



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106987599 B

(45) 授权公告日 2021.06.11

(21) 申请号 201710193202.6

(22) 申请日 2017.03.28

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106987599 A

(43) 申请公布日 2017.07.28

(73) 专利权人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号

(72) 发明人 冯文莉 高淼 黄宁姝 黄峥兰
袁颖

(74) 专利代理机构 重庆市前沿专利事务所(普
通合伙) 50211

代理人 邹晓艳

(51) Int.Cl.

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109957570 A, 2019.07.02

US 2015037297 A1, 2015.02.05

US 9987280 B2, 2018.06.05

US 9458471 B2, 2016.10.04

CN 105339386 A, 2016.02.17

张正义. “bcr和bcr/abl基因在CML发生与发
展中的意义”.《中国优秀博硕士学位论文全文数

据库(硕士)医药卫生科技辑》.2004,

Nora Heisterkamp等. “Structural
organization of the bcr gene and its role
in the Ph⁺ translocation”.《Nature》.1985,
第315卷(第27期),

NCBI. “PREDICTED: Dipodomys ordii zinc
finger protein 629 (Znf629), mRNA”.
《Genbank Database》.2015,

Ralph B Arlinghaus. “Bcr: a negative
regulator of the Bcr-Abl oncoprotein in
leukemia”.《Oncogene》.2002,第8560-8567页.

Feng Lin等. “BCR gene expression
blocks Bcr-Abl induced pathogenicity in a
mouse model”.《Oncogene》.2001,

Nora Heisterkamp等. “The first BCR
gene intron contains breakpoints in
Philadelphia chromosome positive
leukemia”.《Nucleic Acids Research》.1988,
第16卷(第21期),

NCBI. “PREDICTED: Apteryx australis
mantelli zinc finger protein 239-like
(LOC106497307), mRNA”.《Genbank Database》
.2015,

审查员 杨兴艳

权利要求书1页 说明书8页
序列表5页 附图2页

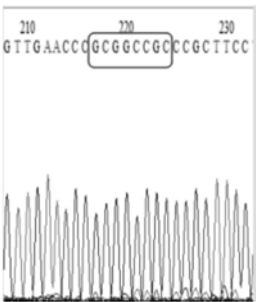
(54) 发明名称

一种抑制人bcr-abl融合基因表达或导致人
bcr-abl基因功能丧失的锌指核酸酶及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种DNA分子,其序列如SEQ
ID No:2所示,还公开了该DNA分子作为靶点在抑
制人bcr-abl融合基因表达或导致人bcr-abl基
因功能丧失中的应用;抑制人bcr-abl基因表达
或导致人bcr-abl基因功能丧失是由锌指核酸酶
介导的bcr-abl融合基因同源重组技术带来的。
本发明针对bcr-abl序列中特异的靶序列位点构
建的ZFN质粒可高效靶向bcr-abl基因发生DNA双

链断裂,以HDR方式进行修复使bcr-abl发生移码
等突变而被破坏,从而丧失促增殖、抑凋亡等恶
性转化潜能,证实ZFNs靶向破坏bcr-abl基因杀
伤和抑制CML细胞的可行性。



CN 106987599 B

1. 一种锌指核酸酶,其特征在于,所述锌指核酸酶能抑制人bcr-abl融合基因表达或导致人bcr-abl基因功能丧失,是针对人bcr-abl融合基因序列的特异性靶位点设计的,所述特异性靶位点的DNA序列如SEQ ID No: 2所示;所述锌指核酸酶由锌指蛋白和FokI内切核酸酶构成,其中所述锌指蛋白的左臂和右臂DNA序列分别如SEQ ID No: 3和SEQ ID No: 4所示,所述锌指核酸酶的切割域为FokI内切核酸酶切割位点。

2. 一种多核苷酸,其编码的蛋白质是权利要求1所述的锌指核酸酶。

3. 一种如权利要求1所述的锌指核酸酶在制备抑制人bcr-abl融合基因表达或敲除人bcr-abl 基因的药物中的应用,其特征在于:是采用由权利要求1所述的锌指核酸酶介导的bcr-abl融合基因进行同源重组。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于:所述的同源重组为同源定向修复,使用到的供体DNA的左臂扩增引物的核苷酸序列分别如SEQ ID No: 7和SEQ ID No: 8所示,右臂扩增引物的核苷酸序列分别如SEQ ID No: 9和SEQ ID No: 10所示。

一种抑制人bcr-abl融合基因表达或导致人bcr-abl基因功能丧失的锌指核酸酶及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,具体涉及一种抑制人bcr-abl融合基因表达或导致人bcr-abl基因功能丧失的锌指核酸酶及其应用。

背景技术

[0002] 慢性粒细胞白血病(Chronic myeloid leukemia,CML)的致病根源是由于t(9;22)(q34;q11)平衡易位导致c-abl基因与bcr基因形成bcr-abl融合基因。该融合基因编码的BCR-ABL融合蛋白具有强烈的酪氨酸激酶活性,持续激活下游的RAS/MAPK,PI3K/AKT,STAT5等促增殖抑凋亡信号,导致细胞的恶性转化。临床上的一线治疗药物伊马替尼是一种酪氨酸激酶抑制剂(Tyrosine kinase inhibitors,TKIs),可以使近70%的CML慢性期患者达到血液学甚至遗传学的完全缓解,但是,另外30%的患者由于BCR-ABL激酶区突变引发耐药,尤其是T315I突变,即使是新开发的第二代酪氨酸激酶抑制剂,也束手无策;并且,酪氨酸激酶抑制剂只能抑制Abl激酶活性,不能使bcr-abl基因转为阴性,特别是白血病干细胞(leukemia stem cell,LSC)对TKIs不敏感,残留的LSC成为复发的根源。因此,探索新的根治CML的方法迫在眉睫。

[0003] 细胞本身存在一种DNA损伤-修复机制,当DNA双链的一条链断裂后,以另外一条链为模板进行同源修复;当DNA双链的两条链均断裂后,以同源染色体的DNA双链为模板进行同源修复,从而确保基因组的稳定。当两条染色体的DNA双链均断裂后,以非同源末端连接(nonhomologous end joining,NHEJ)的方式进行修复,这种修复方式极易发生插入、缺失致移码突变。利用细胞的这种损伤-修复原理,诞生了一种可以定点操作基因组的核酸酶修饰技术。它由特异性的DNA识别结合结构域和非特异性剪切DNA的核酸酶组成。该技术可以靶向特定位置的染色体DNA双链断裂(double-stranded breaks,DSB),以供体DNA为模板,促发同源定向修复(homology directed repair,HDR),或者以极易出错的NHEJ方式进行修复。其中HDR可对靶基因进行定点插入、缺失、修正等操作,而NHEJ由于极易出错,很容易导致靶基因发生插入、缺失和移码突变,从而实现对靶基因的破坏(gene disruption)。

