



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102080098 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 01

(21) 申请号 201010576421. 0

A61K 48/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 12. 07

A61P 35/02 (2006. 01)

(71) 申请人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

(72) 发明人 刘厚奇 孙擎 杨玲

(74) 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204

代理人 丁振英

(51) Int. Cl.

C12N 15/79 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C07K 19/00 (2006. 01)

C12P 21/02 (2006. 01)

A61K 38/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 序列表 2 页

附图 3 页

(54) 发明名称

一种真核表达载体以及在制备抑制白血病细胞增殖药物中的应用

(57) 摘要

本发明涉及基因工程技术领域,本发明的目的在于提供一种将 LIFR α -CT3 与 TAT-PTD 技术结合起来的真核表达载体以及在制备抑制白血病细胞增殖药物中的应用,本发明提供了一种真核表达载体,它含有如 SEQ IDNO:1 所示的核苷酸序列,本发明还提供了上述真核表达载体转染的 CHO 细胞系,本发明还涉及利用上述 CHO 细胞系生产的多肽 190CT3 具有很高的稳定性和穿膜性,可以显著改善临床早幼粒白血病治疗中全反式维甲酸+常规化疗带来的靶向性差,易抗药,药物入胞/入核难的问题。体外实验证实,190CT3 多肽直接作用于急性粒系白血病细胞,可迅速穿透细胞膜和核膜,进而抑制其增殖,促进朝成熟粒细胞方向分化。

1. 一种真核表达载体,它含有如 SEQ ID NO :1 所示的核苷酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的真核表达载体,其特征在于该真核表达载体是 pcDNA3.0。
3. 用权利要求 1 或 2 所述的真核表达载体转染入中国仓鼠卵巢癌细胞所得的细胞株。
4. 根据权利要求 3 所述的细胞株制备的蛋白。
5. 权利要求 1 或 2 所述的真核表达载体制备的蛋白。
6. 权利要求 4 所述的蛋白在制备抑制白血病细胞增殖药物中的应用。
7. 权利要求 5 所述的蛋白在制备抑制白血病细胞增殖药物中的应用。
8. 权利要求 1 或 2 所述的真核表达载体在制备抑制白血病细胞增殖药物中的应用。

一种真核表达载体以及在制备抑制白血病细胞增殖药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种真核表达载体,以及该真核表达载体在制备抑制白血病细胞增殖药物中的应用。

背景技术

[0002] 白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory factor, LIF) 作为的 IL-6 细胞因子家族的一员,能够抑制白血病细胞,例如人 HL-60、U937、小鼠 M1 系的增殖。然而,白血病细胞增长快速并对 LIF 感应能力差的特性,使得机体内有限的 LIF 无法有效抑制白血病细胞的生长 [T.Maekawa, D.Metcalf, Clonalsuppression of HL60 and U937 cells by recombinant human leukemia inhibitoryfactor in combination with GM-CSF or G-CSF, Leukemia 3(1989)270-276 ;D. P. Gearing, N. M. Gough, J. A. King, D. J. Hilton, N. A. Nicola, R. J. Simpson, E. C. Nice, A. Kelso, D. Metcalf, Molecular cloning and expression of cDNA encoding amurine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF), EMBO J 6(1987)3995-4002 ;T. Maekawa, D. Metcalf, D. P. Gearing, Enhanced suppression of human myeloidleukemic cell lines by combinations of IL-6, LIF, GM-CSF and G-CSF, Int J Cancer 45(1990)353-358.]。而外源性、非生理剂量的 LIF 对脂肪细胞、生殖细胞和内分泌细胞等正常细胞具有显著的细胞毒性,同时干扰了细胞因子间的正常协调作用,所以 LIF 的药用价值也不能得到有效地体现 [D. Metcalf, N. A. Nicola, D. P. Gearing, Effects of injected leukemia inhibitory factor onhematopoietic and other tissues in mice, Blood 76(1990)50-56.]。

[0003] LIF 是一种多功能、作用广泛的细胞因子。它的广泛生物学效应是通过结合靶细胞膜上的 LIF 受体 (LIFR) 来实现的。LIFR 包括两个亚基, LIFR α (gp190) 和 LIFR β (gp130)。其中, LIFR α 含有 1239 个氨基酸,胞外区由 789 个氨基酸构成,跨膜区由 26 个疏水氨基酸组成,胞内去由 238 个氨基酸构成。LIFR α 的胞内区共有三个功能域 (Box1、Box2 和 Box3), 这一官能的主要作用结构为 YXXQ (Y 为酪氨酸, X 为任意氨基酸, Q 为谷氨酰胺), 是激活细胞内信号分子的必须序列,在 LIF-LIFR 的信号通路激活过程中, LIF 首先与 LIFR α 结合,并使之与另一受体亚基 β 结合形成异源性二聚体,进而启动细胞内信号转导,引导胞外的信号转入核内,调控特定基因的表达,使细胞产生一系列的生理或病理变化 [Y. Zhang, T. Willson, D. Metcalf, D. Cary, D. J. Hilton, R. Clark, N. A. Nicola, The box-1 region of the leukemia inhibitory factor receptoralpha-chain cytoplasmic domain is sufficient for hemopoietic cell proliferation anddifferentiation, J Biol Chem 273(1998)34370-34383.]。

