

文章编号: 0529-6579 (2000) 02-0092-05

竞争性 RT-PCR 检测哮喘患者 IL-8 表达水平^{*}

何梦璋¹, 张 宏², 薛爱群², 方向平², 钟南山¹

(1. 广州医学院第一附属医院, 广州 510120; 2. 中山大学生物工程研究中心)

摘 要: 利用反向 PCR 法, 缺失人 IL-8 cDNA 内部 1bp 序列, 构建得到 IL-8 突变内标分子. 用已知量的该内标分子, 通过竞争性 RT-PCR 法, 检测支气管哮喘患者外周血 IL-8 基因的表达情况, 发现患者 IL-8 mRNA 的表达水平明显高于正常人对照组, 这一结果初步表明, 利用竞争性 RT-PCR 技术对支气管哮喘患者进行早期基因诊断, 具有一定的可行性.

关键词: IL-8; 竞争性 RT-PCR; 支气管哮喘

中图分类号: R318 **文献标识码:** A

RT-PCR 是分子生物学研究中最重要技术之一, 90 年代初在此基础上建立的竞争性 RT-PCR (competitive reverse-transcription PCR) 技术, 已被广泛用于对目的基因的表达进行精确定量测定^[1,2]. 支气管哮喘病是一种较为严重的气道炎症反应, 其发病的分子机理至今仍不清楚, 早期诊断对该病的有效治疗无疑具有积极的作用. 本文用竞争性 RT-PCR 法, 对支气管哮喘患者的白细胞介素 8 (IL-8) 这种炎症趋化因子基因的表达水平进行检测, 探讨基因诊断支气管哮喘病的可行性.

1 材料和方法

1.1 质料和菌株

含有人 IL-8 基因的质粒 pHUM-IL8、大肠杆菌 DH5 α [supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1] 由中山大学生物工程研究中心提供.

1.2 试剂及 PCR 引物合成

实验所用的酶、试剂盒购自 Promega 和 Sigma 公司, 其余为国产分析纯试剂; PCR 引物由中国科学院上海生物化学研究所合成, PAGE 纯化.

1.3 IL-8 基因的 PCR 扩增

设计扩增 IL-8 基因编码区上游引物序列为 5'-AGTGCTAAAGAACTTAGATG-3'; 下游引物序列为 5'-TATGAATTCTCAGCCCTCT-3'. PCR 反应条件是: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 54 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 反应 2 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min.

1.4 IL-8 基因的反向 PCR 扩增

在 2 条反向引物 5' 端, 分别引入一个 Bgl II 酶切位点

^{*} 收稿日期: 1999-04-27 作者简介: 何梦璋 (1970~), 男, 医师.

上游引物序列为: 5'-CT AGATCTACTGGGTGCAGAGGGTTGTG-3'

Bgl II

下游引物序列为: 5'-CG AGATCTTGATAAATTTGGGGTGG-3'

反向 PCR 扩增的反应条件是: 94 °C 1 min, 60 °C 1 min 40 s, 72 °C 3 min 30 s, 33 个循环, 最后 72 °C 10 min.

1.5 DNA 片段的回收

PCR 扩增产物采用 Promega 的 Wizard™PCR * Preps DNA Purification System 试剂盒, 直接回收纯化. 电泳后琼脂糖凝胶中的 DNA 片段, 则采用 Sigma 公司的 Nucleic Acid Rapid Isolation Kit, 按其推荐的方法进行回收纯化.

1.6 淋巴细胞的制备及总 RNA 的提取

抽取 2 mL 静脉血, 置于抗凝管中, 立即加入 2 mL 4 °C 预冷的生理盐水, 混匀, 把混合物轻铺于 2 mL 的淋巴细胞分离液上. 2 000 r/min 离心 20 min, 将淋巴细胞层吸出转移至另一试管中, 再加入 2 mL 生理盐水, 混匀, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 生理盐水并移至 1.5 mL Eppendorf 管中, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀物即为淋巴细胞. 总 RNA 的提取按 Chomczynski 等^[3]的方法进行.

