

siRNA抑制 HIV-1 基因表达的研究*

魏 玲^{1,2)} 刘 莹¹⁾ 曹 诚^{1)**}

(¹⁾军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 RNA 干扰 (RNA interfering, RNAi) 现象是动植物体内的一种序列特异性的、转录后基因沉默的过程. 在哺乳动物细胞中, 19~25 个核苷酸长短的双链 siRNA (small interfering RNA) 可有效地抑制基因表达. 利用 pBS/H1SP 载体, 它表达的双链 RNA 的转录产物可以用来抑制特异性 HIV-1 基因的表达. 在 siRNA 实验中, 为了比较由 H1 启动子转录的 siRNA 在细胞内的作用, 使用以绿色荧光蛋白 (EGFP) 为报告基因的载体——pEGFP-C1 质粒, 在荧光显微镜下, 很容易地看到 EGFP 在细胞中表达. 将 HIV-1 siRNA 表达载体与表达相应 EGFP-HIV 融合基因的质粒, 共转染人胚肾 293 细胞, 结果表明, 和对照质控载体相比, 转染了 pHIV-siRNA 质粒的细胞中 EGFP-HIV 的表达得到显著抑制. 通过该途径, 筛选出能抑制 HIV-1 基因表达的有效 siRNA. 此外, 还在同一载体上表达两种或三种 siRNA, 分别针对不同的 HIV 基因, 获得了良好的抑制效果.

关键词 siRNA, 双链 RNA, 基因沉默, HIV-1

学科分类号 Q522

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象, 也称为依赖于 RNA 的基因沉默机制, 是指通过双链 RNA (dsRNA) 特异性地抑制与其序列同源的靶基因 mRNA 表达的现象. 因此 RNAi 又经常被称为转录后基因沉默现象 (post-transcriptional gene-silencing, PTGS), 在胞质中双链 RNA 引发了同源 mRNA 的降解. RNAi 现象是真核生物高度保守的分子机制, 它控制基因表达, 并保护它们的基因组免受外源可移动基因的入侵, 如转座子、病毒等^[1]. 这种现象是 Jorgensen 和同事在对矮牵牛 (*petunias*) 进行研究时发现的. 1998 年 Fire 等^[2]在线虫中也发现了这种现象. 在随后的几年中, 越来越多的证据表明, 植物和线虫中的 RNAi 本质是一致的, 它们同属于一类被称为“转录后基因沉默 PTGS”机制. 这种现象又相继在真菌、果蝇和脊椎动物中观察到并通过实验证明^[3,4]. 过去人们认为在哺乳动物中, 长度大于 30 bp 的 dsRNA 能诱导干扰素 (IFN) 生成, 从而引发非特异性地降解 RNA, 抑制蛋白质的合成^[5]. 因此限制了 RNAi 作为试验工具和治疗手段的应用. 但在 2001 年有报道说在哺乳动物中也存在 RNAi 现象, 介导 RNAi 的中间物质是双链小 RNA (small interfering RNA, siRNA), 3' 端带有突出碱基的 21 个核苷酸的 dsRNA 不会诱发

干扰素效应, 从而能特异性地降解靶 mRNA, 导致基因沉默^[5,6]. 这一结果开辟了 RNAi 现象研究与应用的新领域. RNA 干涉也很快成为攻击 HIV 的前沿武器. RNAi 技术出现后, 人们针对 HIV 结构蛋白基因、调节蛋白基因或 CD4 受体基因做了相当多的工作, 结果证明针对这些蛋白质分子的 siRNA, 都能够不同程度地对 HIV 产生抑制作用^[7~11].

为了能够筛选出抑制 HIV-1 基因表达的有效 siRNA, 我们利用人 H1 启动子构建了 pBS/H1SP-siRNA 表达载体, 用于在哺乳动物细胞中自主合成 19 bp (base pair) 的针对 HIV-1 特异性基因的 siRNA 样转录产物. H1 启动子是人类细胞中 RNA 聚合酶 III 用于转录 H1 RNA 的启动子, 包含保守的 DSE、PSE、TATA 3 个顺式作用元件以及其他必需元件^[12]. pBS/H1SP 质粒的转录产物形成由两个 U 组成的 3' 端尾, 并在细胞内形成 19 bp 的

*国家自然科学基金资助项目(30270316).

** 通讯联系人. Tel: 010-66931810, Fax: 010-83821044

E-mail: caoc@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2006-04-04, 接受日期: 2006-05-31

双链发夹结构, 且包含一个 9 nt 的茎环^[13].

