

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.10.004

斑马鱼 Gfi1.1 基因的克隆及其体外转录

朱贤敏 姜利军 赵磊 关军 尹璘 张义成[△]

(华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科 湖北 武汉 430030)

摘要 目的:克隆斑马鱼 Gfi1.1 基因的全长 cDNA,运用 T7 RNA 聚合酶对含有 Gfi1.1 基因的 ORF 区进行体外转录,在体外合成 5 端带有帽子结构的 Gfi1.1 mRNA 分子,为后续研究斑马鱼 Gfi1.1 基因的功能打下基础。**方法:**应用 RT-PCR 从斑马鱼组织中扩增出 Gfi1.1 cDNA 片段,经回收纯化与 pGM-T 载体连接并转化感受态细菌 DH-5 α ,通过蓝白筛选酶切鉴定阳性菌落,少量提取质粒,Nde I 限制性内切酶线性化 pGM-T-Gfi1.1 质粒,运用 T7 RNA 聚合酶对 Gfi1.1 基因进行体外转录及加帽。经凝胶电泳对目的片段进行鉴定。**结果:**RT-PCR 扩增获得约 1.2 kb 的 DNA 片段,DNA 序列分析的结果与 GenBank 上的序列(NM_001020776)一致,酶切线性化及体外转录加帽 pGM-T-Gfi1.1,凝胶电泳鉴定 RNA 分子大小与预期完全一致。**结论:**成功克隆斑马鱼 Gfi1.1 基因并体外转录及加帽 pGM-T-Gfi1.1。

关键词:Gfi1.1 基因;克隆;体外转录

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)10-1818-03

Cloning of Zebrafish Gfi1.1 cDNA and Its in Vitro Transcription

ZHU Xian-min, JIANG Li-jun, ZHAO Lei, GUAN Jun, YIN Jin, ZHANG Yi-cheng[△]

(Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China)

ABSTRACT Objective: To clone the full-length of zebrafish Gfi1.1 cDNA,transcript the Open Reading Frame region of the Gfi1.1 gene in vitro by T7 RNA Polymerase, synthesize a Gfi1.1 mRNA molecule capped at its 5 terminal and provide a basis to further study the biological functions of zebrafish Gfi1.1. **Methods:** Total RNA was isolated from the tissues of zebrafish, and the full-length Gfi1.1 cDNA was amplified by RT-PCR and then ligated to pGM-T vector after retrieve and purification. The product was transformed into competent cells DH-5 α . The positive recombinant clones were selected and identified by the complementation, restriction endonuclease digestion. After the plasmid pGM-T-Gfi1.1 extraction and linearization by Nde I, gene gfi1.1 was transcribed in vitro by T7 RNA Polymerase and capped with the capped analog. Then the product was identified. **Results:** A fragment of 1.2 kb was gained by RT-PCR and its sequence was identical to the sequence deposited in GenBank (NM_001020776). After restriction endonuclease linearization and transcription in vitro, the gfi1.1 RNA product proved to be consistent with the expected results by gel electrophoresis. **Conclusion:** The zebrafish Gene Gfi1.1 is successfully cloned and transcribed in vitro.

Key words: Gfi1.1 gene; Cloning; Transcript in vitro

Chinese Library Classification(CLC): Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)10-1818-03

前言

斑马鱼作为近年发展起来的生物学脊椎动物模型,具有体外发育速度快及胚胎透明的优点,并且通过转基因荧光蛋白可以在体外进行造血系观察^[1]。人 Gfi1(growth factor independent -1) 基因位于人 1 号染色体短臂 2 区^[2],在调节造血干细胞的自我更新方面有重要作用^[3]。Gfi1 的表达与 BCR/ABL 关系密切,可能参与到 CML 的发病机制^[4]。斑马鱼 Gfi1.1 基因与人和小鼠的 Gfi1 基因具有高度的序列同源性,且斑马鱼胚胎 Gfi1.1 基因仅在造血系统中表达。更重要的是 Gfi1.1 在促进红系分化

的同时能够抑制髓系的分化^[5]。为此,本研究构建了斑马鱼 pGM-T-Gfi1.1 载体,并体外转录用于斑马鱼体内稳定表达的加帽的 Gfi1.1 mRNA,为进一步研究 Gfi1 基因与骨髓增殖性肿瘤之间的关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 斑马鱼来源及喂养 野生型斑马鱼购自武汉中科院水生研究所,斑马鱼喂养于 45 L 的玻璃箱中,每箱约投喂 30 尾,维持室温在 27℃,24 小时循环水过滤系统供给。

