

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)04-0430-04

## 实时荧光定量 PCR 检测 RAW264.7 巨噬细胞中 Th1/Th2 型细胞因子转录水平方法的建立及初步应用

单雪芹<sup>1,2</sup>, 韩先干<sup>2\*</sup>, 张敏<sup>2</sup>, 宋军<sup>1,2</sup>, 刘海文<sup>2</sup>, 田明星<sup>2</sup>, 潘玲<sup>1</sup>, 丁铲<sup>2</sup>, 周锦萍<sup>3</sup>, 于圣青<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036; <sup>2</sup>中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241; <sup>3</sup>上海市动物疫病预防控制中心, 上海 201103)

**[摘要]** 目的 建立小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的 Th1 和 Th2 型细胞因子荧光定量 PCR 检测方法。方法 依据 GenBank 中小鼠的  $\beta$ -actin 基因序列、Th1 型及 Th2 型细胞因子的核苷酸序列设计特异性引物, 以 RAW264.7 巨噬细胞 mRNA 反转录后的 cDNA 为模板, 通过构建质粒阳性标准品, 建立检测上述细胞因子转录水平的 real-time PCR 方法。结果 用建立的荧光定量 PCR 方法, 检测牛型布鲁氏菌 S2308 株感染 RAW264.7 巨噬细胞后, 巨噬细胞 Th1 和 Th2 型细胞因子的转录水平。最低检测量为  $10^2$  拷贝/ $\mu$ L, 线性关系很好,  $R^2 \geq 0.982$ , 该方法具有良好的特异性和重复性。结论 成功建立了检测巨噬细胞中 Th1 和 Th2 型细胞因子转录水平的荧光定量 PCR 方法。

**[关键词]** Th1/Th2 型细胞因子; 巨噬细胞 RAW264.7; 实时荧光定量 PCR; 布鲁氏菌

**[中图分类号]** R392.11, R378.5 **[文献标志码]** B

## Establishment and preliminary application of a quantitative real-time PCR method for detecting the transcriptions of Th1/Th2 cytokines in RAW264.7 cells

SHAN Xueqin<sup>1,2</sup>, HAN Xiangan<sup>2\*</sup>, ZHANG Min<sup>2</sup>, SONG Jun<sup>1,2</sup>, LIU Haiwen<sup>2</sup>, TIAN Mingxing<sup>2</sup>, PAN Ling<sup>1</sup>, DING Chan<sup>2</sup>, ZHOU Jinping<sup>3</sup>, YU Shengqing<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; <sup>2</sup>Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241; <sup>3</sup>Shanghai Animal Disease Prevention and Control Center, Shanghai 201103, China

**[Abstract]** **Objective** To establish a quantitative real-time PCR method to detect the transcriptions of Th1/Th2 cytokines in RAW264.7 cells. **Methods** The specific primers were designed according to the sequences of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and  $\beta$ -actin in GenBank database. Total RNA was extracted from RAW264.7 cells, and then was reverse-transcribed into cDNA, which was established as a positive standard template of the quantitative real-time PCR method. The established method was used to detect the cytokine transcriptions in RAW264.7 cells infected with *Brucella abortus* S2308. **Results** Cytokine genes above had a good linear relationship ( $R^2 \geq 0.982$ ) with the detection limit of  $10^2$  copies/ $\mu$ L standard samples. The established quantitative real-time PCR method showed high specificity, sensitivity, and single melting peak for every cytokine. **Conclusion** The quantitative real-time PCR method for detecting the transcription levels of cytokine Th1 and Th2 of macrophage RAW264.7 cells was established successfully.

**[Key words]** Th1/Th2 cytokines; macrophage RAW264.7; quantitative real-time PCR; *Brucella abortus* S2308

布鲁氏菌病(Brucellosis)是由布鲁氏菌(*Brucella*)引起的一种人兽共患传染病, 该病在世界范围内广泛流行并严重危害着人畜健康<sup>[1-4]</sup>。细胞因子在机体的免疫应答过程中起着十分重要的作用<sup>[5]</sup>, 许多

感染性疾病在机体内的发生、发展与免疫力水平密切相关, 而 CD4 细胞在机体免疫反应中起关键作用, CD4 细胞在特异性抗原的刺激下可分化为 Th1 型和 Th2 型细胞。Th1 细胞主要分泌 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2

收稿日期: 2012-10-23; 接受日期: 2012-11-23

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)资助(2010CB530202); 中央级科研院所公益性研究专项(2012JB05)

