

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810053756.7

[51] Int. Cl.

G12N 15/12 (2006.01)
G12N 15/867 (2006.01)
G12N 5/10 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月4日

[11] 公开号 CN 101358191A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

[22] 申请日 2008.7.7

[21] 申请号 200810053756.7

[71] 申请人 中国医学科学院血液学研究所

地址 300020 天津市和平区南京路 288 号

[72] 发明人 王建祥 刘向荣 王敏 饶青
邢海燕

[74] 专利代理机构 天津才智专利商标代理有限公司

代理人 王晓红

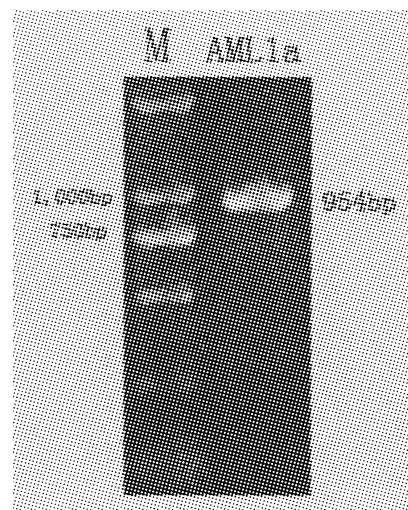
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 8 页

[54] 发明名称

转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法及应用

[57] 摘要

本发明公开了一种转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法及应用, 包含 AML1a 基因的逆转录病毒载体的构建、逆转录病毒的制备、骨髓细胞的感染、小鼠骨髓移植和模型鉴定。本发明采用分子生物学、细胞生物学等方法转导了 AML1a 基因至小鼠骨髓细胞中, 成功建立了具有双表型的 T-淋巴细胞白血病的模型, 为进一步阐述白血病的发病机制以及靶向治疗奠定了良好的基础。



1、一种转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法，包括以下步骤：

1) 载体构建：自 pCDNA3-FLAG-AML1a 中，PCR 扩增 FLAG-AML1a，连接入 pMD18-T Simple 载体中，转化 E.coli DH5 菌株，进行蓝白斑筛选，挑取阳性克隆提取质粒经 Xho I 双酶切鉴定后测序，测序正确的克隆，经 XhoI 酶切得到 FLAG-AML1a 片段，pMSCV-IRES-YFP 经 XhoI 酶切，CIAP 去磷酸化，与自 pMDsimple-T-FLAG-AML1a 载体 XhoI 酶切纯化所得的 FLAG-AML1a 片段连接，转化 DH5 α 感受态细胞后挑取克隆，EcoI 酶切鉴定已插入目的片段正反向，正向插入的质粒命名为 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP；

2) 病毒制备：逆转录病毒载体质粒 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 或 pMSCV-IRES-YFP 分别与辅助质粒 pV Pack-Eco 和 pV Pack-GP 组合，辅助质粒 pV Pack-Eco 含 Env，pV Pack-GP 含 gal-pol，组合通过磷酸钙沉淀法转染 293T 细胞，制备逆转录病毒，病毒感染 3T3 细胞，检测病毒滴度，并测定 AML1a 的表达情况；

3) 骨髓细胞的感染：C57 雄性小鼠的骨髓单个核细胞置于含 mSCF、mIL-3、mIL-6 的 IMDM 培养液中培养，加入 ploybrene 进行三轮逆转录病毒转导；

4) 将转导了 AML1a 基因的小鼠骨髓单个核细胞经尾静脉注射至经 ^{137}Cs 致死剂量照射的 C57 雌性小鼠体内，建立转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型；

5) 模型鉴定。

2、根据权利要求 1 所述的转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法，其特征在于，所述的逆转录病毒的载体是插入人 AML1a 的真核表达质粒，插入核苷酸的长度为 912 个核苷酸，FLAG 和 AML1a 共用 ATG 起始密码子，形成融合基因，由此融合基因编码的蛋白具有 260 个氨基酸，使 FLAG 成为 AML1a 表达的筛选标记。

3、根据权利要求 2 所述的转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法，其特征在于，所述的逆转录病毒载体 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 用于哺乳动物细胞表达，长约 7.2kb，带有 PGK

启动子、多克隆位点及黄色荧光蛋白基因(YFP);其多克隆位点上存在 Eco I、Hpa I 和 Xho I 酶切位点;IRES 使 FLAG-AML1a 和 YFP 共表达。

4、根据权利要求1所述的转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法,其特征在于,所述的模型鉴定采用如下指标:

- 1) 小鼠外周血荧光率的检测——流式细胞术;
- 2) 外周血及骨髓细胞形态学改变——瑞氏-吉姆萨染色观察;
- 3) 各脏器病理变化——HE 染色观察;
- 4) 白血病小鼠细胞表型的鉴定——流式细胞术;
- 5) AML1a 基因整合至小鼠基因组中的检测——PCR;
- 6) AML1a 基因转录水平的 RT-PCR 检测;
- 7) AML1a 基因翻译水平的 Western blot 检测;
- 8) AML1a 基因高表达对小鼠骨髓细胞细胞周期改变的检测——流式细胞术。

5、根据权利要求4所述的转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法,其特征在于,所述模型具有两种细胞表型:一种为 CD3⁺CD4⁺CD8⁺,另一种为 Sca-1⁺cCD3⁺,这两种表型都为 T-淋巴细胞白血病的免疫表型。

6、根据权利要求5所述的转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法,其特征在于,所述模型中两种表型的细胞均具有二次移植能力。

7、用权利要求1-6中任一项所述的方法构建的转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型。

8、权利要求7所述的转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型在白血病的靶向治疗中的应用。

转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法及应用

技术领域

本发明涉及生物技术，尤其是转导人AML1a基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法及应用。

背景技术

目前，恶性肿瘤已成为威胁人类健康的最严重疾病之一。随着社会经济的发展，肿瘤的发病率呈上升趋势。所以针对各种肿瘤的预防、发病机制、诊断、治疗和预后的相关研究成为迫切亟待解决的问题。而恶性肿瘤细胞的过度无限增殖、分化障碍及凋亡受阻是其发病的主要病理生理学基础。已经发现，不少肿瘤的发生机制就是由于增殖分化异常引起的，如白血病等。因此，以肿瘤细胞增殖分化相关基因为靶点的关于各种肿瘤的发病机制、诊断、治疗和预后的基础及临床研究成为目前临床与基础研究的热点课题。细胞的增殖分化受到严格调控，转录因子协调细胞中多种基因的表达是其中重要的调控机制。造血细胞的增殖失控、分化能力的丧失将可能导致细胞的恶性转化及白血病的发生。因此，阐明转录因子的功能对于确定细胞增殖分化调控机制以及在细胞恶性转化中的作用具有重要意义。

AML1也称之为PEBP2 α B、CBF α 2或RUNX1，是一种重要的转录调节因子。它在造血细胞中普遍表达，调节造血细胞的分化和增殖，其异常将导致造血细胞发育异常和血液系统恶性肿瘤的发生。在白血病中，AML1常发生染色体移位，如 t(8;21)，t(3;21) 和 t(12;21)。t(8;21)是急性髓系白血病中最为常见的染色体移位之一。AML1基因和染色体8q22上的ETO基因（又称MTG8）发生重排，由此形成的融合蛋白AML1-ETO中，AML1缺少TD，仅保留了RHD。约25%的儿童ALL存在t(12;21)易位，形成TEL-AML1融合基因。此融合基因可通过Runt同源结构域与野生型AML1竞争DNA结合位点，并可募集N-CoR、mSin3和SMRT核辅助抑制因子，进而与HDAC结合，抑制AML1靶基因的转录。在约6.7%AML中发现有AML1突变，包括点突变、插入、缺失，造成单个氨基酸的改变、肽链合成提前终止和读码框架易位等。这些突变常

