

猪 *IFN- β* 和 *IRF-3* 基因实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

王蕊^{1,2}, 张改平², 乔松林², 刘永晖^{1,2}, 蒋志政^{1,2}, 万博², 鲍登克², 王爱萍^{1*}

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学
重点开放实验室/河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 为建立猪 *IFN- β* 及 *IRF-3* 基因实时荧光定量 PCR 检测方法, 依据 GenBank 中 *IFN- β* 和 *IRF-3* 基因的保守序列, 设计并合成各自特异性引物, 并以 *β actin* 为内参基因, 采用 SYBR Green I 为染料, 建立实时荧光定量检测方法。提取猪肺泡巨噬细胞总 RNA, 经反转录得 cDNA, 用特异性引物经 PCR 扩增得到 *IFN- β* 和 *IRF-3* 基因, 将其克隆至 pMD-19T 载体, 经测序鉴定后得重组质粒, 依次 10 倍稀释做为标准品, 建立标准曲线及溶解曲线。结果表明, *β actin* 基因、*IFN- β* 基因和 *IRF-3* 基因标准曲线线性关系较好, $R^2 \geq 0.997$; 溶解曲线为特异性单峰, 无非特异性扩增, 检测下限可达 100 个拷贝/ μ L。建立的猪 *IFN- β* 和 *IRF-3* 基因实时荧光定量 RT-PCR 检测方法, 特异性强、重复性好, 为从分子水平上研究猪的免疫应答奠定了基础。

关键词: 猪; 实时荧光定量 PCR; *IFN- β* 基因; *IRF-3* 基因

中图分类号: S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)05-0137-05

Establishment of a Real-time Fluorescent Quantitative RT-PCR Assay for Detection of Porcine *IFN- β* and *IRF-3* genes

WANG Rui^{1,2}, ZHANG Gai-ping², QIAO Song-lin², LIU Yong-hui^{1,2}, JIANG Zhi-zheng^{1,2},
WAN Bo², BAO Deng-ke², WANG Ai-ping^{1*}

(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Key Laboratory of
Animal Immunology of the Ministry of Agriculture/Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology,
Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To establish real-time fluorescent quantitative RT-PCR assays for detecting porcine *IFN- β* and *IRF-3*, several specific primer pairs were designed according to the porcine's *IFN- β* and *IRF-3* gene sequences available in GenBank, and the porcine *β actin* gene was used as an internal gene control. The total RNA was extracted from porcine alveolar macrophages. The reverse transcriptase PCR was used to obtain the first strand cDNA. Fragments for *IFN- β* and *IRF-3* were amplified by PCR from the synthesized cDNA using the designed specific primers. The PCR products were purified and cloned into pMD-19T vector. The positive recombined plasmids were serially diluted and used as a standard. The standard and melting curve was analyzed. The results showed that the *Ct* value of *β actin*, *IFN- β* and *IRF-3* genes had a good linear relationship ($R^2 \geq 0.997$) and the melting curve showed a single peak. The established real-time PCR methods can detect 100 copies of *IFN- β* and *IRF-3* mRNA. The developed real-time PCR using SYBR Green I

收稿日期: 2012-01-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30730068); 河南省重大科技攻关计划项目(082101510002)

作者简介: 王蕊(1987-), 女, 河南南阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 病毒分子致病机制。E-mail: mengyu25129@126.com

* 通讯作者: 王爱萍(1970-), 女, 青海西宁人, 教授, 主要从事动物免疫学研究。E-mail: pingaw@126.com

dye had high sensitivity, specificity and reproductivity, and could be used as an effective tool for detection and quantification of *IFN- β* and *IRF-3*.