作者简介: 单雪芹(1987-), 女, 安徽蚌埠人, 硕士研究生

Tel: 15955124766; E-mail: sxq06113071@163.com

\*Corresponding authors, 于圣青, E-mail: yus@shvri.ac.cn; 韩先干, E-mail: hanxgan@163.com



等, 主要介导细胞免疫应答, 与抗病毒作用有关; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-6、IL-10 等, 主要介导体液免疫应答。细胞因子在蛋白水平常使用 ELISA 和 ELISpot 进行检测, 但这两项技术实验周期长, 且敏感性较低。实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 技术是从 mRNA 水平直接探测 PCR 过程中的荧光变化<sup>[6-7]</sup>, 具有实时、定量、污染少及敏感性高等优点<sup>[8-10]</sup>, 该方法广泛应用于细胞因子的检测<sup>[11-13]</sup>。但运用 real-time PCR 方法, 检测 RAW264.7 巨噬细胞在感染布鲁氏菌后, 其细胞因子的转录水平的差异, 尚未见报道。本研究通过建立检测 RAW264.7 巨噬细胞中 Th1 型及 Th2 型细胞因子荧光定量检测方法, 成功对感染布鲁氏菌后 RAW264.7 巨噬细胞中 Th1 及 Th2 型细胞因子转录水平的差异进行检测, 为进一步研究布鲁氏菌感染对巨噬细胞免疫功能的影响提供参考。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 牛型布鲁氏菌 (*Brucella abortus*) S2308 株与 RAW264.7 巨噬细胞为中国农业科学院上海兽医研究所禽传染病实验室保存。DMEM 细胞培养基、胎牛血清购自 BioWest 公司; 庆大霉素、氨苄青霉素为上海生工生物工程技术有限公司产品; 总 RNA 提取用 TRIzol 购自英潍捷基(上海)贸易有限公司; MLV Reverse Transcriptase、DNase I、RNase Inhibitor、SYBR Go Taq qPCR Master Mix 为 Promega 公司产品; RNA 酶抑制剂 RRI、Oligo(dT)<sub>15</sub> 引物、pMD18-T simple 载体、RNase-free water 购自 TaKaRa 生物工程公司; PCR Mix 为康为试剂公司产品; 大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ 、DNA marker、DNA 凝胶回收试剂盒均购自于 Fermentas 公司; 普通质粒小提试剂盒购自天根生物有限公司; 荧光定量 PCR 仪购自 Eppendorf 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计** 根据 GenBank 中小鼠的 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 及  $\beta$ -actin 的核苷酸序列, 应用 BLAST 进行同源性比较分析, 分别选取序列的保守区域, 利用 Primer3 荧光定量引物设计软件设计荧光定量引物(表 1)。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的片段, 与 pMD18-T simple 载体相连, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 测序鉴定。对鉴定结果正确的菌液提取质粒 DNA 作为阳性标准品, -40 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.2 细胞培养** 小鼠 RAW264.7 巨噬细胞, 使用含 100 mL/L 胎牛血清(FBS)和双抗(青霉素,  $1 \times 10^5$  U/L; 链霉素 100 mg/L)的 DMEM 培养基于 6 孔板中, 置于含 50 mL/L CO<sub>2</sub> 的 37 $^{\circ}$ C 的细胞培养箱中培养。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

基因	序列(5'-3')	引物大小	片段长度(bp)
$\beta$ -actin	F: GCTGTCCCTGTATGCCTCT	19	222
	R: TTGATGTCACGCACGATT	19	
TNF- $\alpha$	F: GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC	25	300
	R: ACATTGAGGCTCCAGTGAATTCGG	25	
IFN- $\gamma$	F: TCAGCTGATCCTTTGGACCC	19	72
	R: CTCAGAGCTAGGCCGAGG	20	
IL-2	F: TCCTCTCCAGGAGCTAACA	20	82
	R: ATTCCAAACCAGCAACCATC	20	
IL-4	F: TCTTGATAAACTAATTGTCTCTCTCGTCAC	21	83
	R: GCAGGATGACAAGTAGCTGGG	29	
IL-6	F: TCCAGTTGCCTTCTGGGAC	21	140
	R: GTG TAA TTA AGC CTC CGA CT TG	20	
IL-10	F: CGGGAAGACAATAACTG	19	240
	R: CATTTCGATAAGGCTTGG	17	