[0004] 目前,主要的核酸酶修饰技术包括锌指核酸酶(Zinc finger nucleases,ZFNs),类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nuclease,TAL-ENs)和规律成簇间隔短回文重复/Cas核酸酶(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated systems,CRISPR/Cas)核酸酶。CRISPR/Cas核酸酶技术起步较晚,该技术操作起来最简单,但是,其潜在的完全性问题尚未得到证实。TALENs的主要优势在于不受靶序列特征的限制,但是特异识别靶序列的TALENs片段太长,不利于后续载体的装载和表达,并且在靶细胞内引入大量的重复序列也是未知的安全隐患。相比而言,虽然ZFNs构建过程较复杂,但其是人类基因编辑最确立的技术,技术成熟,免疫原性低,特异性较高,较适用于体内疗法,且已在基因治疗领域显示出良好的前景,是本研究较为理想的工具。

发明内容

[0005] 针对以上问题,本发明一方面提供一种DNA分子,其序列如SEQ ID No:2所示。

[0006] 本发明的另一方面在于提供如SEQ ID No:2所示的DNA分子作为靶点在抑制人bcr-abl融合基因表达或导致人bcr-abl基因功能丧失中的应用;所述抑制人bcr-abl基因表达或导致人bcr-abl基因功能丧失是由锌指核酸酶介导的bcr-abl融合基因同源重组技术带来的。

[0007] 在上述技术方案中,所述人bcr-abl基因的核苷酸序列如SEQ ID No:1所示。

[0008] 所述的锌指核酸酶的锌指蛋白的核苷酸编码序列如SEQ ID No:3和4所示。

[0009] 所述的同源重组为同源定向修复,使用到的供体DNA的左臂扩增引物如SEQ ID No:7和8所示,右臂扩增引物如SEQ ID No:9和10所示。

[0010] 本发明的有益效果是:本发明定位了bcr-abl基因中一段特异的靶序列位点DNA片段,并针对此特异位点构建ZFN质粒,将此质粒核转染K562细胞可以使bcr-abl基因发生定点断裂,并以供体DNA为模板进行同源修复,使其插入8个碱基最终导致bcr-abl基因的破坏。本发明的显著优势表现在针对bcr-abl序列中特异的靶序列位点构建的ZFN质粒可高效靶向bcr-abl基因发生DNA双链断裂,以HDR方式进行修复使bcr-abl发生移码等突变而被破坏,从而丧失促增殖、抑凋亡等恶性转化潜能,证实ZFNs靶向破坏bcr-abl基因杀伤和抑制CML细胞的可行性。

附图说明

[0011] 图1是鉴定转染ZFN质粒的K562细胞基因组DNA测序结果峰图。

[0012] 图2是K562细胞相关蛋白Western Blot检测结果图,Blank:空白对照组;GFP:空载组。

[0013] 图3是K562细胞、GFP和ZFN-L/R+Donor质粒核转染K562细胞克隆形成镜下图,K562细胞:未处理细胞,GFP:空载质粒,ZFN-L/R+Donor:ZFNs和Donor同时作用于K562细胞。

[0014] 图4是GFP和ZFN-L/R+Donor质粒核转染K562细胞后细胞克隆形成数柱状图。

具体实施方式

[0015] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0016] 实施例1、针对人bcr-abl基因特异靶位点序列的ZFN质粒和Donor质粒的设计与构建

[0017] 一、针对人bcr-abl基因特异靶位点序列的锌指核酸酶的设计合成

[0018] 根据NCBI的查询和拼接确定了人bcr-abl基因的基因序列(如SEQ ID No:1所示),通过生物信息学的方法,完成ZFNs设计,确定了该人bcr-abl基因的锌指核酸酶作用的特异靶位点序列为:

[0019] GGCGTCGACGGCgactacGAGGACGCCGAG(如SEQ ID No:2所示);中间部分序列(gactac)为FokI内切核酸酶切割位点,也即ZFN特异敲除的靶位点序列,且本发明中所用的FokI内切核酸酶为专性异二聚化Fok I质粒,购自Addgene公司,可避免同源二聚化导致的非特异切割。

[0020] 本发明中设计的针对人bcr-abl基因的锌指核酸酶(ZFNs)由锌指蛋白(ZFP)和

FokI酶构成

[0021] (1) 锌指蛋白 (ZFP) 的左臂 (ZFP-L)、右臂 (ZFP-R) 序列

[0022] ZFP-L的DNA序列为(如SEQ ID No:3所示):

[0023] 5' -GTCGACCTGGAGCCCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAGAGCTTCAGCGACTG
CCGCGACCTGGCCCGCCACCAGCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAGAGCTTC
AGCGACCCCGGCAACCTGGTGCGCCACCAGCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGGCA
AGAGCTTCAGCGACCCCGGCGCCCTGGTGCGCCACCAGCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGA
GTGCGGCAAGAGCTTCAGCGACTGCCGCGACCTGGCCCGCCACCAGCGCACCCACACCGGCAAGAAGACCAGCTGC
GGCCGC-3'。

[0024] ZFP-R的DNA序列为(如SEQ ID No:4所示):

[0025] 5' -GTCGACCTGGAGCCCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAGAGCTTCAGCCGCAG
CGACAACCTGGTGCGCCACCAGCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAGAGCTTC
AGCGACTGCCGCGACCTGGCCCGCCACCAGCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGGCA
AGAGCTTCAGCGACCCCGGCAACCTGGTGCGCCACCAGCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGA
GTGCGGCAAGAGCTTCAGCCGCAGCGACAACCTGGTGCGCCACCAGCGCACCCACACCGGCAAGAAGACCAGCTGC
GGCCGC-3'。

[0026] 在上述ZFP-L和ZFP-R的DNA序列中,5' 端的下划线部分为Sal I酶切位点。3' 端的下划线部分为Not I酶切位点,下划线前面的碱基T为防止移码添加的碱基。

[0027] (2) FokI酶

[0028] Fok I-L质粒(质粒编号37198)和Fok I-R质粒(质粒编号37199)均购自Addgene。

[0029] 二、质粒pAd-Track-CMV-ZFN-L的构建

[0030] 按照如下步骤操作:

[0031] (1) 将上述ZFP-L的编码序列交由北京华大基因公司合成;用Sal I酶和Not I酶(TaKaRa公司)对ZFP-L和pAd-Track-CMV(重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存)进行双酶切,37℃,1h;

