

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510071959.5

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 11 月 29 日

[11] 公开号 CN 1869225A

[51] Int. Cl. (续)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

[22] 申请日 2005.5.27

[21] 申请号 200510071959.5

[71] 申请人 中国医学科学院基础医学研究所

地址 100005 北京市东单三条 5 号

[72] 发明人 彭 勇 汪俊华 袁建刚 彭小忠
强伯勤

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 3 页

[54] 发明名称

一种白血病相关基因 ASH2L 在白血病分子分型诊断中的应用

[57] 摘要

白血病相关基因 ASH2L 编码的蛋白可与基因 DPY-30-like 编码的蛋白相互作用，二者是组蛋白甲基化转移酶复合体的成员。本发明研究发现 ASH2L 的表达在 PMA 刺激 K562 分化过程中被特异地下调，与 ASH2L 功能相关的 DPY-30-like 以及复合体另一个稳定成员 WDR5 的表达则没有如 ASH2L 的规律性变化，证明 ASH2L 的表达与 K562 增殖状态的正相关性是相对独特的，因此 ASH2L 可作为白血病分子分型诊断的候选标志物。同时本发明构建了原核表达 ASH2L 的 N-端蛋白和 DPY-30-like 全长蛋白的质粒，转化大肠杆菌表达相应蛋白；纯化该蛋白后以此为抗原可制备高质量的抗体，可应用于白血病分子分型诊断中。

1. 一种在白血病来源的细胞系中高表达的基因 ASH2L, 其表达的蛋白在 PMA 刺激的 K562 分化过程中相对独特, 可作为白血病分子分型诊断的候选标志物。
2. 一种含有权利要求 1 所述的 ASH2L 基因 N-端部分序列的原核表达载体, 是 pGEX-ASH2L. N。
3. 一种含有权利要求 2 所述表达载体的原核重组菌。
4. 根据权利要求 3 所述的重组菌, 其中所述的重组菌是含有重组质粒 pGEX-ASH2L. N 的重组大肠杆菌 BL21-ASH2L. N。
5. 一种制备高特异性抗 ASH2L 多克隆抗血清的方法, 步骤如下:
 - (1) 按照权利要求 4 所述的重组菌 BL21-ASH2L. N;
 - (2) 重组菌通过微生物发酵和纯化工艺制备高纯度 GST-ASH2L. N 蛋白;
 - (3) 用高纯度 ASH2L. N 蛋白免疫家兔, 可以得到高特异性的多克隆抗血清;
 - (4) 通过该方法得到的高特异性抗血清可以运用于白血病的基础研究及临床诊断。
6. 根据权利要求 5 所述的抗体, 可以免疫沉淀到含有 ASH2L 的蛋白复合体。
7. 根据权利要求 6 所述的蛋白复合体, 它具有组蛋白 3-赖氨酸 4 甲基化转移酶的活性。
8. 根据权利要求 7 所述具有组蛋白 3-赖氨酸 4 甲基化转移酶活性的蛋白复合体, ASH2L、DPY-30-like 和 WDR5 是其中的重要成员, 检测这些成员在 PMA 刺激 K562 分化过程中表达变化的方法, 步骤如下:
 - (1) 按照权利要求 12 所述, ASH2L、DPY-30-like 和 WDR5 是该蛋白复合体的成员;
 - (2) 根据 ASH2L、DPY-30-like 和 WDR5 的序列特点, 设计特异性的 Northern 杂交探针;
 - (3) 用 ASH2L、DPY-30-like 和 WDR5 的特异性探针实施 Northern 杂交, 以检测 ASH2L、DPY-30-like 和 WDR5 在 PMA 刺激 K562 细胞分化过程中的表达变化;
 - (4) 用该方法可以确证, ASH2L 的表达在 PMA 刺激 K562 分化过程中被特异地持续下调, 而 DPY-30-like 和 WDR5 的变化在该过程中没有如 ASH2L 的规律变化;
 - (5) 根据 ASH2L 在 PMA 刺激 K562 分化过程中表达变化的特异性, ASH2L 可作为白

血病分子分型诊断的候选标志物。

9. 根据权利要求5所述的抗ASH2L的多克隆抗血清和权利要求8所述ASH2L在PMA刺激K562分化过程中表达变化的特异性，该抗血清可用于白血病分子分型诊断中。

一种白血病相关基因 ASH2L 在白血病分子分型诊断中的应用

技术领域

本发明属于基因重组、抗体制备和临床诊断领域。具体地说，本发明涉及一种白血病相关基因 ASH2L 的 N-端部分的重组基因工程及蛋白纯化工艺，涉及 ASH2L 相互作用蛋白 DPY-30-like 全长的重组基因工程及蛋白纯化工艺，涉及运用该两种纯化蛋白制备高特异性抗体，涉及 ASH2L 在 PMA 刺激 K562 细胞分化过程中被特异性下调，涉及含有 ASH2L 部分基因的重组质粒和表达该蛋白的重组菌株和它们在白血病分子分型诊断中的应用。

