

猪 IL-12p40 竞争定量 RT-PCR 检测方法的建立

司兴奎, 张济培, 陈建红, 顾万军

(佛山科学技术学院 动物医学系, 广东 佛山 528231)

摘要:根据 GenBank 中猪 IL-12p40 的序列设计引物, 采用 RT-PCR 技术扩增 377 bp 的部分基因片段, 并克隆到 pGEM-T Easy 载体中, 构建成含 IL-12p40 部分基因片段的重组质粒. 利用反向 PCR 技术构建与扩增 377 bp 片段共用同一对引物但扩增 255 bp 片段的竞争重组子. 通过重组质粒与竞争重组子竞争定量 PCR 方法 (qc-PCR), 建立了猪 IL-12p40 的标准竞争曲线和直线回归方程.

关键词:猪; IL-12p40; 竞争定量 RT-PCR

中图分类号: Q511; S828

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)04-0091-04

Establishment of a Quantitative Competitive RT-PCR Assay for Detection of Porcine IL-12p40 mRNA

SI Xing-kui, ZHANG Ji-pei, CHEN Jian-hong, GU Wan-jun

(Department of Animal Medicine, Foshan University, Foshan 528231, China)

Abstract: A 377 bp fragment of IL-12p40 was amplified from the total RNA of porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by RT-PCR, and one recombinant (primitive plasmid) was obtained by ligation of the 377 bp fragment and pGEM-T Easy vector. The other recombinant (competitive) plasmid containing 255 bp fragment of IL-12p40 was amplified by the same pair of primers for the 377 bp fragment, was constructed by reverse PCR based on the primitive plasmid. By the quantitative competitive PCR between the logarithm of ratios of amplified copies of primitive plasmid (which will be replaced by cDNA of IL-12p40 mRNA) to the amplified copies of series 2-fold dilution competitive plasmid copies in comparison with the logarithm of molecules of series 2-fold dilution competitive plasmid, the linear regression equation of the standard competitive curve for IL-12p40 mRNA detection was verified.

Key words: porcine; IL-12p40; quantitative competitive RT-PCR

IL-12 是由 p35 和 p40 两个亚单位组成的异源二聚体, 其免疫调节功能的发挥被 p40 的转录水平和 IL-12 受体所控制. IL-12 主要由 B 细胞、树突状细胞和巨噬细胞等抗原递呈细胞产生, 作为前炎症细胞因子, 在感染后可迅速产生, 增强机体对多种传染病的抵抗力, 诱导产生 IFN- γ 及促进 NK 和 Tc 细胞的细胞毒性反应; 此外, IL-12 还具有很强的抗肿瘤作用. 鉴于上述的诸多生物活性, IL-12 已被作为促进细胞免疫反应的佐剂以提高机体对免疫原的应答^[1]. 但由于 IL-12 的表达量较低, 且其半衰期较短, 故采用常规生物学技术很难准确反映其在调节

机体免疫应答等过程中的含量变化情况^[2]. 本研究旨在建立一种采用质粒 DNA 分子作为竞争模板, 检测猪 IL-12p40 的 qcRT-PCR 技术, 以期检测猪 IL-12p40 mRNA 转录的影响奠定技术基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体质粒 *E. coli* DH5 α 由佛山科学技术学院广东省预防兽医学重点实验室保存, pGEM-T Easy 载体质粒为 Promega 公司产品.

收稿日期: 2007-12-04

作者简介: 司兴奎 (1973—), 男, 副教授, 博士, E-mail: sixingkui@163.com

基金项目: 广东省自然科学基金博士科研启动基金 (06300063)

1.2 工具酶

AMV 禽源反转录酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 为 TaKaRa 生物有限公司产品;RNase A 为 Sigma 公司产品;Rnasin 为鼎国生物工程公司产品。

1.3 主要试剂

TRIzol LS Reagent 为 Invitrogen 公司产品;定量用 pUC19DNA/*Msp* I (*Hpa* II) Marker, 232 为 MBI Fermentas 生物工程公司产品;100 bp DNA Marker 及 DNA 快速回收试剂盒为博大泰克生物科技公司产品;ConA IV 型、IPTG、X-gal、DEPC 为 Sigma 公司产品;淋巴细胞分离液为通宝达生物科技有限公司产品。

