

陈翠腾, 傅光华, 黄瑜, 等. 鸭 RLRs 和 IFN 基因 SYBR GREEN I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (3): 209-215.

CHEN C-T, FU G-H, HUANG Y, et al. Establishment of a Real-time Fluorescence Quantitative PCR Assay for Detection of Duck RIG-I Like Receptors and *interferon* Genes [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, 30 (3): 209-215.

鸭 RLRs 和 IFN 基因 SYBR GREEN I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

陈翠腾, 傅光华, 黄瑜*, 傅秋玲, 万春和, 程龙飞, 陈红梅, 施少华

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 首次建立以 GAPDH 为内参, 同时检测鸭 RIG-I、MDA5、IFN- α 和 IFN- γ 等 4 种 mRNA 相对表达量的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法(RT-FQ-PCR)。以目的基因的克隆质粒为标准品, 建立标准曲线, 并进行熔解曲线、重复性及稳定性分析。该方法 Ct 值线性范围为 12.0~32.0; 目的基因(RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ)和内参基因(GAPDH)的扩增效率均在 95%~105%, 其相关系数均在 0.99 以上; 扩增产物的熔解曲线都只出现 1 个特异性单峰, 无引物二聚体或其他非特异性产物生成, RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 的 Tm 值依次为(81.9±0.33)、(81.9±0.32)、(93.6±0.23)、(81.8±0.28)、(87.8±0.24)℃, 其敏感度均达到 100 copies · μL^{-1} , 重复性和稳定性好, 为从 mRNA 水平上深入研究 RIG-I 样受体、干扰素与鸭机体免疫功能相关性奠定了基础。

关键词: RIG-I 样受体; 干扰素; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S 852.4

文献标识码: A

Establishment of a Real-time Fluorescence Quantitative PCR Assay for Detection of Duck RIG-I Like Receptors and *interferon* Genes

CHEN Cui-teng, FU Guang-hua, HUANG Yu*, FU Qiu-ling, WAN Chun-he, CHENG Long-fei,
CHEN Hong-mei, SHI Shao-hua

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences,
Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: This study established detection of duck RIG-I, MDA5, IFN- α and IFN- γ mRNA relative expression levels synchronous of SYBR Green I real-time quantitative PCR for the first time. GAPDH was used as an internal reference. Cloning plasmids of objective genes were used as the standards for establishing standard curves for analysis of the melting curve, repeatability and stability. The linear range of Ct values of the method was 12.0 to 32.0. The amplification efficiencies of target genes (RIG-I, MDA5, IFN- α , IFN- γ) and the reference gene (GAPDH) were from 95% to 105%, and the correlation coefficients were above 0.99. The melting curve of amplification product only appeared a specific single peak, and there was no primer dimer or other non-specific product formation. Tm values of RIG-I, MDA5, IFN- α , IFN- γ and GAPDH were (81.9±0.33), (81.9±0.32), (93.6±0.23), (81.8±0.28) and (87.8±0.24)℃, respectively. The sensitivity reached 100 copies · μL^{-1} , and repeatability and stability were good. This method would lay the foundation for further study of correlation between duck RIG-I like receptor, *interferon* and immune function from the mRNA levels.

Key words: RIG-I like receptors; Interferon; real-time fluorescence quantitative PCR

鸭是最主要的水禽之一, 对其相关基因表达水平的定量分析, 有利于更深入了解各基因功能及其

与生产、抗病能力的关系。受体和细胞因子与某些疾病的发生和发展有密切联系, 因此受体和细胞因

收稿日期: 2014-08-21 初稿; 2015-01-31 修改稿

作者简介: 陈翠腾 (1987—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 动物病原与分子生物学 (E-mail: 973900245@qq.com)

* 通讯作者: 黄瑜 (1965—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 家禽传染病 (E-mail: huangyu_815@163.com)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201936); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-43); 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2011R1025-8)

子的检测具有重要意义。机体的先天性免疫系统在抵抗病毒的感染中发挥着重要作用。当宿主受到病毒感染，其通过模式识别受体（PRRs）识别病原相关分子模式（PAMPs），激活宿主的先天性免疫反应，从而诱导产生干扰素、促炎症细胞因子等一系列的抗病毒因子。RIG-I 样受体（RIG-I like receptors, RLRs）是一类新发现的细胞内信号转导受体，它能识别细胞质中的病毒 RNA，通过级联信号诱导产生干扰素和促炎症细胞因子，在抗病毒天然免疫反应中起非常重要的作用^[1]。干扰素（interferon, IFN）是具有广谱抗病毒活性的细胞因子。