可以造成AML1表达下降或转录活性丧失。由此可见，AML1不能与靶基因启动子结合或者结合后不能起始转录将会影响靶基因的转录，从而影响正常造血功能。

AML1基因转录后通过选择性剪接产生至少三种异构体AML1a、AML1b和AML1c。其中，AML1b与AML1c仅在氨基末端存在27个氨基酸残基的差异，均具有两个主要的功能结构域：RHD和TD，两者的功能基本相同。AML1c为全长型AML1，即我们通常所说的AML1。AML1a与AML1c起源于相同的启动子，由于剪接的不同，转录剪接后产生不同的mRNA，使得AML1a较之AML1c在羧基端缺少230个氨基酸残基。AML1a具有RUNT同源结构域，但缺少转录激活结构域，因此通常被认为不具有转录激活功能，但由于其具有RHD，可以与AML1b/1c竞争结合靶基因的DNA结合位点，导致靶基因不能正常转录，提示AML1a可能干扰AML1的功能。AML1b可以激活TCRs和GM-CSF的转录，但AML1a却没有此功能。并且，AML1a的过表达可以抑制由G-CSF诱导的髓系祖细胞32Dc13细胞系的终末分化。有研究表明，在AML中AML1a的表达远高于正常对照。实验也已证实AML1a在急性白血病(AL)中的高表达。此外，AML1a可以抑制由AML1b介导的M-CSFR启动子的转录，提示AML1a对AML1b具有拮抗作用。在成体中，AML1基因的缺失易于发生恶性血液疾病。因此，基于以上结果，AML1a在白血病发生中可能发挥类似于AML1相关白血病中融合蛋白的作用，干扰AML1的正常功能从而导致白血病的发生。

但是，AML1a在造血细胞增殖分化中发挥了何种作用，是否会导致小鼠发生白血病，如果发生白血病，白血病细胞呈现何种表型，目前均不清楚。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是，提供一种转导人AML1a基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法及应用，建立一种小鼠白血病模型，是进行白血病发病机制和靶向治疗的有力工具。

为了解决上述技术问题，本发明采用的技术方案是：一种转导人AML1a基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法，包括以下步骤：

1) 载体构建：自pCDNA3-FLAG-AML1a中，PCR扩增FLAG-AML1a，连接入pMD18-T Simple载体中，转化E.coli DH5菌株，进行蓝白斑筛选，挑

取阳性克隆提取质粒经 Xho I 双酶切鉴定后测序, 测序正确的克隆, 经 XhoI 酶切得到 FLAG-AML1a 片段, pMSCV-IRES-YFP 经 XhoI 酶切, CIAP 去磷酸化, 与自 pMDsimple-T-FLAG-AML1a 载体 XhoI 酶切纯化所得的 FLAG-AML1a 片段连接, 转化 DH5 α 感受态细胞后挑取克隆, EcoI 酶切鉴定已插入目的片段正反向, 正向插入的质粒命名为 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP;

2) 病毒制备: 逆转录病毒载体质粒 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 或 pMSCV-IRES-YFP 分别与辅助质粒 pV Pack-Eco (含 Env) 和 pV Pack-GP (含 gal-pol) 组合, 组合通过磷酸钙沉淀法转染 293T 细胞, 制备逆转录病毒, 病毒感染 3T3 细胞, 检测病毒滴度, 并测定 AML1a 的表达情况;

3) 骨髓细胞的感染: C57 雄性小鼠的骨髓单个核细胞置于含 mSCF、mIL-3、mIL-6 的 IMDM 培养液中培养, 加入 ploybrene 进行三轮逆转录病毒转导;

4) 将转导了 AML1a 基因的小鼠骨髓单个核细胞经尾静脉注射至经 ^{137}Cs 致死剂量照射的 C57 雌性小鼠体内, 建立转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型;

5) 模型鉴定。

所述的逆转录病毒的载体是插入人 AML1a 的真核表达质粒, 插入核苷酸的长度为 912 个核苷酸, FLAG 和 AML1a 共用 ATG 起始密码子, 形成融合基因, 由此融合基因编码的蛋白具有 260 个氨基酸, 使 FLAG 成为 AML1a 表达的筛选标记。

所述的逆转录病毒载体 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 用于哺乳动物细胞表达, 长约 7.2kb, 带有 PGK 启动子、多克隆位点及黄色荧光蛋白基因 (YFP); 其多克隆位点上存在 Eco I、Hpa I 和 Xho I 酶切位点; IRES 使 FLAG-AML1a 和 YFP 共表达。

所述的模型鉴定采用如下指标:

- 1) 小鼠外周血荧光率的检测——流式细胞术;
- 2) 外周血及骨髓细胞形态学改变——瑞氏-吉姆萨染色观察;
- 3) 各脏器病理变化——HE 染色观察;
- 4) 白血病小鼠细胞表型的鉴定——流式细胞术;
- 5) AML1a 基因整合至小鼠基因组中的检测——PCR;

- 6) AML1a 基因转录水平的 RT-PCR 检测;
- 7) AML1a 基因翻译水平的 Western blot 检测;
- 8) AML1a 基因高表达对小鼠骨髓细胞细胞周期改变的检测——流式细胞术。

所述模型具有两种细胞表型：一种为 CD3⁺CD4⁺CD8⁺，另一种为 Sca-1⁺cCD3⁺，这两种表型都为 T-淋巴细胞白血病的免疫表型。

所述模型中两种表型的细胞均具有二次移植能力。

所述的方法构建的转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型。

所述的转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型在白血病的靶向治疗中的应用。

本发明的有益效果是：本发明的白血病小鼠模型可以为白血病的靶向治疗提供新的靶向分子 AML1a。为白血病的靶向治疗提供新的动物模型，从而进一步研究和阐述淋巴细胞白血病的发病机制。

附图说明

图 1 是 PCR 扩增 FLAG-AML1a 片断的凝胶电泳分析 (M: DL2, 000 Maker);

图 2 是 pMD18-T-FLAG-AML1a 质粒克隆及 XhoI 酶切鉴定 (M: DL 15, 000 Maker; P: Plasmid; C: XhoI 酶切);

图 3 是 EcoI 酶切鉴定 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 正反向，正向存在一长约 900bp 的片段 (2、10、14、15 号克隆为正向插入)；

图 4 是 pV Pack-Eco、pV Pack-Eco、pMSCV-IRES-YFP 及 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 质粒结构图；

图 5 是转染 MSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 的 293T 细胞 (光镜及荧光显微镜，400×)；

图 6 是共转染 pV Pack-Eco、pV Pack-Eco、pMSCV-IRES-YFP 或 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 的 293T 细胞转染效率测定 293T-CON: 未转染对照组；293T-YFP: 载体质粒为 pMSCV-IRES-YFP 的转染组；293T-AML1a: 载体质粒为 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 的转染组)；

图 7 是逆转录病毒滴度测定 (3T3-CON: 未感染对照组；YFP: 仅转导 YFP 的感染组，病毒滴度 1.2×10^5 ；AML1a 转导 AML1a 及 YFP 的感染组，病毒滴度 4.1×10^4 。ml 数为所加入病毒上清的体积)；

图 8 是 Western blot 检测感染 3T3 细胞中 AML1a 的表达 (CON: 未感染的 3T3 细胞; YFP: 单一转导 YFP 的 3T3 细胞; AML1a: 转导 AML1a 的 3T3 细胞);

图 9 是逆转录病毒感染 C57 小鼠骨髓细胞感染效率测定 (CON: 未感染对照组; YFP: 仅转导 YFP 的对照组; AML1a: 转导 AML1a 及 YFP 的感染组);

图 10 是 Western blot 检测 C57 小鼠 BMMNC 中 AML1a 的表达 (CON. 未感染对照组; YFP. 单一转导 YFP 的小鼠 BMMNC; AML1a. 转导 AML1a 的小鼠 BMMNC);

图 11 是 105#、109#、110#和 111#AML1a 移植小鼠及 YFP 对照小鼠外周血 5w、12w 及处死前荧光率测定;

图 12 是骨髓移植小鼠生存情况 (A. 骨髓移植小鼠生存情况; B. 骨髓移植小鼠生存曲线 AML1a: 转导 AML1a 小鼠 (n=12); YFP: 仅转导 YFP 的对照小鼠 (n=12));

图 13 是 AML1a 骨髓移植小鼠中发病鼠的解剖外观 (105#(A) 109#(D) 均可见肝脾肿大。B: 105#小鼠脾脏, 上方为正常对照; C: 105#小鼠肝脏, 右侧为正常对照。109#伴有胸腺瘤(E), F: 109#小鼠脾脏)

图 14 是 105#小鼠外周血、骨髓细胞形态及组织病理切片结果 (a. 外周血瑞氏染色; b. 骨髓瑞氏-吉姆萨染色; c. 股骨; d. 脾; e. 肝; f. 胸骨; g. 肺);

图15是109#小鼠外周血、骨髓细胞形态及组织病理切片结果 (a. 外周血瑞氏染色; b. 骨髓瑞氏-吉姆萨染色; c. 股骨; d. 脾; e. 肝; f. 肺; g. 肾);

