

采用 RNA 干扰方法特异性降低 胚胎干细胞中 Nanog 的表达

田雪梅 刘娜 陆敏*

(中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所, 天津 300020)

摘要 胚胎干细胞是从内细胞团分离得到的一群具有多向分化潜能和自我更新能力的细胞, 发育上的全能性赋予其在临床上广泛的应用前景。对胚胎干细胞全能性机制的研究是其在临床上得以应用的前提和基础。Nanog 在胚胎干细胞全能性的维持中起着至关重要的作用, 为了更详尽地研究 Nanog 在胚胎干细胞全能性维持中的作用, 我们采用 RNA 干扰的方法, 特异性地降低胚胎干细胞中 Nanog 的表达, 并观察伴随 Nanog 的表达下降 J1 细胞的变化。在本试验中, 我们设计合成了四条针对 Nanog 的干扰片段, 转染 J1 细胞, 利用 RT-PCR、Real-Time PCR、Western 印迹检测各个片段对 J1 细胞中 Nanog 表达的影响。结果显示, Nanog-P1 对 J1 细胞中 Nanog 的干扰效率可达 90% 以上。Nanog 表达下降后 J1 细胞中全能性相关基因 *utfl* 的表达显著降低, 而分化相关基因 *gata6* 的表达有明显升高, 说明 Nanog 在胚胎干细胞的全能性维持中起重要作用。

关键词 胚胎干细胞; Nanog; RNA 干扰; 全能性

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)是指从内细胞团(inner cell mass, ICM)分离得到的一群具有发育上全能性的细胞群体^[1,2]。它有两个主要特点: 一是具有发育上的全能性(pluripotency), 即在体外合适条件下可发育成三个胚层的各种细胞、组织; 胚胎干细胞注入发育中的囊胚中可发育成一个完整的生物个体。另一个主要特点是具有自我更新(self-renewal)能力, 即在体外能无限增殖并维持其自身的胚胎干细胞特性。基于胚胎干细胞以上两个主要特点, 其在发育生物学研究和临床应用方面都具有极为广泛的应用前景, 例如在临床应用方面可用于各种退行性病变的治疗, 如糖尿病^[3]、帕金森综合症^[4]等。目前, 将胚胎干细胞用于这些疾病的治疗研究方面虽然取得了一定的进展, 但是将其最终应用于临床还存在一定的风险, 其中最大的风险就是致瘤性, 了解胚胎干细胞自我更新机制是解决这些问题的关键所在。

1981 年, Evans 等^[1]从小鼠的胚胎中分离得到具有全能性的胚胎干细胞系, 该细胞需要在饲养层细胞存在的情况下才能在体外维持不分化状态。人们认识到饲养层细胞可分泌一些因子用以维持胚胎干细胞的自我更新, 此后许多研究小组开始寻找这一维持胚胎干细胞不分化的因子。1998 年 Smith^[5]发现饲养层是通过分泌白血病抑制因子(leukemia inhibitor factor, LIF)来维持小鼠胚胎干细胞在体外的不分化

状态的。LIF 可以在无饲养层存在的情况下维持胚胎干细胞的自我更新, 也就是说 LIF 是维持胚胎干细胞不分化的关键细胞因子。随后 Niwa 等^[6-8]又发现 LIF 维持胚胎干细胞不分化的作用是通过激活信号传导及转录活化因子-3 (signal transducers and activators of transcription-3, STAT3)的磷酸化来实现的, STAT3 的激活可维持胚胎干细胞自我更新。1998 年, Thomson 等^[9]从废弃的体外受精卵中分离得到人的胚胎干细胞, 并且发现人的胚胎干细胞只能在饲养层存在的情况下才能维持不分化状态。LIF 作用于人胚胎干细胞可以激活 STAT3 的磷酸化, 但是却不能维持人胚胎干细胞的自我更新。2003 年, 人们发现了一个新的同源盒基因 *nanog*, 其特异性地表达于胚胎干细胞、胚胎癌细胞、内细胞团细胞等全能性细胞中, 在已经分化的细胞中不表达。*nanog* 是一个同源盒基因, 同源性同 NK 同源盒家族类似。*nanog* 的 cDNA 全长 2 184 bp, 但是只有一个开放阅读框, 编码一个含有 305 个氨基酸的蛋白质。其 cDNA 包含一个长的 3' 端非转录区(UTR), 其中包含 B2 重复单位, 这可能有助于 *nanog* 在胚胎干细胞中的表达。研究