1.4 猪外周血淋巴细胞分离与体外培养

按文献[2]介绍的方法进行。

1.5 猪外周血淋巴细胞总 RNA 提取

按照 TRIzol LS Reagent 试剂盒说明书进行。

1.6 猪 IL-12p40 部分基因片段的扩增与克隆

1.6.1 猪 IL-12p40 部分基因的反转录 采用 Oligo dT18 作为下游引物,参照 AMV 禽源反转录酶使用说明书略作修改,cDNA 合成方法具体为:取适量总 RNA,加入 Oligo dT18 后 70 ℃作用 10 min,冰浴 2 min;补加 5 × 反转录缓冲液、反转录酶、RNasin、dNTP 和无 RNase 三蒸水至 20 μL,室温反转录 10 min 后,42 ℃ 2 h。具体反应体系为 5 × RT buffer 4 μL,10 mmol/L dNTPs 4 μL,50 μg/μL Oligo(dT) 18 1 μL,AMV 反转录酶(10 U/μL) 1 μL,RNasin(30 U/μL) 1 μL,总 RNA 及无 RNase 三蒸水 9 μL。

1.6.2 猪 IL-12p40 部分基因的扩增 采用 Primer Premier5.0 软件根据 GenBank 中的序列(参考序列号:U08317)设计合成引物,对 IL-12p40 cDNA 进行扩增。其中,上游引物序列为:5'-GATGCTGGCCAG-TACACC-3',下游引物序列为 5'-TCCAGCAGCAGCT-CAATG-3',可扩增片段为 377 bp。PCR 的反应体系为:10 × PCR buffer 5 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,25 pmol/μL 上、下游引物各 1 μL,cDNA 2 μL,*Taq* DNA 聚合酶 2.5 U,加水至总体积为 50 μL。按照下列条件进行扩增反应:94 ℃预变性 3 min,然后 94 ℃变性 30 s,59 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,循环 35 次,最后 72 ℃延伸 10 min。反应结束后,取 10 μL 扩增产物用凝胶电泳后,以 EB 染色后在紫外检测仪上观察分析,记录结果。

1.6.3 PCR 产物的克隆 将符合预期大小的 PCR 产物,采用玻璃奶 DNA 片段回收试剂盒按照说明书推荐的方法进行回收,使用三蒸水溶解后 -20 ℃保

存备用。

1.6.4 PCR 产物与质粒载体的连接、转化、重组子的鉴定及质粒少量提取 参见文献[3-4]介绍的方法进行。对阳性重组子在对菌落进行 PCR 鉴定后,少量提取相应质粒用 *EcoR* I 限制性内切酶进行酶切鉴定。

1.6.5 序列测定与分析 选取插入预期大小目的片段的阳性重组子,采用 SP6 启动子和 T7 启动子通用引物在 ABI377 测序仪上进行序列测定,登陆 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast 进行网上比对分析和鉴定。

1.7 猪 IL-12p40 部分基因片段竞争缺失质粒的构建

在获得含有猪 IL-12p40 部分基因片段的重组子作 100 倍稀释的基础上,采用 Primer Premier5.0 软件设计并合成缺失 IL-12p40 部分基因片段中间区域的反向特异性引物;同时在上下游引物的 5' 端各加入 *Bam*H I 限制性内切酶识别序列和 2 个保护性碱基。上游引物为:5'-TAGGATCCGAGTGTCAG-GAGGGCAGTG-3',下游引物为:5'-TAGGATCCGC-CACCAGCAGGTGAAACG-3'。除退火条件为 64 ℃延伸时间为 3 min 外,PCR 反应体系及反应条件均参见 1.6.2。反应结束后,取 10 μL 扩增产物用凝胶电泳后,以 EB 染色后在紫外检测仪上观察分析,记录结果。PCR 产物的回收、酶切、连接、转化及鉴定均参见 1.6.3、1.6.4 及 1.6.5 中方法进行。