1.7 cDNA 单链模板的合成

取 5 μg 总 RNA 作模板, 按 Promega 公司 Reverse Transcription System Kit 推荐的方案进行, 反应体积为 20 μL.

1.8 竞争性 PCR 结果的统计学分析

根据竞争性 PCR 的数学原理^[4], 待测 IL-8 cDNA 的起始质量浓度 = (待测 IL-8 cDNA PCR 产物的荧光亮度/竞争模板 PCR 产物的荧光亮度) × 竞争模板的起始质量浓度, 单位为 ng/μL. 荧光亮度由 UVP 紫外凝胶图像分析仪测定. 待测 IL-8 mRNA 的表达量 = (待测 IL-8 cDNA 的起始质量浓度 × 加入逆转录产物的体积) / 作逆转录模板的总 RNA 量, 单位为 ng/μg 外周血淋巴细胞总 RNA. 所得数据采用统计学软件处理, 数据用均数 ± 标准误差表示, 组间均数比较采用 *t* 检验.

2 结果与分析

2.1 IL-8 基因的克隆

用含有 IL-8 基因的质粒 pHUM-IL8 为模板, PCR 扩增获得预期 218 碱基对的 IL-8 基因目标带, 回收后与 Promega 的 pGEM-T 载体连接 (图 1), 转化 JM109, IPTG/X-gal 蓝

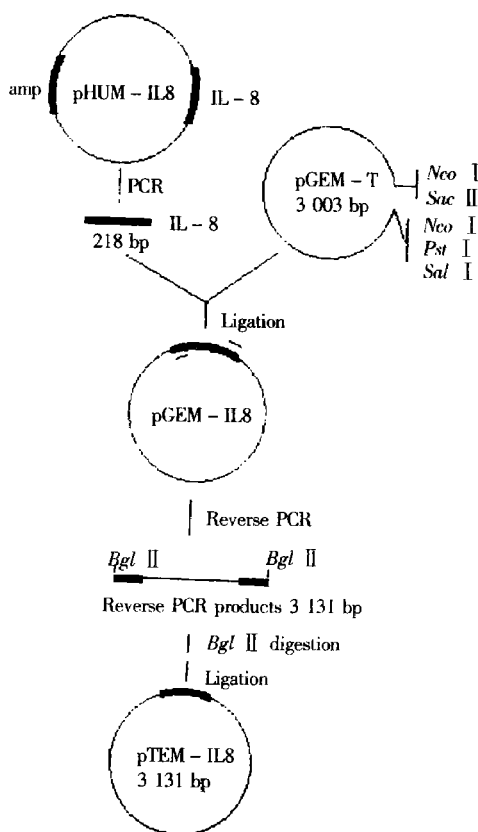


图 1 IL-8 内标分子的构建过程

Fig.1 Construction of IL-8 competitive molecule

白筛选白色菌落,提取质粒,用 pGEM-T 载体上的 *Nco* I 和 *Pst* I 进行双酶切消化反应,电泳结果证实有预期大小的 IL-8 目标带插入,见图 2,所获得的含有 IL-8 基因重组质粒命名为 pGEM-IL8。

2.2 IL-8 内标分子的构建

构建过程见图 1,以构建的重组质粒 pGEM-IL8 为模板,用反向引物进行连同载体部分在内的反向 PCR 扩增,得到的扩增带较 pGEM-IL8 用 *Nco* I 单酶切消化产物小约 100 碱基对(图 3),与预期结果一致,表明通过反向 PCR 已经成功的缺失掉 IL-8 基因内部预期的 95 碱基对序列。用 *Bgl* II 消化反向 PCR 产物 5'端和 3'端中分别引入的 *Bgl* II 限制性内切酶位点,经回收纯化后回入 T₄ DNA 连接酶,使其自连环化,然后转化大肠杆菌 JM109,提取质粒,用载体部分的 *Nco* I 和 *Pst* I 位点进行双酶切消化,电泳可见突变后 IL-8 基因较正常的小约 100 碱基对,见图 3。获得的重组 IL-8 内标分子命名为 pTEM-IL8。