[0032] (2) 随后将酶切产物分别进行纯化回收,具体步骤按照天根生化科技有限公司普通DNA产物纯化试剂盒(货号DP204);

[0033] (3) 将酶切回收产物用T4连接酶(TaKaRa公司)进行连接,16℃,16h;

[0034] (4) 连接产物转化入DH5α感受态后在Kana抗性的平板上进行分区划线,随后在37℃孵箱中培养12h;

[0035] (5) 在上述Kana平板上挑取8-10个单克隆菌落进行扩大培养;

[0036] (6) 在扩增得到的菌液中提取质粒,具体步骤按照天根生化科技有限公司质粒小提试剂盒(货号DP103);

[0037] (7) 提取得到的质粒进行测序验证,其中得到的测序结果正确的质粒就为pAd-Track-CMV-ZFP-L;

[0038] (8) 以Fok I-L质粒为模板,PCR扩增Fok I-L质粒,以表1所列的引物进行目的片段PCR扩增反应。反应体系为25μl,12.5μl Premix Taq、1μl 10μM引物FokI-Sence primer、1μl 25μM引物FokI-antisence primer、100ng质粒DNA,加超纯水至25μl。PCR扩增程序:94℃ 5min;94℃ 30s,退火温度58℃,72℃ 30s,循环29次,最后72℃延伸5min;PCR扩增产物用2%

琼脂糖凝胶电泳检测；

[0039] 表1扩增Fok I质粒DNA目的片段引物表

[0040]	扩增 Fok I 质粒 DNA 目的片段引物	SEQ ID	目的片段	Tm
[0041]	FokI-Sence primer 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCGGCGGCG GCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGCCC TGGTGAAGAGCGAGCTGGAGGAGAAG -3'	SEQ ID No: 5	591bp	58°C
	FokI-antisense primer 5'-CCGCTCGAGTCAGAAGTTGATCTCGC CGTTGTTGAACTTGCGCCGC-3'	SEQ ID No: 6		

[0042] 注：FokI-Sence primer中GCGGCCGC为Not I酶切位点，下划线为linker序列，5'端的AAGGAAAAAA为保护碱基。FokI-antisense primer中CTCGAG为Xho I酶切位点，5'端的CCG为保护碱基。

[0043] (9) 随后将PCR产物进行纯化回收，具体步骤按照天根生化科技有限公司普通DNA产物纯化试剂盒(货号DP204)；

[0044] (10) 用Xho I酶和Not I酶(TaKaRa公司)对Fok I-L和pAd-Track-CMV-ZFP-L质粒进行双酶切，37°C，1h；

[0045] (11) 随后将酶切产物分别进行纯化回收，具体步骤按照天根生化科技有限公司普通DNA产物纯化试剂盒(货号DP204)；

[0046] (12) 将它们的酶切回收产物用T4连接酶(TaKaRa公司)进行连接，16°C，16h；

[0047] (13) 连接产物转化入DH5α感受态后在Kana抗性的平板上进行分区划线，随后在37°C孵箱中培养12h；

[0048] (15) 在上述Kana平板上挑取8-10个单克隆菌落进行扩大培养；

[0049] (16) 在扩增得到的菌液中提取质粒，具体步骤按照天根生化科技有限公司质粒小提试剂盒(货号DP103)；

[0050] (17) 提取得到的质粒进行测序验证，其中得到的测序结果正确的质粒就为pAd-Track-CMV-ZFN-L。

[0051] 三、质粒pAd-Track-CMV-ZFN-R质粒的构建

[0052] 过程与上述“质粒pAd-Track-CMV-ZFN-L的构建”过程类似，不同处是将ZFP-R合成后构建pAd-Track-CMV-ZFP-R质粒，再与Fok I-R质粒相连接构建pAd-Track-CMV-ZFN-R质粒。(扩增Fok I-R质粒所用的PCR引物\程序和产物长度同表1)。

[0053] 四、同源模板Donor质粒的构建

[0054] 以K562细胞cDNA为模板，PCR扩增Donor(左臂bcr 217~758，长542bp；右臂：bcr 759~1523bp，长765bp)，左臂克隆入Kpn I和Not I酶切位点，右臂克隆入Not I和Xba I酶切位点，将左、右臂同时克隆入质粒pAd-Track-CMV中。

[0055] 按照如下步骤操作：

[0056] (1) 以K562细胞(上海细胞所提供) cDNA为模板，PCR扩增Donor左臂(Donor-L)，以表2所列的引物进行目的片段PCR扩增反应。反应体系为25μl，12.5μl Premix Taq、1μl 10μM引物Donor-L-F、1μl 25μM引物Donor-L-R、100ng cDNA，加超纯水至25μl。PCR扩增程序：94°C 5min；94°C 30s，退火温度56°C，72°C 30s，循环29次，最后72°C延伸5min，PCR扩增产物用

2%琼脂糖凝胶电泳检测；

[0057] 表2扩增Donor左臂的引物

[0058]	扩增 Donor 左臂的引物		SEQ ID	目的片段	Tm
	Donor-L-F	5'-CGGGGTACCCAGCGATGGGGCTTCCG GCG-3'	SEQ ID No: 7	542bp	56°C
	Donor-L-R	5-AAGGAAAAAAGCGGCCGCGGGTTCAA CTCGGCGTCCTCGTAGTCG-3'	SEQ ID No: 8		

[0059] 注：以上2条引物的下划线处碱基分别为Kpn I和Not I酶切位点

[0060] (2) 用Kpn I酶和Not I酶 (TaKaRa公司) 对Donor-L的PCR产物和pAd-Track-CMV进行双酶切, 37°C, 1h;

[0061] (3) 随后将酶切产物分别进行纯化回收, 具体步骤按照天根生化科技有限公司普通DNA产物纯化试剂盒 (货号DP204);

[0062] (4) 将它们的酶切回收产物用T4连接酶 (TaKaRa公司) 进行连接, 16°C, 16h;

[0063] (5) 连接产物转化入DH5α感受态后在Kana抗性的平板上进行分区划线, 随后在37°C孵箱中培养12h;

[0064] (6) 在上述Kana平板上挑取8-10个单克隆菌落进行扩大培养;

[0065] (7) 在扩增得到的菌液中提取质粒, 具体步骤按照天根生化科技有限公司质粒小提试剂盒 (货号DP103);

[0066] (8) 提取得到的质粒进行测序验证, 其中得到的测序结果正确的质粒就为pAd-Track-CMV-Donor-L;

[0067] (9) 再以K562细胞cDNA为模板, PCR扩增Donor右臂 (Donor-R), 以表3所列的引物进行目的片段PCR扩增反应。反应体系为25μl, 12.5μl Premix Taq、1μl 10μM引物Donor-R-F、1μl 25μM引物Donor-R-R、100ng cDNA, 加超纯水至25μl。PCR扩增程序: 94°C 5min; 94°C 30s, 退火温度56°C (见表3), 72°C 30s, 循环29次, 最后72°C延伸5min, PCR扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测;

