

王永娟,王 岑,朱善元,等. 4 种方法制备外周血淋巴细胞总 RNA 对鹅 α 干扰素的影响比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):204-206.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.068

4 种方法制备外周血淋巴细胞总 RNA 对鹅 α 干扰素的影响比较

王永娟,王 岑,朱善元,左伟勇

(江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室,江苏泰州 225300)

摘要:无菌采取鹅外周血并进行抗凝处理,以全血提取法、细胞分离直接提取法、细胞分离培养提取法及细胞分离诱导提取法分别提取外周血中淋巴细胞的总 RNA;紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和得率;以总 RNA 为模板通过 RT-PCR 法扩增鹅 α -干扰素($GoIFN-\alpha$)基因,并构建重组质粒 pGEMT- α ,通过比较 $GoIFN-\alpha$ 序列确定各种提取方法的可行性。结果显示,4 种方法提取的 RNA 纯度高,均可作为模板扩增出目的基因,满足后续的分子生物学研究;其中以细胞分离直接提取法制备的 RNA 产量最多,此结论为外周血淋巴细胞总 RNA 的提取提供了一种更快捷的方法。

关键词:外周血;淋巴细胞;RNA 提取;RT-PCR;方法比较;鹅;干扰素

中图分类号:S858.33 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)05-0204-02

干扰素是真核细胞对各种刺激作出反应而自然形成的一组复杂且具有多种功能的活性蛋白质(主要是糖蛋白),是一种由单核细胞和淋巴细胞产生的细胞因子^[1]。刺激产生干扰素的外源因素主要有病毒和其他种类的干扰素诱导剂,如植物血凝素(PHA)、刀豆素(ConA)^[2-3]。在外源因素刺激下,原处于 G₀ 期的淋巴细胞转化为淋巴母细胞,从而获得丰富的含有丝分裂且生长活跃的细胞群体,终止分裂中期的淋巴细胞,提取总 RNA 并反转录,即可得到 1 个表达细胞因子的 cDNA 库。多个报道显示^[4-7],为获取目的基因,一般在外源因素刺激后再提取外周血淋巴细胞总 RNA,本研究尝试采用多种方法制备总 RNA 并扩增目的基因,以探索一种最为快捷简便的外周血淋巴细胞总 RNA 提取方法,为其他细胞因子的分离奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

成年扬州白鹅购自扬州瑞农科技有限公司;刀豆球蛋白(ConA)购自 Sigma 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;禽淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;Revert Aid M-MuLV Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、Taq DNA 聚合酶、1 kb DNA Ladderr、Prestained Protein 分子量 marker、pGEM-T Easy Vector System、限制性内切酶、质粒提取试剂盒购自美国 Promega 公司;胶回收试剂盒、细胞培养

液、细胞消化液、DH5 α 大肠杆菌感受态细胞购自康为世纪生物科技有限公司。

1.2 引物设计与合成

根据已发表的 $GoIFN-\alpha$ 基因序列(登录号:HQ115583)设计 1 对引物,拟扩增的全长序列为 576 bp。引物 F1:5'-ATGCCTGGGCCATCAGCCCCAC-3'和 R1:5'-TTAGCGCATGGCGCGGCTGAGG-3'由上海 Invitrogen 公司合成。

1.3 总 RNA 提取

1.3.1 细胞分离诱导提取总 RNA 使用无菌注射器采取鹅翼静脉血 5 mL,3.8% 枸橼酸钠抗凝。按淋巴细胞分离液说明书分离淋巴细胞,加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 细胞培养液并吹匀,计数后稀释至 2×10^6 个/mL。用终浓度 64 mg/L ConA 刺激诱导^[7],于 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱中培养 24 h 后,收集细胞并按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,通过紫外分光光度计测其纯度和浓度。

1.3.2 细胞分离培养提取总 RNA 使用无菌注射器采取鹅翅静脉血 5 mL,3.8% 枸橼酸钠抗凝。按淋巴细胞分离液说明书分离淋巴细胞,后将其重悬于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 细胞培养液中,计数后稀释至 2×10^6 个/mL,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱中培养 24 h 后,按 Trizol 说明书提取总 RNA,通过紫外分光光度计测其纯度和浓度。

1.3.3 细胞分离直接提取总 RNA 使用无菌注射器采取鹅翼静脉血 5 mL,3.8% 枸橼酸钠抗凝。按淋巴细胞分离液说明书分离淋巴细胞,用 PBS 重新悬浮,反复洗涤 2~3 次后按 Trizol 说明书提取总 RNA,通过紫外分光光度计测其纯度和浓度。