我们通过对 NCBI 发表的 HIV-1 1 000 多个序列的同源比较, 拟以 HIV-1 *gag*、*env*、*nef* 基因中极为保守的 5 个 RNA 序列做为 RNA 干涉的靶序列, 并根据这些序列, 构建一系列 RNA 干涉表达载体. 我们还利用 pEGFP-C1 载体构建了 pEGFP-C1-Gag、pEGFP-C1-Env、pEGFP-C1-Nef 质粒, 这些质粒可以在哺乳动物细胞中表达 EGFP-Gag、EGFP-Env、EGFP-Nef 融合蛋白. 通过两种质粒共转染后比较干涉效果, 筛选具有显著抑制效果的 HIV siRNA. 因为 HIV-1 有巨大的序列多样性, 我们还在同一载体上表达多种 siRNA, 为 HIV 的基因治疗奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与细胞株. 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为本室保存, 菌株培养在含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中. 人胎肾 293 细胞, 本室保存, 培养在 DMEM 培养基中, 并添加 10% 胎牛血清、3.7 g/L 碳酸氢钠、100 U/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素. DMEM 是 GIBCOBRL 产品. 胎牛血清是杭州江滨生物技术公司产品.

1.1.2 工具酶和化学试剂. pfu DNA 聚合酶为天为时代公司产品; 限制性内切酶及 T4 连接酶均为 TaKaRa 公司产品; 琼脂糖及其他有关化学试剂均为进口或国产分析纯.

1.1.3 试剂盒. PCR 产物回收试剂盒为 Promega 公司产品; 质粒提取试剂盒为 Roche 公司产品; 化学发光试剂为 Amersham Biosciences 公司产品; Lipofectamine™ 2000 转染试剂为 Invitrogen 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 siRNA 序列的设计. 通过同源比较, 本实验选择了 HIV-1 序列中极度保守、对病毒生长繁殖影响大、而且不能与宿主基因有同源性的 RNA 序列作为特异性抑制序列, 分别为: *gag1*, 5' gUGACAUAGCAGGAACUAC 3'; *gag2*, 5' AUAGUAAGAAUGUAUAGCC 3'; *env1*, 5' UUCCCAUACAUUAUGUGC 3'; *env2*, 5' UAAAUAGGCAGUCUAGCAGA 3'; *nef*, 5' CACAAGGCUACUCCUGAU 3'.

1.2.2 siRNA 表达载体 (pBS/H1SP) 的构建. 构建工作由刘萱博士完成, 质粒酶切位点如图 1 所示, 利

用 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点将体外合成的 dsRNA 分别克隆至经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切的 pBS/H1SP 质粒上. 在 H1 启动子后连接 19 nt 的 siRNA 编码序列、9 nt 的间隔序列、反向的 19 nt siRNA 序列以及 5 个 T 的转录终止序列, 经 pBS/H1SP 质粒转录产生的 dsRNA 能够在细胞内形成 19 bp 的双链发夹结构, 且包含一个 9 nt 的茎环, 其转录产物二级结构如图 2 所示, 这 5 种质粒分别是 pGag-siRNA (2 种)、pEnv-siRNA (2 种) 及 pNef-siRNA (1 种).

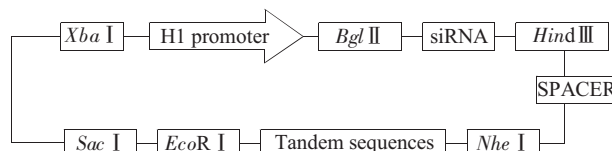


Fig. 1 The map of pBS/H1SP enzyme digestion sites

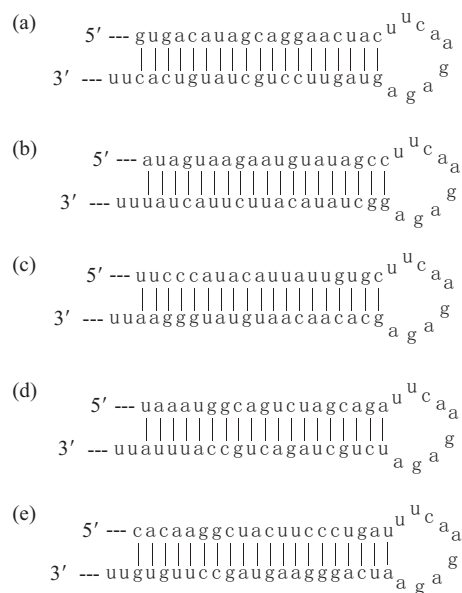


Fig. 2 The secondary structure of pBS/H1SP-siRNA transcripts

(a) Gag1-siRNA. (b) Gag2-siRNA. (c) Env1-siRNA. (d) Env2-siRNA. (e) Nef-siRNA.