[0068] 表3扩增Donor右臂的引物

[0069]	扩增 Donor 右臂的引物		SEQ ID	目的片段	Tm
	Donor-R-F	5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCTTCCTGA AGGACAACCTGATCG-3'	SEQ ID No: 9	765 bp	56°C
	Donor-R-R	5'-GCTCTAGAGCCAGGATTCCCGACAGGACCC ATTTTC-3'	SEQ ID No: 10		

[0070] 注：以上2条引物的下划线部分碱基分别为Not I和Xba I酶切位点

[0071] (10) 随后将PCR产物进行纯化回收, 具体步骤按照天根生化科技有限公司普通DNA产物纯化试剂盒 (货号DP204);

[0072] (11) 用Not I酶和Xba I酶 (TaKaRa公司) 对Donor-R的PCR产物和pAd-Track-CMV-Donor-L质粒进行双酶切, 37°C, 1h;

[0073] (12) 随后将酶切产物分别进行纯化回收, 具体步骤按照天根生化科技有限公司普通DNA产物纯化试剂盒 (货号DP204);

[0074] (13) 将它们的酶切回收产物用T4连接酶 (TaKaRa公司) 进行连接, 16℃, 16h;
 [0075] (14) 连接产物转化入DH5 α 感受态后在Kana抗性的平板上进行分区划线, 随后在37℃孵箱中培养12h;
 [0076] (15) 在上述Kana平板上挑取8-10个单克隆菌落进行扩大培养;
 [0077] (16) 在扩增得到的菌液中提取质粒, 具体步骤按照天根生化科技有限公司质粒小提试剂盒 (货号DP103);
 [0078] (17) 提取得到的质粒进行测序验证, 其中得到的测序结果正确的质粒就为pAd-Track-CMV-Donor。

[0079] 实施例2、锌指核酸酶定点切割bcr-abl基因并插入NotI酶切位点促发同源定向修复

[0080] 1、冻存细胞的复苏与培养

[0081] 从液氮中取出装有K562细胞的冻存小管, 立即投入37℃的温水中快速晃动, 直至冻存液完全融解; 在2min内完成复温; 将细胞悬液移入无菌的离心管, 加入5mL培养液, 轻轻吹匀; 将细胞悬液1000r/min离心5min, 弃上清; 向含有细胞沉淀的离心管加入1mL完全培养基。

[0082] 2、细胞培养条件及传代培养:

[0083] 细胞培养条件

[0084] 培养基组成成分: 1640 (Gibco Lot: 1737734)

[0085] 10% FBS (BI Lot: 1616756)

[0086] 传代培养:

[0087] (1) K562细胞密度达约80%左右;

[0088] (2) 用移液器反复吹打数次, 至细胞全部均匀重悬在培养基中, 将其转移到离心管中; 500rpm离心5min;

[0089] (3) 弃上清, 加入2mL培养基重悬细胞, 分两份加到有培养基的培养瓶中;

[0090] (4) 晃动培养瓶使细胞分布均匀后, 至37℃、5% CO₂培养箱中培养。

[0091] 3、核转染方法

[0092] 使用Lonza公司提供的电转试剂Cell Line Nucleofector Kit V及核转染仪进行转染实验, 具体操作按照试剂说明书进行。

[0093] 4、细胞基因组DNA提取: 按照天根生化科技有限血液/组织/细胞基因组提取试剂盒 (货号: DP304) 操作步骤说明, 提取步骤3得到的培养48小时的细胞基因组DNA。

[0094] 5、目的片段PCR扩增反应和PCR产物测序验证

[0095] 以上述步骤4得到的细胞基因组DNA为模板, 以下表4所列的引物进行目的片段PCR扩增反应。反应体系为25 μ l, 12.5 μ l Premix Taq, 1 μ l 10 μ M引物Sense primer、1 μ l 25 μ M引物Anti-sense primer、100ng基因组DNA, 加超纯水至25 μ l。PCR扩增程序: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 退火温度56℃, 72℃ 30s, 循环29次, 最后72℃延伸5min。PCR扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0096] 表4扩增bcr-abl基因组DNA目的片段引物表

[0097]	扩增 bcr-abl 基因组 DNA 目的片段引物	SEQ ID	目的片段	Tm
--------	---------------------------	--------	------	----

[0098]	Sence primer	5'-GACGCCGAGAAGCCCTTC-3'	SEQ ID No: 11	468bp	56°C
	Anti-sence primer	5'-AATCCTCAAACTCCGGGGG -3'	SEQ ID No: 12		

[0099] 将PCR产物直接进行测序,将测序所得的序列结果与bcr-abl基因中的靶位点序列进行同源性比较分析,以鉴定转染ZFN质粒K562细胞基因组DNA中靶位点是否被定点插入NotI酶切位点。测序结果峰图如图1所示,K562细胞基因组DNA的靶位点被定点插入NotI酶切位点。

[0100] 6、Western Blot检测相关蛋白变化

[0101] 提取细胞总蛋白与浓度测定:

[0102] (1) 收集前述步骤3得到的培养48小时的细胞到10ml离心管里,1000rpm离心10min,弃尽上清液;

[0103] (2) 再加入2mlPBS于离心管中将细胞悬液,吹打混匀,1000rpm离心10min,弃尽上清液;

[0104] (3) 加入1ml PBS重新混匀,将细胞悬液转至新的1.5ml EP管中;

[0105] (4) 配制裂解液:PMSF:NaF:NaVO₄:RIPA=1:1:1:100,每个dish加60μl裂解液。冰上裂解30分钟,每10分钟振荡一次(5-10s);

[0106] (5) 将EP管放入4℃离心机,12000rpm离心40分钟,上清液转移至另一个新的EP管中,记录体积,加上清液1/4体积的5×蛋白上样buffer,沸水煮5分钟,-80℃超低温冰箱保存;

[0107] (6) BCA试剂盒测蛋白浓度:配制BCA标准品工作液,终浓度0.5mg/ml。将标准品和待测品加入96孔板,按照说明书向每孔加工作液,振荡混匀后37℃水浴箱孵育35分钟,测定560nm处吸光度值,绘制标准曲线并计算蛋白浓度及上样量(见表5)。