收稿日期: 2008-06-11 接受日期: 2008-12-04

国家自然科学基金资助项目(No.30570357)

* 通讯作者。Tel: 022-87410797, Fax: 022-87410801, E-mail:

minlu001@yahoo.com

发现, *nanog* 在分化的组织中不表达, 并且伴随着胚胎干细胞的分化, 其表达水平也迅速下降; 而如果在胚胎干细胞中外源性地过表达 *nanog*, 则可使得胚胎干细胞在既没有 LIF 也没有饲养层存在的条件下保持其不分化状态。Nanog 被认为是全能性细胞的特异性标志, 是维持胚胎干细胞不分化的主要因子。这一因子与前期发现的 Oct4、Sox2 被认为是维持胚胎干细胞自我更新的关键因子, 但是目前对于这三个转录因子的作用机制还不是很清楚^[10-12]。

RNA 干扰为我们提供了一个有效研究单个基因功能的方法, 我们采用 RNA 干扰方法, 特异性地降低胚胎干细胞中 *nanog* 的表达, 并在其表达下降后检测全能性标志 *utf1*^[13] 和 *nanog* 以及分化标志 *gata6*^[14-16] 的表达变化, 以期在今后的研究中更加详尽地了解 Nanog 在胚胎干细胞中的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 小鼠胚胎干细胞的培养

小鼠胚胎干细胞系 J1 细胞和饲养层细胞系 SNL 细胞由哈佛大学医学院王征宇博士惠赠, 并按实验室已有的方法培养传代^[17]。J1 细胞培养于含有 15% 胎牛血清(Hyclone)、1× 非必需氨基酸(Hyclone)、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 μmol/L 巯基乙醇(Sigma)、100 μg/μl 青霉素、100 μg/μl 链霉素、1 000 U/ml 小鼠重组 LIF (Chemicon) 的高糖 DMEM (Gibco-BRL) 培养液中, 5% CO₂, 37 °C 条件下培养。J1 细胞培养过程中, 需每天换液并隔天传代。SNL 细胞培养于含有 15% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 μg/μl 青霉素、100 μg/μl 链霉素的高糖 DMEM 培养液中, 5% CO₂, 37 °C 条件下培养。

1.2 干扰小片段的设计合成

根据 *nanog* 基因已知序列 (AY278951.1) 并按 siRNA 序列设计的原则^[18]: 从转录本(mRNA)的 AUG 起始密码开始, 寻找 AA 二连序列, 并记下其 3' 端的 19 个碱基序列, 作为潜在的 siRNA 靶位点, 设计时参照 Ambion 的网上设计工具 (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_tools.html)。使用 BLAST 将潜在的序列与相应的基因组数据库进行比较, 排除那些和其他基因序列同源的序列。同时我们设计一条针对绿色荧光蛋白(GFP)的 siRNA 序列 GFP-siRNA 作为阴性对照。GFP-siRNA 用以排除 RNA 干扰试验中的 off-target 作用^[19]。我们最终选定四条针对 Nanog 序列的 siRNA, 通过对这四条干扰序列的研究, 以期

Table 1 Sequence information about Nanog siRNAs and negative control siRNA

dsRNAs	Target sequence
Nanog-P1	AAGGACAGGTTTCAGAAGCAG
Nanog-P2	AAGACCTGGTTTCAAAACCAA
Nanog-P3	AATGCTGCTCCGCTCCATAAC
Nanog-P4	AATTTGGAAGCCACTAGGGAA
GFP-siRNA	AAGAGCGATTTGGACGACAAG

找到最有效的干扰序列。干扰序列信息见表 1。

siRNA 用 Silencer siRNA Construction Kit (Ambion) 按照说明书所示的方法合成。为了检测各 siRNA 在 J1 细胞中的转染效率, 我们用 Label IT siRNA Tracker Intracellular Localization Kit (Mirus) 将 GFP-siRNA 标记上 Cy3, 来观测其在细胞内的分布和转染效率。转染 24 h 后收获细胞, 用流式方法检测其转染效率。