1.2.3 siRNA 串联表达载体的构建. 如图 3 所示, pBS/H1SP 质粒中含有 *Xba* I 和 *Nhe* I 酶切位点, 且二者属于同尾酶. 因此, 包含一个 siRNA 的转录单元经 *Xba* I + *Eco* R I 双酶切片断能够克隆至包含另一个 siRNA 转录单元的、经 *Nhe* I + *Eco* R I 双酶切的 pBS/H1SP 质粒上, 从而形成多个 siRNA 转录单元串联结构, 实现对 HIV-1 多个目标基因的抑制.

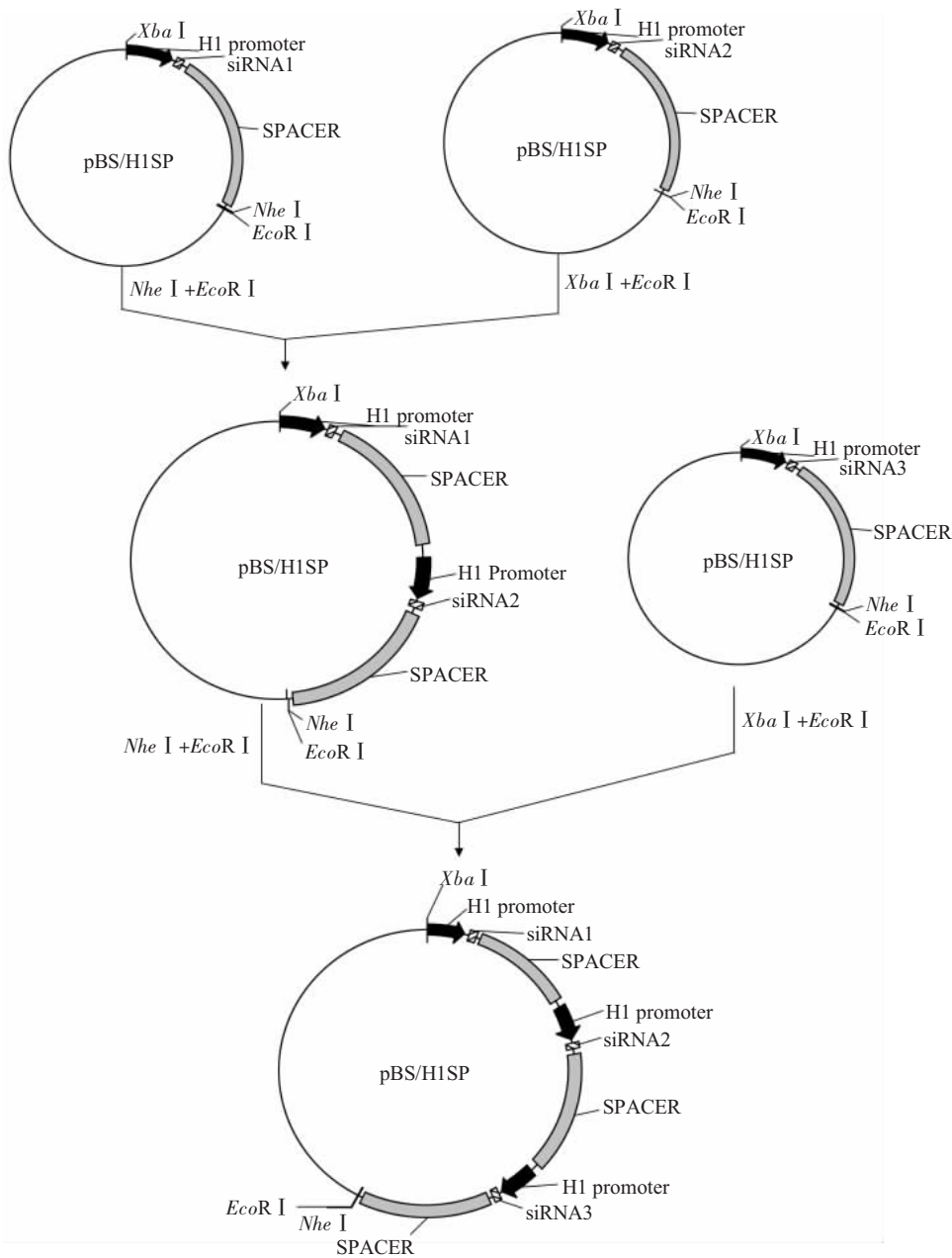


Fig. 3 Construction of trispecific HIV-1 siRNA

1.2.4 pEGFP-C1-HIV 载体构建. pEGFP-C1 质粒购自美国 BD Biosciences 公司, 为卡那霉素抗性. HIV-1 全基因组由曹诚教授提供, 其序列与 Lee 等发表的序列完全相同^[14]. 利用以下 3 对引物从 HIV-1 全基因组中扩增 *gag*、*env*、*nef* 基因. 引物设计如下: *gag* 引物 1, 5' CGgaattcTATGGGTGC-GAGAGCGTCAGTA 3' (*EcoR* I 位点); *gag* 引物 2, 5' CGCggatccTTGTGACGAGGGGTCGTTGCC 3' (*Bam*H I 位点); *env* 引物 1, 5' CGgaattcTATG-AAAGAGCAGAAGACAGTGGCA 3' (*EcoR* I 位点); *env* 引物 2, 5' gggATAGCAAAATCCTTT-

CCAAGCC 3' (*Sma* I 位点一半); *nef* 引物 1, 5' CGgaattcTATGGGTGGCAAGTGGTCAAAA 3' (*EcoR* I 位点); *nef* 引物 2, 5' gggAGCAGTT-CTTGAAGTACTCCGG 3' (*Sma* I 位点一半).

利用 *EcoR* I、*Bam*H I 酶切位点将 HIV-1 *gag* 基因克隆至 pEGFP-C1 质粒中, 得到 pEGFP-C1-Gag 质粒. 同样方法, 利用 *EcoR* I、*Sma* I 酶切位点分别将 *env*、*nef* 基因克隆至 pEGFP-C1 质粒中, 得到 pEGFP-C1-Env、pEGFP-C1-Nef 质粒.

1.2.5 细胞转染. 质粒用 Roche 质粒提取试剂盒纯