图16是 109#、105#小鼠脾细胞、骨髓细胞免疫表型测定 (A. 109#小鼠免疫表型示Sca-1⁺C-KIT⁺Thy1.2⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺, YFP:单一转导YFP的对照组; B. 109#小鼠YFP阳性细胞为Sca-1⁺C-KIT⁺双阳和CD3⁺CD4⁺CD8⁺双阳性表型; C. 105#小鼠YFP阳性细胞中免疫表型示Sca-1⁺cCD3⁺);

图 17 是发病小鼠 AML1a 基因整合及表达的鉴定 (a. 发病小鼠 SP 基因组 DNA 扩增 AML1a 基因; b. AML1a 在 mRNA 水平的表达情况; c. 相应 β -actin 的表达 d. AML1a 蛋白在小鼠 SP 细胞中的表达。21#为单一转导

YFP 的对照小鼠，AML1a vector 为 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 质粒，293T-AML1a 为已证实有 AML1a 表达的 293T 细胞)；

图18是二次移植小鼠BM细胞周期测定 (a. 正常对照细胞周期测定； b. 发病小鼠细胞周期测定； c. 发病小鼠BMCG0/G1期百分比与正常对照的比较， $P < 0.05$)。

具体实施方式

结合下述实施例对本发明做进一步说明，但本发明不仅限于下述实施例。

1 携带 AML1a 的逆转录表达载体的构建

利用高保真 DNA 多聚酶，自 pCDNA3-FLAG-AML1a 中，PCR 扩增 FLAG-AML1a，序列见 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2，上游引物和下游引物分别为 5'-CTCGAGGGATCCCACTATAGGGAGACCCAAG-3' 和 5'-CCCTATTCTATAGTGTACCT-3'，反应条件为 95°C 预变性 5 min，95°C 45s，53 °C 45s，72°C 45s，30 个循环后 72°C 延伸 2 min，扩增片段长度为 954bp，电泳定量 (图 1) 并进行胶回收纯化，连接入 pMD18-T Simple 载体中，转化 E.coli DH5 α 菌株，在 LB 平板中进行蓝白斑筛选，挑取阳性克隆提取质粒经 Xho I 双酶切鉴定后 (图 2)，送测序。测序正确的克隆，经 XhoI 酶切得到 FLAG-AML1a 片段，胶回收纯化。pMSCV-IRES-YFP 经 XhoI 酶切，CIAP 去磷酸化，纯化定量，与自 pMD18-T-FLAG-AML1a 载体 XhoI 酶切纯化所得的 FLAG-AML1a 片段连接，转化 DH5 α 感受态细胞后挑取克隆，EcoI 酶切鉴定已插入目的片段正反向 (图 3)。

2 逆转录病毒的制备

2.1 磷酸钙共沉淀法转染 293T 细胞制备逆转录病毒

大量提取质粒，分别将 pMSCV-IRES-YFP、pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 与辅助质粒 pV Pack-Eco (含 Env)、pV Pack-GP (含 gal-pol) (图 4) 组合，共同转染 293T 细胞。转染前 24h 用胰酶消化、收集处于对数生长期的第 4-12 代 293T 细胞，用含 10%FBS 的 DMEM 培养液以 5×10^6 细胞/孔均匀平铺于 10-20 个 10cm 培养皿中。37°C 5%CO₂ 孵箱培养 24h，达 50-60%汇合度后开始转染。于转染前 1h 更换为 5%FBS 的 DMEM 培养液。于 1.5ml 灭菌

EP 管内加入 20 μ g 质粒，加入 10 μ l 2.5M 的 CaCl₂，用无菌去离子水补齐至 1ml；在 10ml 灭菌 EP 管内加入已达室温的 2 \times BBS 液 1ml，将质粒与 CaCl₂ 的混合液缓慢滴入 BES 液中，边滴边轻弹管壁，混匀；室温放置 15min 后将上液缓慢滴入 10cm 培养皿上，边滴边摇，混匀；将 10cm 培养皿放入 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 孵箱孵育 12h；吸去培养基；加 5ml 含 5%FBS 的 DMEM 培养液，于 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 孵箱孵育；48h 观察 293T 细胞转染情况，荧光显微镜下可见转染 AML1a 293T 细胞的荧光表达（图 5）。流式细胞术检测 293T 细胞的转染效率（图 6）。

2.2 逆转录病毒的浓缩及滴度测定

转染 48h 及 72h 后小心收集 293T 细胞培养上清，4 $^{\circ}$ C 25,000rpm 离心 100min，弃上清，以 4 $^{\circ}$ C 无血清 IMDM 培养基 2ml 溶解沉淀，分装，-80 $^{\circ}$ C 冻存。留取少量上清，将上清样品梯度稀释，感染 NIH/3T3 细胞，测定 YFP 阳性率，估算病毒滴度。具体方法为：感染前 24h 用胰酶消化、收集第 4-12 代 3T3 细胞，用含 10%FBS 的 DMEM 培养液以 1×10^5 细胞/孔均匀平铺于六孔板上。37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 孵箱培养 24h，于感染前 1h 更换为含 10%FBS 的 DMEM 培养液。在未浓缩病毒上清中按 1:1,000 比例加入 8 μ g/ μ l ploybrene，混匀，按 0.1、0.2、0.5、1ml 的浓度梯度分别加入六孔板中，使总培养体系为 2ml，混匀，6h 后更换为 10%FBS 的 DMEM 培养液，每孔重复三次。感染 48h 后胰酶消化、收集 3T3 细胞，PBS 液洗涤细胞，悬于 1%多聚甲醛的 PBS 液中，1h 内流式细胞仪检测荧光率。取荧光阳性率在 10%左右的 3T3 计算病毒滴度。计算公式见下：病毒滴度 (cfu/ml) = 细胞数 (1×10^5) \times 荧光阳性率 / 病毒量 (ml)

结果显示仅转导 YFP 的感染组，病毒滴度约为 1.2×10^5 ，转导 AML1a 及 YFP 的感染组，病毒滴度约为 4.1×10^4 （图 7）。剩余病毒上清离心浓缩，-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

3 Western blot 对感染 3T3 细胞中 AML1a 的表达的鉴定

收集 1×10^7 3T3 细胞，PBS 洗涤后悬浮于细胞裂解液中裂解细胞，冰上放置 30min，4 $^{\circ}$ C 12,000g 离心 10min，收集上清。以 Bicinchoninic Acid assay 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳的分离胶与浓缩胶的浓度分别为 10% 和 4%。待测细胞裂解液和蛋白分子量标准首先加入 4 \times 变性凝胶上样缓冲

液，100℃煮沸 3min。然后依次加入上样孔中。电泳开始时电流为 20mA/cm 凝胶，染料进入分离胶后，电流加大至 40mA/cm 凝胶，继续电泳直到染料抵达分离胶底部，断开电源。取下凝胶，用转移缓冲液浸泡数 min，然后进行转膜。用半干蛋白转移装置将蛋白转移到硝酸纤维素滤（NC）膜上，按转移蛋白的常规方法进行，电转 3h。转移结束后去除滤纸。把凝胶转移至考马斯亮蓝染液的托盘中染色，以检查蛋白转移是否完全。将转移上蛋白的 NC 膜浸在 5%脱脂奶 4℃封闭过夜后，将膜与抗 FLAG 抗体（1: 2000 稀释）孵育 2h，然后用 PBS-T 缓冲液洗膜 3 次，每次 5min。将膜与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG（1: 500 稀释）共同孵育 1.5h，PBS-T 缓冲液洗膜 3 次，每次 5min。最后以 DAB 为底物显色。结果显示 AML1a 在 AML1a 病毒转导组高表达，在未转导组及 YFP 对照组均无表达（图 8）。

3 小鼠模型的建立

3.1 逆转录病毒感染 C57 小鼠 BMMNC 及感染效率的测定

4-6 周龄雄性 C57 小鼠，腹腔内注射 5 氟尿嘧啶（5-Fu）150mg/kg，3d 后处死小鼠，取股骨及胫骨骨髓，分离单个核细胞，培养于加 mSCF 50 ng/ml、mIL-3 50 ng/ml 和 mIL-6 10 ng/ml 的 20%FBS 的 IMDM 中，刺激细胞增殖 24h 后离心，留取上清 4℃保存，加入病毒浓缩液及 polybrene 8 ug/ml，混匀，1,500rpm 离心 90min，加入 FBS，使终浓度为 5%，感染 4h 后 2,000rpm 离心 10min，弃上清，加入含有上述 4℃保存的含细胞因子的培养液及 20%FBS 的 IMDM 中培养，每 24h 感染一次，维持相同的细胞因子浓度。浓缩病毒上清感染三次。感染 72h 后，取 1×10^6 细胞流式细胞仪测定 YFP 阳性率。结果显示逆转录病毒可以感染小鼠骨髓细胞，YFP 的对照组及 AML1a 组的感染效率分别为 36%和 27%（图 9）。