1.3 细胞转染

采用脂质体(Lipofectamine 2000, Invitrogen)转染 J1 细胞, 为了提高转染效率我们在接种细胞的同时进行转染。细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种于 24 孔板中, 按照 100 nmol/L siRNA、2 μg/ml Lipofectamine 2000 的比例转染细胞, 每次干扰试验重复两孔。

1.4 RNA 提取并逆转录

转染 24 h 后, 将细胞用冷的 PBS 洗两遍, 加入 1 ml Trizol (Invitrogen) 室温静置 5 min, 加入 0.2 ml 氯仿剧烈震荡 15 s 混匀, 室温静置 3 min。 1.2×10^4 r/min 离心 15 min, 取上清液, 加入 0.5 ml 异丙醇混匀, 室温静置 15 s; 1.2×10^4 r/min, 4 °C 离心 15 min。弃上清液, 75% 乙醇洗两次, 弃上清液, 将 RNA 晾干, 用分光光度计检测 RNA 浓度。

根据测定的浓度取 2 μg RNA 做逆转录: 2 μg RNA、2 μl Oligo(dT)、2 μl dNTP (10 mmol/L, 各 2.5 mmol/L)、23 μl 双蒸水, 65 °C 水浴 5 min, 然后迅速放入冰浴中冷却; 再加入 8 μl 缓冲液、2 μl RNase 抑制剂、3 μl 逆转录酶, 总体积 40 μl, 37 °C 2 h, 最后 80 °C 灭活 10 min。

1.5 RT-PCR 以及 Real-Time PCR

RT-PCR: 以上节逆转录得到的 1 μl cDNA 为模板, 进行 PCR 反应。条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 40 s, 58 °C 45 s, 72 °C 1 min, 共 25 个循环, 再于 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物用 0.1% 琼脂糖凝胶电泳进行检查。

Real-Time PCR: 以上节逆转录得到的 1 μl cDNA

为模板, 用 QuantiTect SYBR Green PCR Master mix (Qiagen) 试剂盒, 在 ABI7500 实时 PCR 仪上进行 Real-Time PCR 反应, 条件为: 95 °C 变性 15 min, 94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 34 s, 40 循环, 数据收集设在延伸阶段。

试验所用引物: Nanog 上游引物 GCACTCAA-GGACAGGTTT; 下游引物 GCGTTCACCAGATA-GCC。GAPDH 上游引物 CACTTGAAGGGTGG-AGC; 下游引物 GGGCTAAGCAGTTGGTG。GATA6 上游引物 GCAGTGGCTCTGTCCCTAT; 下游引物 ACACCAAGAATCCTGTCTCG。Utf1 上游引物 ACC-AGATCCGCCAACTCAT; 下游引物 AGGTGCGGG-TGCTAACG。

1.6 Western 印迹

细胞用冷的 PBS 洗涤两次, 然后重悬于细胞裂解液中: 50 mmol/L Tris (pH 7.4)、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L EGTA、1 mmol/L NaF、20 mmol/L Na₂P₂O₇、1 mmol/L Na₃VO₄、1% Triton X-100、10% glycerol、0.25% deoxycholate 和 0.1% SDS。经 SDS-PAGE 分离后, 电转移至 PVDF 膜上。膜封闭后与抗 Nanog (BETHYL, 1 : 1 000), 抗肌动蛋白(Santa, 1 : 200)抗体室温温育 2 h, 与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔的二抗(Amersham Life Sciences, 1 : 20 000) 室温反应 1 h, 用化学发光法检测 Nanog 在干扰前后的表达变化。

1.7 统计学处理

以上实验至少重复 3 次, 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。所有变量均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各实验组与阴性对照组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Nanog 干扰序列的设计

为了得到有效的干扰片段, 我们设计合成了四条针对 Nanog 的 dsRNA。Off-target 作用^[15]是 RNA 干扰中一个重要的干扰因素, 这一作用可以采用合适的阴性对照或者模拟干扰试验来消除, 在本试验中我们采用 GFP-siRNA 作为阴性对照来消除 off-target 的作用。Nanog-siRNA 以及 GFP-siRNA 序列见表 1。