Key words: porcine; real-time fluorescent quantitative PCR; *IFN- β* gene; *IRF-3* gene

干扰素(interferon, IFN)作为内源抗病毒感染因子发现于 1957 年^[1],由 I 型干扰素和 II 型干扰素两大基因家族组成。I 型干扰素(*IFN- α/β*)由一系列紧密相关的 *IFN- α* 基因和单一的 *IFN- β* 基因编码;II 型干扰素由一个结构不相关的 *IFN- γ* 组成,由单一基因编码^[2]。*IFN- α/β* 具有多种生物学功能,最重要的是对免疫系统的影响,是机体抵抗病毒的第一道防线,并具有重要的免疫调节功能,如可调节抗体产生,增强 T 细胞和 NK 细胞的细胞毒性作用,抑制淋巴细胞的增殖及 T 细胞向 Th1 细胞的分化等^[3-5]。

IFN- β 基因由病毒或双链 RNA 诱导产生,在转录水平上受到严格调控,其诱导和表达由一些对免疫系统有重要影响的转录因子控制,其中一类转录因子称为干扰素调节因子(IRF, IFN regulatory factor),包括 9 个成员(IRF-1—IRF-9)^[6],*IRF-3* 在 *IFN- β* 基因的表达中起重要作用。*IRF-3* 表达于机体多种细胞,在病毒感染或 TLR 激活状态下活化,通过磷酸化和核移位而调控 *IFN- β* 的表达^[7];IFN 相关的转录因子可调节多种基因的表达,这些基因产物对天然免疫和获得性免疫具重要调节作用^[8]。因此,检测 *IFN- β* 及其调节因子 *IRF-3* 的转录动态可了解机体应对病毒感染时免疫系统的应答状态。

反转录 PCR 是研究哺乳动物组织中基因表达的有效方法,实时荧光定量 PCR 可灵敏、精确的从 mRNA 水平上对细胞因子进行定量^[9],甚至可对在靶细胞中表达水平很低的细胞因子进行检测,目前该方法已成功用于猪细胞因子检测^[10]。鉴于此,建立了一种猪 *IFN- β* 、*IRF-3* mRNA 的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法,旨在为从分子水平上研究猪的抗病毒免疫反应奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

Trizol Regent 购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自 Tiangen 公司,反转录酶 M-MLV(Rnase H⁻)、Premix Ex Taq DNA 聚合酶、pMD-19T 载体以及 SYBR[®] Premix Ex Taq (Perfect Real Time)酶均购自宝生物工程(TaKa-Ra)(大连)有限公司。荧光定量 PCR 仪 Mastercycler ep realplex 为 Eppendorf 公司产品。

1.2 猪肺泡巨噬细胞(PAM)总 RNA 的提取与反转录

依照文献[11]的方法分离培养 PAM,参照

Trizol Regent 说明提取细胞总 RNA,按反转录酶 M-MLV 说明书并以 Oligo(dT)18 作为下游引物进行反转录。cDNA 合成按 40 μ L 反应体系进行:Oligo(dT)18(50 pmol/ μ L) 2.0 μ L,总 RNA 1 μ g,加 DEPC 水至 28 μ L,72 $^{\circ}$ C 下水浴 10 min,立即冰浴 5 min,加 5 \times M-MLV Buffer 8.0 μ L,dNTP(各 10 mmol/L) 2 μ L,RNA 酶抑制剂 1 μ L,M-MLV 转录酶(200 U/ μ L) 1.0 μ L 加 DEPC 至 40 μ L。42 $^{\circ}$ C 下反转录 1 h,70 $^{\circ}$ C 保温 15 min 后冰上冷却,置于一 80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.3 猪 *IFN- β* 及 *IRF-3* 基因部分片段的扩增

根据 GenBank 中猪的 *IFN- β* 、*IRF-3* 及看家基因 *β -actin* 各基因的保守序列设计并合成了各自的特异性引物,引物序列见表 1。每个基因设计 2 对引物,1 对长片段引物(前加 p),用于构建标准质粒,另 1 对短片段引物用于 Real-Time PCR 反应。引物均由生工生物工程技术有限公司合成。分别以 cDNA 为模板,用各自特异性引物进行 PCR 扩增,反应体系(20 μ L):预混的 Ex Taq 聚合酶 10 μ L,cDNA 模板 2 μ L,上、下游引物各 1 μ L(10 μ mol/L),ddH₂O 6 μ L。PCR 反应参数 95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,53~65 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30~50 s,共 30 个循环,反应产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 重组标准质粒的构建