3.2 AML1a 蛋白在 C57 BMMNC 中表达的测定

收集感染 72h 的 BMMNC 进行蛋白电泳，以 FLAG 抗体来检测 AML1a 的表达情况。结果显示 AML1a 在携带 AML1a 的病毒转导组高表达，在未转导组及 YFP 对照组均无表达（图 10）。由此进一步证实病毒感染的有效性。

3.3 骨髓移植小鼠定期外周血荧光检测

移植小鼠定期尾静脉取血，流式细胞术检测外周血单个核细胞荧光阳

性率变化情况。转导 AML1a 组小鼠外周血 YFP 阳性率随移植时间的延长而逐渐增加，而 YFP 对照组阳性率变化不明显(图 11)。

3.4 接受 AML1a 骨髓移植的小鼠发生白血病

用 D-Hanks 洗涤逆转录病毒基因转导的 BMMNC 两次，计数。4-6 周龄雌性 C57 小鼠经 9Gy 致死剂量照射后，尾静脉输入 3×10^6 转导后的 BMMNC，剪耳做标记，在 SPF 级动物合格环境下饲养，移植 4w 后定期经尾静脉取血，查血象、白细胞分类和荧光阳性率。血象有异常改变后，处死小鼠，研究有无肝、脾、淋巴结肿大，及细胞表型改变。结果显示在 12 个月的观察期内移植了转导 AML1a 组的 12 只小鼠有 9 只相继发病（表 1 和图 12A、B），而 12 只 YFP 对照组小鼠健康存活。发病鼠解剖可见肝脾肿大，可伴有胸腺瘤（图 13）。

表 1 AML1a 骨髓移植小鼠中发病鼠的基本情况

小鼠编号	101	102	103	105	108	110	107	109	111
骨髓移植后									
生存时间(d)	110	133	142	180	180	234	282	282	312
骨髓及脾的 单个核细胞 表型	ND	ND	Sca-1 cCD3	Sca-1 cCD3	Sca-1 cCD3	Sca-1 c-Kit Thy1.2 CD3 CD4 CD8	Thy1.2 CD3 CD8 CD4	Sca-1 c-Kit Thy1.2 CD3 CD4 CD8	Sca-1 c-Kit Thy1.2 CD3 CD4 CD8
胸腺瘤	ND	ND	+	-	+	-	+	+	+
脾脏重量(g)	ND	ND	0.2	0.4	0.2	0.31	0.2	0.21	0.42
外周血白细胞 计数($\times 10^6/ml$)	10.1	12.7	15.2	12.7	12	15.2	22.6	23.4	30.2
诊断	AL	AL	T-ALL	T-ALL	T-ALL	T-ALL	T-ALL	T-ALL	T-ALL

ND:未测定

4 白血病小鼠模型的鉴定

4.1 发病小鼠外周血、骨髓细胞形态及病理结果

小鼠外周血涂片、 1×10^5 BMMNC 甩片, 瑞氏-吉姆萨染色普通光学显微镜下观察(图 14a、14b、15a、15b)。取发病小鼠肝、脾、骨髓、胸腺、肾等组织器官石蜡包埋切片, 进行 HE 染色: ①取材裸鼠移植瘤肿瘤组织块, 10%中性福尔马林固定 24 小时, 常规石蜡包埋, $4\mu\text{m}$ 切片; ②切片常规用二甲苯脱蜡, 经梯度乙醇至水洗: 二甲苯 I 5min→二甲苯 II 5min→100%乙醇 2min→95%乙醇 2min→80%乙醇 2min→75%乙醇 2min→蒸馏水水洗 2min; ③苏木素染色 5min, 自来水洗 5min; ④盐酸乙醇分化 30sec, 自来水洗 3min; ⑤弱碱性水溶液返蓝 60sec, 自来水洗 10min; ⑥伊红染色 2min, 蒸馏水洗 2 次; ⑦常规脱水、透明、封片: 75%乙醇 2min→80%乙醇 2min→95%乙醇 2min→100%乙醇 2min→二甲苯 I 5min→二甲苯 II 5min→中性树胶封片。普通光学显微镜观察、摄片。结果显示相关组织均有白血病细胞浸润(图 14c-g、15c-g)。

4.2 发病小鼠免疫表型分析

取 BMMNC 及脾细胞标记各系抗体进行流式检测。流式结果显示主要有两种免疫表型(图 18): 一种为 $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ (图 16A, B), 另一种为 $\text{Sca-1}^+\text{cCD3}^+$, 提示发病小鼠均为 T-淋巴细胞白血病(图 16C)。

5 白血病小鼠中 AML1a 基因整合的鉴定

提取 C57 移植小鼠脾单个核细胞的基因组 DNA, PCR 扩增 AML1a, 上游引物和下游引物分别为 $5' -\text{GGATCCCACTATAGGGAGACCCAAG}$ 和 $5' -\text{CCCTATTCTATAGTGTCACCT}$, 反应条件为 95°C 预变性 5 min, 95°C 45s, 53°C 45s, 72°C 45s, 30 个循环后 72°C 延伸 2 min, 预计扩增片段长度为 948bp, 结果显示白血病小鼠中均有 AML1a 基因的整合, 对照组中没有该基因的整合(图 17a)。

6 发病小鼠 AML1a 基因表达的鉴定

提取 C57 移植小鼠脾单个核细胞 RNA 及蛋白质, 用 RT-PCR 及 Western blot 方法检测小鼠造血系统内 AML1a 的表达情况。用分光光度计测定 A_{260}/A_{280} , 计算 RNA 含量, 并经 12g/L 琼脂糖凝胶电泳证实 RNA 完整。20 μ l 逆转录反应体系含 2 μ g 总 RNA, 4 μ l RT 缓冲液, 50pmol/L oligo(dT)₁₆, 1 mmol/L dNTPs, 0.1 mmol/L DTT, 15U RNA 酶抑制剂 (Takara), 200U MLV (Invitrogen), 于 65°C 水浴 5min, 冰浴 5min, 37°C 水浴 60min, 70°C 15min 终止反应, 所得 cDNA -20°C 保存备用。上游引物和下游引物分别为 5' -GGATCCCACTATAGGGAGACCCAAG-3' 和 5' -CCCTATTCTATAGTGTCACCT-3', 反应条件为 95°C 预变性 5 min, 95°C 45s, 53 °C 45s, 72°C 45s, 30 个循环后 72°C 延伸 2 min, 预计扩增片段长度为 948bp, 结果显示 AML1a 在白血病小鼠中无论是转录阶段还是翻译阶段均高表达, 在 YFP 对照组无表达(图 17b-17d)。

7 发病小鼠白血病细胞二次移植能力的鉴定

为确定发病小鼠白血病细胞的二次移植能力, 取上述已鉴定细胞表型的 7 只小鼠的脾细胞 (5×10^6) 分别经尾静脉注射至半数致死剂量 (4.5Gy) 照射的同类小鼠中, 每只原代发病小鼠的脾细胞各移植 4 只。第二代小鼠移植后 4-9w 内均可发病, 平均移植后生存期为 47d。组织病理及细胞表型与第一代发病鼠一致。

8 AML1a 对小鼠 BM 细胞周期的影响的鉴定

将 AML1a 小鼠脾细胞传代后取第二代发病鼠的骨髓细胞进行细胞周期测定。与对照组相比, AML1a 组小鼠 BM 中 G0/G1 细胞比例增高, S 期细胞比例明显降低 (图 18a, 18b), 两组小鼠 BM G0/G1 期细胞差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 18c), 说明 AML1a 基因可以抑制细胞自 G0/G1 期向 S 期转换。

综上所述, 本发明通过构建 pMSCV-FLAG-AML1a-IRES-YFP 质粒, 将此质粒和 pMSCV-IRES-YFP 分别与辅助质粒 pV Pack-Eco (含 Env)、pV Pack-GP (含 gal-pol) 组合, 通过磷酸钙沉淀法转染 293T 细胞, 制备逆转录病毒。病毒感染 3T3 细胞, 检测病毒滴度, 并测定 AML1a 的表达情况。C57 雄性小鼠的骨髓单个核细胞 (BMMNC) 置于含 mSCF、mIL-3、mIL-6 的 IMDM 培养液中培养, 通过三轮逆转录病毒转导 AML1a 后, 将此 BMMNC