化. 细胞转染采用 Lipofectamine 2000 转染试剂, 每 60 mm 细胞培养皿共转染 5 μ g pHIV-siRNA 质粒和 0.5 μ g pEGFP-C1-HIV 质粒. 转染过程使用不加抗生素和血清的 DMEM 培养基, 转染 6~12 h 后换成含血清和抗生素的完全培养基, 继续培养至 72 h.

1.2.6 免疫印迹(immunoblot, IB)分析. 用预冷的细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 100 mg/L PMSF, 1% NP-40, 蛋白酶抑制剂 1 片/10 ml)裂解上述细胞. 裂解上清经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转膜, 用交联 HRP(horseradish peroxidase) 的 anti-GFP 进行免疫印迹检测. 抗原-抗体复合物用化学发光试剂显色.

2 结 果

2.1 pEGFP-C1-HIV 载体的构建及鉴定

以 HIV-1 基因组 DNA 为模板, 分别扩增 *gag*、*env*、*nef* 基因. 3 组 PCR 反应体系中分别加入 5 μ l PCR 反应缓冲液、5 μ l dNTP (150 μ mol/L)、正向、反向引物各 2 μ l (5 μ mol/L)、HIV-1 基因组 DNA 模板 1 μ g, 最后补加去离子水至 50 μ l. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 反应 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min. PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 分别为 *gag* 约 1 535 bp、*env* 约 2 588 bp、*nef* 约 618 bp (图 4a). 随后, 将 PCR 产物分别克隆至经 *Eco*R I 和 *Bam*H I、*Eco*R I 和 *Sma* I、*Eco*R I 和 *Sma* I 双酶切的 pEGFP-C1 质粒中, 得到 pEGFP-C1-Gag、pEGFP-C1-Env、pEGFP-C1-Nef 质粒. 这 3 种质粒分别经 *Bgl* II (*nef*)、*Hind* III (*env*)、*Bgl* II (*gag*) 酶切鉴定, 结果与预期相符(图 4b). 测序后的结果与