1.1.2 质粒与菌种 pGM-T 克隆质粒购自北京天根公司 pGM-T 克隆试剂盒,该质粒具有氨苄青霉素抗药基因。DH-5 α 感受细菌为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 Trizol 液购自 Invitrogen 公司。cDNA 逆转录合成试剂盒、T7 高产量体外转录试剂盒和限制性内切酶 Nde I 均购自 Fermentas 公司。Taq- DNA polymerase、10 $\times$ Taq Buffer、

作者简介:朱贤敏(1985-),女,博士研究生,主要研究方向:骨髓增殖性肿瘤,E-mail:scarecrow1346@163.com

[△]通讯作者:张义成(1966-),男,博士,教授、主任医师,E-mail:yczhang@tjh.tjmu.edu.cn

(收稿日期:2013-08-25 接受日期:2013-09-19)

dNTP Mix, 10 mM, 25 mM $MgCl_2$, Water, nuclease-free 均购自 Fermentas 公司。凝胶回收试剂盒购自 Fermentas 公司。LB 琼脂购自 Oxoid 公司。pGM-T 克隆质粒购自北京天根公司。1 kb DNA ladder 购自广东东盛科技生物有限公司。质粒小提试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。

1.1.4 引物设计 引物根据 GeneBank NM_001020776 序列采用 Primer Premier 5 软件进行设计。Gfi1.1 cDNA 全长引物, 上游引物: 上游 5'-CCCTGAAGCTGATAACG, 下游 5'-GCAAGC-AAACCAACG。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼 Gfi1.1 基因的扩增与纯化 采用 Trizol 法提取斑马鱼组织总 RNA, 应用 Fermentas 逆转录试剂盒合成 cDNA, 反应条件: 模板 RNA 2 μ g, OligodT 1 μ L, 加 DEPC 水补足 12 μ L, 混匀, 65 $^{\circ}C$ 5 min 后置于冰上继续加样, 5 $\times$ 逆转录缓冲液 4 μ L, RiboLock RNase Inhibitor 1 μ L, 10 mM dNTP 2 μ L, M-M-LV 逆转录酶 1 μ L, 混匀, 继续 42 $^{\circ}C$ 60 min, 72 $^{\circ}C$ 5 min, -20 $^{\circ}C$ 保存备用。PCR 反应体系: 斑马鱼 cDNA 模板 2 μ L, 斑马鱼 gfi1.1 全长引物 (20 pmol/ μ L) 2 μ L, 10 mM dNTP 1 μ L, 5 $\times$ LA 缓冲液 2 μ L, LA 酶 0.5 μ L, DEPC 水 12.5 μ L, 总体积 20 μ L, 反应条件: 98 $^{\circ}C$ 预变性 30 s, 98 $^{\circ}C$ 10 s 变性, 56 $^{\circ}C$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 50 s, 35 个循环后, 72 $^{\circ}C$ 终延伸 5 min。PCR 产物的切胶回收纯化: PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 按 Fermentas 凝胶回收试剂盒回收纯化目的条带。

1.2.2 pGM-T-Gfi1.1 载体的构建 斑马鱼 gfi1.1 PCR 产物与 pGM-T 载体的连接: Gfi1.1 目的片段 1 μ L, pGM-T 载体 1 μ L, 10 $\times$ T4 连接酶缓冲液 1 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, DEPC 水 6 μ L, 混匀后 24 $^{\circ}C$ 水浴过夜。取 5 μ L 连接产物加入到 50 μ L DH-5 α 感受态细菌中冰上 30 min, 42 $^{\circ}C$ 水浴中热休克 90 s, 转移至冰上 2 min, 加放 400 μ L 不含抗生素的 LB 培养液, 放于 37 $^{\circ}C$ 摇床, 150 rpm 1 小时, 取 100 μ L 菌液于涂有 IPTG 和 X-GAL 的氨苄青霉素浓度为 100 μ g/mL 的琼脂平板上, 用无菌玻璃棒将细菌均匀涂布到整个平板表面, 将平板置于 37 $^{\circ}C$ 培养箱正置干燥约 1 h, 然后将平板倒置放在 37 $^{\circ}C$ 培养箱培养 16-18 h, 进行菌落挑取, 质粒小量提取, 送北京擎科新业生物技术有限公司测序。