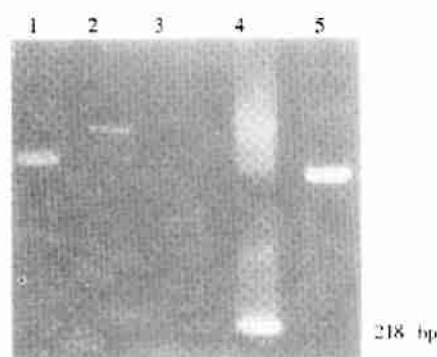


图 2 IL-8 基因 RCP 扩增结果及重组 pGEM-IL8 质粒的鉴定

Fig.2 PCR amplification of human IL-8 and identification of recombinant pGEM-IL8 plasmid

- 1 未经酶切的 pGEM-IL8;
- 2 经 *Nco* I/*Pst* I 消化的 pGEM-IL8;
- 3 100 碱基对上样 Ladder;
- 4 质粒 pGEM-IL8 的 PCR 扩增结果;
- 5 pGEM-IL8 质粒



图 3 pGEM-IL8 质粒反向 PCR 扩增及内标分子 pTEM-IL8 酶切鉴定结果

Fig.3 Inverse PCR amplification of IL8 gene and identification of recombinant pTEM-IL8 plasmid

- 1 λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III;
- 2 pGEM-IL8 反向 PCR 扩增片段;
- 3 pGEM-IL8/*Nco* I 酶切结果;
- 4 100 碱基对上样 Ladder;
- 5 218 碱基对 IL-8 基因 PCR 片段作正对照;
- 6 pTEM-IL8/*Pst* I + *Nco* I 双酶切结果

2.3 支气管哮喘患者 IL-8 mRNA 表达水平的测定

选取支气管哮喘患者 8 例,年龄 (28.9 ± 10.6) 岁,健康者 6 例,年龄 (27.3 ± 5.9) 岁,分别提取总 RNA 进行逆转录反应,然后将每个样品 20 μ L 的反应产物分成 4 份(5 μ L/份)作为 PCR 模板,在 4 个反应管里再分别依次加入 0.1,0.01,0.001,0.000 1 ng 的 pTEM-IL8 内标分子作为竞争性模板,用扩增 IL-8 基因的引物进行竞争性 PCR 扩增,结果见图 4。由图 4 中可以看出,200 碱基对大小的带为 IL-8 基因的扩增带,123 碱基对带是内

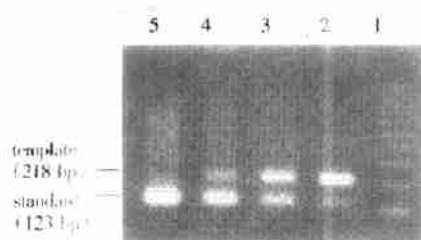


图4 IL-8 基因竞争性 PCR 扩增结果

Fig.4 Results of IL8 gene quantitative competitive PCR

1 100 碱基对上样 Ladder;
5~2 内标分子模板量分别为
0.0001, 0.0001, 0.01, 0.1 ng

标分子的扩增带,并且,内标分子扩增带的信号随着竞争性模板量的增加而增强,相反 IL-8 基因扩增带的信号随着竞争性模板量的增加而减弱。通过采集各扩增带荧光强度的信号并进行计算,发现 IL-8 基因在每个支气管哮喘患者中的表达水平均高于对应的正常人 ($P < 0.05$),见图 5。