1.8 猪 IL-12p40 部分基因的标准竞争曲线及直线回归方程的构建

将含有 IL-12p40 部分基因片段(含有较大的目的片段,简称为目的质粒)的重组质粒及相应缺失中间部分基因片段的竞争重组子(含有较小的目的片段,简称为竞争质粒)进行竞争定量(qc-PCR)。具体方法为:将 1 μL 10⁷ 倍稀释的 IL-12p40 竞争质粒同相应倍比稀释(2 × 10⁵ ~ 2¹⁰ × 10⁵ 倍系列稀释)的 1 μL 目的质粒在 50 μL 体系内进行竞争反应,方法和条件参见 1.6.2,将 10 μL 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检查,同时以 pUC19DNA/*Msp* I (*Hpa* II) Marker, 23 定量 DNA Marker 做参照。用 Kodak KDS1D3.0 软件凝胶成像分析系统分析大小两竞争片段含量,并计算出二者拷贝数的比值,将比值取常用对数作为纵坐标,而将倍比稀释目的质粒拷贝数的常用对数值作横坐标,用 Excel2000 软件进行直线回归分析,并得到 IL-12p40 部分基因的直线回归方程和标准竞争曲线。

2 结果与分析

2.1 猪 IL-12p40 部分基因片段克隆及其竞争缺失质粒的鉴定

猪外周血淋巴细胞经 ConA 刺激后,提取细胞总

RNA,经反转录后获得 cDNA,采用 IL-12p40 特异性引物进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检查,结果表明扩增出 1 条特异的略小于 400 bp 的片段. 将扩增产物克隆入 pGEM-T Easy 载体,挑取白色菌落分别进行菌落 PCR、*EcoR* I/*Bam*H I 酶切鉴定及测序鉴定与分析,结果表明成功获得含有 IL-12p40 基因中 377 和 255 bp 的阳性重组子,见图 1.



M: 100 bp DNA marker; 1:重组子 *EcoR* I 酶切产物(395,2 997 bp); 2、3:菌落 PCR 产物(377 bp); 4:重组子 *Bam*H I 酶切产物(3 276 bp); 5:重组子 *EcoR* I 酶切产物(279,2 997 bp); 6、7:菌落 PCR 产物(255 bp)

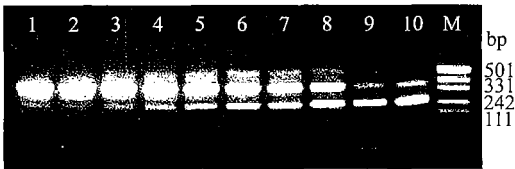
M:100 bp DNA marker; 1:identification of recombinants by *EcoR* I digestion (395, 2 997 bp); 2,3:amplification product of colony PCR (377 bp); 4: identification of recombinants by *Bam*H I digestion (3 276 bp); 5: identification of recombinants by *EcoR* I digestion (279 and 2 997 bp); 6,7:amplification product of colony PCR (255 bp)

图 1 猪 IL-12p40 部分基因片段的克隆及竞争缺失质粒的鉴定

Fig. 1 Colony PCR and enzymatic identification of partial fragment of IL-12p40 and its deleted competitive plasmid

2.2 猪 IL-12p40 标准竞争曲线及直线回归方程的建立

将 1 μ L 含有 IL-12p40 部分基因片段目的质粒倍比稀释(自 2×10^5 始至 $2^{10} \times 10^5$ 倍系列稀释,初始浓度为 0.67 μ g/ μ L 即 1.78×10^{11} 拷贝/ μ L)同 1 μ L 10^7 倍竞争质粒(质量为 40.1 fg 即 11 046.7 拷贝)进行 qc-PCR. 将 10 μ L 扩增产物进行分析,结果见图 2 和表 1. 直线回归分析获得直线回归方程的相关指数 r^2 为 0.971 5,如图 3.