[0004] 申请人的前期工作中已证实,通过脂质体转染的方式,将 LIFR α 细胞内区全长序列 (LIFR α -CT) 和含 Box3 功能域的 C 末端序列 (LIFR α -CT3) 分别富集于人类急性早幼粒白血病细胞 HL-60 胞质中,可促进该系白血病细胞的粒细胞方向分化,并有效抑

制其增殖潜力 [H. Liu, J. Dan, S. Tang, S. Wu, Involving of the cytoplasmic region of leukemia inhibitory factor receptor alphasubunit, IL-6 related signal transducer-gp 130 or fas death domain for MAPKp42/44 activation in HL-60 cell with LIF or anti-Fas IgG, Mol Cell Biochem 217(2001)113-120 ;H. Liu, S. Liu, S. Tang, K. Ji, F. Wang, S. Hu, Molecular analysis of signaling events mediated by the cytoplasmic domain of leukemia inhibitory factor receptor alpha subunit, Mol Cell Biochem 258(2004)15-23 ;L. Yang, S. R. Liu, S. P. Tang, F. M. Wang, H. Q. Liu, [Effects of the box-3 region of the LIFR alpha-chain cytoplasmic domain(gp190CT3) on the proliferation and differentiation of HL-60 cells.], Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 25(2004)679-682.],这与临床目前治疗急性早幼粒白血病经典方案,即全反式维甲酸+常规化疗药物的治疗原则是完全一致的。但脂质体转染的方式只能应用于体外实验,如何将 LIFR α -CT3 高效能地在病理性白血病细胞内乃至胞核内富集,仍需进一步探索。

[0005] 蛋白质转导结构域 (protein transduction domain, PTD) 或称细胞穿膜肽 (cell penetrating peptides, CPPs) 是一条以肽为载体的有效运输各种物质进入细胞及细胞核的系统 [Y. Wang, H. Lin, S. Lin, J. Qu, J. Xiao, Y. Huang, Y. Xiao, X. Fu, Y. Yang, X. Li, Cell-penetrating peptide TAT-mediated delivery of acidic FGF to retina and protection against ischemia-reperfusion injury in rats, J Cell Mol Med(2009) ; V. P. Torchilin, Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery, Biopolymers 90(2008)604-610.]。通过不同途径,可经 PTD 携带入胞/核的物质有全长蛋白质、DNA、化学药物、寡核苷酸、40nm 磁珠和 200nm 脂质体等 [L. N. Johnson, S. M. Cashman, R. Kumar-Singh, Cell-penetrating peptide for enhanced delivery of nucleic acids and drugs to ocular tissues including retina and cornea, Mol Ther 16(2008)107-114 ;W. J. Ryves, A. J. Harwood, Use of a penetratin-linked peptide in dictyostelium, Mol Biotechnol 33(2006)123-132.]。目前研究中最常用的 PTD 是人类免疫缺陷 I 型病毒 (HIV-1) 来源的 TAT 蛋白 (TAT-PTD) 片段,其全长翻译后仅为 11 个富含酸性氨基酸的寡肽,与其他 PTD 比较, TAT-PTD 具有短小、高效、不影响下游分子生理功能的优良特性 [L. Jiang, Y. Ma, J. Wang, X. Tao, D. Wei, The transduction of His-TAT-p53 fusion protein into the human osteogenic sarcoma cell line (Saos-2) and its influence on cell cycle arrest and apoptosis, Mol Biol Rep 35(2008)1-8.]。

[0006] TAT 可以有效地介导外源物质进入细胞。1998 年, Nagahara 等发现 TAT-PTD 与其他蛋白融合表达的蛋白质 (TAT-蛋白质) 能够高效地进入体外培养的细胞,并且表现出生物学功能,具有生物学活性 [H. Nagahara, A. M. Vocero-Akbani, E. L. Snyder, A. Ho, D. G. Latham, N. A. Lissy, M. Becker-Hapak, S. A. Ezhevsky, S. F. Dowdy, Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells; TAT-p27Kip1 induces cell migration, Nat Med 4(1998)1449-1452.]。近些时候,严世荣、李敬风等将 TAT 蛋白的 PTD 区段编码基因与外源蛋白基因连接表达融合蛋白,再将其转入小鼠体内,发现融合蛋白可以快速到达体内各组织,且表现出较强生物活性 [严世荣,严洁,等, Tat- β -半乳糖苷酶对小鼠生物膜穿透性的研究,基础医学与临床 22(2002)343-345 ;李敬风,严洁,

方峰,陈宝芳,孙万群,严世荣, Tat 融合蛋白在 sd 大鼠肾组织表达的研究, 鄯阳医学院学报 22(2003)197-199.]。作为蛋白转导结构功能域, TAT-PTD 全长仅含 11 个氨基酸 (TAT-PTD₄₉₋₅₇:YGRKKRRQRRR), 却能将与之连接的近 100% 的融合物高效带入细胞膜和核膜。故其机制虽仍待进一步阐明, TAT-PTD 依然得到了广大科研工作者的广泛应用。总体来说, TAT-PTD 的生物学应用主要是通过融合蛋白的形式, 利用细菌表达载体与靶基因、靶肽、靶氨基酸等连接来实现的。一般来说, TAT 的融合蛋白也都含有某种蛋白“标签”, 以便于进一步的纯化。纯化后的 TAT 融合蛋白可直接应用于体外培养的细胞体系内或实验动物体内。以上技术虽然实用、成熟、蛋白产量充足, 但费时费力, 经济性差 [Barka T, Gresik ES, Henderson SC(2004) Production of celllines secreting tat fusion proteins. J Histochem Cytochem 52(4):469-477]。且原核表达体系得到的融合蛋白缺乏转录后的剪切、翻译修饰, 很大程度上存在无生物活性的可能性。