2.2 dsRNA 在胚胎干细胞中转染效率的检测

制约 RNA 干扰有效性的另一个重要因素是转染效率。为了观察 siRNA 在 J1 细胞中的转染效率, 我们用 Cy3 标记 GFP-siRNA, 以不同的浓度转染 J1 细胞,

转染后用荧光显微镜和流式的方法检测转染效率, 以期找到最适合的转染条件。siRNA 转染 J1 细胞 24 h 后消化细胞, 用流式细胞计数方法检测其转染效率。结果显示, 以 100 nmol/L siRNA、2 μg/ml Lipofectamine 转染 J1 细胞, 转染效率最高可达 90% (图 1), 以这样的转染效率得到的细胞可以用于后续的干扰试验。

2.3 筛选有效的 Nanog 干扰片段

为了得到针对 Nanog 的有效干扰片段, 我们用设计得到的四个 Nanog-siRNAs 与阴性对照片段 GFP-siRNA 同时转染 J1 细胞。24 h 后用 Trizol 提取总 RNA, 然后用特异性的 Nanog 引物对 Nanog 的表达情况进行检测; 用 GAPDH 作为内源性对照; J1 细胞在无饲养层和 LIF 条件下培养 7 天, 诱导 J1 细胞分化, 分化的 J1 细胞(Diff-J1)作为 Nanog 表达下降的阳性对照。结果显示, 四个干扰片段以及分化的 J1 细胞中 Nanog 的表达量都有不同程度的下降(图 2)。其中, 转染 Nanog-P2、Nanog-P3 的 J1 细胞中 Nanog 的表达下降不是很明显, 与阴性对照相比没有明显的区别。而转染 Nanog-P1 和 Nanog-P4 的细胞以及分化的胚胎干细胞中, Nanog 的表达显著下降, 转染 Nanog-P1 的细胞甚至比分化的 J1 细胞中 Nanog 的表达水平还要低。这初步表明, Nanog-P1 和 Nanog-P4 对 J1 细胞中 Nanog 的表达有明显的沉默作用。

2.4 Real-Time PCR 检测干扰片段对 Nanog 的干扰效率

为更好地检测各个干扰片段对 Nanog 表达的影响, 我们应用 Real-Time PCR 的方法检测细胞转染 siRNAs 24 h 后 J1 细胞中 Nanog 的表达水平。结果显示, 在转染 Nanog-P1、Nanog-P4 的 J1 细胞以及分化的 J1 细胞(Diff-J1)中 Nanog 的表达水平与对照组细胞(GFP-siRNA)相比显著下降($P < 0.01$)。分化的 J1 细胞中 Nanog 的表达为对照组细胞的 30% 左右, 而转染 Nanog-P1、Nanog-P4 的 J1 细胞中 Nanog 的表达水平要低于分化的 J1 细胞。这说明这两个片段可以有效地降低 J1 细胞中 Nanog 的表达, 对 Nanog 的干扰效率分别为 90% 和 76%, 其中 J1 细胞转染 Nanog-P1 后 Nanog 的表达只有对照细胞的 10% (图 3)。基于上述实验我们得出结论, Nanog-P1 可以非常有效地降低胚胎干细胞中 Nanog 的表达, 因此在以后的研究中拟用该片段来特异性地降低胚胎干细胞中 Nanog 的表达, 继而研究 Nanog 在胚胎干细胞中的作用机制。