背景技术

白血病的准确分型是治疗白血病的重要前提条件。目前，白血病的诊断和分型主要通过一些理化指标来实现，具体而言是通过常规组化（主要是细胞形态检测结果）作为分型的基础。这些理化指标主要是癌变细胞的外在表型，基本不涉及到细胞癌变分子机理过程，因此进行诊断时细胞已经大体完成了整个癌变过程，这样的诊断手段可以对已发病病人进行确诊，但不能预判，对大规模筛查意义也较小。如果我们明确各种类型白血病在发病过程所特异表达的基因，或者在患病组织和细胞中能检测到表达急剧变化的基因，将可以准确、快速地确定类型，从而对治疗起到很好的辅助作用。

经过我们的研究，成功地发现 ASH2L 基因在造血组织中高表达，特别是在髓系多潜能分化前体细胞中高表达。在白血病来源的 K562 细胞向髓系方向分化的过程中，ASH2L 的表达被明显地下调，用 PMA 刺激 8 小时后，ASH2L 的表达完全停止（汪俊华等，2001, J. Molecular Medicine, 79: 399-405）。因此，ASH2L 基因在白血病分子分型诊断方面存在潜在的应用价值。但是在缺乏 ASH2L 作用机理方面深入理解的情况下，我们仍然不清楚与 ASH2L 在功能上相关的分子是否如 ASH2L 样在 PMA 刺激的 K562 分化过程中有类似的表达特点，换言之，ASH2L 的表达特点是否是特异的还不能确定。在这些细节还没有研究清楚之前，ASH2L 在分子分型诊断方面的应用将受到限制。因此在本发明中，主要通过对与 ASH2L 相互作用的分子进行鉴定，以确定其起功能的方式，同时对 ASH2L 在功能上密切相关的基因在 PMA 刺激的 K562 细胞中的表达进行了检测，以确定 ASH2L 在该过程中的表达调控是否是特异的；同时我们对特异的抗 ASH2L 的抗体制备方面进行了研究，高质量的抗体是进行基础研究和临床诊断必不可少的手段。

发明内容

本发明是在用酵母双杂交系统筛选出与 ASH2L 相互作用蛋白的基础上进行的, 根据该相互作用提供的信息确定了 ASH2L 作用的分子机理, 并通过实验确证了该分子机理。在这样的基础上, 本发明的目的在于提供 ASH2L 在 K562 分化过程中表达变化的独特性证据, 同时提供了可以特异检测到真核细胞中表达的 ASH2L 的抗体的生产工艺, 包括选取 ASH2L 上特异的基因片段、重组表达质粒、重组菌, 并提供了抗原蛋白 (ASH2L.N) 纯化方法和抗体免疫方法, 为白血病分子分型诊断提供有力的工具。与此同时, 还提供了与 ASH2L 相互作用蛋白 DPY-30-like 的纯化和抗体制备方法, 为相关的基础研究提供工具。

本发明研究证明, ASH2L 编码的蛋白可以与低等生物剂量补偿机制上游调控因子 DPY-30 基因的人同源基因 DPY-30-like 所编码蛋白相互作用, 可以通过真核细胞内蛋白免疫共沉淀实验来验证该相互作用。

本发明从 ASH2L 上选取 N-端编码 1-99aa 的基因片段以及 DPY-30-like 的全长片段, 通过分子生物学方法分别获得含有该两个片段的重组质粒, 转化大肠杆菌 (BL21) 进行重组表达含有该两个片段的 GST-融合蛋白, 并通过 GST-亲和层析进行纯化。运用该蛋白免疫家兔, 获得高特异性抗血清。

本发明运用抗 ASH2L.N 和 DPY-30-like 的抗血清可以实施上述真核细胞蛋白免疫共沉淀实验, 证明 ASH2L 与 DPY-30-like 之间的相互作用的确存在。通过生物信息学分析, 我们发现在低等生物如酵母中, ASH2L 和 DPY-30-like 的同源蛋白被包含于同一个蛋白复合体 (SET1 蛋白复合体) 中, 该复合体具有组蛋白 3-赖氨酸 4 甲基化转移酶活性 (Nagy P.L., et al. 2002. Proc Natl Acad Sci. 99: 90-4.)。本发明运用上述 ASH2L 和 DPY-30-like 的抗血清, 在 K562 细胞中实施了蛋白免疫沉淀, 并检测发现沉淀得到的蛋白组分具有组蛋白 3-赖氨酸 4 甲基转移酶活性, 证明了该蛋白复合体的存在。