实时荧光定量 PCR（Real-time fluorescence quantitative PCR, RT-FQ-PCR）技术是 20 世纪 90 年代发展起来的 RNA 定量领域一项极具创新性的检测核酸的新技术，该技术在检测组织或细胞中 mRNA 方面具有敏感性、准确性高以及重复性好等优点，还避免了普通 PCR 反应中易产生污染等问题，且可以进行高通量操作^[2]。目前实时荧光定量 PCR 技术在基因表达尤其在细胞因子的表达研究中已成为主要的研究方法之一^[3-5]。

本研究参照 GenBank 中各品种鸭 RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 基因序列设计鸭 RIG-I、MDA5、GAPDH 部分基因和 IFN- α 、IFN- γ 全基因扩增引物，根据目的基因 RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 的特异性序列设计荧光定量 PCR 检测引物，以 GAPDH 为内参，建立检测鸭 RIG-I、MDA5、IFN- α 和 IFN- γ mRNA 相对表达量的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法，为 RIG-I 样受体和干扰素与鸭机体免疫功能相关性的研究提供简便的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病毒毒株 鸭坦布苏病毒（FJMH220 株），福建省农业科学院畜牧兽医研究所禽病室分离、鉴定和保存。

1.1.2 试验动物 80 日龄麻鸭 5 只，1 日龄时购于莆田某鸭场，由福建省农业科学院畜牧兽医研究所禽病研究室专门饲养至 80 日龄。

1.1.3 主要试剂 TransZolTM Up Plus RNA Kit 和 Trans5 α Chemically Competent Cell 购自 TransGen Biotech；Reverse Transcriptase XL (AMV)、Ribonuclease Inhibitor、DL2000 DNA Marker、pMD 18-T Vector、SYBR Premix Ex

TaqTM (Tli RNaseH Plus)、EASY Dilution 均购自 TaKaRa 公司；Dream Taq Green PCR Master Mix (2 \times) 购自 Thermo Scientific；Oligo (dT) 20 Primer 由 Invitrogen 合成；Random Primer 6N 由生工生物工程（上海）有限公司合成；dNTP Mixture 购自 TIANGEN；Gel Extraction Kit 和 Plasmid Mini Kit 购自 OMEGA 公司。

1.1.4 主要仪器 NANODROP 2000；DYY-6C 型电泳仪；SYNGENE 全自动凝胶成像系统，型号：G : BOX EF；Eppendorf Centrifuge 5417R 台式高速冷冻离心机；TaKaRa PCR Thermal Cycler；THZ-D 台式恒温振荡器；DK-522 型电热恒温水浴锅；隔水式恒温培养箱；Master cycler ep realplex 荧光定量 PCR 仪。

1.1.5 引物的设计与合成

(1) 目的基因扩增引物的设计与合成

根据 GenBank 中绿头鸭 RIG-I 基因（GenBank 登录号：KJ451068.1）、MDA5 基因（GenBank 登录号：KJ451070.1）和 GAPDH 基因（GenBank 登录号：AY436595.1）序列设计引物，参考朱海侠等^[6]和 Reaiche^[7]的 IFN- α 、IFN- γ 引物序列，引物由上海生工生物工程有限公司合成，其中 RIG-I、MDA5 只扩增了中间一段目的序列，未扩增全长，引物序列见表 1。

表 1 目的基因扩增引物序列及其扩增片段

Table 1 Primer sequences and objective gene amplified fragment

引物	序列(5'~3')	扩增片段 长度/bp	Ref
DRIG(F2)	ACAATGTGTTAACGAC-CAGG	1674	
DRIG(R2)	GTGTAGGAGAGTAAT-AGATGCACTA		
DMDA5(F2)	AGTGGCAAACACCAGAGT-GGCTGTTA	1429	
DMDA5(R2)	TCTCAT-CAGCTCGAGCTCGACC		
DIFN- α (F)	AACCCAAGAGCCACCAT-GCCT	594	[6]
DIFN- α (R)	CTCTTAGCGGATGGT-GCGGGT		
DIFN- γ (F)	ATGACTTGCCAGAC-CTACTG	502	[7]
DIFN- γ (R)	TCATTAACATCTG-CATCTCTTTG		
DGAPDH(F)	ATGACTCTACTCATGGC-CACTT	661	
DGAPDH(R)	GCCCCATCAGCAGCAGCCT-TCA		