[0007] 申请人已于 2004 年 3 月 24 日就含有 gp190CT3 基因的重组表达载体申请了中国专利, 并获得授权, 专利号为 ZL200410017156.7, 发明名称为: 抑制白血病细胞增殖的重组表达载体。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种将 LIFR α -CT3 与 TAT-PTD 技术结合起来的真核表达载体以及在制备抑制白血病细胞增殖药物中的应用, 该真核表达载体不仅能够得到高纯度融合蛋白 LIFR α -CT3, 而且表达的 LIFR α -CT3 能够高效地在病理性白血病细胞内乃至胞核内富集。

[0009] 本发明是在申请人的中国专利 ZL200410017156.7 基础上, 根据采用 LIFR α -CT3 能激活 STAT3 分子这一事实, 将含有 LIFR α 的 Box3 基因的 LIFR α -CT3 与 TAT-PTD 紧密结合, 构建成含有二者的重组真核表达载体; 再通过设计相应引物, 使用 PCR 的方法并插入相应的人体免疫球蛋白 IgG 重链来源的信号肽序列 (N 端) 和 cMyc 蛋白纯化标签 (C 端), 本发明的 pcDNA3.0-ss-TAT-CT3-cMyc 重组质粒及插入片段示意图 1 所示。

[0010] 本发明提供了一种真核表达载体, 它含有以下序列 - 自 N 端至 C 端分别含有以下基因片段: 人体免疫球蛋白 IgG 重链来源的信号肽增强子及序列、蛋白转导结构功能区 HIV-1 型病毒来源的 TAT-PTD、gp190-CT3 基因、cMyc 蛋白纯化标签; 具体序列如下:

[0011] GCCGCCACCATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATATCCAGAGGATATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGGCGGTTATCAGCCTCAAGCAAAACCAGAAGAAGAACAAGAAAATGACCCTGTAGGAGGGGCAGGCTATAAGCCACAGATGCACCTCCCCATTAATTCTACTGTGGAAGATATAGCTGCAGAAGAGGACTTAGATAAACTGCGGGTTACAGACCTCAGGCCAATGTAAATACATGGAATTTAGTGTCTCCAGACTCTCCTAGATCCATAGACAGCAACAGTGAGATTGTCTCATTTGGAAGTCCATGCTCCATTAATTCCCGACAATTTTGATTCTCCTAAAGATGAAGACTCTCCTAAATCTAATGGAGGAGGGTGGTCCTTTACAACTTTTTTCAGAACAACCAAACGATGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTAG (如 SEQ ID NO:1 所示);

[0012] 上述真核表达载体是 pcDNA3.0。

[0013] 本发明还提供了上述真核表达载体转染入 CHO 细胞所得的细胞株 CHO-190CT3。具体技术方案为: 将以上重组载体转染入中国仓鼠卵巢癌细胞 (CHO 细胞) 后加 G418 筛选, 挑取单克隆后大量扩增 CHO 细胞, 得到含有融合蛋白细胞培养基上清。该上清经包被有抗

cMyc 凝胶的蛋白层析柱纯化,即可得到高纯度的 190CT3(如图 2 所示)。

[0014] 本发明还提供了上述细胞株 CHO-190CT3 所制备的蛋白 190CT3。

[0015] 本发明还提供了上述真核表达载体在制备抑制白血病细胞增殖药物中的应用。

[0016] 本发明的技术方案主要包括以下几部分:

[0017] 分别合成含有信号肽(ss)、cMyc 标签(cMyc),TAT-PTD(TAT)和 LIFR α -CT3 的相应引物;

[0018] 经典分子生物学方法(参见《分子克隆实验指南》,美国冷泉港出版社)构建含有以上基因的重组真核质粒 pcDNA3.0-190CT3;

[0019] 转染 pcDNA3.0-190CT3 入 CHO 细胞并 G418 加压筛选,建立高表达 pcDNA3.0-190CT3 的真核表达细胞株。

[0020] 收集 CHO 培养基上清,通过针对 cMyc 蛋白标签的特异性蛋白层析柱纯化得到融合蛋白 190CT3。

[0021] 本发明经体外实验发现,浓度 30 μ g/ml 时,190CT3 针对人早幼粒白血病细胞 HL-60 具有高效穿膜性,可在 30 分钟内穿入透胞膜/核膜;进一步研究发现,190CT3 可以替代 LIF,启动信号转导,抑制早幼粒白血病细胞的生长,促进其朝粒细胞方向分化,且无明显毒副作用,因而可作为针对早幼粒白血病细胞的特异性蛋白治疗剂(如图 3 与图 4 的示)。