用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,将回收产物与 pMD-19T 载体连接,并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,涂布于氨苄青霉素抗性培养基。37 $^{\circ}$ C 下培养过夜,挑取单克隆,做 PCR 及测序鉴定,鉴定正确的重组质粒用作标准品。

1.5 循环条件的优化

采用 SYBR Green I 染料法,在 Mastercycler ep realplex (Eppendorf 公司)荧光定量 PCR 仪上进行反应,以出现最小的 *Ct* 值、最大的荧光量和不出现非特异性扩增为标准,优化 PCR 反应条件。

退火温度的优化:由于定量引物扩增片段低于 150 bp,优先采用两步法 PCR 进行扩增,其次选择三步法,退火温度选择在 55~65 $^{\circ}$ C,比较电泳条带的明亮程度以及 *Ct* 值、荧光强度和溶解曲线有无引物二聚体来确定最佳退火温度。

引物浓度的优化:在优化的退火温度下,对引物浓度在 10~50 mmol/L 范围内进行优化,同样通过比较 *Ct* 值、荧光强度及溶解曲线是否有引物二聚体峰来确定最佳引物浓度。

表 1 猪 *IFN-β* 及 *IRF-3* 基因 cDNA PCR 扩增及实时荧光定量 PCR 扩增引物序列

基因	引物序列(5'→3')	用途	基因登录号	产物长度/bp
<i>β-actin</i>	pF:CCATGTACGTGGCCATCCAG	RT-PCR 及质粒构建	XM003124280	477
	pR: TGATGTCCACGTCGCACTTC			
	F:TGCGGGACATCAAGGAGAA	Real-time PCR		133
	R:TCGTTGCCGATGGTGATG			
<i>IRF-3</i>	pF:CCTCAGGACGAGCCGTGGGTCAA	RT-PCR 及质粒构建	NM213770	180
	pR:GAGGCAGGCCTTGTACTGGTCGG			
	F:AAGGTTGTCCCCATGTGTCTCCG	Real-time PCR		93
	R:GGAAATGTGCAGGTCCACCGTG			
<i>IFN-β</i>	pF:CTGGAACAGTTGCCTGGGACTCC	RT-PCR 及质粒构建	NM001003923	377
	pR:TGGACGACTGTCCAGGCACAGC			
	F:TGCAACCACCACAATTCC	Real-time PCR		79
	R:CTGAGAATGCCGAAGATCTG			

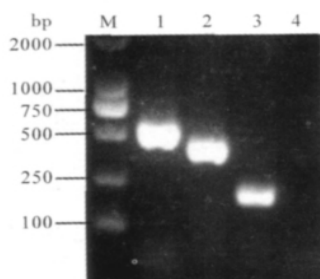
1.6 Real-time PCR 标准曲线的制作

用质粒提取试剂盒提取重组质粒,经核酸蛋白紫外分光仪测其 OD_{260}/OD_{280} nm 处吸光值,选取比值在 1.8~2.0 的质粒用于标准品制作标准曲线。并根据质粒浓度换算成拷贝数(copies),10 倍系列稀释成含有 $10^8 \sim 10^2$ 个拷贝/ μ L 的 7 个梯度,以此作为模板根据优化的反应条件进行 PCR 反应,并在扩增完成后增加溶解曲线。溶解曲线分析在反应结束后进行,条件为 95 °C 15 s,60 °C 15 s 后温度经 20 min 逐渐升高至 95 °C 并维持 15 s。每个梯度每次反应进行 3 次重复,并进行 3 次不同反应,确定其检测的特异性及重复性。