(2) 目的基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测引物的设计与合成

荧光定量 PCR 检测引物参考 Barber 等^[8]、Song C 等^[9]、万春和等^[10]以及 Reaiche^[7]等提供的序列, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列见表 2。

表 2 荧光定量 PCR 检测引物序列及其扩增片段

Table 2 Fluorescence quantitative PCR primer sequences and amplified fragment

引物	序列(5'~3')	扩增片段 长度/bp	Ref
qDRIG(F)	GTGTATGGAGGAAAC-CCTATTCTTAACT	92	[8]
qDRIG(R)	GGAGGGTCATACCTGTT-GTTGAT		
qMDA5(F)	CCTGGAGTAGGAGGTG-CAAA	114	[9]
qMDA5(R)	CAGTTGGGAGGCATGT-TCTT		
qDIFN- α (F)	ACCAACGACACGCAG-CAAGC	262	[10]
qDIFN- α (R)	TGTGGTTCTGGAG-GAACGTGTTGGAT		
qDIFN- γ (F)	ATGACTTGCCAGAC-CTACTG	159	[7]
qDIFN- γ (R)	AGGATTGCCATCAGCTA-CAT		
qDGAPDH(F)	TGCTAAGCGTGTCA-CATCT	187	[7]
qDGAPDH(R)	AGTGGTCATAAGACCCTCCA		

1.2 试验方法

1.2.1 动物试验以及采样 80 日龄麻鸭 5 只攻鸭坦布苏病毒, 肌注, 每只 0.5 mL, 1 d 后处死、解剖, 快速取肝脏、脾脏置于 -80°C, 用于后续 RNA 的提取与反转录等实验操作。

1.2.2 RNA 的提取与反转录 参照 TransZol™ Up Plus RNA Kit 和 Reverse Transcriptase XL (AMV) 试剂盒说明书进行。

1.2.3 麻鸭 RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 基因的扩增与克隆

(1) 麻鸭 RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 基因的 PCR 扩增: PCR 反应体系为 40 μ L: PCR Master Mix (2×) 20 μ L, 上、下游引物 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , 模板 2 μL , ddH₂O 16 μL 。PCR 反应程序: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 53°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳。

(2) 目的片段的克隆及提取质粒 DNA: 参照

Gel Extraction Kit、pMD® 18-T Vector、Trans5α Chemically Competent Cell 和 Plasmid Mini Kit 试剂盒说明书。

(3) 重组质粒的 PCR 鉴定: 将提取的重组质粒 DNA 作为模板, 进行 PCR 反应, PCR 反应的体系和程序同前面所述, PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 检查目的条带。

(4) 目的基因序列测定和分析: 将阳性重组质粒送上海生工生物工程有限公司测序。利用 DNASTar 软件对测序的结果进行拼接和序列分析。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 反应条件的摸索和标准曲线的建立 以鸭 GAPDH 基因为内参, 采用 SYBR Green I 染料法, 在 Master cycler ep realplex 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增和数据分析, 建立检测鸭 RIG-I、MDA5、IFN- α 和 IFN- γ 基因的实时荧光定量 PCR 方法, 并进行敏感性、特异性、重复性和稳定性分析。将含有鸭 RIG-I、MDA5、GAPDH 部分基因和 IFN- α 、IFN- γ 基因的阳性质粒作为标准品, 分别构建标准曲线。

1.2.4.1 荧光定量 PCR 的建立

(1) 荧光定量 PCR 最佳条件优化: 本研究在建立最佳荧光定量 PCR 反应体系和反应程序时主要对引物浓度和退火温度进行了优化。以下反应液配制均在冰上进行, 荧光定量 PCR 反应体系 (20 μL): SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL , 上游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 模板 2 μL , 灭菌蒸馏水 7.2 μL 。反应程序: 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 20 s, 54°C 退火 15 s, 68°C 延伸 20 s, 扩增 40 个循环。为了分析 SYBR Green I PCR 扩增的特异性, 还需要对扩增产物制作熔解曲线。反应设内参 GAPDH 基因和空白对照 (灭菌蒸馏水代替模板)。