1.2.3 pGM-T-Gfi1.1 质粒的线性化 pGM-T-Gfi1.1 载体的线性化: 选取靠近 SP6 启动子下游的 NdeI 限制性内切酶, 酶切反应体系: 10 $\times$ 快速酶切缓冲液 2 μ L, 质粒 DNA 4 μ L, NdeI 限制性内切酶 2 μ L, 加入 DEPC 水 12 μ L, 总体积 20 μ L, 37 $^{\circ}C$ 水浴过夜, 次日将反应过夜的酶切产物置于 65 $^{\circ}C$ 水浴 5 min, 使限制酶失活。NdeI 酶切产物的回收纯化: 将酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 按试剂盒切胶回收目的条带。

1.2.4 体外转录 Gfi1.1 mRNA 及鉴定 采用切胶回收纯化的线性化 pGM-T-Gfi1.1 质粒为体外转录的模板, 反应体系: DEPC 水 1 μ L, 5 $\times$ TranscriptAid 反应缓冲液 4 μ L, 100 mM ATP 2 μ L, CTP2 μ L, GTP2 μ L, UTP1.5 μ L, 帽子类似物 2 μ L, 线性化 pGM-T-Gfi1.1 模板 3.5 μ L, T7 Transcript Aid 酶混合液 2 μ L, 总体积 20 μ L, 充分混匀, 短暂离心后, 置于 37 $^{\circ}C$ 水浴锅中孵育 3 h。对体外转录的 Gfi1.1 mRNA 产物进行跑胶, 加样体系: Gfi1.1 mRNA 产物 1 μ L, DEPC 水 2 μ L, 2 $\times$ RNA loading 染料

3 μ L, 充分混匀, 短暂离心, 置于 70 $^{\circ}C$ 水浴中加热 10 min, 并且同时对 RiboRuler RNA Ladder 进行 70 $^{\circ}C$ 水浴热孵育 10 min, 将该产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果

2.1 斑马鱼 Gfi1.1 基因的克隆

经过 RT-PCR 产物的凝胶电泳结果, 获得 1219 bp 的片段, 与期望的目的片段大小一致(图 1A)。

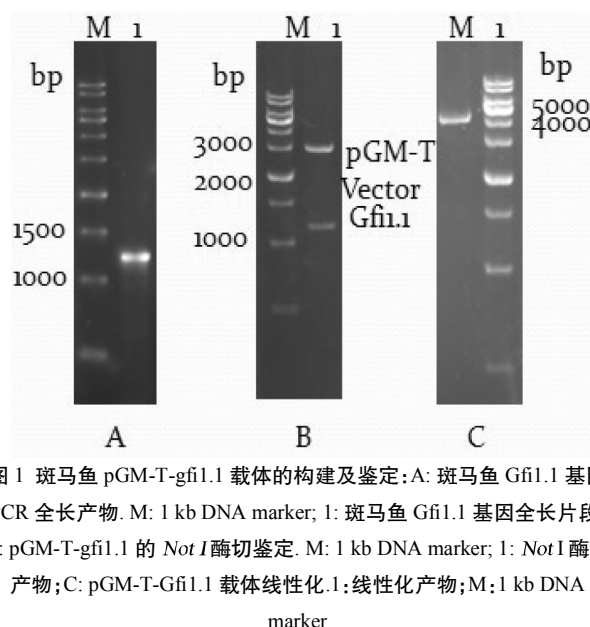


图 1 斑马鱼 pGM-T-gfi1.1 载体的构建及鉴定: A: 斑马鱼 Gfi1.1 基因 PCR 全长产物; M: 1 kb DNA marker; 1: 斑马鱼 Gfi1.1 基因全长片段; B: pGM-T-gfi1.1 的 Not I 酶切鉴定; M: 1 kb DNA marker; 1: Not I 酶切产物; C: pGM-T-Gfi1.1 载体线性化; 1: 线性化产物; M: 1 kb DNA marker

Fig.1 Construction and identification of the zebrafish pGM-T-Gfi1.1: A: Full length of PCR product of zebrafish Gfi1.1 gene. M: 1 kb DNA marker; 1: PCR product of zebrafish Gfi1.1; B: Identification of pGM-T-Gfi1.1 vector by digestion of Not I M: 1 kb DNA marker; 1: digestion product of Not I; C: linearization of the pGM-T-Gfi1.1 1: linearization product; M: 1 kb DNA marker