[0022] 本发明公开了表达抑制急性粒细胞白血病(M1 和 M3)增殖的 190CT 多肽的真核表达载体以及 CHO 细胞系,其含有蛋白转导结构功能域(HIV1-TAT)及白血病抑制因子(LIF)受体 α 亚基胞内区含功能域 Box-3 的 C-末端序列的基因。本发明得到的多肽 190CT3 具有很高的稳定性和穿膜性,可以显著改善临床早幼粒白血病治疗中全反式维甲酸+常规化疗带来的靶向性差,易抗药,药物入胞/入核难的问题。体外实验证实,190CT3 多肽直接作用于急性粒系白血病细胞,可迅速穿透细胞膜和核膜,进而抑制其增殖,促进朝成熟粒细胞方向分化。

附图说明

[0023] 图 1:pcDNA3.0-190CT3 重组质粒及插入片段示意图。

[0024] 图 2:转染了 pcDNA3.0-190CT3 分泌的上清经纯化、浓缩后,考马斯亮蓝染色和免疫印迹染色的结果(其中 ss-CT3-cMyc 是转染了 pcDNA3.0-ss-CT3-cMyc 的 CHO 细胞株所做对照)。

[0025] 图 3:不同时间点下,免疫荧光术检测浓度为 30 μ g/ml 的融合蛋白加入 HL-60 培养基后,入胞和入核的效率对照,

[0026] 其中 A:PBS 阴性对照;B:ss-CT3-cMyc 组;C:ss-TAT-CT3-cMyc 组。图 4:同一时间点(1h),免疫荧光术标记不同浓度的融合蛋白 190CT3 加入 HL-60 培养基后,入胞/入核量与剂量的对应关系。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图和实施例对本发明作详细描述,但本发明的实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的保护范围。

[0028] 实施例 1:构建 pcDNA3.0-190CT3 真核表达载体

[0029] 1.1 所需试剂

[0030] 限制性内切酶 Sal I, Nhe I, Xho I 和 BamH I 均购于上海英骏公司 (Invitrogen, 上海)。DNA 聚合酶、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒购于宝生物工程有限公司 (Takara, 大连)。真核表达载体 pcDNA3.0 购于美国 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA, USA)。鼠抗人 cMyc 表位 (标签) 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司 (Santa Cruz, CA, USA); FITC 标记的荧光山羊抗鼠二抗购于上海康成公司 (康成, 上海)。以下所有引物合成均由上海英骏 (Invitrogen, 上海) 完成。

[0031] 1.2 真核载体 pcDNA3.0-190CT3 的构建准备

[0032] 以真核表达载体 pcDNA3.0-gp190CT3 为模板 (制备方法参见中国专利 ZL200410017156.7), 采用标准 PCR 扩增流程 (94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 30s, 30 个循环), 和以下引物完成:

[0033] 上游引物:

[0034] 5'-CGC GGATCC GCCGCCACCATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATATCCAGAGGA GCTAGC CGC GTCC AC TATCAGCCT-3' (如 SEQ ID NO:2 所示)

[0035] 下游引物:

[0036] 5'-CCG CTCGAG CTACAGATCCTCTCTGAGATGAGTTTTTGTTCATCGTTTGGTTTGTTC-3' (如 SEQ ID NO:3 所示)

[0037] 其中上游引物含有 BamH I, Nhe I, Sal I 三个酶切位点 (方框) 和人 IgG 重链来源的信号肽序列 (下划线); 下游引物含有 Xho I 酶切位点 (方框内) 和 cMyc 蛋白纯化标签全长 (下划线)。以上 PCR 产物约含 492 个碱基对 (bp)

[0038] (序列为: CGCGGATCCGCCGCCACCATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATATCCAGAGGAGCTAGCCGCGTCTGACTATCAGCCTCAAGCAAAACCAGAAGAACAAGAAAA TGACCCTGTAGGAGGGGCAGGCTATAAGCCACAGATGCACCTCCCCATTAATTCTACTGTGGAAGATATAGCTGCA GAAGAGGACTTAGATAAACTGCGGGTTACAGACCTCAGGCCAATGTAAATACATGGAATTTAGTGTCTCCAGACTC TCCTAGATCCATAGACAGCAACAGTGAGATTGTCTCATTTGGAAGTCCATGCTCCATTAATCCCGACAATTTTTGA TTCCTCCTAAAGATGAAGACTCTCCTAAATCTAATGGAGGAGGGTGGTCTTTACAAACTTTTTTCAGAACAAACC AAACGATGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTAGCTCGAGCGG), 经常规电泳, 胶回收后, 测序正确率为 100%。

[0039] 针对 TAT-PTD 的插入片段 (Genbank Accession No. AAT48070; TATGGCAGGAAGAAGC GGAGACAGCGACGAAGA), 首先, 由 Invitrogen 公司合成两条核苷酸链, 序列分别为

[0040] 上游: 5'-CTAGCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAG-3' (如 SEQ ID NO:4 所示);

[0041] 下游: 5'-TCGACTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCGTGCCATAG-3' (如 SEQ ID NO:5 所示)。

[0042] 此两条核苷酸链含有互补的 TAT-PTD 序列 (下划线), 并在两端分别设计有针对 Nhe I 和 Sal I 的粘性末端。经常规去火程序 (等体积混合两核苷酸链, 95°C 2min 后在 45min 内冷却至 25°C) 后直接放入 4°C 保存。