根据文献分析可知, 含有 ASH2L 的组蛋白 3-赖氨酸 4 甲基化转移酶蛋白复合体中还包括一个稳定成员 WDR5 (Roguev A., et al. 2001. Embo J. 20: 7137-48.; Roguev A., et al. 2003. J Biol Chem. 278: 8487-93.), 根据 NCBI 上提供的基因序列, 设计引物成功的从 K562 细胞的 cDNA 中克隆到该基因。本发明检测了上述三个基因: ASH2L、DPY-30-like 和 WDR5 在 PMA 刺激的 K562 细胞分化过程中的表达特点。为实现该目的, 分别设计了三个基因用于 Northern 杂交用探针, 用同一张 RNA 杂交膜 (含有 PMA 刺激后不同时间段的细胞总 RNA) 进行杂交。结果发现, 只有 ASH2L 在 PMA 刺激后表达明显下调, 在 8 个小时后, 表达完全停止。另外两个成员的

表达虽有波动,但始终维持在较高水平,说明 ASH2L 的高表达与 K562 细胞的癌变状态呈现正相关的关系,同时也说明与 ASH2L 功能相关的其他分子并没有呈现出与 K562 癌变状态的这种相关性,因此 ASH2L 与 K562 高增殖癌变状态的正相关关系是相对独特的。这种独特性可使 ASH2L 作为白血病分子分型诊断的候选标志物,从而具备潜在的应用价值。

小结:本发明涉及的基因 ASH2L,通过组蛋白 3-赖氨酸 4 甲基化复合体起作用,且在 PMA 刺激 K562 分化过程中的表达被明显下调,表现为 ASH2L 的高表达与 K562 细胞癌变增殖状态的正相关关系;同时与 ASH2L 在功能上密切联系的其他基因比较,ASH2L 的高表达与 K562 细胞高增殖状态的正相关关系是独特的;同时本发明提供了一种制备 ASH2L 特异抗体的方法,可以有效地检测真核细胞中表达的 ASH2L 蛋白,它们可以在临床诊断即白血病的分子分型诊断中起辅助作用;同时提供了 DPY-30-like 的特异性抗体制备方法,可以应用到相关的基础研究中。

本发明的主要技术特征在于:

(1) ASH2L,一个造血系统高表达基因,与 DPY-30-like 相互作用,并一起参与组蛋白 3 赖氨酸 4 甲基化转移酶复合体;在该复合体的成员中,ASH2L 的高表达与 K562 细胞的高增殖状态成正相关关系,且相对独特;

(2) 含有编码 ASH2L 1-99aa 的 DNA 序列的重组质粒 pGEX-ASH2L. N;

(3) 含有编码 DPY-30-like 的 DNA 序列的重组质粒 pGEX-DPY-30-like;

(4) 含有重组质粒 pGEX-ASH2L. N 的重组菌 BL21-ASH2L

(5) 含有重组质粒 pGEX-DPY-30-like 的重组菌 BL21-DPY-30-like

附图表说明

下面结合附图对本发明作进一步详细描述。

图 1, 重组质粒 pGEX-ASH2L. N 和 pGEX-DPY-30-like 构建图

图 2, 纯化后 GST-ASH2L. N 和 GST-DPY-30-like 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图和用其制备的抗体检测真核细胞表达的 ASH2L 和 DPY-30-like 蛋白

图 3, ASH2L 和 DPY-30-like 的相互作用 (CoIP 实验结果)

图 4, ASH2L 和 DPY-30-like 所在复合体组蛋白赖氨酸甲基转移酶活性

图 5, ASH2L、DPY-30-like 和 WDR5 三个基因在 PMA 刺激 K562 细胞分化过程中的表达变化

具体实施方式

在下面的实施例中进一步说明了本发明，但并不限制本发明的范围。

实施例 1

本发明中使用的引物序列及用途

引物名称	序列	用途
ASH2L- 1	ATGGCGGCGGCAGGAGC	ASH2L 的克隆
ASH2L- 2	CGGGGTTCCTCATGGGGAC	ASH2L 的克隆
DPY-30-like-1	ATGGAGCCAGAGCAGATGCTG	DPY-30-like 的克隆
DPY-30-like-2	GTTTCGATCTTCAAACGTGCC	DPY-30-like 的克隆
WDR5-1	GCATCTCGCTCAACAGACTGC	WDR5 的克隆
WDR5-2	ACCACCTCCAAGACACCCTG	WDR5 的克隆
ASH2L-6P-UP	CGGGATCCATGGCGGCGGCAGGAGC	pGEX-ASH2L.N 质粒构建
ASH2L-6P-DOWN	CCGCTCGAGTCACACCTCTGATGTATCCCAGC	pGEX-ASH2L.N 质粒构建
DPY-6P-UP	CGGAATTCACCATGGAGCCAGAGCAGATGCTG	pGEX-DPY-30-like 质粒构建
DPY-6P-DOWN	CCGCTCGAGGTTTCGATCTTCAAACGTGCC	pGEX-DPY-30-like 质粒构建
ASH2L-N1	ATGGCGGCGGCAGGAGC	Northern blot 探针制备
ASH2L-N2	CACCTCTGATGTATCCCAGC	Northern blot 探针制备
DPY-N1	ATGGAGCCAGAGCAGATGCTG	Northern blot 探针制备
DPY-N2	GTTTCGATCTTCAAACGTGCC	Northern blot 探针制备
WDR5-N1	GCGACGGAGCAGAAGAAG	Northern blot 探针制备
WDR5-N2	GTCACCTCTCCACAGTTTAATTG	Northern blot 探针制备