1.3.4 全血提取总 RNA 使用无菌注射器采取鹅翼静脉血 5 mL,3.8% 枸橼酸钠抗凝。按 Trizol 说明书直接提取总 RNA,通过紫外分光光度计测其纯度和浓度。

1.4 $GoIFN-\alpha$ 基因的 RT-PCR 扩增

$GoIFN-\alpha$ 基因的反转录(RT):取上述 4 种 RNA 悬浮液

收稿日期:2014-05-26

基金项目:安徽省滁州市产学研合作项目(编号:201208);江苏农牧科技职业学院重点支持项目(编号:NSFZD1305)。

作者简介:王永娟(1980—),女,江苏海门人,博士,副教授,主要从事动物疫病防控研究。E-mail:43088591@qq.com。

通信作者:左伟勇,博士,教授,主要从事生物工程技术研究。E-mail:979490023@qq.com。

各 5 μL , 参照反转录酶说明书, 均选用特异性引物 R1 分别合成 cDNA 第 1 链, RT 产物各自标记后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

GoIFN- α 基因的 PCR 扩增: 取上述 4 种 RT 产物各 2 μL 为 cDNA 模板, 分别加入 MixTaq DNA 聚合酶 25 μL , 上、下游引物 (F1、R1) 各 1 μL , 超纯水补足至各反应体系均 50 μL , 混匀后参照下列反应程序进行 PCR 扩增。反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 28 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。PCR 产物各取 5 μL 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定片段大小。

1.5 *GoIFN- α* 基因的克隆与鉴定

将上述 4 种经凝胶电泳鉴定后的 PCR 产物用胶回收试剂盒纯化回收, 并分别与 pGEMT-easy 载体进行连接, 按照常规方法^[8]转化 DH5 α 感受态细胞后进行蓝白斑试验, 提取重组质粒并作酶切鉴定。将阳性 *GoIFN- α* 全基因重组质粒送至上海立菲生物技术公司测序。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 纯度与浓度测定

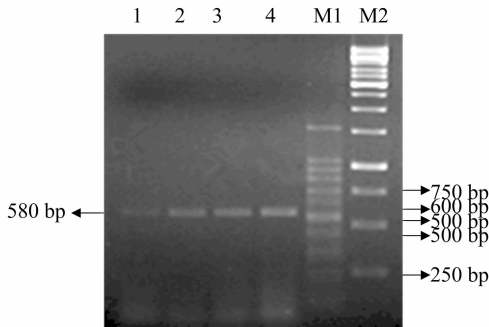
紫外分光光度仪分别测定 4 种不同方法提取的总 RNA 纯度和浓度, 结果见表 1, 其中 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值反映总 RNA 的纯度。

表 1 4 种方法提取的总 RNA 纯度和浓度

方法	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
细胞分离诱导提取法	2.002	0.886
细胞分离培养提取法	2.013	0.912
细胞分离直接提取法	2.009	1.376
全血提取法	2.016	1.123

2.2 *GoIFN- α* 全基因的扩增

对上述 4 种方法所得的扬州鹅外周血总 RNA, 采用体积及反应条件完全相同的反应组分进行反转录。之后在相同条件下进行全长 *GoIFN- α* 基因的 PCR 扩增。扩增产物经 1.2% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测, 均获得了符合预期大小的约 576 bp 的条带 (图 1)。



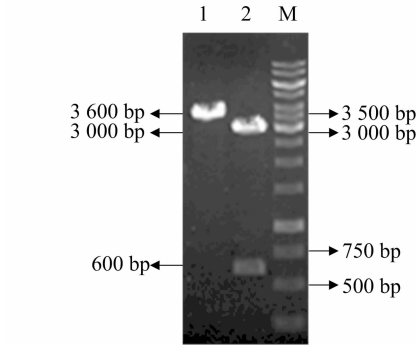
1—全血提取法所得*GoIFN- α* 基因; 2—细胞分离诱导提取法所得*GoIFN- α* 基因; 3—细胞分离培养提取法所得*GoIFN- α* 基因; 4—细胞分离直接提取法所得*GoIFN- α* 基因; M1—DNA 分子量标准 (DL 100); M2—DNA 分子量标准 (DL 10000)。