(2) 荧光定量敏感性分析: 将稀释成不同浓度的质粒作为模板, 同时进行荧光定量 PCR 扩增。

(3) 荧光定量特异性分析: 观察分析扩增产物的熔解曲线是否显示为特异性单峰。

(4) 荧光定量重复性和稳定性分析: 荧光定量 PCR 检测同一阳性标准品, 每个阳性标准品设 5 个重复, 评价其重复性, 再将标准品置于 -80°C, 分别于 1 周和 2 周后再重检, 评价其重复性和稳定性。

1.2.4.2 标准曲线的建立

(1) 标准品处理: 用 NANODROP 2000 分光光度计测量并计算出提取的 RIG-I、MDA5、

IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 等 5 种重组质粒浓度分别为 7.75×10^9 、 6.04×10^9 、 6.87×10^9 、 5.85×10^9 、 6.96×10^9 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, A260/A280 均在 1.8~2.0, 5 种重组质粒纯度较好, 满足实时荧光定量 PCR 的要求。

(2) 建立标准曲线: 将 RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 基因重组标准质粒做 10 倍连续稀释, 取 10 倍连续稀释 ($10^{-2} \sim 10^{-9}$) 的质粒进行荧光定量 PCR 反应, 建立检测鸭 RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 基因的标准曲线。

2 结果与分析

2.1 IFN- α 、IFN- γ 、基因和 GAPDH、RIG-I、MDA5 部分基因重组质粒的 PCR 鉴定

IFN- α 、IFN- γ 基因和 GAPDH、RIG-I、MDA5 部分基因重组质粒进行 PCR 反应后电泳结果可见扩增出特异性目的条带 (图 1)。

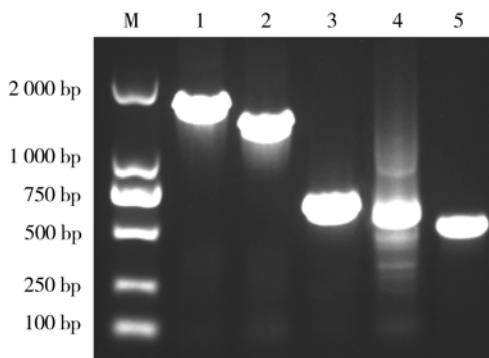


图 1 重组质粒的 PCR 鉴定结果

Fig. 1 PCR identification results of recombinant plasmid

注: M 为 DL 2000 DNA Marker; 1 为 RIG-I 部分基因片段; 2 为 MDA5 部分基因片段; 3 为 GAPDH 部分基因片段; 4 为 IFN- α 全基因; 5 为 IFN- γ 全基因。

2.2 鸭 IFN- α 、IFN- γ 基因和 GAPDH、RIG-I、MDA5 部分基因的测序结果

分别将 IFN- α 、IFN- γ 基因和 GAPDH、RIG-I、MDA5 部分基因重组质粒的测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 结果显示 IFN- α 、IFN- γ 基因和 GAPDH、RIG-I、MDA5 部分基因各自与 GenBank 上已发表的序列都有较高的同源性, 最高序列的同源率都达 99% 以上。

2.3 荧光定量 PCR 方法建立

荧光定量 PCR 扩增出特异性的目的条带, 如图 2 所示。

2.3.1 实时荧光定量 PCR 最佳优化条件

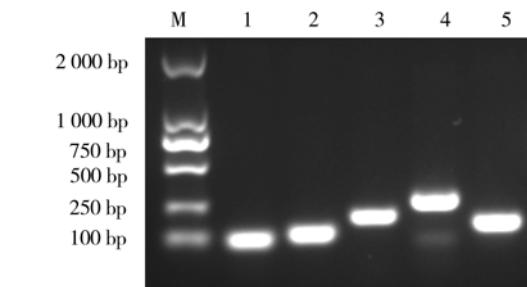


图 2 荧光定量 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR results of fluorescence quantitative

注: M 为 DL 2000 DNA Marker; 1 为 RIG-I 扩增片段; 2 为 MDA5 扩增片段; 3 为 GAPDH 扩增片段; 4 为 IFN- α 扩增片段; 5 为 IFN- γ 扩增片段。

应体系 (20 μL): SYBR Premix Ex TaqTM 10 μL , 上游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 模板 2 μL , 灭菌蒸馏水 7.2 μL 。最佳反应程序: 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 20 s, 54°C 退火 15 s, 68°C 延伸 20 s, 扩增 40 个循环。