实施例 2

ASH2L、DPY-30-like 和 WDR5 基因的克隆

K562 细胞于 10 cm 培养皿上，用含 10% FBS 的 R1640 培养基于 37 度，5% CO₂ 培养至细胞数量达到 2×10^7 以上，收获细胞提取总 RNA 并进行反转录。反转录使用 PROMEGA 公司试剂盒进行，方法见试剂盒说明。以该 cDNA 为模板，扩增 ASH2L、DPY-30-like 和 WDR5 三个基因。使用的引物分别为 ASH2L-1/2、DPY-1/2 以及 WDR5-1/2（序列见实施例 1）。PCR 反应的条件分别是：ASH2L，退火温度为 64 度，延伸 7 分钟；DPY-30-like，退火温度为 60 度，延伸 1 分钟；WDR5 的退火温度为 60 度，延伸 1.5 分钟；其他条件同普通 PCR 条件，使用 Pfu 酶。

PCR 产物，经过 Taq 酶在 72 度条件下进行加尾反应 10 分钟后，直接和 pGEM-T 载体(PROMEGA

公司产品)连接,连接反应按照试剂盒说明进行,在4度过夜或者室温进行1-2小时。转化连接产物于感受态DH5a细菌,涂布于含氨苄青霉素的LB固体培养基上,37度培养8小时以上,挑选单克隆进行PCR鉴定,条件同上。阳性克隆培养于LB液体培养基,提取质粒即得到三基因全长cDNA克隆。可进行测序以进一步确定序列。

实施例3

抗ASH2L、DPY-30-like特异性抗体的制备:

抗原制备:从ASH2L和DPY-30-like的cDNA模板上PCR扩增所需要的片段,引物分别为ASH2L-6P-UP/ASH2L-6P-DOWN和DPY-6P-UP/DPY-6P-DOWN两对(序列见实施例1)。ASH2L上的目的片段为N-端1-99aa编码区,DPY-30-like则为其全长。PCR片段两端含有限制性酶切位点EcoR I和Xho I,所以用这两种酶消化PCR产物和载体质粒pGEX-6P-1。然后用T4连接酶将消化后的PCR片段和载体进行连接,形成重组质粒(见图1)。

PCR条件:退火温度为65度,延伸时间为1分钟,其他条件同普通的PCR反应。PCR反应产物50ul(大约5ug)和载体质粒(pGEX-6P-1)6-10ug分别用EcoR I和Xho I进行消化后用琼脂糖电泳回收DNA片段,在10ul体系中进行连接,其中含有1ul 10x连接缓冲液、1ul T4连接酶、100ng消化后的PCR片段、200ng消化后的载体片段、水补足10ul。在16度连接10小时以上。转化大肠杆菌DH5a,涂布于含氨苄青霉素的LB固体培养基上,37度培养8小时后,挑取单菌落进行PCR鉴定,PCR条件同上。挑取PCR阳性克隆,经过含氨苄青霉素LB液体培养后,提取质粒,经过EcoR I / Xho I双酶切鉴定得到阳性克隆。

将上述重组阳性克隆转化BL21大肠杆菌。挑取单克隆,在液体LB培养基中37度培养6-8小时,当菌液在 $OD_{260}=0.6$ 或者略高于该值时,按照0.0125%的浓度加入1M的IPTG进行诱导表达。30度诱导4-6小时后收集菌体(5000rpm 30分钟)。将湿菌用30%原培养基体积的PBS重悬洗涤一次,再次离心收集菌体(5000rpm 30分钟)。用10%原培养基体积的PBS溶解湿菌后进行超声破菌(在冰上操作)。超声条件为:100W功率情况下,超声10秒,间歇10秒,共进行50次。然后12,000 rpm离心30分钟。收集上清,经过0.45um的滤膜过滤除杂质后,上柱(GST亲和层析柱),柱上结合10分钟以上,也可反复结合。用PBS缓冲液洗涤柱子数次,每次10倍柱床体积,流出液用考马斯亮兰G250检测,到流出液不含有任何蛋白或者含有很微量蛋白为止。然后用2x GST洗脱液进行洗脱,洗脱液为柱床体积的0.8倍左右。SDS-PAGE电泳检测蛋白浓度和纯度(图3),同时通过分光光度计检测确定蛋白浓度。