2 结果与分析

2.1 质粒标准品的构建

由 PAM 提取的总 RNA 经反转录成 cDNA 后,用特异性引物(前加 p)进行 PCR 扩增 *IFN-β*、*β-actin*、*IRF-3* 基因,得到与目的片段大小一致的产物。产物回收后与 pMD-19T 载体连接,并转化 DH-5 α 感受态细胞。经 PCR 及测序鉴定,表明成功构建了质粒标准品(图 1)。



M. DS2000 DNA Maker; 1. 重组 *β-actin* 质粒 PCR 产物;
2. 重组 *IFN-β* 质粒 PCR 产物; 3. 重组 *IRF-3* 质粒
PCR 产物; 4. 阴性对照

图 1 重组质粒 PCR 鉴定

2.2 Real-time PCR 循环条件的优化结果

建立了 20 μ L 的 Real-time PCR 反应体系: SYBR® Premix Ex Taq 10 μ L, 上、下游引物(10 pmol/ μ L)各 1 μ L, cDNA 1 μ L, 补加 ddH₂O 至 20 μ L。最佳反应条件:*IFN-β*、*β-actin* 及 *IRF-3* 基因均采用两步法扩增:95 °C 3 min;95 °C 20 s, 60 °C(*β-actin*)、62 °C(*IFN-β*)或 63.3 °C(*IRF-3*) 30 s,40 个循环;扩增结束后进行溶解曲线分析。在以上反应条件下均获得了最大的荧光值和最小的 *Ct* 值,且溶解曲线只有单一峰。

2.3 标准曲线的制作

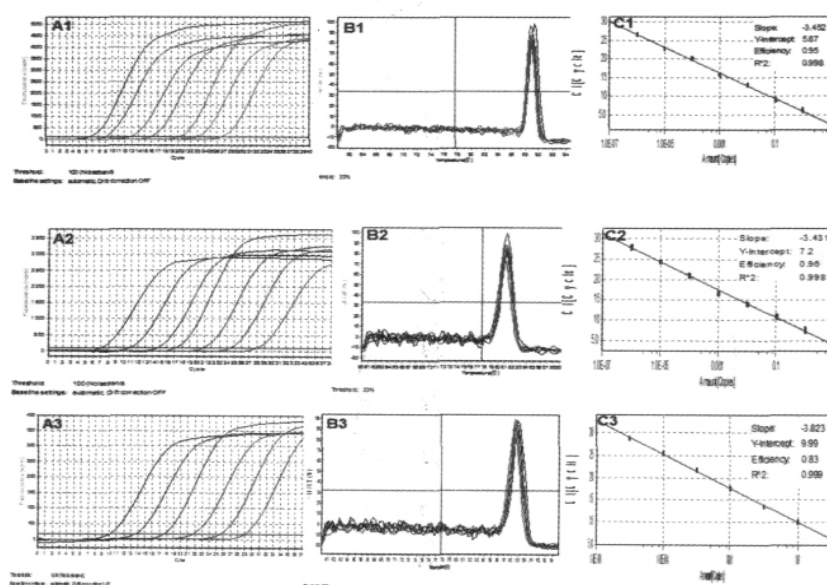
以 10 倍系列稀释的标准质粒为模板进行 Real-time PCR 反应,反应结束后系统自动生成扩增曲线、标准曲线和溶解曲线。扩增曲线表明系列依次稀释的标准质粒扩增曲线间距均匀且为 S 型,标准曲线表明标准质粒浓度在 $10^2 \sim 10^9$ 个拷贝/ μ L 均与 *Ct* 值呈现良好的线性关系,相关系数 $R^2 \geq 0.997$,扩增效率为 1 左右,且检测下限可达 100 个拷贝/ μ L(图 2)。

2.4 特异性及重复性分析

溶解曲线表明,*IFN-β*、*β-actin*、和 *IRF-3* 基因均只出现单一峰,无杂峰形成(图 2);将 Real-time PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,出现目的条带,条带单一且与常规 PCR 电泳无差异(图 3)。用作标准曲线制作的系列稀释质粒进行重复 Real-time PCR 扩增,1 次反应设置 3 个重复,进行 3 次反应,结果表明组内及组间变异系数均小于 4%,表明此法重复性较好。