2.3.2 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 熔解曲线 熔解曲线 (图 3~7) 分析表明, 此方法扩增的目的基因 (RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ) 和内参基因 (GAPDH) 都只出现 1 个特异性单峰, 无引物二聚体或其他非特异性产物生成。RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 的 Tm 值分别为 (81.9 ± 0.33)、(81.9 ± 0.32)、(93.6 ± 0.23)、(81.8 ± 0.28)、(87.8 ± 0.24) °C。

2.3.3 荧光定量 PCR 检测的敏感性测定 根据已知浓度的重组质粒标准品进行 10 倍系列稀释后的荧光定量 PCR 结果, 表明 RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 敏感度达 100 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以下。图 8 为内参基因 GAPDH 进行 10 倍系列稀释后, 其 $10^{-2} \sim 10^{-9}$ 等 8 个梯度的荧光定量 PCR 结果, 由图可看出此荧光定量 PCR 检测方法可检测

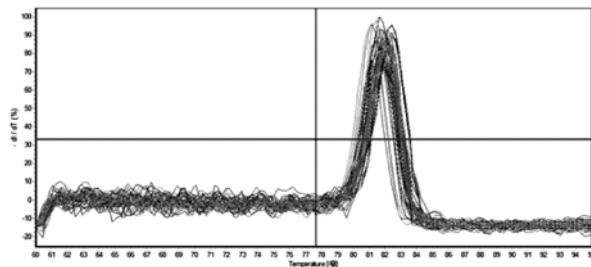


图 3 麻鸭 RIG-I 荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig. 3 Melting curve of Sheldrake RIG-I fluorescence quantitative PCR

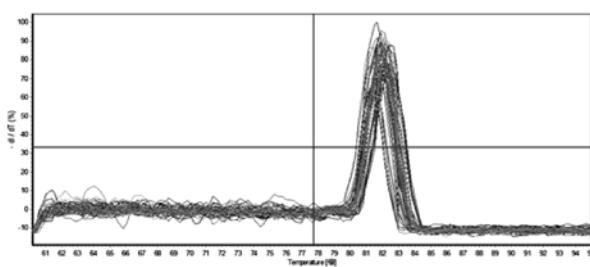


图4 麻鸭 MDA5 荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig. 4 Melting curve of Sheldrake MDA5 fluorescence quantitative PCR

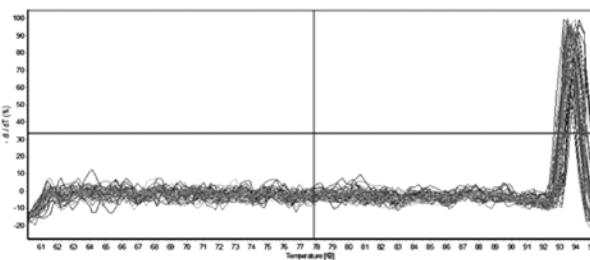
图5 麻鸭 IFN- α 荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig. 5 Melting curve of Sheldrake IFN- α fluorescence quantitative PCR

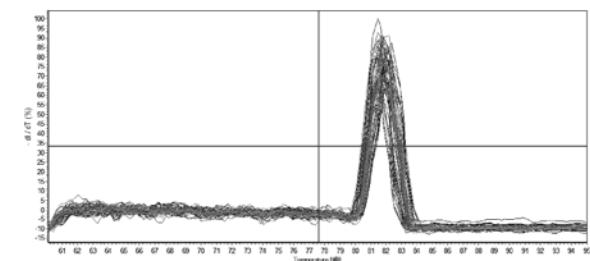
图6 麻鸭 IFN- γ 荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig. 6 Melting curve of Sheldrake IFN- γ fluorescence quantitative PCR

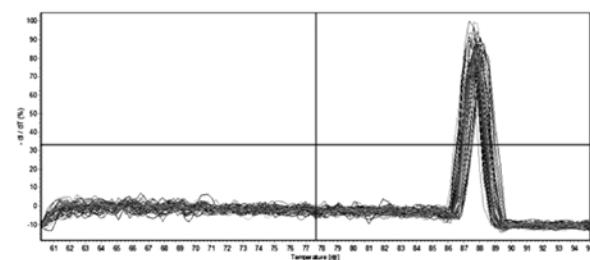


图7 麻鸭 GAPDH 荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig. 7 Melting curve of Sheldrake GAPDH fluorescence quantitative PCR