取上述蛋白进行抗体制备，具体步骤为：

- 1) 第一次基础免疫：取300—500 μ g抗原与等体积弗氏完全佐剂混合，直至形成油包水状乳浊液，采用背部多点注射20—30个。
- 2) 二次加强免疫：两周以后，200—300 μ g抗原与等体积弗氏不完全佐剂充分混匀，背部多点注射。免疫后7—10天后耳缘部取血ELISA测抗体效价。若滴度小于1:1000，进一步加强免疫。
- 3) 第三次加强免疫：抗原200—300 μ g与等体积不完全佐剂混合，背部多点注射。7—10天后耳缘部取血，ELISA测抗体效价。

要求每两周免疫一次，达到所需滴度后的第10天颈动脉放血，收集抗血清，ELISA检测抗体滴度。滴度未达到，则继续加强免疫。待滴度达到要求后，颈动脉放血，收集血清，分装后-70℃保存。

实施例4

ASH2L和DPY-30-like相互作用的验证

K562细胞于10 cm培养皿上，用含10% FBS的R1640培养基于37度，5% CO₂培养至细胞数量达到 2×10^7 以上。收集细胞后进行CoIP实验如下：

- 1) 用PBS洗两细胞两次。收集细胞至1ml冰上预冷的EBC缓冲液，置冰上10分钟。
- 2) 4℃高速离心(15000rpm)15分钟，将上清转入一离心管，加入50ul Protein-A agarose于4℃孵育30分钟。
- 3) 4℃高速离心(15000rpm)15分钟，将上清转入一离心管，加入2ul抗体(本发明中用上述抗DPY-30-like的多克隆抗血清)后于4℃孵育60分钟。
- 4) 加入50ul Protein-A agarose于4℃孵育30分钟。
- 5) 离心，弃上清(留用部分检测未结合的目的蛋白)，用含100mM氯化钠的NETN溶液洗涤Protein-A珠子3次，最后用NETN洗涤1次。
- 6) 加入50 ul PBS和50 ul 2×SDS-PAGE loading buffer，变性后进行(12%)SDS-PAGE电泳并进行Western Blot检测。Western Blot检测时使用抗ASH2L的多克隆抗血清。

EBC缓冲液配制：

50mM Tris-Cl (pH 8.0)

120mM NaCl

0.5% NP-40

10ug/ul aprotinin (用前加入)

1ug/ul leupeptin (用前加入)

50ug/ml PMSF (用前加入)

100mM NaF

NETN 缓冲液配制:

20mM Tris-Cl (pH 8.0)

100mM NaCl

1mM EDTA (pH 8.0)

0.5% NP-40

实施例 5

ASH2L 和 DPY-30-like 所在蛋白复合体的组蛋白 3 赖氨酸 4 甲基化转移酶活性检测

A、首先培养并收集细胞、提取核抽提物。K562 细胞用含 10% FBS 的 R1640 培养基于 37 度, 5% CO₂ 培养至细胞数量达到 2×10^7 以上。收集细胞后进行核抽提实验如下:

- 1) 收集细胞, 2000rpm 10 分钟
- 2) 冰浴 PBS 洗细胞两次
- 3) 1:5 重悬于 Buffer A 中, 冰浴, 匀浆器匀浆至细胞破碎达 95% 以上(台盼蓝监测), 6500g 离心 20 秒。
- 4) 沉淀重悬于 Buffer B 中, 冰浴, 匀浆器匀浆至细胞核破碎达 95% 以上(台盼蓝监测), 13000g 离心 10 分钟。
- 5) 取上清, 用 1:50 Buffer C 透析, 4℃, 2 小时。
- 6) 离心 4℃, 15000rpm, 30min, 取上清, Brandford 法测蛋白浓度。
- 7) 核抽提物中蛋白浓度: 1mg/ml

注: Buffer A pH=7

HEPES 10 mM

MgCl₂ 1.5 mM

KCl 10 mM

DTT	0.5 mM
NP-40	0.5%
PMSF	0.5 mM
Aprotinin	100ug/ml
Leupeptin	5ug/ml
Pepstain A	1ug/ml

Buffer B

HEPES	20 mM
MgCl ₂	1.5 mM
NaCl	420 mM
EDTA	0.2 mM
Glycerol	25% (v/v)
Aprotinin	100ug/ml
Leupeptin	5ug/ml
Pepstain A	1ug/ml