尾静脉注射至致死剂量照射的 C57 雌性小鼠体内。定期尾静脉取血，查血象及白细胞分类。血象有异常改变后，处死小鼠，解剖查看肝、脾、淋巴结等器官肿大情况，流式细胞术分析细胞表型变化。各器官组织进行病理检测，流式分析显示细胞表型。

所得的小鼠模型具有两种细胞表型： $CD3^+CD4^+CD8^+$ ，另一种为 $Sca-1^+cCD3^+$ 。两种表型的细胞均具有二次移植能力。小鼠模型的脾细胞传代，第二代发病鼠的骨髓细胞的细胞周期阻滞于 G1 期。

本发明的白血病小鼠模型可以为白血病的靶向治疗提供新的靶向分子 AML1a。为白血病的靶向治疗提供新的动物模型，从而进一步研究和阐述淋巴细胞白血病的发病机制。

序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 中国医学科学院血液学研究所

<120> 转导人 AML1a 基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法及应用

<130>

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 783

<212> DNA

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(783)

<400> 1

```
atg gac tac aag gac gac gac gat aag gaa ttc cgt atc ccc gta gat      48
Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Glu Phe Arg Ile Pro Val Asp
1           5           10           15
```


aaa atc aca gtg gat ggg ccc cga gaa cct cga aga cat cgg cag aaa 576
 Lys Ile Thr Val Asp Gly Pro Arg Glu Pro Arg Arg His Arg Gln Lys
 180 185 190

cta gat gat cag acc aag ccc ggg agc ttg tcc ttt tcc gag cgg ctc 624
 Leu Asp Asp Gln Thr Lys Pro Gly Ser Leu Ser Phe Ser Glu Arg Leu
 195 200 205

agt gaa ctg gag cag ctg cgg cgc aca gcc atg agg gtc agc cca cac 672
 Ser Glu Leu Glu Gln Leu Arg Arg Thr Ala Met Arg Val Ser Pro His
 210 215 220

cac cca gcc ccc acg ccc aac cct cgt gcc tcc ctg aac cac tcc act 720
 His Pro Ala Pro Thr Pro Asn Pro Arg Ala Ser Leu Asn His Ser Thr
 225 230 235 240

gcc ttt aac cct cag cct cag agt cag atg cag gag gaa gac aca gca 768
 Ala Phe Asn Pro Gln Pro Gln Ser Gln Met Gln Glu Glu Asp Thr Ala
 245 250 255

ccc tgg aga tgt taa 783
 Pro Trp Arg Cys
 260

<210> 2
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 2

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Glu Phe Arg Ile Pro Val Asp
 1 5 10 15

Ala Ser Thr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Pro Ser Thr Ala Leu Ser Pro
 20 25 30

Gly Lys Met Ser Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ala Pro Asp Ala Gly Ala
 35 40 45

Ala Leu Ala Gly Lys Leu Arg Ser Gly Asp Arg Ser Met Val Glu Val
 50 55 60

Leu Ala Asp His Pro Gly Glu Leu Val Arg Thr Asp Ser Pro Asn Phe
 65 70 75 80

Leu Cys Ser Val Leu Pro Thr His Trp Arg Cys Asn Lys Thr Leu Pro
 85 90 95

Ile Ala Phe Lys Val Val Ala Leu Gly Asp Val Pro Asp Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Met Ala Gly Asn Asp Glu Asn Tyr Ser Ala Glu Leu Arg
 115 120 125

Asn Ala Thr Ala Ala Met Lys Asn Gln Val Ala Arg Phe Asn Asp Leu
 130 135 140

Arg Phe Val Gly Arg Ser Gly Arg Gly Lys Ser Phe Thr Leu Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Val Phe Thr Asn Pro Pro Gln Val Ala Thr Tyr His Arg Ala Ile
 165 170 175