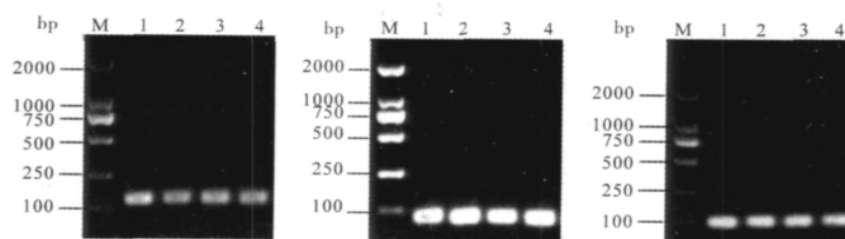
3 讨论

细胞因子的检测一般从 2 个水平上进行,蛋白水平和 mRNA 水平,前者最常用的是 ELISA,细胞内染色,但这些均需要一定的蛋白表达量,并且依赖



A. 扩增曲线; B. 溶解曲线; C. 标准曲线; 1. β -actin; 2. $IFN-\beta$; 3. $IRF-3$

图 2 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测结果



M. DS2000 DNA Maker; 1-4. 荧光定量 PCR 产物

图 3 SYBR Green I Real-time PCR 的琼脂糖凝胶电泳分析

特异性抗体;后者常用的方法有 PCR、Northern Blot 和 Rnase 保护性试验,这 2 种方法能对目的基因进行定量,但需要大量的模板 RNA^[12],依据常规 PCR 发展起来的有 Real-time PCR 可对目的基因进行精确定量,而且所需模板量较少,可检测低至 1 个拷贝数的基因。本试验选用 SYBR Green I 作为 Real-time PCR 的荧光染料,其能与所有 DNA 双链结合而发出荧光,当其与 DNA 双链解离时无荧光,因此荧光强度的增加与 PCR 产物的增加完全同步,并可通过溶解曲线分析其扩增的特异性,比其他染料更简单易行。但由于 SYBR Green I 的结合特性,很容易与非特异性产物和引物二具体结合,所以对引物的设计要求比较高^[13]。

本研究利用构建好的标准重组质粒,建立了猪 $IFN-\beta$ 、 $IRF-3$ 及看家基因 β -actin 的标准曲线,结果表明,该方法灵敏度高,可检测低至 100 拷贝,溶解曲线表明该方法扩增的产物具有特异性,无引物

二聚体及非特异性产物生成,并且该方法重复性好,而且 3 种因子均采用两步法扩增,与普通的三步法 PCR 扩增相比,极大缩短了检测时间。猪 $IFN-\beta$ 及 $IRF-3$ SYBR Green I real-time PCR 检测方法的成功建立,为快速检测和定量 $IFN-\beta$ 及 $IRF-3$ 的表达水平提供了必要的技术平台。

参考文献:

- [1] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference I the interferon[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 1957, 147: 258-267.
- [2] Howard A Young, Paritosh Ghosh. Molecular regulation of cytokine gene expression; interferon-gamma as a model system[J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1997, 56: 109-127.
- [3] Filippo Belardelli. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response[J]. AP-MIS, 1995, 103: 161-179.