Buffer C

HEPES	10 mM
Kcl	50 mM
EDTA	0.2 mM
DTT	0.5 mM
Glycerol	20% (v/v)
Aprotinin	100ug/ml
Leupeptin	5ug/ml
Pepstain A	1ug/ml

B、免疫沉淀

- 1) 预清除: 在上述细胞核抽提物 (0.5ml) 中加入 10 ul protein-A agarose, 4℃孵育和颠倒混匀 0.5 小时, 4℃ 13000rpm 离心 15 分钟, 取上清;
- 2) 在上述上清中加入 2 ul 抗体 (抗 ASH2L 或 DPY-30-like), 4℃孵育和颠倒混匀 1 小时;
- 3) 加入 Protein-A agrose 30ul, 4℃孵育和颠倒混匀 1 小时;
- 4) 用 PBS 反复冲洗/离心 (13000rpm) 5 次;

C、组蛋白 3 赖氨酸 4 甲基化转移酶活性检测

1) 混合组分:

在 50ul 体系中, 加入 2ul S-adenosyl [*methyl*-³H]methionine; 组蛋白 5ul; 通过 IP 分离的细胞核抽提的各组分 10ul; 用酶缓冲液补足体积至 50ul.

2) 37 °C 孵育 60 min; ;

3) 离心后将上清吸出, 加入 SDS-PAGE loading buffer, 95°C 变性 5 分钟 (注意防止辐射) 后进行 SDS-PAGE 电泳;

4) 进行放射自显影 (两周以上)

注: a) 组蛋白甲基化转移酶缓冲液

50 mM Tris, pH 8.5,

20 mM KCl,

10 mM MgCl₂,

10 mM β-mercaptoethanol,

250 mM sucrose

1mM PMSF

0.5 mM DTT

b) 组蛋白混合物 用上述 Buffer 溶解组蛋白为 0.2 mg/ml (购自 ROCHE 公司)

c) S-adenosyl [*methyl*-³H]methionine 0.8-1mM (购自 SIGMA 公司)

实施例 6

检测 ASH2L、DPY-30-like 和 WDR5 在 PMA 刺激的 K562 细胞中的表达变化

培养 K562 细胞于添加 10% FBS、2mM 谷氨酰胺、50UI/ml 青霉素和 50mg/ml 链霉素的 R-1640 培养基中, 在 37°C 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。收获对数生长期细胞, 并重悬于新鲜的含 10% FBS 的 R-1640 培养基中, 将细胞浓度调整到 $4-5 \times 10^5$ /ml。PMA 溶于二甲基亚砷 (DMSO), 储存浓度为 1mg/mL (1.6×10^{-3} M) 避光保存于 -20°C。使用时以 R-1640 培养基将其稀释 100 倍, 每 10 毫升细胞加稀释后的 PMA 31 μl, 终浓度为 50×10^{-9} M。分别于诱导 0.5, 1, 2, 4, 8 小时后收获细胞提取总 RNA。将收获的 RNA 进行甲醛-琼脂糖凝胶电泳分离及转膜。然后进行 Northern 杂

交:

- 1) 杂交液 (购自 CLONETECH 公司) 68℃预热, 将膜先放在 6×SSC 缓冲液中浸湿, 小心置于杂交管中, 核酸面朝向管腔, 并使膜与杂交管之间没有气泡。
- 3) 加入 5ml 杂交液, 68℃预杂交 30 min。
- 4) 弃去预杂交液。将 ^{32}P 标记的探针在 98℃变性 5min, 然后与预热的杂交液混匀, 加到杂交管内, 68℃杂交 60 min。
- 5) 洗膜: 杂交结束后, 将膜小心的从管内取出。置于 2×SSC, 0.5%SDS 中室温洗三次, 共 30-40 分钟。然后置于 0.1×SSC, 0.1%SDS 中, 68℃洗膜两次, 每次 20 分钟。
- 6) 将湿膜置于保鲜膜内, 压 X 光胶片, -70℃曝光

注: a) 探针模板DNA的制备

用引物ASH2L-N1/N2、DPY-N1/N2以及WDR5-N1/N2分别从三个基因的全长模板上克隆相应片段。PCR反应的退火温度分别是65度、59度和57度, 延伸时间为1分钟。PCR反应使用Taq酶进行, 产物用琼脂糖凝胶电泳回收后直接和pGEM-T载体 (PROMEGA公司试剂盒) 连接, 连接反应按照试剂盒说明进行, 在4度过夜或者室温进行1-2小时。转化连接产物于感受态DH5a细菌, 涂布于含氨苄青霉素的LB固体培养基上, 37度培养8小时以上, 挑选单克隆进行PCR鉴定, 条件同上。阳性克隆培养于LB液体培养基, 提取质粒即得到三基因的探针模板DNA。

b) 探针标记方法

取约 25ng的探针模板DNA, 于0.5ml离心管中, 用不含DNA酶的水补足至 30 μl , 98℃变性 4 分钟, 迅速放到冰上。杂交探针用随机引物标记试剂盒标记 (Promega-a-Gene[®] Labeling System)。依次在上述离心管中加入以下试剂:

成分	体积	终浓度
5×标记缓冲液	10 μl	1×标记缓冲液
dNTP混合物(无dCTP)	2 μl	每种20 $\mu\text{mol/l}$
10mg/ml BSA	2 μl	400 $\mu\text{g/ml}$
[α - ^{32}P] dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 比活度 >3000Ci/ mmol)	5 μl	333nmol/l
Klenow酶 (5u/ μl)	1 μl	100u/ml

室温标记1小时, 取1 μl 用于测定标记效率。剩余的探针98℃变性4分钟后加入杂交液中。将1 μl 标记产物稀释500倍, 取5 μl 用于测定标记效率。方法为三氯乙酸沉淀法。

探针的比活度一般约为 $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ cpm/ μg 。

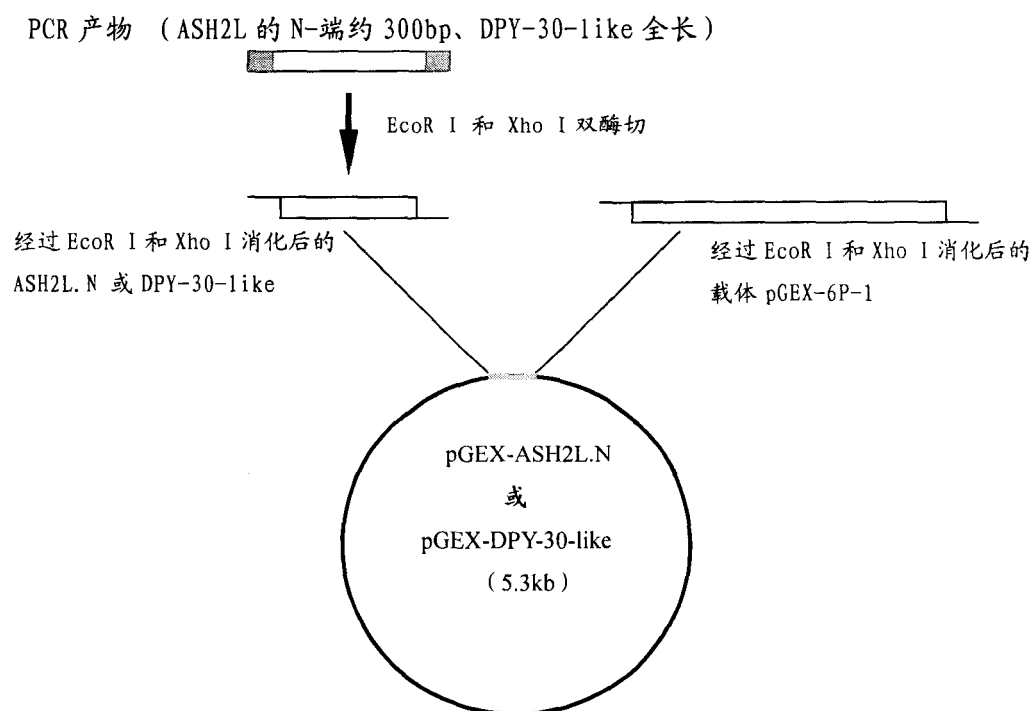


图 1

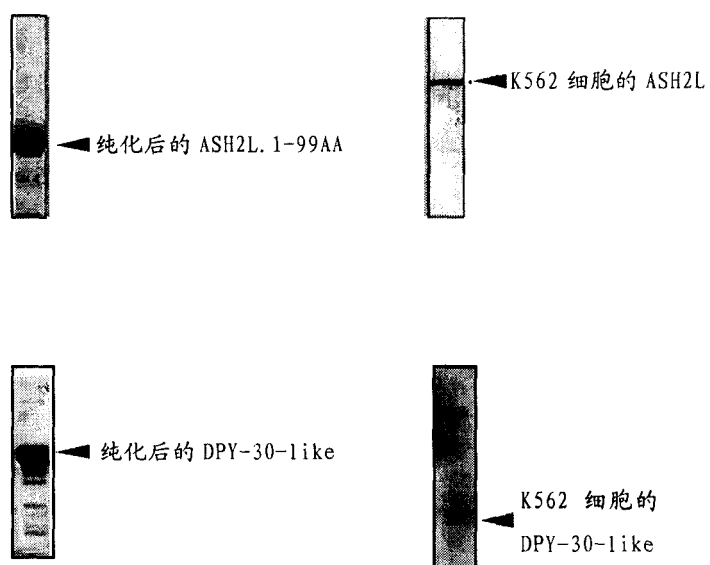


图 2

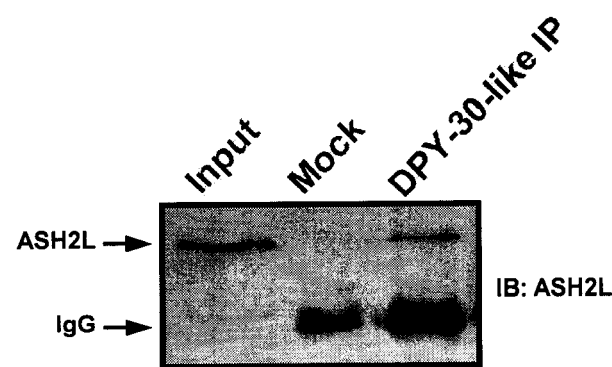


图 3

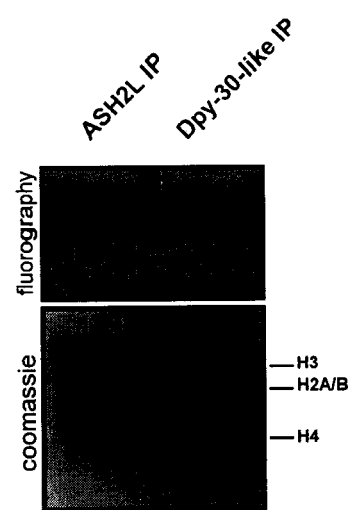


图 4

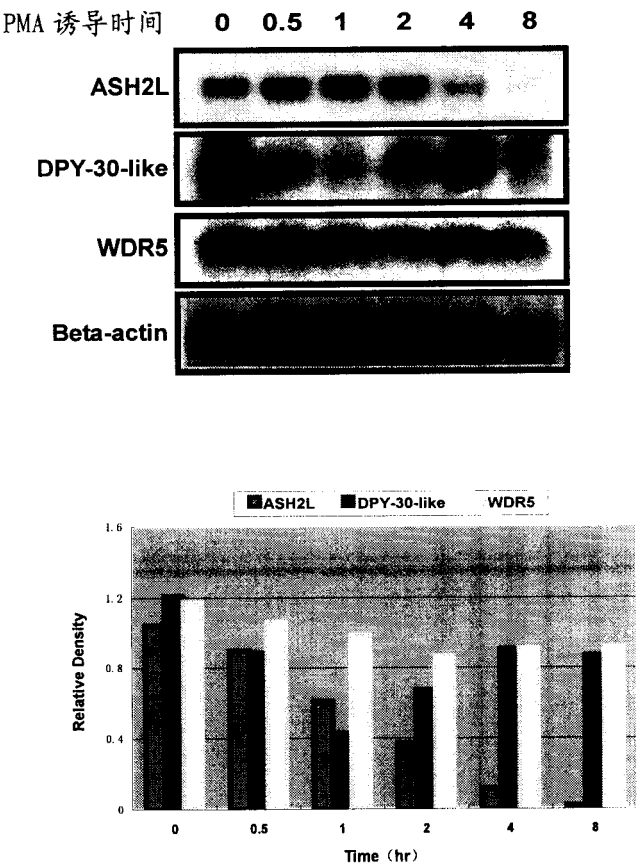


图 5

专利名称(译)	一种白血病相关基因ASH2L在白血病分子分型诊断中的应用		
公开(公告)号	CN1869225A	公开(公告)日	2006-11-29
申请号	CN200510071959.5	申请日	2005-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院基础医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院基础医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院基础医学研究所		
[标]发明人	彭勇 汪俊华 袁建刚 彭小忠 强伯勤		
发明人	彭勇 汪俊华 袁建刚 彭小忠 强伯勤		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/63 C12N1/21 C12N15/70 C07K16/18 G01N33/53 C12Q1/68 C12N15/09		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

白血病相关基因ASH2L编码的蛋白可与基因DPY - 30 - like编码的蛋白相互作用，二者是组蛋白甲基化转移酶复合体的成员。本发明研究发现ASH2L的表达在PMA刺激K562分化过程中被特异地下调，与ASH2L功能相关的DPY - 30 - like以及复合体另一个稳定成员WDR5的表达则没有如ASH2L的规律性变化，证明ASH2L的表达与K562增殖状态的正相关性是相对独特的，因此ASH2L可作为白血病分子分型诊断的候选标志物。同时本发明构建了原核表达ASH2L的N - 端蛋白和DPY - 30 - like全长蛋白的质粒，转化大肠杆菌表达相应蛋白；纯化该蛋白后以此为抗原可制备高质量的抗体，可应用于白血病分子分型诊断中。