图 1 鹅 *IFN- α* 全长基因 PCR 扩增产物电泳图

2.3 *GoIFN- α* 全基因克隆与鉴定

将各 PCR 产物克隆至 pGEM-T 载体, 分别用限制性内切酶 *Sal* I 或 *Eco* R I 对重组质粒进行酶切鉴定, 酶切产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 2 (以细胞分离直接提

取法所得 *GoIFN- α* 基因重组为例), 均出现预期大小的 DNA 条带, 鉴定正确的重组质粒命名为 pGEMT- α 。



1—*Sal* I 酶切 pGEMT- α ; 2—*Eco* R I 酶切 pGEM-T-*GoIFN- α* ; M—DNA 分子量标准 (DL 10000)

图 2 pGEMT- α 酶切鉴定

2.4 *GoIFN- α* 基因序列测定

将各种方法所对应的重组质粒 pGEMT- α 送至上海立菲生物技术公司测序, 结果见表 2。4 种方法制备的 *GoIFN- α* 序列同源性的 100.0%, 与参考序列的同源性为 99.7%。

表 2 4 种方法对应 *GoIFN- α* 序列与参考序列的同源性

方法	同源性 (%)				
	参考序列	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4
参考序列	—	99.7	99.7	99.7	99.7
方法 1	—	—	100.0	100.0	100.0
方法 2	—	—	—	100.0	100.0
方法 3	—	—	—	—	100.0
方法 4	—	—	—	—	—

3 结论与讨论

本研究通过 4 种方法制备鹅外周血淋巴细胞总 RNA 并扩增目的基因 *GoIFN- α* , 结果显示, 各种方法所制备的总 RNA 均可扩增出预期的目的基因, 其中以“细胞分离直接提取法”所得总 RNA 浓度最高, 同等条件下所得目的基因产量也最多。此结果提示我们: 从外周血淋巴细胞中分离细胞因子, 可以避开以往的细胞分离诱导提取法, 改用无需诱导剂的细胞分离直接提取法, 既高效又快捷, 且能满足后期的分子生物学研究。另外, 全血提取法在不分离淋巴细胞的情况下直接提取, 同样获得了目的基因, 因此在对目的基因无产量要求的情况下全血提取法也是很好的选择。

本研究中的全血提取法、细胞分离培养提取法及细胞分离直接提取法均未涉及到淋巴细胞的诱导, 但却成功获得了目的基因, 究其原因可能是所采鹅已受到外来病毒的感染, 外周血淋巴细胞已转化为具有分化能力的淋巴母细胞, 因此, 分离的外周血细胞就算没有刺激也可以达到预期目的。其中细胞分离直接提取法, 淋巴细胞已从全血中分离出来却又未经培养, 淋巴细胞密度大、活性高, 因此同等条件下总 RNA 和目的基因产量均最高。而全血提取法可能含其他细胞 RNA 量较多, 故出现总 RNA 产量高、目的基因产量不高的局面。

本研究各种方法获得的 *GoIFN- α* 基因序列与 GenBank 中已发表的 *GoIFN- α* 基因序列 (登录号: HQ115583) 同源性达 99.7%, 说明该基因相对保守, 证实了禽 *IFN- α* 基因序列

李泳宁,朱宏阳,吴 焜,等. 1 种微生物发酵饲料在断奶仔猪养殖上的应用[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):206-208.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.069

1 种微生物发酵饲料在断奶仔猪养殖上的应用

李泳宁¹, 朱宏阳¹, 吴 焜², 连建芸²

(1. 福建卫生职业技术学院, 福建福州 350101; 2. 福建省新闻科生物科技开发有限公司, 福建福州 350008)

摘要:选用 28 日龄健康断奶仔猪 150 头, 随机分为 5 组, 每组 30 头, 分别为对照组、抗生素组、分别添加 0.5%、1.0%、2.0% 微生物发酵饲料的 3 个试验组, 考察其对断奶仔猪的生长性能和腹泻情况的影响。试验结果表明, 添加 1.0% 微生物发酵饲料试验组效果较好, 与对照组相比, 料肉比降低了 12.89%, 处理间差异显著; 同时该处理有效提高了直肠中双歧杆菌、乳酸杆菌的数量, 分别比对照组提高了 11.83%、15.24%; 该处理对仔猪腹泻率和粪便中大肠杆菌的数量能起到显著的抑制作用。