**1.2.3 RNA 提取、反转录及定量** 取培养 24 h 的 RAW264.7 细胞, 每管  $4 \times 10^6$  个细胞, 1 000 r/min 离心 15 min, 收集巨噬细胞, 每管加入 1 mL TRIzol 裂解细胞, 按照 TRIzol 法推荐步骤提取细胞总 RNA, 用 DNase I 去除 RNA 中基因组的污染。对去除基因组污染的 RNA 采用 Oligo(dT) 作为引物, 参照 MLV 反转录酶说明书提供的方法进行反转录。反转录体系为 20  $\mu$ L 体系, 总 RNA 2~4  $\mu$ g, Oligo dT(25  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, M-MLV(200 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 5  $\times$  M-MLV 缓冲液 5  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 4  $\mu$ L, RRI(40 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 最后补加无 RNase ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。

**1.2.4 细胞因子实时定量 PCR 检测方法的建立** 测定各细胞因子的重组质粒的浓度及其 A<sub>260/280</sub> 的比值, A<sub>260/280</sub> 的比值在 1.8~2.0 的质粒方可用于建立标准曲线, 检测各重组质粒的 A<sub>260/280</sub> 的比值及质粒的浓度。质粒 10 倍系列稀释, 共稀释 6 个梯度, 20  $\mu$ L 反应体系如下: SYBR<sup>®</sup> Green I 10  $\mu$ L, 10 pmol/L 的上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, RNase Water 8  $\mu$ L。采用 Promega 的 SYBR<sup>®</sup> Green I 在 Eppendorf 定量 PCR 仪上扩增, 建立标准曲线。反应程序: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环, 总延伸结束后, 加入融解曲线分析步骤。反应结束后, 计算机利用自带分析软件得到标准曲线。

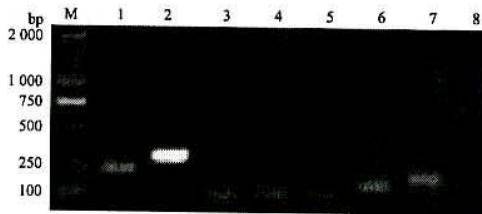
**1.2.5 实时定量 PCR 检测布鲁氏菌感染巨噬细胞中细胞因子 mRNA 含量** 将培养至对数生长期的巨噬细胞, 使用无血清无抗生素的 DMEM 培养基洗涤 3 次后再次加入无抗生素的 DMEM 培养基。使用布鲁氏菌 S2308 株感染巨噬细胞, 每个细胞感染复数(multiplicity of infection: MOI)为 100, 1 000 r/min 水平转子离心 5 min, 在 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 的条件下培养 1 h; 再加入含 100  $\mu$ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基在相同条件下作用 1 h。同时设无细菌感染的巨噬细胞为对照组。使用无血清无抗生素的 DMEM 培养基洗涤 3 次, 加入含血清和抗生素的 DMEM 培养基, 此时记为 0 h, 收集巨噬细胞, 4 h 后收集剩余孔巨噬细胞<sup>[14]</sup>; 加 150  $\mu$ L 的 5 mL/L Triton X-100 使细胞充分裂解, 室温放置 5 min, 将收集的样品放置 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱待提取细胞 RNA。提取布鲁氏菌 S2308 株感染的巨噬细胞 RNA, 采用本研究已建立的实时定量 PCR 方法对样品中内参基因及 6 种细胞因子进行相对定量检测, 并对巨噬



细胞中6种细胞因子 mRNA 表达变化进行分析。

## 2 结果

**2.1 RAW264.7 巨噬细胞 Th1、Th2 型细胞因子 RT-PCR 及引物特异性鉴定** 对各细胞因子的 RT-PCR 扩增结果表明,利用本研究设计的 real-time PCR 引物,成功扩增各细胞因子的目的条带(图1)。回收的目的片段与 pMD18-T simple 载体相连,小提质粒,各重组质粒的  $A_{260/280}$  的比值及质粒的浓度见表2。



M: DL2000 DNA marker; 1:  $\beta$ -actin; 2: TNF- $\alpha$ ; 3: IFN- $\gamma$ ; 4: IL-2; 5: IL-4; 6: IL-6; 7: IL-10; 8: 空白对照。

图1 RT-PCR 扩增细胞因子基因

表2 各重组质粒的  $A_{260/280}$  的比值及质粒的浓度

基因	$A_{260/280}$	质粒浓度 (ng/ $\mu$ L)
$\beta$ -actin-T	1.864	328.5
TNF- $\alpha$ -T	1.879	302.5
IFN- $\gamma$ -T	1.890	231.5
IL-2-T	1.863	279.0
IL-4-T	1.899	235.5
IL-6-T	1.892	196.0
IL-10-T	1.890	273.0