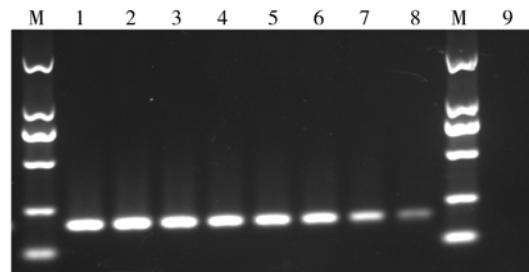


图8 GAPDH 基因敏感性测定

Fig. 8 Determination of GAPDH gene sensitivity

注: M为DL-2000 DNA Marker, 1~8为 $10^{-2} \sim 10^{-9}$ 倍稀释, 9为阴性对照。

出浓度稀释到 10^{-8} 。其他基因的检测敏感性与GAPDH相同。

2.3.4 荧光定量 PCR 检测的重复性和稳定性测定

(1) 批内重复: 荧光定量 PCR 检测同一阳性标准品, 每个阳性标准品设 5 个重复, 组内变异系数为 $0.44\% \sim 0.82\%$, 说明重复性较好(表 3)。

(2) 批间重复: 将标准品置于 -80°C , 分别于 1 周和 2 周后再重检, 组间变异系数为 $0.65\% \sim 0.94\%$, 说明重复性和稳定性都较好(表 4)。

表3 荧光定量 PCR 组内统计

Table 3 The Intra-group statistics of fluorescence quantitative PCR

质粒名称	标准拷贝数	Ct 平均值 ± 标准差	变异系数 /%
RIG-I	7.75×10^5	18.01 ± 0.08	0.44
MDA5	6.04×10^5	16.91 ± 0.11	0.65
IFN α	6.87×10^5	15.90 ± 0.13	0.82
IFN γ	5.85×10^5	16.77 ± 0.10	0.60
GAPDH	6.96×10^5	17.27 ± 0.10	0.58

表4 荧光定量 PCR 组间统计

Table 4 The Inter-group statistics of fluorescence quantitative PCR

质粒名称	标准拷贝数	Ct 平均值 ± 标准差	变异系数 /%
RIG-I	7.75×10^5	17.98 ± 0.13	0.72
MDA5	6.04×10^5	17.02 ± 0.15	0.88
IFN α	6.87×10^5	16.04 ± 0.15	0.94
IFN γ	5.85×10^5	16.86 ± 0.11	0.65
GAPDH	6.96×10^5	17.54 ± 0.16	0.91

2.3.5 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 标准曲线 标准曲线(图 9~13)分析表明, 此方法具

有较高的灵敏度, RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 的检测下限均低于 100 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 基因的扩增效率均在 95%~105%, 其相关系数均在 0.99 以上。其中 RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 基因的扩增效率依次为 1.05、1.01、1.03、0.99 和 1.03, 其相关系数依次为 0.995、0.996、0.992、0.997 和 0.995。

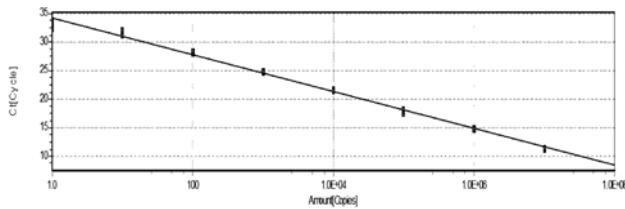


图 9 麻鸭 RIG-I 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 9 Standard curve of Sheldrake RIG-I fluorescence quantitative PCR

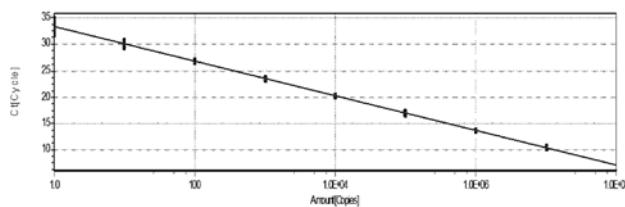


图 10 麻鸭 MDA5 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 10 Standard curve of Sheldrake MDA5 fluorescence quantitative PCR