[0108] 表5蛋白浓度测定

组别	1	2	3	4	5	6	7	8
标准孔								
PBS (μl)	20	19	18	16	12	8	4	0
0.5mg/ml 标准品 (μl)	0	1	2	4	8	12	16	20
[0109] 工作液 A: B=50: 1 (μl)	200	200	200	200	200	200	200	200
测试孔								
PBS (μl)	18	18	18	18	18	18	18	18
待测样品 (μl)	2	2	2	2	2	2	2	2
工作液 A: B=50: 1 (μl)	200	200	200	200	200	200	200	200

[0110] Western Blot:

[0111] (1) 配制10%分离胶加入安装好的电泳仪中,1ml无水乙醇压线,37℃烤箱静置30min取出,弃去无水乙醇,配制5%浓缩胶,根据实验需求加入适量孔梳,再将配好的浓缩胶加入,37℃烤箱静置20min。待浓缩胶完全凝固后去掉胶条放入电泳槽中,加入内槽液(1

×SDS)后拔掉梳子,加入外槽液后排气泡。每孔加入30μg蛋白样品,两步法电泳:80V电泳30分钟,120V电泳90分钟;

[0112] (2) 提前预冷湿转液并将滤纸浸泡在湿转液中,按目的条带分子量切胶浸润湿转液待用。剪与切胶大小相等的膜,甲醇活化1min,双蒸水2min转入湿转液中。转膜:按照三层滤纸、膜、胶和三层滤纸的顺序放入转膜仪,210mA恒流,小分子蛋白按照分子量大小相同时间转膜,大分子量蛋白按照分子量×0.85时间转膜;

[0113] (3) 配制5%的封闭奶粉待转膜结束时将PVDF膜放入进行封闭,4℃冰箱4h;

[0114] (4) TBST去除膜上封闭液放置于蜡板上,加入一抗(1:1000稀释)后密封,4℃冰箱充分反应14-18h;

[0115] (5) 取出PVDF膜,TBST洗3次/5min,加入二抗(1:2000稀释),4℃90分钟后再用TBST洗2次/5min,TBS洗5min;

[0116] (6) 配制发光液:A液:B液=1:1,加在膜上避光于发光仪内显像。

[0117] Western Blot检测相关蛋白结果如图2所示,与空白组,空载组以及各种质粒单独作用组对比ZFN-L/R和Donor共同作用于CML细胞后能使p-Bcr-Abl蛋白明显下调,且Bcr-Abl蛋白下游的效应分子p-Stat5和p-Erk都明显下调;与空白组,空载组以及各种质粒单独作用组对比ZFN-L/R和Donor共同作用于CML细胞后能激活PARP和Caspase-3蛋白,说明其能促进CML细胞凋亡。

[0118] 7、克隆形成实验

[0119] (1) 分别用空载质粒GFP和ZFN-L/R+Donor质粒核转染K562细胞,并且设对照组(无质粒转染),每组处理设置5个复孔,每孔铺300个细胞于24孔板,调整每孔终培养基至750μl;

[0120] (2) 在每孔中加入750μl 2.7%甲基纤维素,混匀;

[0121] (3) 37℃、5%CO₂恒温细胞孵箱内培养7-10天观察结果。结果如图3、4所示:ZFN-L/R和Donor共同作用于K562细胞后能明显抑制K562细胞的克隆大小和克隆数量,即抑制K562细胞的克隆形成能力。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 重庆医科大学
[0003]	<120> 采用锌指核酸酶技术破坏人bcr-abl融合基因以抑制CML细胞增殖和促使其凋亡
[0004]	<130> 1
[0005]	<160> 12
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 6021
[0008]	<212> DNA
[0009]	<213> 人工序列
[0010]	<223> 人bcr-abl基因
[0011]	<400> 1
[0012]	atggtggacc cgggtgggctt cgcggaggcg tggaaggcgc agttcccgga ctcagagccc 60
[0013]	ccgcgcattg agctgcgctc agtgggagac atcagacagg agctggagcg ctgcaaggcc 120
[0014]	tccattcggc gcctggagca ggaggtgaac caggagcgct tccgcatgat ctacctgcag 180
[0015]	acgttgcttg ccaaggaaaa gaagagctat gaccggcagc gatggggctt ccggcgcgcg 240
[0016]	gcgcaggccc ccgacggcgc ctccgagccc cgagcgtccg cgtcgcgccc gcagccagcg 300
[0017]	cccggcgacg gagccgaccc gccgcccgcg gaggagcccc agggccggcc cgacggcgag 360
[0018]	ggttctccgg gtaaggccag gcccgggacc gcccgagcg ccggggcagc cgcgtcgggg 420
[0019]	gaacgggacg accggggacc ccccgccagc gtggcggcgc tcaggtccaa cttcgagcgg 480
[0020]	atccgcaagg gccatggcca gcccggggagc gacgccgaga agcccttcta cgtgaacgtc 540
[0021]	gagtttcacc acgagcgcgg cctggtgaag gtcaacgaca aagaggtgtc ggaccgcac 600
[0022]	agctcccttg gcagccaggc catgcagatg gacgcacaaa agtcccagca cggcgcgggc 660
[0023]	tcgagcgttg gggatgcac caggccccct taccggggac gctcctcgga gagcagctgc 720
[0024]	ggcgtcgacg gcgactacga ggacgccgag ttgaaccccc gcttcctgaa ggacaacctg 780
[0025]	atcgacgcca atggcggtag caggccccct tggccgcccc tggagtacca gccctaccag 840
[0026]	agcatctacg tcgggggcat gatggaaggg gagggcaagg gcccgctcct gcgcagccag 900
[0027]	agcacctctg agcaggagaa gcgccttacc tggccccgca ggtcctactc ccccgaggt 960
[0028]	tttgaggatt gcggaggcgg ctataccccg gactgcagct ccaatgagaa cctcacctcc 1020
[0029]	agcgaggagg acttctctc tggccagtcc agccgcgtgt cccaagccc caccacctac 1080
[0030]	cgcattgtcc gggacaaaag ccgctctccc tcgcagaact cgcaacagtc cttcgacagc 1140
[0031]	agcagtcacc ccacgccga gtgccataag cggcaccggc actgcccggg tgctcgtgtc 1200
[0032]	gaggccacca tcgtgggcgt ccgcaagacc gggcagatct ggcccaacga tggcgagggc 1260
[0033]	gccttccatg gagacgcaga tggctcgttc ggaacaccac ctggatacgg ctgcgctgca 1320
[0034]	gaccgggcag aggagcagcg ccggcaccaa gatgggctgc cctacattga tgactcgccc 1380
[0035]	tcctcatcgc cccacctcag cagcaagggc aggggcagcc gggatgcgct ggtctcggga 1440
[0036]	gccctggagt ccactaaagc gactgagctg gacttggaag agggcttgga gatgagaaaa 1500
[0037]	tgggtcctgt cggaatcct ggctagcgag gagacttacc tgagccacct ggaggcactg 1560
[0038]	ctgtgcacca tgaagccttt gaaagccgct gccaccacct ctcagccggg gctgacgagt 1620
[0039]	cagcagatcg agaccatctt cttcaaagt cctgagctct acgagatcca caaggagttc 1680
[0040]	tatgatgggc tcttcccccg cgtgcagcag tggagccacc agcagcgggt gggcgacctc 1740
[0041]	ttccagaagc tggccagcca gctgggtgtg taccgggcct tcgtggacaa ctacggagtt 1800