**2.2 标准曲线的建立** 将浓度为 2.0 ng/ $\mu$ L 的各重组质粒,进行 10 倍稀释,共稀释 6 个梯度作为模板,对  $\beta$ -actin 和 6 种细胞因子进行 real-time PCR,系统自动生成扩增反应的标准曲线及融解曲线。各细胞因子的扩增效率在 0.96 以上,  $R^2$  值均在 0.982 以上, real-time PCR 结果表明质粒的拷贝数为  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$  的范围内有良好的线性关系。

从融解曲线图可知, Th1 和 Th2 型细胞因子的扩增结果显示融解曲线没有杂峰,扩增特异性较好。经重复性试验证明 real-time PCR 有较好的稳定性和重复性。如 Th1 型的 IFN- $\gamma$  和 Th2 型的 IL-10 (图2)。

**2.3 感染布鲁氏菌 S2308 株的巨噬细胞中 6 种细胞因子 mRNA 的实时荧光定量检测结果** 运用本研究建立的方法,对布鲁氏菌 S2308 株感染 0 h 和 4 h 的巨噬细胞中各细胞因子的变化进行检测(表3),结果表明:与未感染布鲁氏菌的对照组相比,布鲁氏菌

S2308 株感染巨噬细胞 4 h 后 TNF- $\alpha$  和 IL-6 明显上调,上调倍数分别为 32.67 和 18.51。IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 IL-4 基因下调,下调倍数分别为 0.36、0.73 和 0.57。IL-10 基因表达与未感染布鲁氏菌的对照组相比无明显变化。

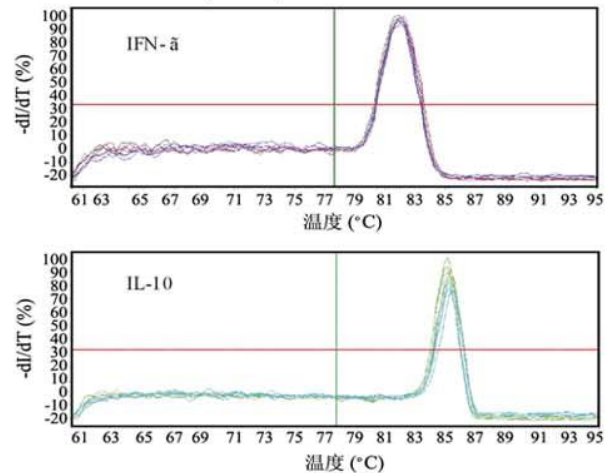


图2 Th1 和 Th2 型细胞因子的融解曲线

表3 布鲁氏菌 S2308 株感染 0 h 和 4 h 后的巨噬细胞中各细胞因子的相对定量值

	0 h	4 h
TNF- $\alpha$	12.64	32.67
IFN- $\gamma$	6.77	0.36
IL-2	0.84	0.73
IL-4	0.61	0.57
IL-6	15.14	18.51
IL-10	3.03	1.16

## 3 讨论

成熟的 T 细胞依据细胞表面的 CD 分子可分为 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞。CD4<sup>+</sup>T 辅助细胞(Th)分为 Th1、Th2 和 Th0 等 3 个亚群的细胞因子,其中 Th0 是 Th1 和 Th2 细胞的前体细胞。Th1 细胞主要分泌 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 等,主要介导细胞免疫应答,与抗病毒作用有关; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-6、IL-10 等,主要介导体液免疫应答。

目前在基因表达水平评价细胞因子表达的方法有 Northern 杂交和 RNA 酶保护试验等,但该方法与 ELISA 和 ELISpot 两种方法相似,存在实验周期较长,敏感性相对较低的缺点。近年来,为了能够快速、准确地检测细胞因子的表达,相对定量和绝对定量的方法被广泛使用。real-time PCR 方法具有较高的敏感性,常被用作检测基因的 mRNA 水平<sup>[15-16]</sup>。因其结果精确、可靠且有很强的重复性,又常用作检测感染疾病后宿主体内细胞因子 mRNA 表达的变化。