2.5 Western 印迹检测干扰后细胞中 Nanog 的蛋

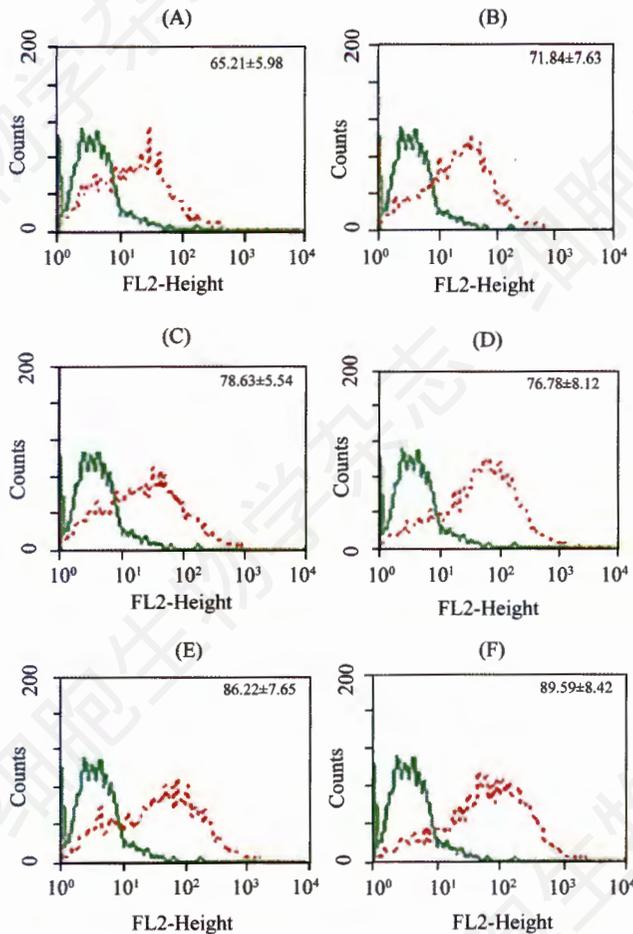


Fig.1 Flow cytometry analysis of transfection efficiency at 24 h
A: 25 μmol/L siRNA, 1 μg/ml Lipofectamine; B: 50 μmol/L siRNA, 1 μg/ml Lipofectamine; C: 100 μmol/L siRNA, 1 μg/ml Lipofectamine; D: 25 μmol/L siRNA, 2 μg/ml Lipofectamine; E: 50 μmol/L siRNA, 2 μg/ml Lipofectamine; F: 100 μmol/L siRNA, 2 μg/ml Lipofectamine.



Fig.2 RT-PCR analysis Nanog expression in J1 cells transfected with Nanog-siRNAs

蛋白质水平表达变化

前面, 通过 Real-Time PCR 我们观察到 Nanog-P1 可以有效地降低 J1 细胞中 Nanog 的 mRNA 水平的表达。为了检测该干扰片段确实对 Nanog 的蛋白质水平表达有影响, 我们用 Western 印迹检测 J1 细胞转

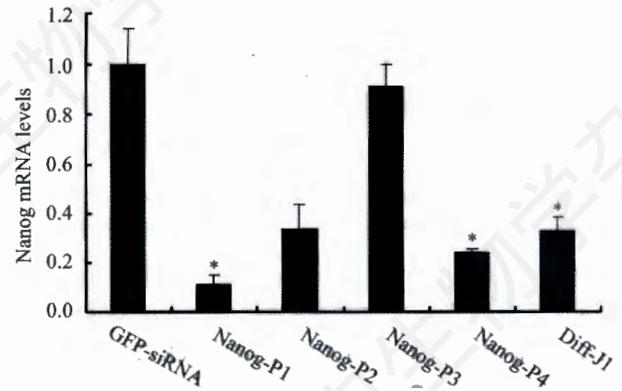


Fig.3 Real-Time PCR analysis Nanog expression in J1 cells transfected with Nanog-siRNAs (* $P < 0.01$)

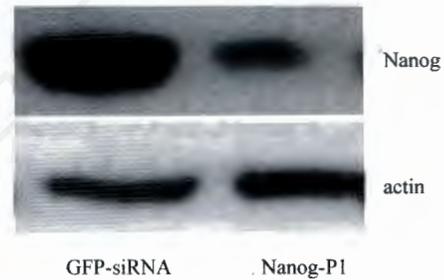


Fig.4 Western blot analysis of Nanog protein levels in J1 cells 24 h after transfection

染 Nanog-P1 24 h 后 Nanog 的蛋白质表达水平变化情况。结果显示, 与转染 GFP-siRNA 的阴性对照细胞相比, 细胞转染 Nanog-P1 后, Nanog 的表达水平显著下降, 为 GFP-siRNA 的 $(91.0 \pm 5.33)\%$ (图 4)。