Lys Ile Thr Val Asp Gly Pro Arg Glu Pro Arg Arg His Arg Gln Lys
 180 185 190

Leu Asp Asp Gln Thr Lys Pro Gly Ser Leu Ser Phe Ser Glu Arg Leu
195 200 205

Ser Glu Leu Glu Gln Leu Arg Arg Thr Ala Met Arg Val Ser Pro His
210 215 220

His Pro Ala Pro Thr Pro Asn Pro Arg Ala Ser Leu Asn His Ser Thr
225 230 235 240

Ala Phe Asn Pro Gln Pro Gln Ser Gln Met Gln Glu Glu Asp Thr Ala
245 250 255

Pro Trp Arg Cys
260

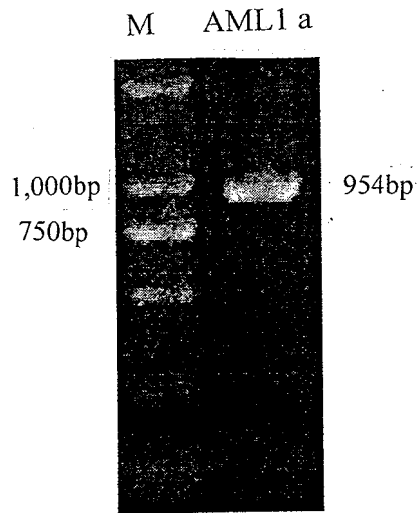


图 1

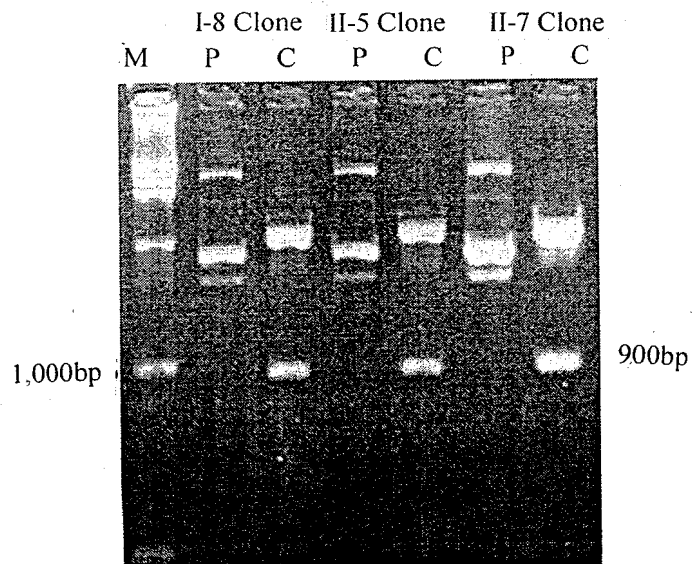


图 2

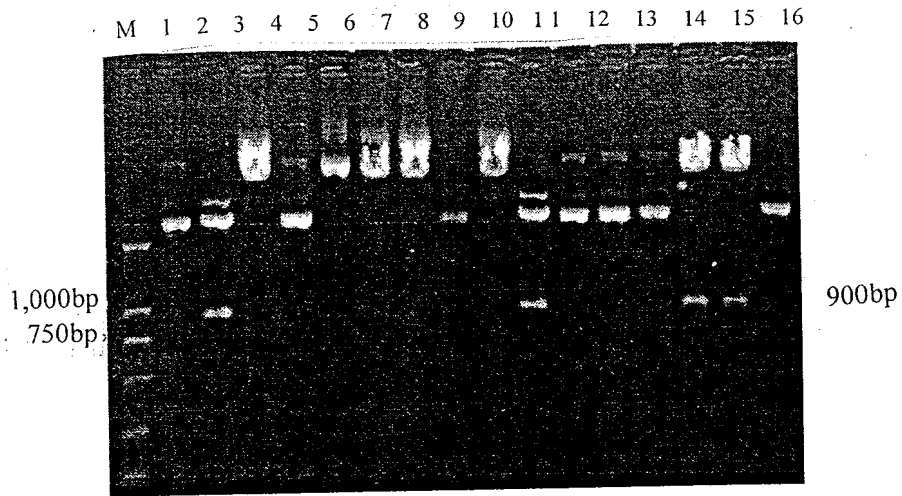


图 3

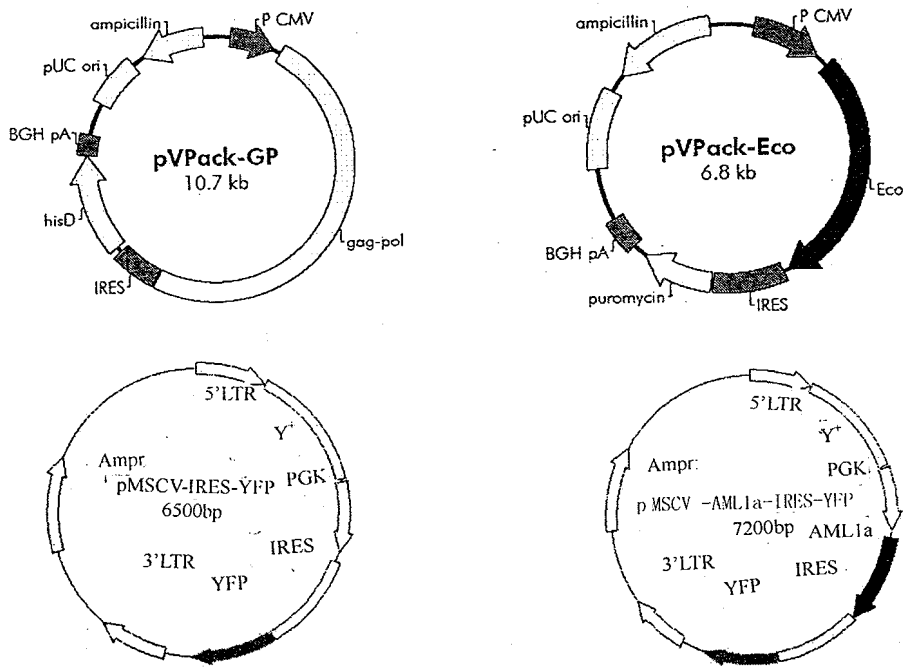


图 4

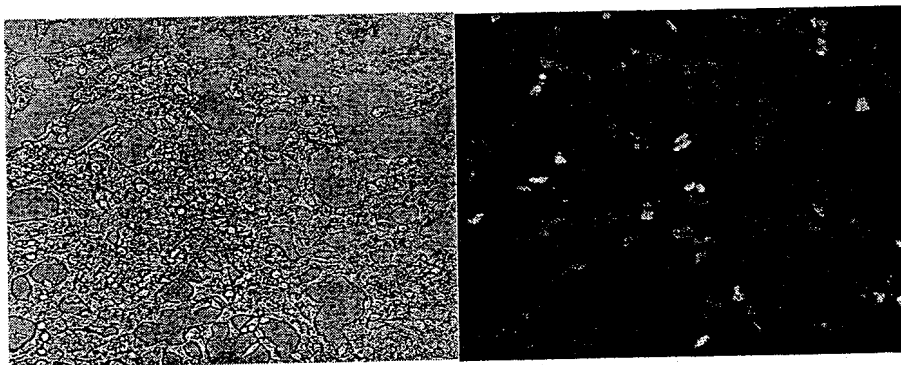


图 5