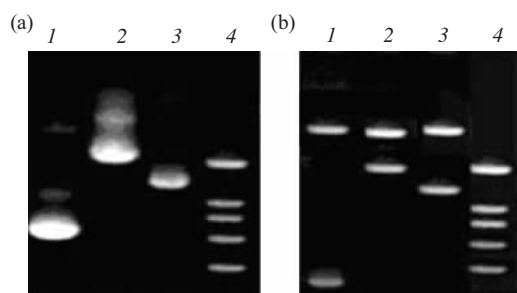


Fig. 4 Construction of pEGFP-C1-HIV plasmid

(a) From lane 1 to lane 3 is the PCR products of *nef*, *env*, *gag* genes, the size of which are about 618 bp, 2 588 bp, 1 535 bp. Lane 4 is DL2000 DNA marker. (b) Lane 1 is pEGFP-C1-Nef/*Bgl* II and the fragment is about 177 bp; Lane 2 is pEGFP-C1-Env/*Hind* III and the fragment is about 1 900 bp; Lane 3 is pEGFP-C1-Gag/*Bgl* II and the fragment is about 1 300 bp; Lane 4 is DL2000 DNA marker.

HIV-1 *gag*、*env*、*nef* 序列完全一致.

2.2 Gag-siRNA 对 EGFP-Gag 蛋白表达的抑制作用

用 pEGFP-C1-Gag 质粒分别与 pBS/H1SP 空载体、pEnv2-siRNA、pGag1-siRNA 和 pGag2-siRNA 共转染 293 细胞. 转染后 72 h 分别裂解细胞, 上清经 SDS-PAGE 电泳转膜后, 用交联 HRP 的 anti-GFP 进行免疫印迹检测. 结果发现 pGag1-siRNA 对 EGFP-Gag 蛋白的表达具有明显的抑制作用, 而作为对照的 pBS/H1SP 空载体和 pEnv2-siRNA 对 EGFP-Gag 蛋白的表达则无抑制作用. 结果证明 pGag1-siRNA 转录的 Gag1-siRNA 可以有效地抑制 EGFP-Gag 蛋白的表达(图 5).

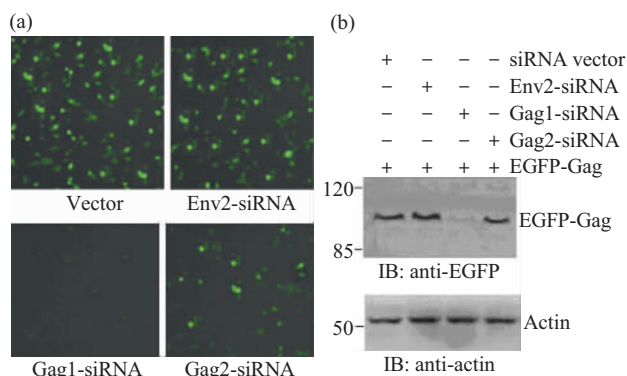


Fig. 5 Inhibition effect of Gag-siRNA to EGFP-Gag

293 cells were cotransfected with pEGFP-C1-Gag and pBS/H1SP empty vector, nonspecific pEnv2-siRNA, specific pGag1-siRNA or pGag2-siRNA. At 72h after cotransfection, the relative strong inhibition effect of Gag1-siRNA was observed.

2.3 Env-siRNA 对 EGFP-Env 蛋白表达的抑制作用

用同样的方法观察到 Env1-siRNA 可以有效地抑制 EGFP-Env 蛋白的表达, 而 pEnv2-siRNA 的抑制效果不明显(图 6).

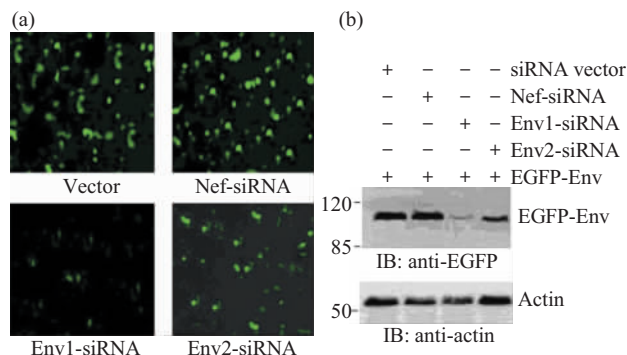


Fig. 6 Inhibition effect of Env-siRNA to EGFP-Env

293 cells were cotransfected with pEGFP-C1-Env and pBS/H1SP empty vector, nonspecific pNef-siRNA, specific pEnv1-siRNA or pEnv2-siRNA. At 72 h after cotransfection, the relative strong inhibition effect of Env1-siRNA was observed.

2.4 Nef-siRNA 对 EGFP-Nef 蛋白表达的抑制作用

用同样的方法观察到 Nef-siRNA 可以有效地

抑制 EGFP-Nef 蛋白的表达(图 7).