2.6 Nanog 表达下降诱导 J1 细胞分化

为了检测 Nanog 表达下降后对 J1 细胞全能性的影响, 我们应用 Real-Time PCR 的方法检测细胞转染 Nanog-P1 24 h 时 J1 细胞中全能性相关基因 *utfl* 和分化相关基因 *gata6* 的表达。结果显示, 伴随着 Nanog 的表达下降, *utfl* 表达显著下降 (0.393 ± 0.025) , 而细胞分化标志 *gata6* 的表达与未分化的 J1 细胞相比却有显著上升 (1.921 ± 0.427) (图 5)。这说明 Nanog 是胚胎干细胞维持自我更新能力的一种非常关键的转录因子, Nanog 表达沉默会诱导胚胎干细胞分化, 从而使全能性相关基因的表达下降而分化相关基因的表达升高。

3 讨论

胚胎干细胞具有非常广泛的临床应用前景。现

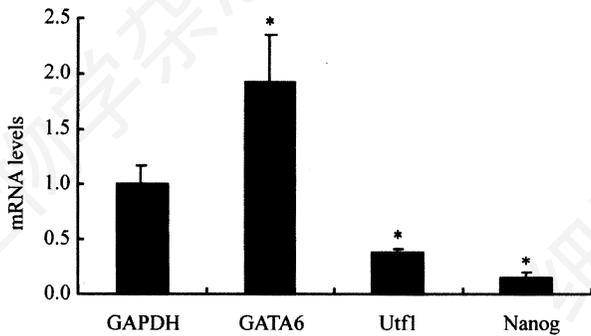


Fig. 5 Real-Time PCR analysis of transcription factor levels in J1 cells 24 h after transfection (* $P < 0.01$)

在许多研究者致力培育适用于临床移植使用的新型胚胎干细胞株。但是, 所有这些都建立在在对胚胎干细胞自我更新和全能性维持机制比较深入了解的基础上才能实现。也就是说对胚胎干细胞自我更新机制的研究将有助于我们对胚胎干细胞体外培养体系的探索。

siRNA 能够特异、有效地降解细胞中特定基因的 mRNA, 从而引起转录后水平的基因沉默^[20]。RNA 干扰现象是 1998 年首次在秀丽线虫中被发现的, 不久, 在真菌、植物、果蝇、锥虫、涡虫、水螅、斑马鱼等真核生物中都发现了 RNA 干扰现象^[21,22]。如今, RNA 干扰已经被广泛应用于人、小鼠及其他哺乳动物基因的功能性研究中^[23]。在本文中我们设计合成了针对 Nanog 的干扰片段, 转入胚胎干细胞之后可以降低 Nanog 的表达。实验结果充分说明 Nanog 在胚胎干细胞全能性维持中起着非常重要的作用, Nanog 表达下降后胚胎干细胞不能继续维持其全能性, 而呈现出分化的特征。

目前 RNA 干扰试验可以分为长期干扰和瞬时干扰两种。长期干扰试验是将干扰序列构建至载体中, 通过筛选稳定表达细胞系而获得, 可以用于研究某个基因的长期功能。而瞬时干扰试验是将小的干扰片段(双链小 RNA 片段)转入细胞中, 以观察基因瞬时表达沉默后的作用。本试验采用了瞬时干扰法, 瞬时干扰试验可以尽可能地排除干扰因素的制约, 同时, 瞬时干扰试验可为长期干扰试验提供干扰序列信息, 缩短试验周期。下一步我们将继续研究胚胎干细胞在 Nanog 表达下降后自我更新能力、增殖能力的变化情况, 以及利用表达谱基因芯片的方法来寻找 Nanog 表达下降后引起表达变化的基因。对这些差异基因的进一步研究可以使更好地研究胚胎干细胞的全能性维持机制, 从而为胚胎干细胞在临床上的应用

打下基础。

参考文献(References)