本研究采用 OIE 推荐使用的 real-time PCR 两步法对巨噬细胞的 6 种细胞因子基因表达进行检测。通过内参基因  $\beta$ -actin 的定量结果消除了实验过程中的误差,对融解曲线的结果分析可知本研究建立的方法扩增的融解曲线均为单一峰型,无引物二聚体等非特异性产物生成,具有很强的特异性。通过设计荧光定量引物对细胞因子 mRNA 进行 RT-PCR,由结果可知,荧光定量引物可以特异性扩增出目的条带,没有非特异性扩增。回收目的条带与 pMD-18T simple 载体连接,构建重组质粒,构建 6 种细胞因子的阳性标准品,建立 real-time PCR 标准曲线。对 10 倍系列稀释的细胞因子的检测结果分析表明该方法具有较高的敏感性,最低检测量为  $10^2$  拷贝/ $\mu$ L,并进行标准曲线的绘制,结果表明线性关系很好,且  $R^2 \geq 0.982$ 。表明本研究建立的 RAW264.7 巨噬细胞 Th1/Th2 型细胞因子的 real-time PCR 检测方法特异性强、敏感性高。

应用建立的方法对布鲁氏菌 S2308 株感染巨噬细胞后的细胞因子进行检测,与对照组相比,布鲁氏菌 S2308 株感染巨噬细胞 4 h 后检测到 TNF- $\alpha$  和 IL-6 基因表达分别上调 32.67 倍和 18.51 倍,结果与 Stordeur 等<sup>[14]</sup>及 Konnai 等<sup>[17]</sup>报道的结果相符。而 IFN- $\gamma$  mRNA 和 IL-10 mRNA 表达水平在 0 h 呈现明显的上调趋势,但 4 h 表现为下调,重复性实验结果均与上述结果一致。由此说明本研究建立的方法较为稳定,能够准确地对细胞因子的表达进行定量。

本研究通过构建的 Th1、Th2 型细胞因子的重组质粒,建立了 RAW264.7 巨噬细胞 Th1、Th2 型细胞因子的 real-time PCR 检测方法,检测结果表明本研究所建立的方法具有良好的敏感性、特异性和重复性,为进一步研究布鲁氏菌感染对巨噬细胞 Th1、Th2 型细胞因子转录水平的影响提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 孙晓庆,韩先干,童永亮,等. 牛型布鲁氏菌铁离子转运蛋白基因的克隆及其表达蛋白的生物学特性[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(2): 132-137.
- [2] Martirosyan A, Moreno E, Gorvel JP. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular Brucella pathogen[J]. Immunol Rev, 2011, 240(1): 211-234.
- [3] Rambow LA, Petersen EM, Gourley CR, et al. Brucella regulators: self-control in a hostile environment[J]. Trends Microbiol, 2009, 17(8): 371-377.
- [4] Kumar S, Tuteja U, Sarika K, et al. Rapid multiplex PCR assay for the simultaneous detection of the Brucella Genus, *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis*[J]. Mic Biol, 2011, 21(1): 89-92.
- [5] Budhia S, Haring LF, McConnell I, et al. Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR [J]. Immunol Methods, 2006, 309(1-2): 160-172.
- [6] Blanchard P, Regnault J, Schurr F, et al. Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method [J]. J Virol Methods, 2012, 180(1-2): 26-31.
- [7] Pathak E, El-Borai FE, Campos-Herrera R, et al. Use of real-time PCR to discriminate parasitic and saprophagous behaviour by nematophagous fungi[J]. Fungal Biology, 2012, 116(5): 563-573.
- [8] Rasmussen Hellberg RS, Naaum AM, Handy SM, et al. Interlaboratory evaluation of a real-time multiplex polymerase chain reaction method for identification of salmon and trout species in commercial products[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(3): 876-884.
- [9] Herrero B, Madriñán M, Vieites JM, et al. Authentication of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using real time PCR[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(8): 4794-4799.
- [10] Sanchez A, Quinteiro J, Rey-Mendez M, et al. Identification of European hake species (*Merluccius merluccius*) using real-time PCR [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(9): 3397-3403.
- [11] Bustin SA, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective[J]. J Mol Endocrinol, 2005, 34(3): 579-601.
- [12] Godomes C, Leader BT, Molini BJ, et al. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR [J]. Cytokine, 2007, 38(1): 1-7.
- [13] Antonio M, Gomez Galan, Marcel Brohé, et al. Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of soya and lupin mitochondrial DNA as markers for the presence of allergens in processed food[J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 834-841.
- [14] Stordeur P, Poulin LF, Craciun L, et al. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR [J]. Immunol Methods, 2002, 259(1-2): 55-64.
- [15] Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification [J]. Biotechniques, 1997, 22(1): 130-131, 134-138.
- [16] Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, et al. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control [J]. Biotechniques, 1997, 22(1): 176-181.
- [17] Konnai S, Usui T, Ohashi K, et al. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR [J]. Vet Microbiol, 2003, 94(4): 283-294.