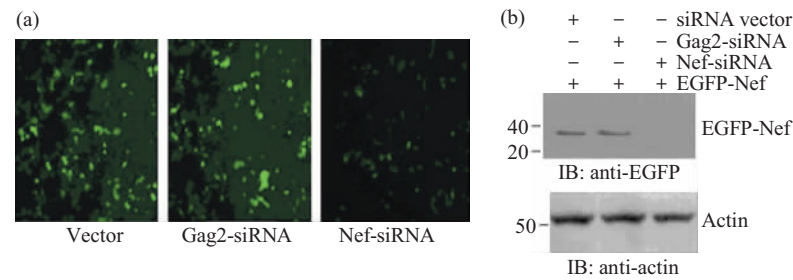


Fig. 7 Inhibition effect of Nef-siRNA to EGFP-Nef

293 cells were cotransfected with pEGFP-C1-Nef and pBS/H1SP empty vector, nonspecific pGag2-siRNA or specific pNef-siRNA. At 72 h after cotransfection, the strong inhibition effect of Nef-siRNA was observed.

2.5 siRNA 串联转录单元中 Nef-siRNA 对 EGFP-Nef 蛋白表达的抑制作用

2.5.1 200 bp SPACER 串联转录单元中 Nef-siRNA 的抑制作用. pEGFP-C1-Nef 质粒分别与 pBS/H1SP 空载体、pNef-siRNA (单联)、pNef-Env1-siRNA (200 bp SPACER 二联)、pGag1-Nef-Env1-siRNA (200 bp SPACER 三联)共转染 293 细胞, 结果见图 8.

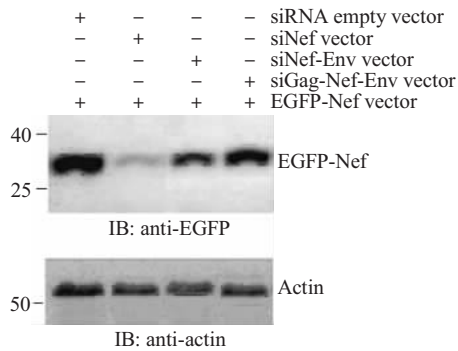


Fig. 8 Inhibition effect of Nef-siRNA in bispecific or trispecific siRNA vectors linked by 200 bp SPACER

293 cells were cotransfected with pEGFP-C1-Nef and pBS/H1SP empty vector, pNef-siRNA, pNef-Env1-siRNA (200 bp SPACER) or pGag1-Nef-Env1-siRNA(200 bp SPACER). At 72 h after cotransfection, the relative weaker inhibition effects of Nef-siRNA in bispecific and trispecific siRNA vectors were observed.

2.5.2 900 bp SPACER 串联转录单元中 Nef-siRNA 的抑制作用. pEGFP-C1-Nef 质粒分别与 pBS/H1SP 空载体、pNef-siRNA (单联)、pNef-Env1-siRNA (900 bp SPACER 二联)、pGag1-Nef-Env1-siRNA (900 bp SPACER 三联) 共转染 293 细胞, 结果见图 9.

Fig. 9 Inhibition effect of Nef-siRNA in bispecific or trispecific siRNA vectors linked by 900 bp SPACER

293 cells were cotransfected with pEGFP-C1-Nef and pBS/H1SP empty vector, pNef-siRNA, pNef-Env1-siRNA (900 bp SPACER) or pGag1-Nef-Env1-siRNA(900 bp SPACER). At 72 h after cotransfection, strong inhibition effects of Nef-siRNA in these three plasmids were observed.

2.5.3 900 bp SPACER 串联转录单元中 Gag1-siRNA 的抑制作用. pEGFP-C1-Gag 质粒分别与 pBS/H1SP 空载体、pGag1-siRNA(单联)、pGag1-Nef-Env1-siRNA (900 bp SPACER 三联) 共转染 293 细胞, 结果见图 10.

2.5.4 900 bp SPACER 串联转录单元中 Env1-siRNA 的抑制作用. pEGFP-C1-Env 质粒分别与 pBS/H1SP 空载体、pEnv1-siRNA(单联)、pGag1-Nef-Env1-siRNA(900bp SPACER 三联)共转染 293 细胞, 结果见图 11.