M:pUC19 DNA/*Msp* I (*Hpa* II) 定量 marker; 1 ~ 10: 1 μ L $2 \times 10^5 \sim 2^{10} \times 10^5$ 倍比稀释的含 IL-12p40 部分基因片段(377 bp) 目的质粒与 1 μ L 10^7 倍稀释含部分缺失片段(扩增 255 bp) 竞争质粒间竞争 PCR 结果

M: pUC19 DNA/*Msp* I (*Hpa* II) marker; 1 - 10: Result of qc-PCR between one microliter of serially diluted target plasmid cloned by partial IL-12p40 gene (377 bp) from 2×10^5 to $2^{10} \times 10^5$ -fold and one microliter of 10^7 -fold diluted its competitive recombinant contained with partially deleted fragment of partial gene of IL-12p40 (amplified 255 bp)

图 2 猪 IL-12p40 部分基因的质粒与竞争缺失质粒间的 qc-PCR 结果

Fig. 2 Result of quantitative competitive PCR between the larger target recombinant cloned by partial gene of IL-12p40 and its partially deleted recombinant

表 1 含有猪 IL-12p40 部分基因的重组子间的 qc-PCR 结果(log10)

项目 items	不同稀释倍数 different dilution rates									
	2×10^5	$2^2 \times 10^5$	$2^3 \times 10^5$	$2^4 \times 10^5$	$2^5 \times 10^5$	$2^6 \times 10^5$	$2^7 \times 10^5$	$2^8 \times 10^5$	$2^9 \times 10^5$	$2^{10} \times 10^5$
倍比稀释质粒的拷贝数对数值	6.0	5.7	5.4	5.0	4.8	4.4	4.2	3.9	3.6	3.2
logarithm of competitive recombinant copies/ (μL^{-1})										
377 bp 与 255 bp 拷贝数比值对数值	...	1.3	1.1	1.0	0.6	0.2	0.1	-0.2	-0.8	-1.0
logarithm of 377 and 255 bp fragment copy ratio										

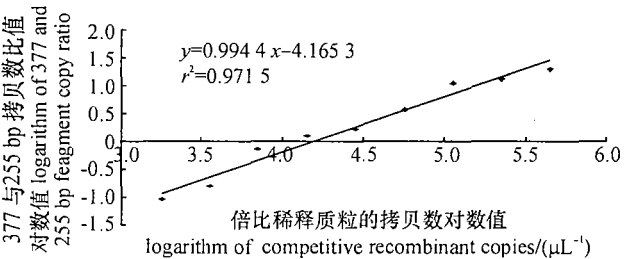


图 3 猪 IL-12p40 mRNA 定量的标准竞争曲线和直线回归方程

Fig. 3 The standard curve and liner regression equation for quantitation of porcine IL-12p40 mRNA

3 讨论

PCR 作为常规的分子生物学技术不但可以用于对目的基因的大量扩增,还可用于对同一目的基因联合限制性内切酶消化、放射性标记技术、ELISA 技术、电化学发光技术及荧光技术进行定量分析^[5-6]. 其中尤其以新近发展起来的实时定量 PCR (real-time PCR) 技术最为高效、便捷,且已有逐步代替其他 PCR 技术定量方法的趋势^[7-8]. 但由于其专用的设备或相应荧光标记的探针价格昂贵,而限制了其广泛应用. 本研究采用竞争定量 PCR 方法,构建含有

目的基因的重组子和缺失部分基因的竞争质粒采用同一对引物进行扩增时,出现扩增片段上大小差异的2个分子,通过二者的拷贝数比值与初始时相应目的基因加入的分子数间的相关性,构建标准竞争曲线和直线回归方程,进而采用曲线及方程对含有目的基因的样品与缺失部分基因的竞争质粒间竞争结果计算出含目的基因样品的模板含量.与实时定量PCR相比,该方法经济、方便且不需要高端设备,更适合拥有常规PCR仪且需对靶基因的定量分析.