2.2 重组质粒 pGM-T-Gfi1.1 的筛选鉴定

取 PCR 产物与 pGM-T 载体进行连接反应, 将连接产物转化 DH-5 α 感受态细菌, 挑选白色克隆于加有抗生素的 LB 中培养扩增, 质粒小量提取后用 NotI 限制性内切酶酶切后经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳可见 2 条条带, 即位于 3015 bp 处的线性 pGM-T 载体和 1219 bp 的目的条带, 结果与预期符合(图 1B)。

2.3 pGM-T-Gfi1.1 质粒的线性化

质粒小量提取后的 pGM-T-Gfi1.1 质粒进行 NdeI 限制性内切酶酶切后经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 可见位于约 4200 bp 的目的条带, 实验结果与预期一致(图 1C)。

2.4 Gfi1.1 mRNA 的体外转录及鉴定

将线性化的 pGM-T-Gfi1.1 质粒进行切胶回收纯化, 按照体外转录试剂盒要求对线性化的 pGM-T-Gfi1.1 进行体外转录, 取 Gfi1.1 mRNA 产物与 2 $\times$ RNA loading 染料的混合物及 RNA Ladder 进行 70 $^{\circ}C$ 水浴加热处理, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 见 RNA Ladder 1200 bp 处一明亮条带, 即为该目的条带, 因 RNA 具有易降解的特性, 因此在目的条带下方可见微弱拖带, 该实验结果与预期一致(图 2)。

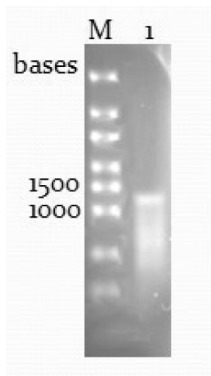


图2 pGM-T-Gfi1.1 载体的体外转录: M: RNA marker; 1: pGM-T-Gfi1.1 的 RNA 产物

Fig.2 In vitro transcription of pGM-T-Gfi1.1. M: RNA marker; 1: RNA product of pGM-T-Gfi1.1

2.5 DNA 序列分析

由北京擎科新业公司对重组质粒 pGM-T-Gfi1.1 进行 Gfi1.1 DNA 序列分析, 所得结果与发表于 GenBank 上的序列 (NM_001020776) 一致。证实重组质粒 pGM-T-Gfi1.1 构建成功。

3 讨论

骨髓增殖性肿瘤 (Myeloproliferative neoplasms, MPN) 是孱弱的干细胞获得性的克隆性髓系恶性肿瘤^[5]。JAK2^{V617F} 突变存在于大于 95 % 的 PV, 50 % ET 和 PMF 患者^[6]。除先前报道的 MPN 患者 JAK2^{V617F} 突变外, 仍有几种体细胞 MPN 相关突变, 包括: MPL, TET₂, ASXL1, IDH1, IDH2, CBL, IKZF1, LNK 和 EZH2, 这些突变基因起源于干细胞阶段。然而, 这些基因突变引起 MPN 的发病机理仍未知晓^[7,8]。

哺乳动物 Gfi1 是 Gilks 和同事在培养 Moloney 小鼠白血病病毒诱导的大鼠 T 淋巴瘤时, 发现前病毒的插入产生了 IL-2 非依赖性细胞系, Gfi1 所在位点是逆转录病毒整合的常见位点之一^[9]。研究表明 Gfi1 的参与起到加强癌蛋白 Pim-1 和 c-Myc 在 T 细胞淋巴瘤形成的作用^[10-14]。基因打靶技术提示 Gfi1 在中性粒细胞分化过程中具有重要作用, Gfi-1 缺失的小鼠会发生严重的中性粒细胞性贫血, 主要表现为成熟粒细胞的缺失^[15,16]。少数 SCN 患者是编码 Gfi1 转录因子突变或者 WAS 基因的活性突变引起^[17]。有报道 Gfi1 在 MDS 病人中呈现低表达水平, 是原始祖细胞数量减低还是与 MDS 疾病相关仍然未知^[18]。有研究表明, Gfi1 与其它转录因子通过竞争与协作共同调节转录过程及系别分化^[19]。

斑马鱼 Gfi1.1 基因与人和小鼠的 Gfi1 基因具有高度的序列同源性, 作为斑马鱼 Gfi 家族成员之一的 Gfi1.1 基因, 首次是以 Tol2 转座子为基础的独立大型增强子诱捕技术进行筛选获得, 增强子诱捕技术是为了识别组织特异性基因并且获得以荧光蛋白为报告基因的转基因斑马鱼系。与其斑马鱼同源基因 Gfi1 不同的是, 斑马鱼胚胎 Gfi1.1 基因仅在造血组织中表达^[1]。最近, 又有报道指出, Gfi1.1 基因在斑马鱼原始造血中是必须的, Gfi1.1 基因的丢失造成早期原始祖细胞标志 scl 和 gata1 的表达沉默。并且, Gfi1.1 的缺失引起斑马鱼血小板数量的增加。