[0042]	gccatggaaa	tggtgagaa	gtgctgtcag	gccaatgctc	agtttgcaga	aatctccgag	1860
[0043]	aacctgagag	ccagaagcaa	caaagatgcc	aaggatccaa	cgaccaagaa	ctctctggaa	1920
[0044]	actctgtctt	acaagcctgt	ggaccgtgtg	acgaggagca	cgttggtcct	ccatgacttg	1980
[0045]	ctgaagcaca	ctcctgccag	ccaccctgac	cacccttgct	tgcaggacgc	cctccgcac	2040
[0046]	tcacagaact	tcctgtccag	catcaatgag	gagatcacac	cccagcggca	gtccatgacg	2100
[0047]	gtgaagaagg	gagagcacgc	gcagctgtg	aaggacagct	tcatgggtga	gctgggtggag	2160
[0048]	ggggcccgca	agctgcgcca	cgtcttctct	ttcaccgagc	tgcttctctg	caccaagctc	2220
[0049]	aagaagcaga	gcggaggcaa	aacgcagcag	tatgactgca	aatggtacat	tccgctcacg	2280
[0050]	gatctcagct	tccagatggg	ggatgaactg	gaggcagtg	ccaacatccc	cctgggtgcc	2340
[0051]	gatgaggagc	tggtacgttt	gaagatcaag	atctcccaga	tcaagagtga	catccagaga	2400
[0052]	gagaagaggg	cgaacaaggg	cagcaaggct	acggagaggc	tgaagaagaa	gctgtcggag	2460
[0053]	caggagtca	tgctgtctgt	tatgtctccc	agcatggcct	tcagggtgca	cagccgcaac	2520
[0054]	ggcaagagtt	acacgttctt	gatctcctct	gactatgagc	gtgcagagtg	gagggagaac	2580
[0055]	atccgggagc	agcagaagaa	gtgtttcaga	agcttctccc	tgacatccgt	ggagctgcag	2640
[0056]	atgtgacca	actcgtgtgt	gaaactccag	actgtccaca	gcattccgct	gaccatcaat	2700
[0057]	aaggaagaag	cccttcagcg	gccagtagca	tctgactttg	agcctcaggg	tctgagtga	2760
[0058]	gccgctcgtt	ggaactccaa	ggaaaacctt	ctcgtgggac	ccagtgaata	tgaccccaac	2820
[0059]	cttttcgttg	cactgtatga	ttttgtggcc	agtggagata	acactctaag	cataactaaa	2880
[0060]	ggtgaaaagc	tccgggtctt	aggctataat	cacaatgggg	aatggtgtga	agcccaaacc	2940
[0061]	aaaaatggcc	aaggctgggt	cccaagcaac	tacatcacgc	cagtcaacag	tctggagaaa	3000
[0062]	cactcctggt	accatggggc	tgtgtccgc	aatgccgtg	agtatctgct	gagcagcggg	3060
[0063]	atcaatggca	gcttcttggt	gcgtgagagt	gagagcagtc	ctggccagag	gtccatctcg	3120
[0064]	ctgagatacg	aagggagggt	gtaccattac	aggatcaaca	ctgcttctga	tggtcaagctc	3180
[0065]	tacgtctcct	ccgagagccg	cttcaacacc	ctggccgagt	tggttcatca	tcattcaacg	3240
[0066]	gtggccgacg	ggctcatcac	cacgtccat	tatccagccc	caaagcgcaa	caagcccact	3300
[0067]	gtctatggtg	tgtcccccaa	ctacgacaag	tgggagatgg	aacgcacgga	catcaccatg	3360
[0068]	aagcacaagc	tgggcggggg	ccagtacggg	gaggtgtacg	agggcgtgtg	gaagaaatac	3420
[0069]	agcctgacgg	tggccgtgaa	gacctgaag	gaggacacca	tggaggtgga	agagtctctg	3480
[0070]	aaagaagctg	cagtcatgaa	agagatcaaa	caccctaacc	tgggtgcagct	ccttgggggtc	3540
[0071]	tgcaccgggg	agccccggtt	ctatatcatc	actgagttca	tgacctacgg	gaacctcctg	3600
[0072]	gactacctga	gggagtgcaa	ccggcaggag	gtgaacgccg	tgggtgctgct	gtacatggcc	3660
[0073]	actcagatct	cgtcagccat	ggagtacctg	gagaagaaaa	acttcatcca	cagagatctt	3720
[0074]	gctgcccga	actgcctggt	aggggagaac	cacttggtga	aggtagctga	ttttggcctg	3780
[0075]	agcaggttga	tgacagggga	cacctacaca	gcccatgctg	gagccaagtt	ccccatcaaa	3840
[0076]	tggtactgc	ccgagagcct	ggcctacaac	aagttctcca	tcaagtccga	cgtctgggca	3900
[0077]	tttggagtat	tgctttggga	aattgtctac	tatggcatgt	ccccttacc	gggaattgac	3960
[0078]	ctgtcccagg	tgtatgagct	gctagagaag	gactaccgca	tggagcgccc	agaaggctgc	4020
[0079]	ccagagaagg	tctatgaact	catgcgagca	tgttggcagt	ggaatccctc	tgaccggccc	4080
[0080]	tcctttgctg	aaatccacca	agcctttgaa	acaatgttcc	aggaatccag	tatctcagac	4140
[0081]	gaagtggaaa	aggagctggg	gaaacaaggc	gtccgtgggg	ctgtgagtag	cttgcctgcag	4200
[0082]	gccccagagc	tgccccacca	gacgaggacc	tccaggagag	ctgcagagca	cagagacacc	4260
[0083]	actgacgtgc	ctgagatgcc	tcactccaag	ggccaggagg	agagcgatcc	tctggaccat	4320