方差分析结果表明,IL-8 基因在支气管哮喘组的平均表达水平与在正常人组里的平均表达水平达到显著差异 ($P < 0.05$),且高于正常人组 1.5 倍以上。

3 讨论

支气管哮喘本质上是一种由多种炎症细胞参与的气道慢性炎症,而 IL-8 在炎症反应及变态反应中具有重要的调节作用^[5]。我们构建的 IL-8 内标分子与待测的 IL-8 基因有相同的引物识别序列,扩增产物较正常的 IL-8 基因扩增产物小近 100 碱基对,因而极易区分。由于在同一反应管里的内标和待测样品对共同的 PCR 引物有相同的竞争能力,当进行 PCR 扩增时,任何参数的改变对两者的影响均是相同的,因此,这种定量结果具有更高的可靠性。在灵敏度方面,一些研究报道以肌动蛋白 (β -actin) 作参照,用酶联免疫法或 RT-PCR 法测定哮喘患者 IL-8 基因的表达^[6,7],但本质还是一种定性分析方法,本实验在结论上虽然与前人一致,即支气管哮喘患者 IL-8 基因的表达水平明显高于正常人,但实现了 IL-8 基因表达的定量分析,采用的方法简便快捷,其精度达到了 pg 级的靶 cDNA,远高于传统的 RNA 杂交定量^[8],对支气管哮喘病的辅助诊断显然有重要的价值。

参考文献:

- [1] FEERRE F, MARCHESE A L, GRIFFIN S L, et al. Development and validation of a polymerase chain reaction method for the precise quantitation of HIV-1 DNA in blood cells from subjects under going a 1-year immuno therapeutic treatment[J]. AIDS, 1993, Sup. 2: 21 ~ 27.
- [2] NOONAN K E, BECK C, HOLZMAYER T A, et al. Quantitation analysis of MDRI gene expression in human tumors by polymerase chain reaction[J]. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87: 7160 ~ 7164.

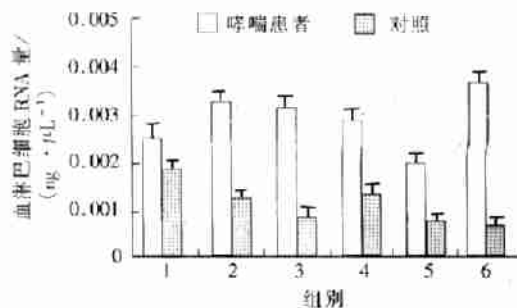


图5 支气管患者和正常人 IL-8 基因表达的差异

Fig.5 Expression level of IL-8 gene in asthmatic patients and controls

- [3] CHOMCZYNSHI P, SACCHI M. Single-step method of RNA isolation by thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156 ~ 162.
- [4] SUSAN K L, JAMES E C. Quantification of XPA gene expression levels in human and mouse cell lines by competitive RTPCR [J]. *Mutation Research*, 1997, 383: 9 ~ 19.
- [5] 薛玉文. 白介素与支气管哮喘 [J]. *国外医学呼吸系统分册*, 1997, 17(2): 59 ~ 61.
- [6] NOCKER R E, et al. *Int Arch Allergy immunol*, 1996, 109: 183 ~ 191.
- [7] NOAH T L. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152: 1290 ~ 1296.
- [8] RAEYMAEKERS L. Quantitation PCR: theoretical consideration with practical implications [J]. *Anal Biochem*, 1993, 214: 582 ~ 585.

Rapid Quantification of Interleukin-8 Gene Expression Level in Asthmatic Patients's Peripheral Blood by Competitive RT-PCR

HE Meng-zhan^{*}, ZHANG Hong, XUE Ai-qun, FANG Xiang-ping, ZHONG Nan-shan

Abstract: Competitive reverse transcription polymerase chain reaction (competitive RT-PCR) is the most efficient method for accurately measuring mRNA level in samples of total RNA. We constructed mutant internal standards, which deleted 95 base pair nucleotides in internal coding sequence of interleukin-8 (IL-8) by inverse PCR technique. The expression level of IL-8 mRNA in asthmatic patients was determined by RT-PCR with this competitive internal standard. The experiment results showed that the mRNA level of IL-8 in asthmatic patients were markedly higher than that in normal people. This suggested it is possible for asthma early diagnosis using hte IL-8 internal standards.

Keywords: IL-8; competitive RT-PCR; asthma

* The First Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China