在淋巴细胞方面, gfi1aa 突变体中, rag-1 的胸腺表达功能仍然保留^[20]。但是, Gfi-1 在造血干细胞的生物学行为形成的确切机制尚不确定。特别是 Jak2 阴性的骨髓增殖性肿瘤的发病机制仍不明确。成功克隆斑马鱼 Gfi1.1 基因并稳定的进行体外转录及加帽 pGM-T-Gfi1.1, 可以进一步研究 Gfi1.1 基因过表达与造血系统维持及骨髓增殖性肿瘤的机制提供有效的研究工具。

本研究根据基因库中斑马鱼 Gfi1.1 基因的 cDNA 序列的 CDS 区, 设计合成了包含 CDS 区的上下游引物, 采用 RT-PCR 克隆出斑马鱼 Gfi1.1 基因的全长序列, 与 pGM-T 载体连接后高效的转化感受态细菌, 获得 pGM-T-Gfi1.1 载体, 经测序验证, 与 GenBank (NM_001020776) 序列一致, 然后根据体外转录试剂盒要求, 具体根据以下要求: 1、pGM-T 提供的载体多克隆位点信息; 2、避免目的基因内部形成的酶切位点; 3、避免 3' 粘性末端的酶切位点, 最终选定 Nde I 限制性内切酶, 对 pGM-T-Gfi1.1 载体进行水浴酶切过夜后纯化回收, 在 T7 Transcript Aid 酶和 Ribo m7G 帽子类似物的参与下, 完成 Gfi1.1 mRNA 的体外转录及加帽过程, 形成稳定的 Gfi1.1 mRNA, 使其免于从 5' 端分解, 帽子结构在 RNA 的起始翻译过程中起重要作用。并且成功的对 Gfi1.1 mRNA 进行跑胶鉴定。由于 RNA 在体外具有易降解的特点, 因此在其目的片段以下有部分已降解的小片段 RNA, 电泳图片的表现为目的条带下方的微弱拖带。斑马鱼 Gfi1.1 mRNA 的体外转录及帽子结构的完成及鉴定, 为今后研究斑马鱼 Gfi1.1 基因的过表达与胚胎造血发生及疾病模型提供了一个有效的研究工具。

参考文献 (References)

- [1] Wei W, Wen L, Huang P, et al. Gfi1.1 regulates hematopoietic lineage differentiation during zebrafish embryogenesis [J]. Cell Research, 2008, 18(6): 677-685
- [2] Roberts T, Cowell JK. Cloning of the human Gfi-1 gene and its mapping to chromosome region 1p22 [J]. Oncogene, 1997, 14(8): 1003-1005
- [3] Zeng H, Raif Y, Christian K, et al. Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells [J]. EMBO J, 2004, 23(20): 4116-4125
- [4] Huang M, Hu Z, Chang W, et al. The growth factor independence-1 (Gfi1) is overexpressed in chronic myelogenous leukemia [J]. Acta haematol, 2010, 123(1): 1-5
- [5] Mascarenhas J, Mughal TI, Verstovsek S. Biology and Clinical Management of Myeloproliferative Neoplasms and Development of the JAK Inhibitor Ruxolitinib [J]. Current Medicinal Chemistry, 2012, 19(26): 4399-4413
- [6] Tefferi A, Skoda R, Vardiman JW. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(11): 627-637
- [7] Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, DH and IKZF1 [J]. Leukemia, 2010, 24(6): 1128-1138
- [8] Passamonti F, Maffioli M, Caramazza D, et al. Myeloproliferative neoplasms: From JAK2 mutations discovery to JAK2 inhibitor therapies [J]. Oncotarget, 2011, 2(6): 485-490

(下转第 1812 页)