关键词:微生物发酵饲料; 仔猪; 生长性能; 腹泻率; 大肠杆菌

中图分类号: S816.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0206-03

近年来, 由于抗生素的长期使用而导致的药物残留、耐药性等问题越来越引起社会的关注, 中国饲料用料和饲料安全问题遇到了严峻的挑战, 因此寻找安全、高效的绿色新型饲料势在必行。作为饲料工业重要发展方向的绿色饲料添加剂, 微生态制剂一直受到广泛关注。微生态制剂在调节动物机体微生态平衡、预防疾病、提高饲料转化率和保护生态环境等方面有着其他添加剂不可替代的作用^[1-3]。

微生物发酵饲料是一种独特的发酵产品, 该产品中不仅含有活性微生物菌体, 还含有微生物发酵代谢所产生的活性成分, 包括蛋白、核苷、寡糖、有机酸和未知生长因子等。目前, 微生物发酵饲料在欧美发达国家的饲养业中已经广泛使用, 并取得了良好的经济效益和社会效益。国内微生物发酵饲料的研究起步较晚, 但随着近年来饲料工业的快速发展, 微生物发酵饲料已被广泛应用于水产和畜禽的养殖中^[4-6]。微生物发酵饲料作为一种新型的生态型饲料, 无疑为现代饲料

工业的发展供了一种全新安全的产品理念。

本试验采用了 1 种多种益生菌复合发酵的微生物发酵饲料, 其产物中不仅含有大量的活性益生菌, 还含有其代谢产生多种的酶、生长因子和有机酸等生物活性物质, 将其应用于断奶仔猪的饲养, 考察其对仔猪生产性能、直肠内微生物菌群数量、腹泻频率及粪便微生物数量的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

微生物发酵饲料由笔者所在实验室制备, 采用液体发酵分别制备地衣芽孢杆菌、酿酒酵母、嗜酸乳杆菌的菌种, 以玉米粉、麸皮、豆粕等为固态基质, 按一定比例接种后进行固态发酵培养。产品主要成分: 地衣芽孢杆菌 $\geq 1.0 \times 10^9$ 个/g, 酿酒酵母 $\geq 2.0 \times 10^8$ 个/g, 嗜酸乳杆菌 $\geq 2.0 \times 10^7$ 个/g, 乳酸含量 $\geq 2.0\%$ 。

1.2 试验动物分组与管理

试验猪场: 福建闽清某猪场。试验时间: 28 d。

选择 28 日龄健康杜 × 长 × 大三元杂交断奶仔猪 150 头。随机分成 5 组, 每组 3 个重复, 每个重复 10 头。A 组为对照组 (基础日粮组); B 组为基础日粮 + 0.5% 微生物发酵饲料; C 组为基础日粮 + 1.0% 微生物发酵饲料; D 组为基础日粮 +

收稿日期: 2015-01-13

基金项目: 福建省科技厅重点项目 (编号: 2012N0012); 福建省福州市科技计划 (编号: 2013-N-68)。

作者简介: 李泳宁 (1979—), 男, 福建诏安人, 博士, 讲师, 研究方向为微生态制剂。E-mail: yongningli@163.com。

保守性良好、遗传进化变异缓慢的观点^[9]。

综上所述, 细胞分离直接提取法可以替代甚至优于之前常用的诱导法以实现畜禽细胞因子的分离扩增; 全血提取法操作简单, 在对目的基因无产量要求的情况下也可运用。

参考文献:

- [1] 郝春丽, 康孟佼, 田兆龙. 禽类干扰素的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2007(6): 38-41.
- [2] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] 吴建设, 张日俊, 周毓平, 等. 全血法鸡淋巴细胞转化试验最佳试验条件的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1997, 28(3): 212-216.
- [4] 岳道友, 索 勋, 汪 明, 等. 鸡 α -干扰素研究进展[J]. 中国家

禽, 2010, 32(17): 45-47.

- [5] 孙亚萍, 王英明, 乔守怡. 干扰素及其最新研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(4): 676-679.
- [6] 王永娟, 朱善元, 左伟勇, 等. 鸡 γ -干扰素成熟肽基因的克隆、表达与抗血清制备[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(6): 1373-1377.
- [7] 王永娟, 朱善元, 左伟勇, 等. 鸡 α -干扰素成熟肽基因的克隆、表达及其多价血清的制备[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 1: 32-36.
- [8] 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, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] 宋鸿雁, 李 艳, 肖 瑾, 等. 鸡 α -干扰素基因的克隆与序列分析[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(12): 20-23.