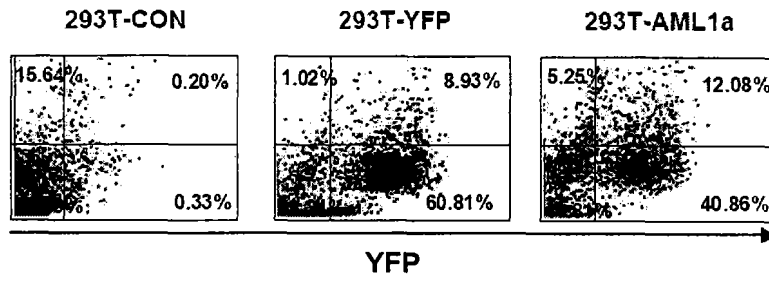


图 6

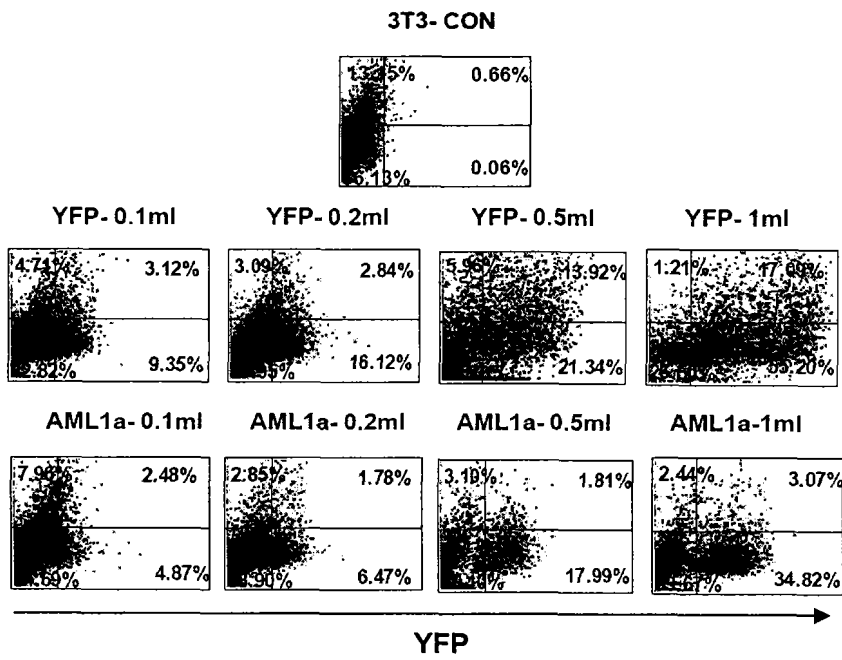


图 7

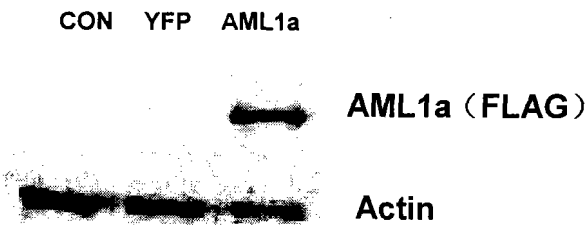


图 8

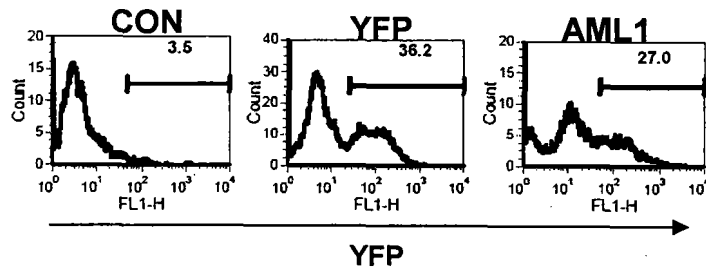


图 9

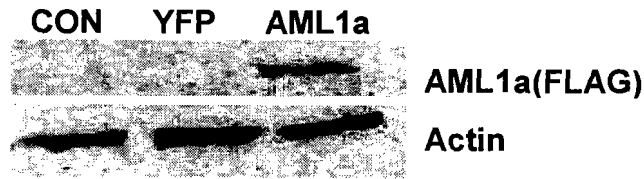


图 10

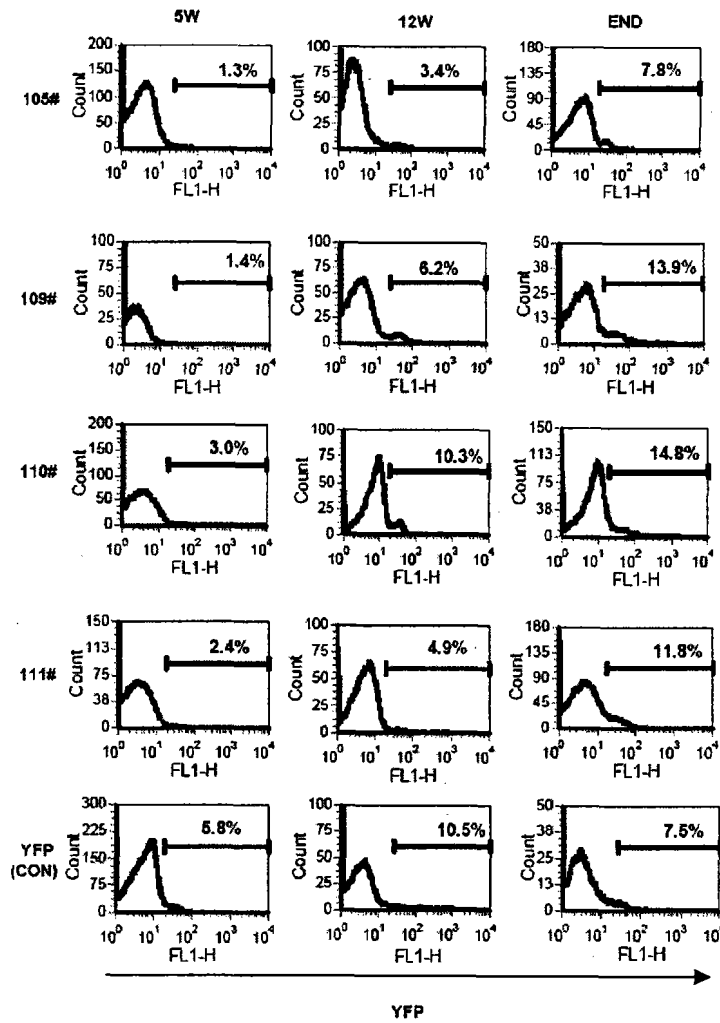


图 11

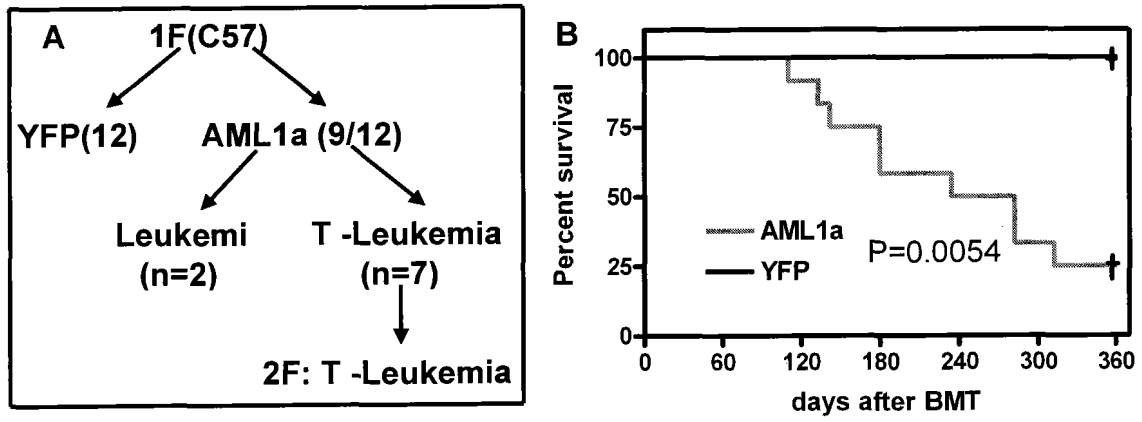


图 12

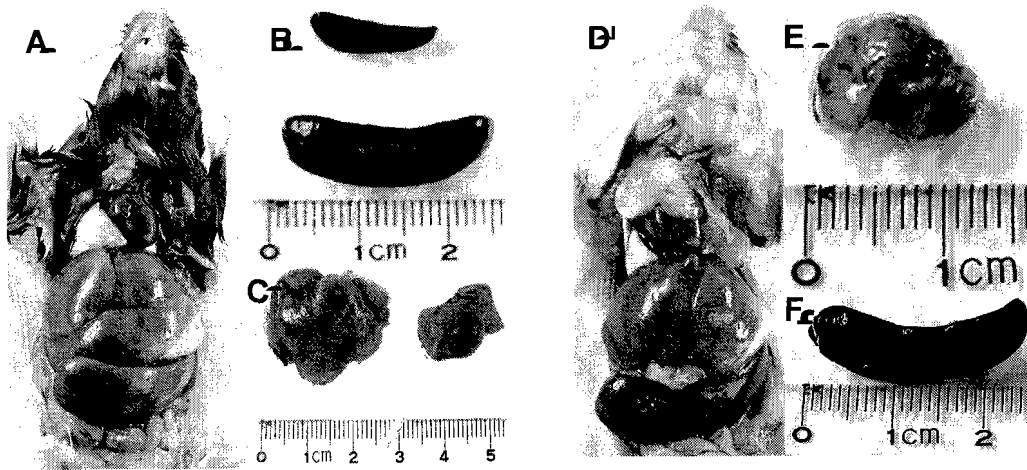


图 13

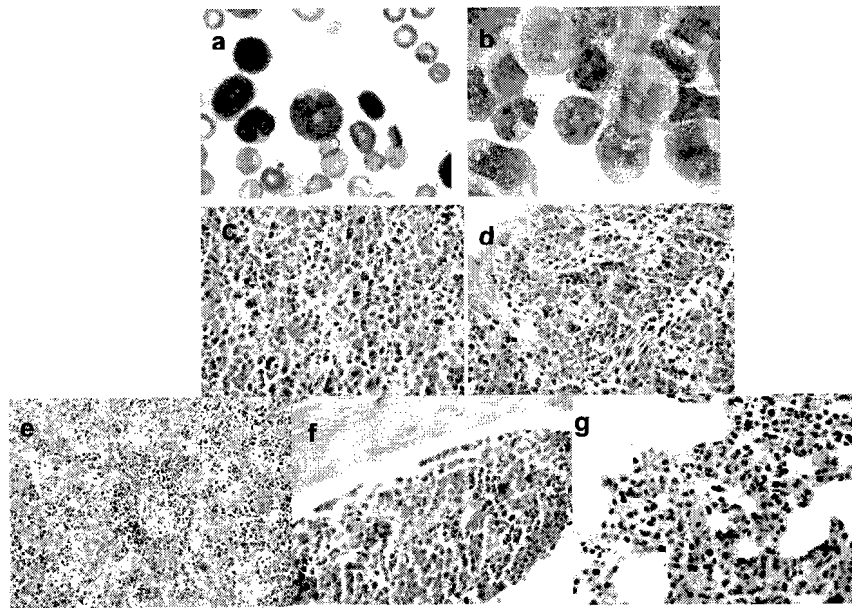


图 14

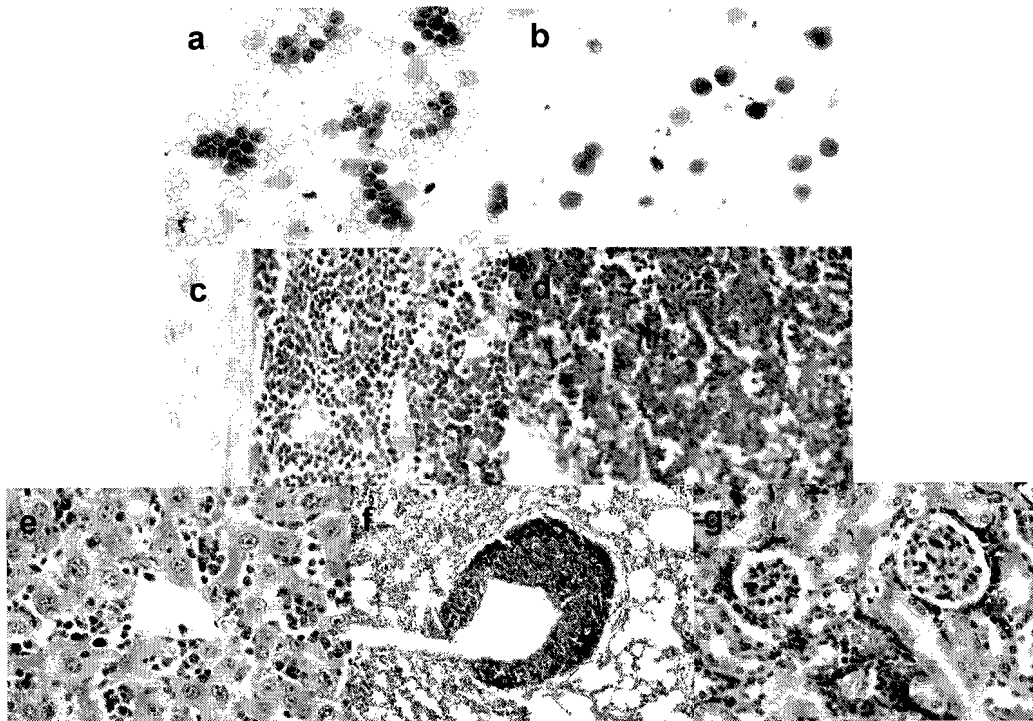


图 15

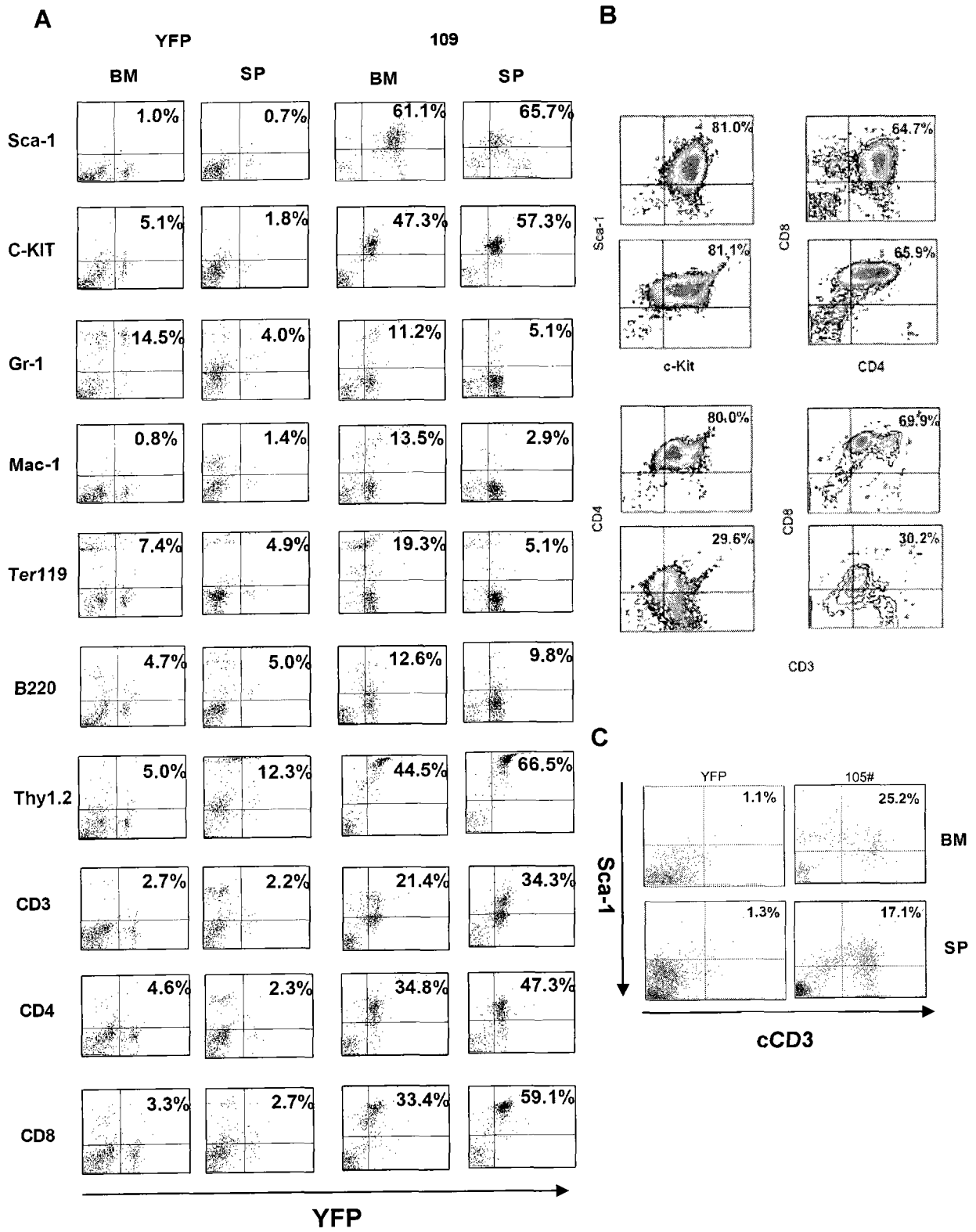


图 16

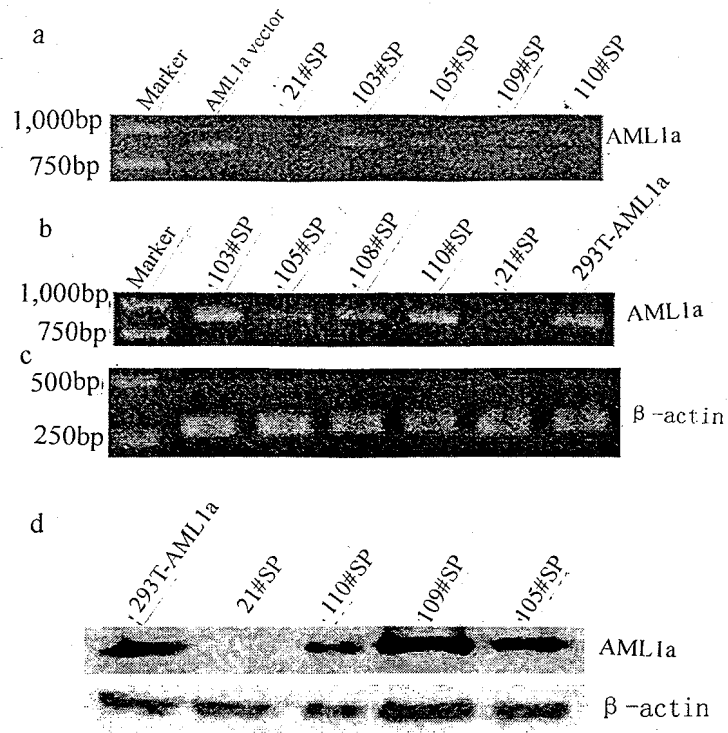


图 17

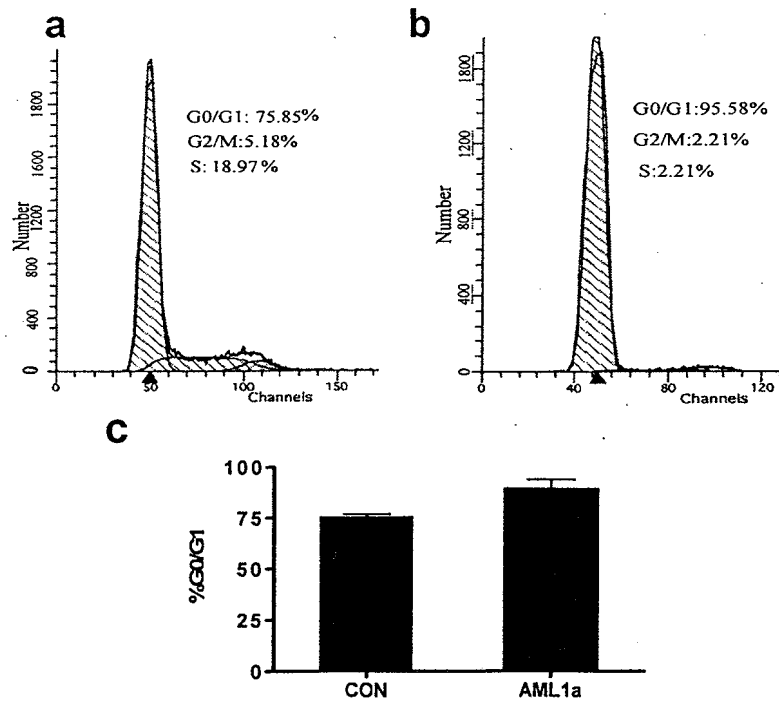


图 18

专利名称(译)	转导人AML1a基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN101358191A	公开(公告)日	2009-02-04
申请号	CN200810053756.7	申请日	2008-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院血液学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院血液学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院血液学研究所		
[标]发明人	王建祥 刘向荣 王敏 饶青 邢海燕		
发明人	王建祥 刘向荣 王敏 饶青 邢海燕		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/867 C12N5/10 G01N15/10 G01N21/64 G01N21/78 G01N33/53 C12Q1/68 A01K67/027		
代理人(译)	王晓红		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种转导人AML1a基因的淋巴细胞白血病小鼠模型的制备方法及应用，包含AML1a基因的逆转录病毒载体的构建、逆转录病毒的制备、骨髓细胞的感染、小鼠骨髓移植和模型鉴定。本发明采用分子生物学、细胞生物学等方法转导了AML1a基因至小鼠骨髓细胞中，成功建立了具有双表型的T-淋巴细胞白血病的模型，为进一步阐述白血病的发病机制以及靶向治疗奠定了良好的基础。