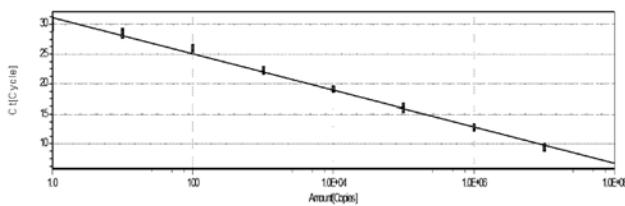


图 11 麻鸭 IFN- α 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 11 Standard curve of Sheldrake IFN- α fluorescence quantitative PCR

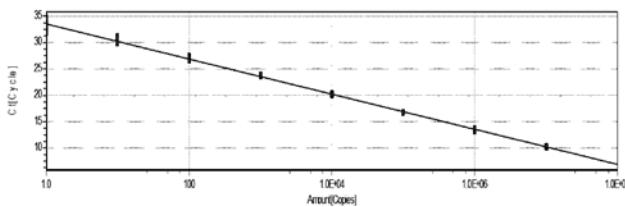


图 12 麻鸭 IFN- γ 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 12 Standard curve of Sheldrake IFN- γ fluorescence quantitative PCR

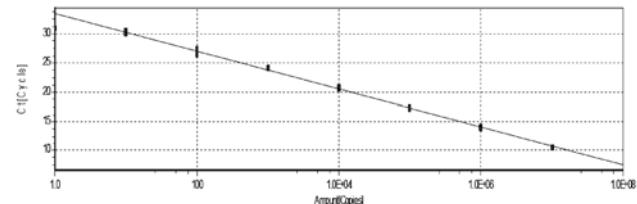


图 13 麻鸭 GAPDH 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 13 Standard curve of Sheldrake GAPDH fluorescence quantitative PCR

3 讨 论

RIG-I 样受体 (RIG-I like receptors, RLRs) 是一类重要的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 能够识别多种病毒 RNA, 通过级联信号诱导产生多种抗病毒因子, 在抗病毒天然免疫反应中起非常重要的作用^[8,11~16]。干扰素 (interferon, IFN) 是一类高活性、多功能的分泌性糖蛋白, 是具有广谱抗病毒、抗肿瘤以及免疫调节功能的细胞因子^[17]。病毒感染在诱导机体表达 IFN 的同时也能通过阻断 IFN 信号通路来抵抗机体 IFN 对其抑制作用^[18]。虽然转录后调节和翻译后修饰对于某些目的基因意义重大, 但有许多研究表明, 实时荧光定量 PCR 测定的细胞因子 mRNA 水平与 ELISA 测定的细胞因子蛋白质水平具有良好的相关性^[19~21]。SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 技术具有使用方便、成本低廉、无需设计探针等优点, 且适用于扩增各种目的基因, 已得到广泛应用。

本研究首次建立了同时检测鸭 RIG-I、MDA5、IFN- α 和 IFN- γ 等 4 种 mRNA 相对表达量的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法, 以 GAPDH 为内参, 可以进行目的基因 mRNA 的相对定量分析。通过内参可以校正由于样品采集、核酸提取以及反转录操作误差等造成模板在核酸数量上的差异对定量样品结果的影响^[22]。目的基因 (RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ) 和内参基因 (GAPDH) 的扩增效率均在 95%~105%, 其相关系数均在 0.99 以上, 符合比较阈值法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法) 相对定量分析的前提, 检测所得 Ct 值可按比较阈值法进行分析, 在以后研究 RIG-I、MDA5、IFN- α 和 IFN- γ mRNA 表达差异时, 可以省去制作标准品及标准曲线步骤, 直接利用比较阈值法即可得到 RIG-I、MDA5、IFN- α 和 IFN- γ mRNA 表达变化结果^[23~24]。熔解曲线分析表明, 此方法扩增的目的基因 (RIG-I、MDA5、IFN- α 、

IFN- γ) 和内参基因 (GAPDH) 都只出现 1 个特异性单峰, 无引物二聚体或其他非特异性产物生成; 对各稀释度 cDNA 进行检测表明, RIG-I、MDA5、IFN- α 、IFN- γ 和 GAPDH 敏感度达 100 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, 可对组织中目的基因的 mRNA 表达进行直接检测; 重复性和稳定性分析结果表明, 该方法重复性和稳定性好。