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 1981, 292 (5819): 154-156
- [2] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, *et al.* Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*, *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 399-404
- [3] Jiang W, Shi Y, Zhao D, *et al.* *In vitro* derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells, *Cell Res*, 2007, 17(4): 333-344
- [4] Groebner M, David R, Franz WM. Embryonic stem cells. Future perspectives, *Internist (Berl)*, 2006, 47(5): 502, 504-508
- [5] Smith A. Cell therapy: in search of pluripotency, *Curr Biol*, 1998, 8(22): R802-804
- [6] Yoshida K, Chambers I, Nichols J, *et al.* Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways, *Mech Dev*, 1994, 45(2): 163-171
- [7] Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, *et al.* STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells, *EMBO J*, 1999, 18(15): 4261-4269
- [8] Niwa H, Burdon T, Chambers I, *et al.* Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3, *Genes Dev*, 1998, 12(13): 2048-2060
- [9] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 1998, 282(5391): 1145-1147
- [10] Chambers I, Colby D, Robertson M, *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells, *Cell*, 2003, 113(5): 643-655
- [11] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, *et al.* The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells, *Cell*, 2003, 113(5): 631-642
- [12] Na Liu, Min Lu. The signal transduction pathways and molecules for ES cells self-renewal, *Chin Sci Bull*, 2005, 50(8):721-726
- [13] Kristensen DM, Nielsen JE, Skakkebaek NE, *et al.* Presumed pluripotency markers UTF-1 and REX-1 are expressed in human adult testes and germ cell neoplasms, *Hum Reprod*, 2008, 23(4): 775-782
- [14] Singh AM, Hamazaki T, Hankowski KE, *et al.* A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells, *Stem Cells*, 2007, 25(10): 2534-2542
- [15] Shimosato D, Shiki M, Niwa H. Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA factors acquire the character of XEN cells, *BMC Dev Biol*, 2007, 7: 80
- [16] Capo-Chichi CD, Rula ME, Smedberg JL, *et al.* Perception of differentiation cues by GATA factors in primitive endoderm lineage determination of mouse embryonic stem cells, *Dev Biol*, 2005, 286(2): 574-586
- [17] Li ZJ, Wang ZZ, Zheng YZ, *et al.* Kinetic expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) during embryonic stem cell differentiation, *J Cell Biochem*, 2005, 95(3): 559-570

- [18] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498
- [19] Cullen BR. Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments, *Nat Methods*, 2006, 3(9): 677-681
- [20] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811
- [21] Sharp PA, Zamore PD. Molecular biology. RNA interference, *Science*, 2000, 287(5462): 2431-2433
- [22] Boshier JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog, *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2): E31-36
- [23] Marx J. Interfering with gene expression, *Science*, 2000, 288(5470): 1370-1372

Down-regulate Nanog Expression in Embryonic Stem Cells Using RNA Interference

Xue-Mei Tian, Na Liu, Min Lu*

(*Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Tian Jin 300020, China*)

Abstract Embryonic stem cells are derived from inner cell mass of blastocyst. Embryonic stem cells have two defining properties, self-renewal and pluripotency, which make them very attractive in clinic. Understanding of the mechanism involved in the pluripotency is essential for achieving these goals. Nanog plays a crucial role in the maintenance of pluripotency. In order to investigate Nanog mechanisms in embryonic stem cells pluripotency, we used RNA interference to specifically down-regulate Nanog expression in embryonic stem cells and investigated the change of J1 cells following with Nanog down-regulation. Here, we designed four siRNAs on the basis of Nanog sequence. Then we analyzed Nanog expression using RT-PCR, Real-Time PCR, and Western blot after these siRNAs were transfected in J1 cells. We observed that Nanog-P1 significantly down-regulated Nanog expression in J1 cells, the precise interference rate of Nanog-P1 was up to 90%. Following Nanog expression was silenced, *utf1* (a pluripotency marker of ES cells) expression was decreased but *gata6* (a differentiation related gene) was up-regulated. Our experiments showed that Nanog played an important role in ES cells pluripotency.

Key words embryonic stem cells; Nanog; RNA interference; pluripotency

Received: June 11, 2008 Accepted: December 4, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570357)

*Corresponding author. Tel: 86-22-87410797, Fax: 86-22-87410801, E-mail: minlu001@yahoo.com