[0084]	gagcctgccg tgtctccatt gctccctcga aaagagcgag gtcccccgga gggcggcctg	4380
[0085]	aatgaagatg agcgctttct ccccaaagac aaaaagacca acttgttcag cgccttgatc	4440
[0086]	aagaagaaga agaagacagc cccaaccct cccaaacgca gcagctcctt ccgggagatg	4500
[0087]	gacggccagc cggagcgagc aggggccggc gaggaagagg gccgagacat cagcaacggg	4560
[0088]	gcactggctt tcacccctt ggacacagct gaccagcca agtccccaaa gccagcaat	4620
[0089]	ggggctgggg tcccaatgg agccctccgg gagtccgggg gctcaggctt ccggtctccc	4680
[0090]	cacctgtgga agaagtccag cacgtgacc agcagccgc tagccaccgg cgaggaggag	4740
[0091]	ggcggtggca gctccagaa gcgttctctg cgctcttctt ccgcctcctg cgttccccat	4800
[0092]	ggggccaagg acacggagtg gaggtcagtc acgtgcctc gggacttgca gtccacggga	4860
[0093]	agacagtttg actcgtccac atttggaggg cacaaaagtg agaagccggc tctgcctcgg	4920
[0094]	aagaggcgag gggagaacag gtctgaccag gtgaccgag gcacagtaac gcctcccccc	4980
[0095]	aggctggtga aaaagaatga ggaagctgct gatgaggtct tcaaagacat catggagtcc	5040
[0096]	agccgggct ccagccgcc caacctgact ccaaaacccc tccggcgga ggtcacctg	5100
[0097]	gcccctgcct cgggcctccc ccacaaggaa gaagctggaa agggcagtc cttagggacc	5160
[0098]	cctgctgcag ctgagccagt gacccccacc agcaaagcag gctcagggtc accagggggc	5220
[0099]	accagcaagg gccccgccga ggagtccaga gtgaggaggc acaagcactc ctctgagtcg	5280
[0100]	ccagggaggg acaaggggaa attgtccagg ctcaaacctg cccgccgcc cccaccagca	5340
[0101]	gcctctgcag ggaaggctgg aggaaagccc tcgcagagcc cgagccagga ggcggccggg	5400
[0102]	gaggcagtc tgggcgcaaa gacaaaagcc acgagtctgg ttgatgctgt gaacagtgac	5460
[0103]	gctgccaaagc ccagccagcc gggagagggc ctcaaaaagc ccgtgctccc ggccactcca	5520
[0104]	aagccacagt ccgccaaagc gtcggggacc cccatcagcc cagccccctg tccctccacg	5580
[0105]	ttgccatcag catcctcggc cctggcaggg gaccagccgt cttccaccgc cttcatccct	5640
[0106]	ctcatatcaa cccgagtgtc tcttcggaaa acccgccagc ctccagagcg gatcgccagc	5700
[0107]	ggcgccatca ccaaggcggt ggtcctggac agcaccgagg cgctgtgcct cgccatctct	5760
[0108]	aggaactccg agcagatggc cagccacagc gcagtgtgg aggccggcaa aaacctctac	5820
[0109]	acgttctgcg tgagctatgt ggattccatc cagcaaatga ggaacaagtt tgccttcga	5880
[0110]	gaggccatca acaactgga gaataatctc cgggagcttc agatctgccc ggcgacagca	5940
[0111]	ggcagtggtc cggcgccac tcaggacttc agcaagctcc tcagttcggg gaaggaaatc	6000
[0112]	agtacatag tgcagaggta g	6021
[0113]	<210> 2	
[0114]	<211> 30	
[0115]	<212> DNA	
[0116]	<213> 人工序列	
[0117]	<223> 人bcr-abl基因的锌指核酸酶作用的特异靶位点	
[0118]	<400> 2	
[0119]	ggcgtcgacg gcgactacga ggacgccgag	30
[0120]	<210> 3	
[0121]	<211> 375	
[0122]	<212> DNA	
[0123]	<213> 人工序列	
[0124]	<223> ZFP-L	
[0125]	<400> 3	

[0126]	gtcgacctgg agcccggcga gaagccctac aagtgccccg agtgccggcaa gagcttcagc	60
[0127]	gactgccgcg acctggcccc ccaccagcgc acccacaccg gcgagaagcc ctacaagtgc	120
[0128]	cccagtgcg gcaagagctt cagcgacccc ggcaacctgg tgcgccacca ggcaccccac	180
[0129]	accggcgaga agccctacaa gtgccccgag tgcggcaaga gcttcagcga ccccggcgcc	240
[0130]	ctggtgcgcc accagcgcac ccacaccggc gagaagccct acaagtgcc cgagtgcggc	300
[0131]	aagagcttca gcgactgccg cgacctggcc cgccaccagc gcacccacac cggcaagaag	360
[0132]	accagctggc gccgc	375
[0133]	<210> 4	
[0134]	<211> 375	
[0135]	<212> DNA	
[0136]	<213> 人工序列	
[0137]	<223> ZFP-R	
[0138]	<400> 4	
[0139]	gtcgacctgg agcccggcga gaagccctac aagtgccccg agtgccggcaa gagcttcagc	60
[0140]	cgcagcgaca acctggtgcg ccaccagcgc acccacaccg gcgagaagcc ctacaagtgc	120
[0141]	cccagtgcg gcaagagctt cagcgactgc cgcgacctgg cccgccacca ggcaccccac	180
[0142]	accggcgaga agccctacaa gtgccccgag tgcggcaaga gcttcagcga ccccggaac	240
[0143]	ctggtgcgcc accagcgcac ccacaccggc gagaagccct acaagtgcc cgagtgcggc	300
[0144]	aagagcttca gccgcagcga caacctggtg cgccaccagc gcacccacac cggcaagaag	360
[0145]	accagctggc gccgc	375
[0146]	<210> 5	
[0147]	<211> 78	
[0148]	<212> DNA	
[0149]	<213> 人工序列	
[0150]	<223> FokI-Sence primer	
[0151]	<400> 5	
[0152]	aaggaaaaaa gcggccgcgg cggcggcggc agcggcggcg gcggcagcgc cctggtgaag	60
[0153]	agcgagctgg aggagaag	78
[0154]	<210> 6	
[0155]	<211> 46	
[0156]	<212> DNA	
[0157]	<213> 人工序列	
[0158]	<223> FokI-antisence primer	
[0159]	<400> 6	
[0160]	ccgctcgagt cagaagtga tctcgccgtt gttgaacttg cgccgc	46
[0161]	<210> 7	
[0162]	<211> 29	
[0163]	<212> DNA	
[0164]	<213> 人工序列	
[0165]	<223> Donor-L-F	
[0166]	<400> 7	
[0167]	cggggtaccc agcgatgggg cttccggcg	29