综上所述, 本研究建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法, 对鸭 RIG-I、MDA5、IFN- α 和 IFN- γ mRNA 进行定量检测具有快速、特异性强、灵敏度高、重复性和稳定性好等优点, 为从 mRNA 水平上深入研究 RIG-I 样受体、干扰素与鸭机体免疫功能相关性奠定了基础。

参考文献:

- [1] 秦成峰, 秦鄂德. RIG-I 样受体与 RNA 病毒识别 [J]. 微生物学报, 2008, 48 (10): 1418—1423.
- [2] HIGUEHI R, DOLLINGER G, WALSH P S, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences [J]. Biotechnology, 1992, (10): 413—417.
- [3] BUSTIN S A, BENES V, NOLAN T, et al. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective [J]. J Mol Endoc, 2005, 34: 597—601.
- [4] HOLM C, NYVOLD C G, PLAUDAN S R, et al. Interleukin-21 mRNA expression during virus infections [J]. Cytokine, 2006, 33 (1): 41—45.
- [5] ZHANG Z, BASHIRUDDIN J B, DOEL C, et al. Cytokine and Toll-like receptor mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissues of cattle during foot-and-mouth disease virus infection [J]. J Comp Pathol, 2006, 134 (1): 60—66.
- [6] 朱海侠, 万春和, 黄瑜, 等. 番鸭 IFN- α 基因的克隆与序列分析 [J]. 福建农业学报, 2011, (4): 523—527.
- [7] REAICHE G Y. Characterization of the Events Involved in the Resolution of Acute Duck Hepatitis B Virus Infection [D]. Adelaide: The University of Adelaide, 2008.
- [8] BARBER M R, ALDRIDGE J R, WEBSTER R G, et al. Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107 (13): 5913—5918.
- [9] SONG C, YU S, DUAN Y, et al. Effect of age on the pathogenesis of DHV-1 in Peking ducks and on the innate immune responses of ducks to infection [J]. Archives of virology, 2014, 159 (5): 905—914.
- [10] 万春和, 朱海侠, 黄瑜, 等. 番鸭 IFN- α mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2012, (4): 63—68.
- [11] YONEYAMA M, KIKUCHI M, MATSUMOTO K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity [J]. J Immunol, 2005, 175 (5): 2851—2858.
- [12] MOGENSEN T H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses [J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22 (2): 240—273.
- [13] YONEYAMA M, FUJITA T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors [J]. Immunol Rev, 2009, 227 (1): 54—65.
- [14] 景志忠, 何小兵, 房永祥, 等. 机体识别病毒核酸的几种分子模式及途径 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(3): 311—322.
- [15] 丁娜, 孙英杰, 张石磊, 等. 鹅模式受体 MDA5 基因克隆及功能分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20 (3): 1—6.
- [16] 陈阳, 黄正洋, 张扬, 等. 鸭维甲酸诱导基因 I 克隆及其结构域功能分析 [J]. 中国农业科学, 2013, 46 (10): 2094—2102.
- [17] SAMUEL C. E. Antiviral actions of interferons [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14 (4): 778—809.
- [18] PEDERSEN E B, HAAHR S, MOGENSEN S C. X-linked resistance of mice to high doses of herpes simplex virus type 2 correlates with early interferon production [J]. Infect Immun, 1983, 42 (2): 740—746.
- [19] BLASCHKE V, REICH K, BLASCHKE S, et al. Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology [J]. J Immunol Methods, 2000, 246 (1—2): 79—90.
- [20] HEIN J, SEHELLENHER U, BEIN G, et al. Quantification of murine IFN- γ mRNA and protein expression: impact of real-time kinetic RT-PCR using SYBR Green I dye [J]. Scand J Immunol, 2001, 54 (3): 285—291.
- [21] MICHAEL WY, CHAN EAGLE S H CHUL, KA-FAI TO, et al. Quantitative detection of methylated SOCS-1, a tumor suppressor gene, by a modified protocol of quantitative real time methylation-specific PCR using SYBR Green I and its use in early gastric cancer detection [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26 (16): 1289—1293.
- [22] GIULIETTI A, OVERHERGH L, VALCKX O, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. Methods, 2001, 25 (4): 386—401.
- [23] DUSSAULT A A, POULIOT M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR [J]. Biol Proced Online, 2006, 8 (1): 1—10.
- [24] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29 (9): 45.

(责任编辑:张梅)