[0043] 1.3 真核载体 pcDNA3.0-190CT3 的构建

[0044] 按常规流程,用 BamH I 和 Xho I 内切酶分别酶切以上 PCR 产物和载体 pcDNA3.0,用胶回收试剂盒回收酶切后的 DNA 片段,然后以基因片段与载体片段摩尔比约 3 : 1 进行连接反应。反应体系 (10 μ l) 包括 :T4 连接酶缓冲液 1 μ l,载体片段 50ng,基因片段 20ng, T4 连接酶 1 μ l,余用去离子水补足。反应混合物置于 16℃ 连接过夜,然后取全部连接产物置于 100 μ l 的 DH5 α 感受态细菌中,0℃ 冰浴 30min,43℃ 热休克 90s,二次冰浴 2min,加入 LB 培养基 800 μ l,37℃ 培养 1h,5000rpm 离心 5min,弃掉 800 μ l 上清,将菌体均匀涂布于 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上,37℃ 倒置培养 18h。从转化的平皿中挑去若干独立菌落接种于 3ml 含相应抗性的 LB 培养基中,37℃ 震荡 12h 后送上海英骏公司测序。经测序鉴定,获得 pcDNA3.0-ss-CT3-cMyc 重组质粒。对真核载体 pcDNA3.0-190CT3,则用 Nhe I 和 Sal I 内切酶酶切以上载体 pcDNA3.0-ss-CT3-cMyc,用胶回收试剂盒回收酶切后的 DNA 片段,然后将以上去火后的 TAT-PTD 插入片段与载体片段以摩尔比约 3 : 1 进行连接反应。连接后转化、涂板、挑克隆、测序操作与前述相同。经最终测序鉴定,可得 pcDNA3.0-ss-TAT-CT3-cMyc (pcDNA3.0-190CT3) 重组质粒。

[0045] 实施例 2 :建立稳定的 pcDNA3.0-190CT3 重组 CHO 细胞株

[0046] 首先确定筛选培养基中合适的 G418 (Invitrogen) 浓度,方法如下 :24 孔细胞培养板接种每孔 1000 个 CHO 细胞,并加 G418 使其浓度分别为 500、1000、2000、3000 μ g/ml,选择能在 10 ~ 14 天把细胞彻底杀死的孔作为 G418 的筛选浓度。

[0047] 参照转染试剂 Eugene 6 操作说明书转染 pcDNA3.0-190CT3 至 CHO 细胞。转染后 24 小时,按 1 : 10 比例进行细胞传代,用含有 3000 μ g/ml G418 的压力筛选培养液筛选培养细胞,10 ~ 14 天后,用克隆环圈住具有新霉素抗性的细胞克隆集落,胰酶消化下后依次于 96 孔、24 孔和 6 孔细胞培养板扩大培养。筛选出的不同细胞克隆按照 0.5×10^6 个细胞接种于 6 孔板中生长至密度为 90% 左右时,胰酶消化下细胞后,使用 RT-PCR 方法检测相关基因的表达,所用引物如下 :

[0048] 上游 :5' -GGAGACAGCGACGAA-3' ;

[0049] 下游 :5' -TTGTAAAGGACCACCC-3' ;

[0050] 所用内参为 Hirp3,引物序列如下 :

[0051] 上游 :5' -CGTTATATTCGGGCTTGTGG-3' ;

[0052] 下游 :5' -GGTCGACCTGAACTGCTGAT-3' 。

[0053] 选择表达水平最高的克隆扩增并按常规方法冻存细胞,命名为 CHO-190CT3。

[0054] 实施例 3 :融合蛋白 190CT3 的分离与纯化

[0055] 将以上 CHO-190CT3 细胞株按照以下培养基成分,在 75cm² 培养瓶中进行扩大培养 :90% RPMI 1640 培养基,9% 胎牛血清 (FBS),1% 青链霉素,并在传代细胞贴壁后添加 3000 μ g/ml G418 新霉素。培养条件为 37℃ +5% CO₂。待细胞融合至 70 ~ 80% 时,将培养基更换 15ml 100% RPMI 1640 培养基。72 小时后回收上清,10000rpm 离心 20min 去除细胞碎片,将剩余上清马上置于 -20℃ 保存。重复以上上清回收程序直至回收量达到 1L。在使用蛋白层析柱纯化相关蛋白前,将上清置于 4℃,使其缓慢融化,然后通过 0.45 μ m 滤器去除可能的杂质、死细胞及细胞碎片,准备上样至蛋白层析柱。

[0056] 使用 Sigma-Aldrich 公司生产的针对 cMyc 蛋白标签的凝胶 (ANTI-c-MycAGAROSE

CONJUGATE, A7470, Sigma Aldrich, USA) 包被蛋白层析柱。包被完成后严格按照说明书冰上操作。得到的溶于氨水的融合蛋白溶液使用 1N 醋酸进行中和,使其 pH 值维持在约 7.0。然后,使用 4℃离心机和 3000MWC0 超滤管 (Millipore, 上海),3500rpm 离心浓缩至约 2ml,分装后 -80℃冻存备用。

[0057] 融合蛋白的浓度测定使用上海生工公司的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行。

[0058] 转染了 pcDNA3.0-190CT3 及其对照质粒 pcDNA3.0-ss-CT3-cMyc 的 CHO 分泌的上清经纯化、浓缩后,考马斯亮蓝染色和免疫印迹染色的结果显示,与空白对照 PBS 相比,pcDNA3.0-ss-CT3-cMyc 与 pcDNA3.0-190CT3 组均在 18kDa 左右出现了明显蛋白条带;从左至右,第 1~第 4 泳道,考马斯亮蓝染色;第 5~第 7 泳道,使用 cMyc 标签特异性抗体标记的免疫印迹实验。