[0168]	<210> 8
[0169]	<211> 45
[0170]	<212> DNA
[0171]	<213> 人工序列
[0172]	<223> Donor-L-R
[0173]	<400> 8
[0174]	aaggaaaaaa gcggccgcgg gttcaactcg gcgtcctcgt agtcg 45
[0175]	<210> 9
[0176]	<211> 44
[0177]	<212> DNA
[0178]	<213> 人工序列
[0179]	<223> Donor-R-F
[0180]	<400> 9
[0181]	aaggaaaaaa gcggccgccc gcttcctgaa ggacaacctg atcg 44
[0182]	<210> 10
[0183]	<211> 36
[0184]	<212> DNA
[0185]	<213> 人工序列
[0186]	<223> Donor-R-R
[0187]	<400> 10
[0188]	gctctagagc caggattccc gacaggaccc attttc 36
[0189]	<210> 11
[0190]	<211> 18
[0191]	<212> DNA
[0192]	<213> 人工序列
[0193]	<223> Sence primer
[0194]	<400> 11
[0195]	gacgccgaga agcccttc 18
[0196]	<210> 12
[0197]	<211> 20
[0198]	<212> DNA
[0199]	<213> 人工序列
[0200]	<223> Anti-sence primer
[0201]	<400> 12
[0202]	aatcctcaaa actccggggg 20

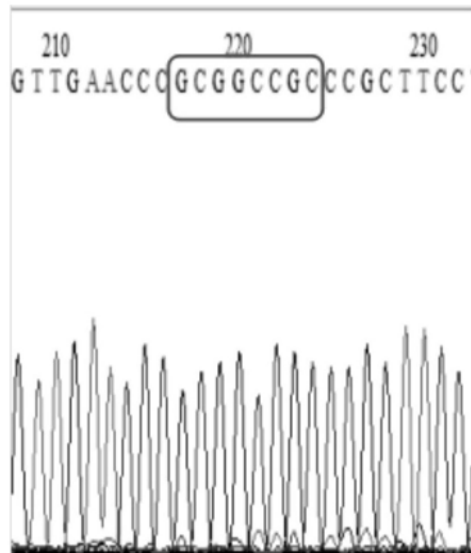


图1

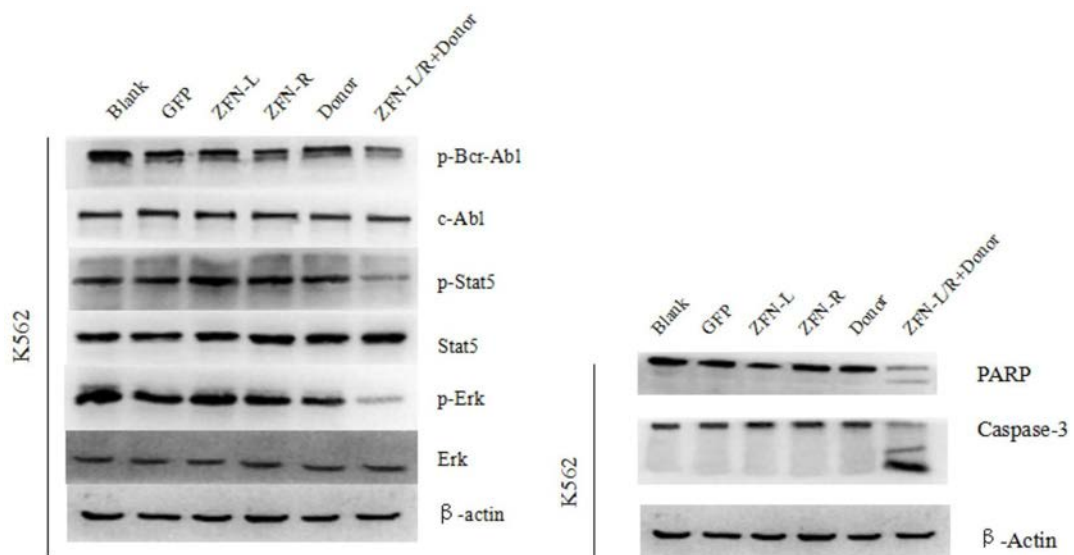


图2

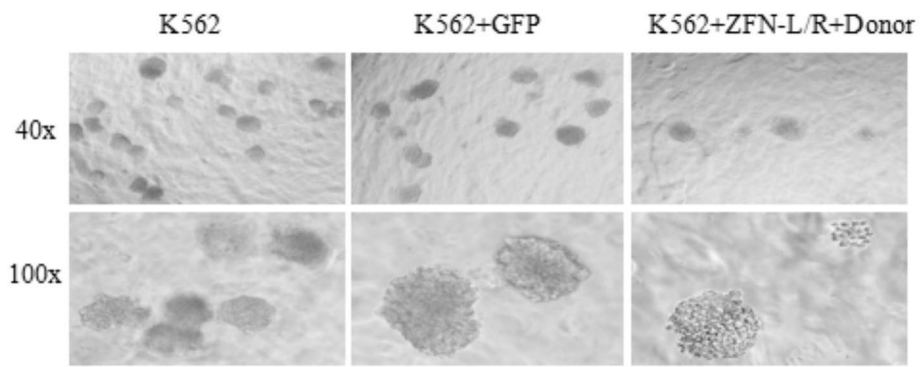


图3

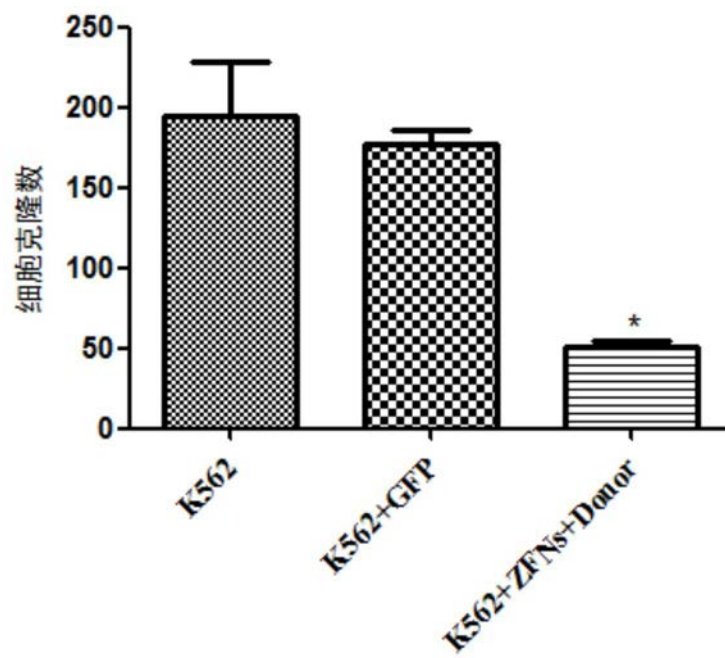


图4