通过上述质粒共转染实验, 我们筛选出了 3 个能够有效抑制 HIV-1 Gag、Nef、Env 蛋白表达的

siRNA, 并且将它们串联在同一个载体上. 但是, 串联 siRNA 的抑制效果说明, 由 200bp SPACER 连接的 3 个 siRNA 之间有一定的相互干扰作用, 这表现在: 串联载体中的某一个 siRNA (如 Nef-siRNA) 对相应蛋白表达的抑制作用明显不如单联载体中相同的 siRNA. 于是, 我们将串联载体的 SPACER 增大到 900 bp, 结果证明这一改进基本上可以消除串联转录单元之间的相互干扰. 进一步实验表明: pGag1-Nef-Env1-siRNA(900 bp SPACER) 转录的 Gag1-siRNA 和 Env1-siRNA 也分别能够抑制 Gag 和 Env 蛋白的表达, 即: 此三联载体转录的 3 种 siRNA 能够分别对 HIV-1 *gag*、*env*、*nef* 基因进行转录后抑制.

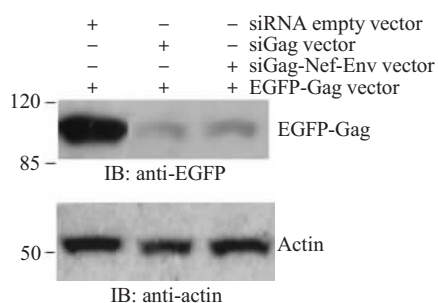


Fig. 10 Inhibition effect of Gag1-siRNA in trispecific siRNA vectors linked by 900 bp SPACER

293 cells were cotransfected with pEGFP-C1-Gag and pBS/H1SP empty vector, pGag1-siRNA, pGag1-Nef-Env1-siRNA (900 bp SPACER). At 72 h after cotransfection, strong inhibition effects of Gag1-siRNA in these two plasmids were observed.

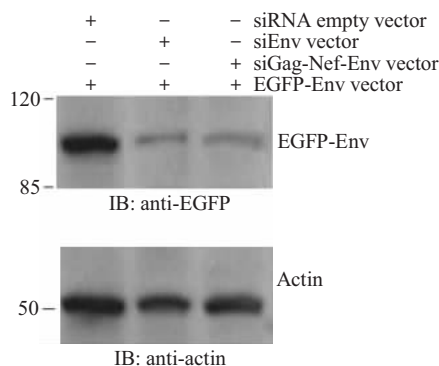


Fig. 11 Inhibition effect of Env1-siRNA in trispecific siRNA vectors linked by 900 bp SPACER

293 cells were cotransfected with pEGFP-C1-Env and pBS/H1SP empty vector, pEnv1-siRNA, pGag1-Nef-Env1-siRNA (900 bp SPACER). At 72 h after cotransfection, strong inhibition effects of Env1-siRNA in these two plasmids were observed.

3 讨 论

本实验室通过对 NCBI 发表的 1 000 多个 HIV-1 序列做了同源比较, 选择了 HIV-1 *gag*、*env*、*nef* 基因中极保守的 5 个序列作为 siRNA 作用的靶序列, 并利用 H1 启动子构建 siRNA 表达载体, 在细胞内自主合成约 19 bp 的 5 种 siRNA 样转录产物, 均能不同程度地抑制 HIV-1 特异性目标基因的表达. 其中针对 *gag1*、*env1*、*nef* 基因的 3 个 siRNA 抑制效果最明显. 而 *Gag2*-siRNA 和 *Env2*-siRNA 的抑制效果不好, 可能与序列中 AT 含量有关, AT 含量过高有可能影响 siRNA 与 mRNA 之间的退火, 从而影响 siRNA 与靶序列的结合. siRNA 的设计原则中曾有人提出在 siRNA 中尽量避免出现 GGG 的序列, GGG 的出现会影响 siRNA 的解链, 间接干扰 RNAi 的作用机制, 而我们选择的 Nef-siRNA 中就有 GGG 序列, 从实验结果来看, Nef-siRNA 的抑制效果非常好. 因此, 我们认为这个设计原则是从理论角度出发总结出来的, 它是否合理还必须在实验中得到证实.

在研究同一载体上表达多个有效的 siRNA 时发现, 200 bp SPACER 连接的 2 个 siRNA 的特异性干涉效果很不好, 可能由于转录单元相距过近而影响某些转录相关的酶与 H1 启动子的结合, 产生了相互干扰的作用, 从而影响 siRNA 的转录效率, 进一步影响 siRNA 对靶基因的干涉效果; 当我们增大 siRNA 转录单元之间的插入间隔至 900 bp 时, 可以明显改善串联 siRNA 的抑制效果, 并且串联转录单元中的 3 个 siRNA 对相应的靶序列都分别有转录后抑制作用, 这表明, 如果一个位点发生突变时, 另外两个位点的 siRNA 也可以对病毒靶序列起到干涉作用. 综上所述, 本实验为进一步用 siRNA 进行病毒感染的基因治疗奠定了基础, 当一个位点效果不显著时, 可以联合几个位点使用, 这样可以有效防止病毒变异株的出现.