根据qc-PCR采用的竞争模板不同又可分为DNA或RNA模板两类^[9-10].采用RNA作为竞争模板虽然兼顾反转录效率对试验的影响,但难以确定竞争模板的稀释范围.据相关研究结果,即便采用RNA作为竞争模板也难保证扩增效率一致,因为对于来自SP6、T7或T3 RNA聚合酶体外转录获得的RNA,除了要完全消化掉线性化的模板DNA外,一些未能完全转录的大小不一且占较高比例RNA,对于真正起到竞争作用的RNA存在一定程度的干扰,进而影响试验结果的可信度^[9-10].本研究采用DNA作为竞争模板,尽管存在忽略反转录效率对构建曲线的影响之不足,但因其稳定、操作简单、容易确定竞争模板的稀释范围等优点而显示出较好的应用前景.

参考文献:

- [1] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 北京:科学出版社, 2001:232-239.
 - [2] 杨汉春,姚火春,王君伟. 动物免疫学[M]. 2版. 北京:中国农业大学出版社,2003:66-178.
 - [3] 萨姆布鲁克J,拉塞尔D W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂等译. 北京:科学出版社,2003:26-701.
 - [4] 郑洁,郭鑫,杨汉春,等. PRRS病毒感染对猪细胞因子IL-2、IL-4、IL-10 mRNA转录的影响[J]. 畜牧兽医学报,2003,34(5):484-489.
 - [5] DUFOUR V, ARNAULD C, LANTZ O, et al. Quantification of porcine cytokine gene expression using RT-PCR, a homologous internal control and chemiluminescence for microplate detection [J]. J Immunol Methods, 1999, 229: 49-60.
 - [6] IN-SOO C, ELLEN W C, SAMUEL K M, et al. Evaluation of cytokine gene expression in porcine spleen cells, peripheral blood mononuclear cells, and alveolar macrophages by competitive RT-PCR [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2002,34: 119-126.
 - [7] BRUNBORG I M, MOLDAL T, JONASSEN C M. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR [J]. J Virol Methods, 2004, 123(2): 171-178.
 - [8] CHUNG W B, CHAN W H, CHAUNG H C, et al. Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs [J]. J Virol Methods, 2005, 124(1-2): 11-19.
 - [9] MANSFIELD L S, URBAN J F, MURTAUGH M P, et al. Construction of internal cDNA competitors for measuring IL-10 and IL-12 cytokine gene expression in swine [J]. Vet Immunol Immuno-Pathol, 1998, 65: 63-74.
 - [10] JOHN S B, SIVADASAN K, BARRY T. Rouse limitation and modifications of quantitative polymerase chain reaction [J]. J Immunol Methods, 1993, 65: 207-216.
- 【责任编辑 柴 焰】
-
- (上接第90页)
- [9] 吴垠,孙建明,周遵生. 温度对中国对虾、日本对虾主要消化酶活性的影响[J]. 大连水产学院学报,1997,12(2):15-22.
 - [10] 沈文英,胡洪国,潘雅娟. 温度和pH值对南美白对虾消化酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼,2004,35(6):543-548.
 - [11] MAUGLE PAUL D. Effects of shot-necked clam diet on shrimp growth and digestive enzyme activities [J]. Bull Jap Soc Sci Fish,1982,48(12):1759-1754.
 - [12] 刘玉梅,朱谨钊. 中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究[J]. 海洋与湖沼,1991,22(6):571-575.
 - [13] 许培玉,周洪琪. 小肽制品对凡纳滨对虾蛋白酶和淀粉酶活力的影响[J]. 上海水产大学学报,2005,14(2):133-137.
 - [14] DAS K M, TRIPATHI S D. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val) [J]. Aquac,1991,92:21-32.
 - [15] 梅景良,马燕梅,王宏,等. pH值对黑鲷胃肠道及肝胰脏主要消化酶活力的影响[J]. 云南农业大学学报,2004,19(5):592-596.
 - [16] 潘鲁青,刘涨宇,肖国强. 甲壳动物幼体消化酶研究进展[J]. 中国水产科学,2006,13(3):492-501.
 - [17] 李广丽,李思发. 长江、瓯江、辽河中华绒螯蟹消化酶的初步研究[J]. 上海水产大学学报,1996,5(2):134-137.
 - [18] 于书坤. 中国对虾消化酶的研究[J]. 海洋科学集刊,1987,28(10):89-90.
- 【责任编辑 柴 焰】