[0059] 实施例 4:急性早幼粒白血病细胞 HL-60 实验(体外实验)

[0060] 利用免疫荧光、细胞计数、流式细胞仪、免疫印迹等分子生物学实验方法,从形态学、相关蛋白表达量、融合蛋白入胞/入核情况及磷酸化水平等方面分析细胞形态变化;STAT3 分子磷酸化、Jak2 分子磷酸化水平及粒细胞表明标志物 CD14 和 CD15 来分析融合蛋白对 HL-60 细胞分化与增殖的影响。

[0061] 具体方法如下:

[0062] 1) 细胞生长状态的比较

[0063] 按照 30 μ g/ml 的终浓度将以上纯化后的融合蛋白加入标准 HL-60 细胞培养体系中,用倒置相差显微镜观察按照不同时间点(1~7 天)排列的 HL-60 细胞及野生型 HL-60 细胞(每 24 小时补充添加融合蛋白一次),7 天内可见加入融合蛋白后的 HL-60 细胞组与野生型 HL-60 细胞相比,细胞密度偏小,将 2 组分别计数后绘制细胞生长曲线。结果显示:添加有融合蛋白 190CT3 的 HL-60 细胞组增殖明显趋缓。

[0064] 2) 细胞分化水平的比较

[0065] 将以上实验组和对照组 HL-60 细胞在 7 天时,通过流式细胞仪检测粒细胞表面分化抗原 CD14 和 CD11b 的表达差异。使用 BD 公司提供的(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) Calibur[®]流式细胞仪和 CD14, CD11b 抗体,严格按照说明书操作,结果使用 FACSCalibur 和 CELLQuest 3.0 版本的软件进行分析处理(Becton Dickson, San Jose, CA, USA)。结果显示,与野生型 HL-60 细胞比较,实验组 HL-60 细胞的 CD14 与 CD11b 均显著提高,证实融合蛋白 190CT3 可在短时间内促进急性早幼粒白血病细胞朝粒细胞方向分化。

[0066] 3) 免疫荧光检测融合蛋白 190CT3 的入胞/入核情况

[0067] 制备以上实验组与对照组 HL-60 的细胞图片,方法记述于(J.P.Bach, H. Borta, W. Ackermann, F. Faust, O. Borchers, M. Schrader, The secretory granule protein syncollin localizes to HL-60 cells and neutrophils, J Histochem Cytochem 54(2006)877-888.) 一文中。用免疫荧光术检测 LIFR α 的表达情况。一抗为兔抗人 LIFR α 抗体(Santa Cruz, USA);二抗为 FITC 标记的山羊抗兔 IgG(北京中山生物技术有限公司)。结果:经融合蛋白 190CT3 刺激后的 HL-60 细胞与野生型 HL-60(LIFR α 阴性)相比,30 分钟内即可在 1.0×10^5 个早幼粒白血病 HL-60 细胞、胞核内均显示 LIFR α 强阳性,且此阳性结果在 8h 后仍可检测到(图 3)。而在同一时间点(1h)上,免疫荧光术标记不同浓度的融合蛋白 190CT3 加入 HL-60 培养基后,入胞/入核量与剂量的对应关系如下:随着

融合蛋白浓度的不断增加,进入 HL-60 细胞的蛋白量(以荧光强度示)在 30 μ g/ml 190CT3 时达到顶峰,与之相比,即使 190CT3 量增至 50 μ g/ml 时亦未见荧光强度明显增强(图 4)。这说明融合蛋白 190CT3 可高效进入 HL-60 细胞,并参与细胞的代谢和细胞通路变化。

[0068] 上述实验证实:本发明的重组融合蛋白表达载体 pcDNA3.0-190CT3 通过真核表达体系 CHO 细胞的高效表达,可分泌重组融合蛋白 190CT3;该重组融合蛋白在经过 cMyc 蛋白层析柱纯化后能在短时间内高效率的进入白血病细胞,并最终导致其增殖受抑制,粒系分化程度增高。这说明 190CT3 融合蛋白可代替 LIF 启动 STAT3 信号通路,抑制白血病细胞的增殖并促进其向粒细胞方向分化。

[0069] 因而,本发明重组表达载体可用于制备抑制白血病细胞增殖的靶向性蛋白药物。

[0001]

序列表
SEQUENCE LISTING

<110> 中国人民解放军第二军医大学

<120> 一种真核表达载体以及在制备抑制白血病细胞增殖药物中的应用

<130> 说明书, 权利要求书

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 498

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gccgccacca tggattttca ggtgcagatt ttcagcttcc tgctaatacag tgcctcagtc 60

ataatatcca gaggatatgg caggaagaag cggagacagc gacgaagagg cggttatcag 120

cctcaagcaa aaccagaaga agaacaagaa aatgacctg taggaggggc aggctataag 180

ccacagatgc acctcccat taattctact gtggaagata tagctgcaga agaggactta 240

gataaaactg cgggttacag acctcaggcc aatgtaaata catggaattt agtgtctcca 300

gactctccta gatccataga cagcaacagt gagattgtct catttggaag tccatgctcc 360

attaattccc gacaattttt gattcctcct aaagatgaag actctcctaa atctaattgga 420

ggagggtggt cctttacaaa cttttttcag aacaaaccaa acgatgaaca aaaactcatc 480

tcagaagagg atctgtag 498

[0002]