RNAi 最后要成为临床治疗的有效手段, 仍有很多问题需要解决. a. 一些 mRNA 的识别靶点因其二级结构或高度折叠而被遮盖; 还有一些 mRNA 与蛋白质形成复合物而隐藏了其 siRNA 序列的识别位点. b. 也有研究结果表明, siRNA 的高度特异性使其与 mRNA 间单个碱基的错配都会降低基因沉默效率, 会产生大量的 siRNA 逃避突变体^[1], 在不同个体间, HIV-1 巨大的序列多样性给高度特异性 siRNA 的设计带来很大困难. 为此, 在设计靶

序列时, 尽量从抑制效果、序列的保守性及与人类基因组的非同源性等几个因素综合考虑^[15,16]。另外, 选择宿主细胞膜上的受体或协同受体作为靶点也不失为一种有效的方法^[10]。c. siRNA 的稳定性问题, 体外合成的 siRNA 导入细胞后易被 RNase 降解, 因此理想的方法是构建能在细胞内稳定表达的载体^[17]。

参 考 文 献

- Bernstein E, Denli A M, Hannon G J. The rest is silence. *RNA*, 2001, **7** (11): 1509~1521
- 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
- Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, **418** (6894): 244~251
- Kasschau K D, Carrington J C. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 1998, **95** (4): 461~470
- Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediates RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411** (6836): 494~498
- Caplen N J, Parrish S, Imani F, *et al.* Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (17): 9742~9747
- Novina C D, Murray M F, Dykxhoorn D M, *et al.* siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*, 2002, **8** (7): 681~686
- Surabhi R M, Gaynor R B. RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol*, 2002, **76** (24): 12963~12973
- Lee N S, Dohjima T, Bauer G, *et al.* Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (5): 500~505
- Martínez M A, Gutiérrez A, Armand-Ugon M, *et al.* Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *AIDS*, 2002, **16** (18): 2385~2390
- Jacque J M, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, 2002, **418** (6896): 435~438
- Hannon G, Chubb A, Maroney P A, *et al.* Multiple *cis*-acting elements are required for RNA polymerase III transcription of the gene encoding H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *J Biol Chem*, 1991, **266** (34): 22796~22799
- Baer M, Nilsen T W, Costigan C. Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (1): 97~103
- Ratner L, Haseltine W, Patarca R, *et al.* Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLVIII. *Nature*, 1985, **313** (24): 277~284
- Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, *et al.* Killing of leukemic cells with BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene*, 2002, **21** (37): 5716~5724
- Tushl T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (5): 446~468
- Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, **296** (5567): 550~553

Research of siRNA Inhibition Effect in HIV-1 Gene Expression*

WEI Ling^{1,2)}, LIU Xuan¹⁾, CAO Cheng^{1)**}

¹⁾Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

²⁾Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract RNA interfering (RNAi) is a process of sequence-specific, posttranscriptional gene silencing in animals and plants. In mammalian cells, duplexes of 19~25 nts (nucleotides) RNAs efficiently inhibit gene expression. The pBS/HISP vector expressing siRNA is used which inhibit specific HIV-1 gene expression. To assess the intracellular effect of this H1 promoter-driven siRNA, a reporter plasmid pEGFP-C1-HIV protein which expresses fusion protein of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and HIV protein was used. The expression of the reporters can be easily visualized by fluorescence microscopy in living cells. siRNA-generating vectors targeted to several HIV-1 genomes were constructed and then co-transfected with respond reporter expression vectors into HEK293 cells. Cells transfected with pHIV-siRNA exhibited a significant inhibition of pEGFP-HIV expression compared with cells transfected with control vectors. By this way, it is successfully to select effective siRNA for silencing target HIV-1 genes. Then two or three siRNA transcripts targeted to different HIV genes were expressed by one plasmid, and a relative strong inhibition effect was observed.

Key words siRNA, dsRNA, gene silencing, HIV-1

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30270316).

**Corresponding author . Tel: 86-10-66931810, Fax: 86-10-83821044, E-mail: caoc@nic.bmi.ac.cn

Received: April 4, 2006 Accepted: May 31, 2006