- [5] Borg D, Weigelt M, Wilhelm C., et al. Mesenchymal stromal cells improve transplanted islet survival and islet function in a syngeneic mouse model [J]. *Diabetologia*, 2013
- [6] Phinney D, Prockop D. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11): 2896-2902
- [7] Chamberlain G, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. *Stem Cells*, 2009, 25(11): 2739-2749
- [8] Lee MK, Kwon CH, Joh J W., et al. Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation [J]. *Transplantation*, 2010, 89(5):509-517
- [9] Solari MG, Srinivasan S, Boumaza I., et al. Marginal mass islet transplantation with autologous mesenchymal stem cells promotes long-term islet allograft survival and sustained normoglycemia [J]. *J Autoimmun*, 2009, 32(2): 116-124
- [10] Ito T, Itakura S, Todorov L., et al. Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function [J]. *Transplantation*, 2010, 89(12): 1438-1445
- [11] Lehmann R, Spinaz GA, Moritz W. Has time come for new goals in human islet transplantation? [J]. *Am J Transplant*, 2008, 8(6): 1096-1100
- [12] Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ., et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(13):1318-1330
- [13] Lai Y, Brandhorst H, Hossain H., et al. Activation of NFkappaB dependent apoptotic pathway in pancreatic islet cells by hypoxia [J]. *Islets*, 2009, 1(1): 19-25
- [14] Carlsson PO, Palm F, Andersson A., et al. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site [J]. *Diabetes*, 2001, 50(3): 489-495
- [15] 赵东波, 张福琴, 宋振顺. 骨髓基质干细胞及其来源的产胰岛素细胞移植对受体胰岛和新生血管的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26: 865-867
- [16] Robertson RP. Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass[J]. *Diabetes [J]*. 2010, 59(6): 1285-1291
- [17] Avallari G, Olivi E, Bianchi F., et al. Mesenchymal stem cells and islet cotransplantation in diabetic rats: improved islet graft revascularization and function by human adipose tissue-derived stem cells preconditioned with natural molecules [J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(12): 2771-2781
- [18] Yao Y, Zhang F, Wang L., et al. Lipopolysaccharide preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of acute myocardial infarction [J]. *J Biomed Sci*, 2009, 12(16): 174-181
- [19] Zhen H, Wang J, Xue L., et al. LPS-pretreated bone marrow stem cells as potential treatment for myocardial infarction [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 11(17): 1294-303
- [20] Penko D, Foroni L, Valente S., et al. Endothelial progenitor cells enhance islet engraftment, influence beta cell function and modulate islet connexin 36 expression [J]. *Cell Transplant*, 2013

(上接第 1820 页)

- [9] Gilks CB, Bear SE, Grimes HL, et al. Progression of interleukin-2(IL-2) dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene(Gfi1) encoding a novel zincfinger protein [J]. *Mol cell boil*, 1993, 13(3): 1759-1768
- [10] Zornig M, Schmidt T, Karsunky H, et al. Zinc finger protein GFI-1 cooperates with myc and pim-1 in T-cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2 [J]. *Oncogene*, 1996, 12(8): 1789-1801
- [11] Schmidt T, Zornig M, Beneke R, et al. MoMuV proviral integrations identified by Sup-E selection in tumors from infected myc/pim bitransgenic mice correlate with activation of the gfi-1 gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(13): 2528-2534
- [12] Schmidt T, Karsunky H, Gau E, et al. Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis [J]. *Oncogene*, 1998, 17(20): 2661-2667
- [13] Schmidt T, Karsunky H, Rodel B, et al. Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with beta-selection [J]. *EMBO J*, 1998, 17(18): 5349-5359
- [14] Scheijen B, Jonkers J, Acton D, et al. Characterization of pal-1, a common proviral insertion site in murine leukemia virus-induced lymphomas of c-myc and Pim-1 transgenic mice [J]. *J Virol*, 1997, 71(1): 9-16
- [15] Karsunky H, Zeng H, Schmidt T, et al. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1 [J]. *Nat Genet*, 2002, 30(3): 295-300
- [16] Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, et al. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation [J]. *Immunity*, 2003, 18(1): 109-120
- [17] Boztug K, Klein C. Novel genetic etiologies of severe congenital neutropenia [J]. *Curr Opin Immunol*. 2009, 21(5): 472-480
- [18] Huh HJ, Chae SL, Lee M, et al. CD34,RAB20,PU.1 and GFI1 mRNA expression in myelodysplastic syndrome [J]. *Int J Lab Hematol*. 2009, 31(3): 344-351
- [19] Phelan JD, Shroyer NF, Cook T, et al. Gfi1-Cell&Circuits: Unraveling transcriptional networks of development and disease [J]. *Curr Opin Hematol*, 2010, 17(4): 300-307
- [20] Jeffrey D, Cooney, Gordon J, et al. Teleost growth factor independence (gfi) genes differentially regulate successive waves of hematopoiesis [J]. *Developmental Biology*, 2013, 373(2): 431-441