(下转第 144 页)

nsp7 蛋白为非结构蛋白,其主要功能是参与其他 nsp 蛋白的加工,因此,该蛋白在猪体内存在的水平可以反映 PRRS 病毒在猪体内感染状况。本试验成功构建了 pET28a-nsp7 表达载体,表达和纯化了 nsp7 重组蛋白,并用间接 ELISA 法初步分析了重组蛋白 nsp7 的抗原性,为进一步研究基于 nsp7 蛋白的快速诊断技术提供了必要的条件。

参考文献:

- [1] 钱如文.猪繁殖与呼吸综合征的发生与防制[J].现代农业科技,2009(4):302.
 - [2] 冯淑平,何丹,易春华,等.广西部分地区高致病性猪繁殖与呼吸综合征的流行病学研究[J].现代农业科技,2009(1):229,238.
 - [3] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等.从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J].中国畜禽传染病,1996,18(2):1-4.
 - [4] Chen J, Liu T, Zhu C G, *et al.* Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence[J]. Biochem Genet, 2006, 44: 421-431.
 - [5] 李彬,何孔旺,温立斌,等.我国长江流域 PRRSV ORF3 基因的遗传变异[J].华北农学报,2011,26(3):204-209.
 - [6] 范博华,蒋继志,刘红梅,等.PRRS 病毒 E 基因的克隆及表达载体的构建[J].华北农学报,2006,21(1):27-30.
 - [7] den Boon J A, Faaberg K S, Meulenberg J J, *et al.* Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papain-like cysteine proteases[J]. J Virol, 1995, 69: 4500-4505.
 - [8] Van Dinten L C, Wassenaar A L, Gorbalenya A E, *et al.* Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains[J]. J Virol, 1996, 70: 6625-6633.
 - [9] Elizabeth Brown, Steven Lawson, Craig Welbon, *et al.* Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2009, 16(5): 628-635.
 - [10] 万博,鲍登克,乔松林,等.猪 α 干扰素的表达及在 PAM 细胞系中抗 PRRSV 活性检测[J].河南农业科学,2010(3):93-95.
 - [11] 张凤华,卢晓燕,徐红云,等.感染 PRRSV Nsp2 基因部分缺失变异株的仔猪抗体变化规律[J].华北农学报,2011,26(3):68-71.
 - [12] 詹丽娥,乔国锋,乔忠,等.猪生殖与呼吸系统综合症研究进展[J].山西农业科学,1999,27(1):73-75.
 - [13] Fang Y, Kim D Y, Ropp S, *et al.* Heterogeneity in Nsp2 of Europeanlike porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States [J]. Virus Res, 2004, 100(2): 229-235.
-
- (上接第 140 页)
- [4] Biron C A, Pien G C, Cousens L P, *et al.* Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines[J]. Annu Rev Immunol, 1999, 17: 189-220.
 - [5] Argyrios N, Theofilopoulos, Roberto Baccala, Bruce Beutler, *et al.* The function of type I interferons in antimicrobial immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12: 419-424.
 - [6] Mitsuharu Sato, Tadatsugu Taniguchi, Nobuyuki Tanaka. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors studies from gene knockout mice [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, 12: 133-142.
 - [7] Mitsuharu Sato, Nobuyuki Tanaka, Tadatsugu Taniguchi, *et al.* Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN- β gene[J]. FEBS Letters, 1998, 425: 112-116.
 - [8] 曹永浩,周元聪,张仕坚,等.干扰素调节因子家族和免疫调控[J].生命的化学,2006,26(5):387-389.
 - [9] Patrick Stordeur, Lionel F Poulin, Ligia Craciun, *et al.* Cytokine mRNA quantification by real-time PCR[J]. J Immunol Methods, 2002, 259: 55-64.
 - [10] 冯丽丽,张丽萍,张改平,等.脂多糖对猪肺泡巨噬细胞分泌 IL-1 β 及 TNF- α 的影响[J].河南农业科学,2009(3):107-109.
 - [11] Tahar Ait-Ali, Alison D Wilson, David G Westcott, *et al.* Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated swine alveolar macrophages[J]. Viral Immunology, 2007, 20: 105-118.
 - [12] Ramos-Payán R, Aguilar-Medina M, Estrada-Parra S, *et al.* Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR Green I [J]. Scand J Immunol, 2003, 57: 439-445.
 - [13] Marka A Valasek, Joyce J Repa. The power of real-time PCR [J]. Advances in physiology education, 2005, 29(3): 151-159.