<210>	2	
<211>	108	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
cgcggatccg ccgccaccat ggattttcag gtgcagattt tcagcttcct gctaatcagt		60
gcctcagtca taatatccag aggagctagc cgcgtcgact atcagcct		108
<210>	3	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
ccgctcgagc tacagatcct cttctgagat gagtttttgt tcategtttg gtttgttc		58
<210>	4	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	4	
ctagctatgg caggaagaag cggagacagc gacgaagag		39
<210>	5	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	5	
tcgactette gtcgctgtct ccgcttcttc gtgccatag		39

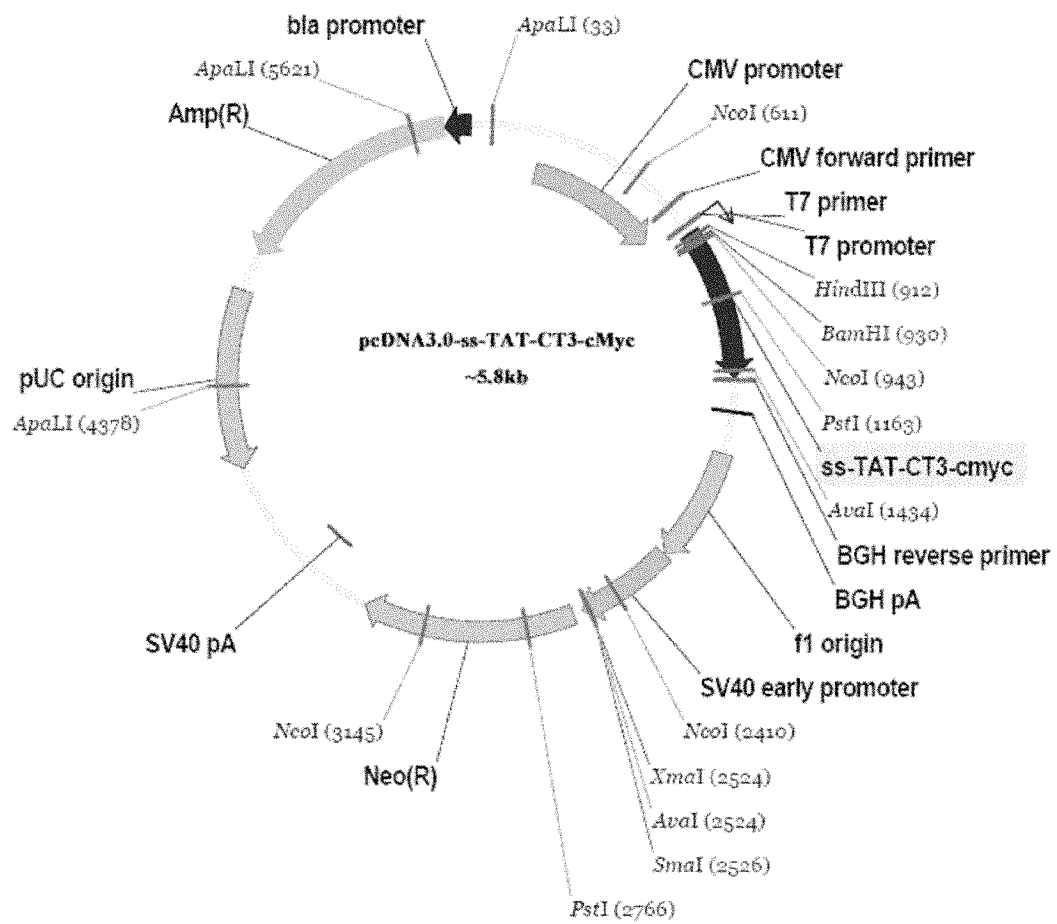


图 1

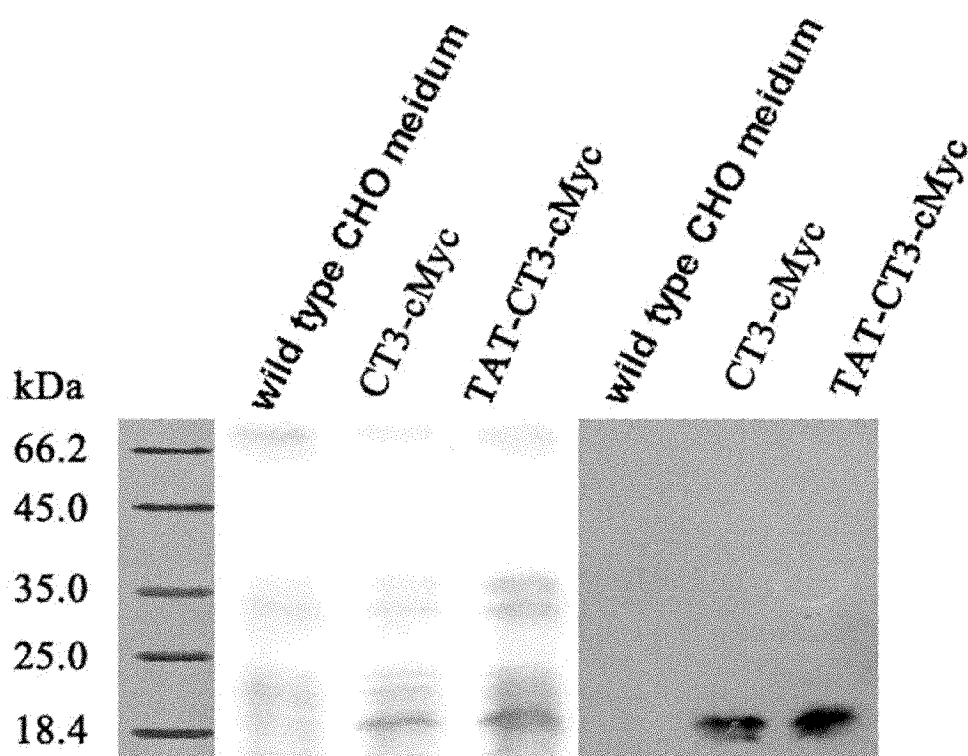


图 2

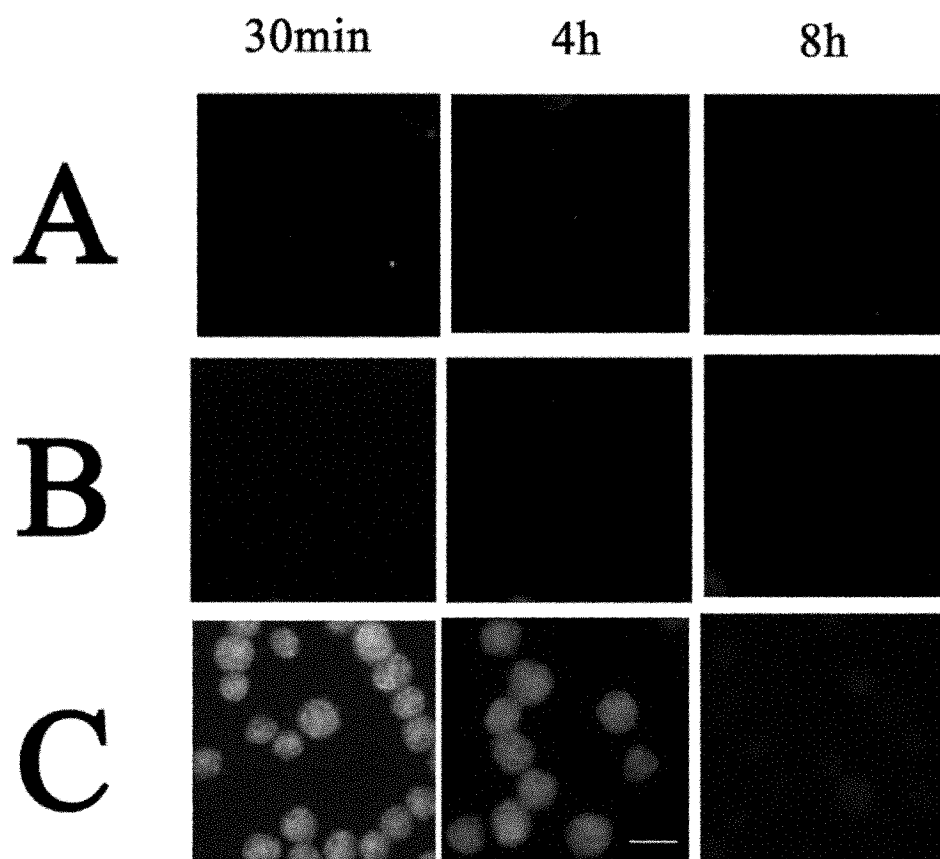


图 3

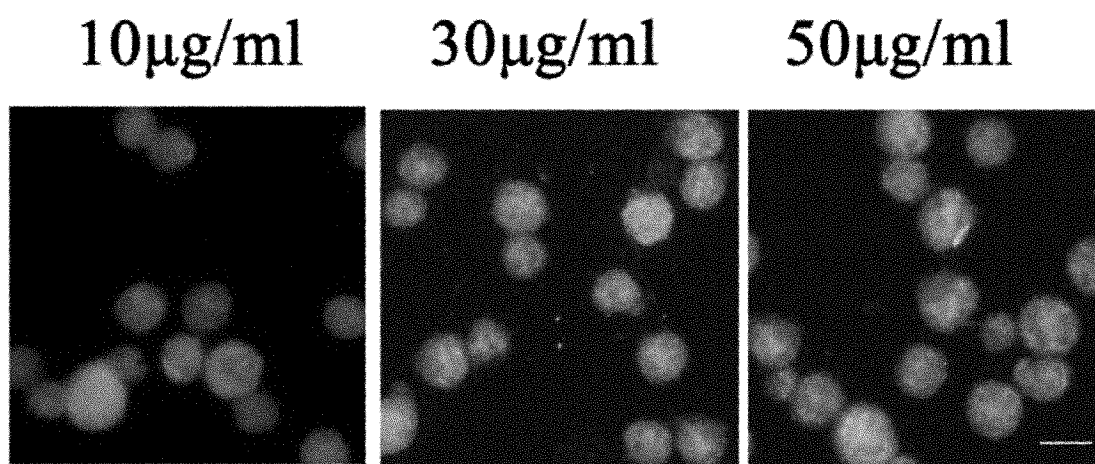


图 4