·胸部疾病·

呼吸道感染样本中IFITMs引物优化

1.济南大学-山东省医学科学院医学与生命科学学院（山东 济南 250200）
2.山东省罕少见病重点实验室,山东省医药生物技术研究中心,山东省医学科学院(山东 济南 250062)
左清利[1,2] 鲁艳芹[1,2] 韩金祥[1,2]

【摘要】**目的** 优化干扰素诱导的跨膜蛋白（Interferon induced transmenmbrane proteins,IFITMs）的五个亚型基因，即IFITM1、IFITM2、IFITM3、IFITM5和IFITM10。**方法** 提取呼吸道感染样本中核酸，通过RT-qPCR筛选出具有特异性的引物且Ct值在[15,35]之间，再利用琼脂糖凝胶电泳对引物的特异性进行近一步的验证。**结果** RT-qPCR结果显示IFITM1相关引物中IFITM1-3具有特异性；IFITM2相关引物中IFITM 2-2具有特异性；IFITM3相关引物IFITM3-2有较好特异性；IFITM5相关引物中IFITM5-4具有特异性；IFITM10相关引物中IFITM10-1、IFITM10-2、IFITM10-3具有特异性。具有特异性的所有引物的琼脂糖凝胶电泳条带单一明亮。**结论** IFITM1-3优于该基因的其它引物；IFITM2-2优于IFITM2-1；IFITM3-2优于IFITM3-1；IFITM10-1、 IFITM10-2 和IFITM10-3均适用。

【关键词】呼吸道感染；引物；IFITMs
【中图分类号】R373.1
【文献标识码】A
DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2017.02.009

Optimization of IFITMs Primers in Respiratory Tract infection Samples

ZUO Qing-li, LU Yan-qin, HAN Jin-xiang. University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250200, Shandong Province, China

[Abstract] ***Objective*** To optimize the five subtypes of interferon inducible transmembrane proteins, namely IFITM1, IFITM2, IFITM3, IFITM5 and IFITM10. ***Methods*** Extraction of nucleic acids from respiratory tract infection samples. Specific primers were screened by qRT-PCR and Ct value was between (15,35), and the specificity of primers was verified by agarose gel electrophoresis. ***Results*** IFITM1-3 was specific in the IFITM1 primers. IFITM 2-2 was specific in the IFITM2 primers. IFITM3-2 was specific in the IFITM3 primers. IFITM5-6 was specific in the IFITM5 primers. IFITM10-1, IFITM10-2 and IFITM10-3 were specific in the IFITM10 primers. Agarose gel electrophoresis bands of all primers with specificity were single bright. ***Conclusion*** IFITM1-3 was superior to other primers of IFITM1 primers. IFITM 2-2 was superior to other primers of IFITM2 primers. IFITM3-2 was superior to other primers of IFITM3 primers. IFITM5-4 was superior to other primers of IFITM5 primers. IFITM10-1, IFITM10-2 and IFITM10-3 were superior to other primers of IFITM10 primers.

[Key words] Respiratory Tract Infection; Primer; IFITMs

全球近二百万的儿童死亡病例是由于急性呼吸道感染(ARI)导致的[1]。病毒是呼吸道感染的主要病原体，如呼吸道合胞病毒、腺病毒和偏肺病毒等[2]。小儿支原体肺炎也是儿科常见疾病，利用阿奇霉素序贯疗法进行治疗能迅速缓解患儿临床症状[3]。干扰素诱导跨膜蛋白(interferon inducible transmembrane proteins，IFITM)[4]在人类中包括5个基因，分别是IFITM1、IFITM2、IFITM3、IFITM5和IFITM10，位于11号染色体上。IFITM1、IFITM2和IFITM3的抗病毒效应一直是研究的热点，但IFITM5和IFITM10在呼吸道病毒感染中的研究尚未报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料 呼吸道感染患者的肺泡灌洗液来源于山东省济南市儿童医院。

1.2 试剂仪器 QIAamp MinElute Virus Spin Kit，购于QIAGEN。One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit、6xLoading Buffer、DL2000 DNA marker均购于TAKARA。Nanodrop2000，购于Thermo Scientific。LightCycler480，购于Roche。EB核酸染料，购于中生泰瑞。

1.3 实验方法

作者简介：左清利，男，药学专业，硕士研究生，主要研究方向：呼吸道感染样本中IFITMs的表达差异
通讯作者：韩金祥

1.3.1 引物设计：查找GENEBANK中IFITMs基因序列设计引物：IFITM1(NM_003641)，IFITM1-1上游引物：5’-GAGAGAGGCCTGCGACAA-3’，下游引物：5’-CGTTTCAGTTTCTCAGAAGTGTG-3’；IFITM1-2上游引物：5’-AGGCCTGCGACAAGTGAG-3’，下游引物：5’-TGGAACCTTGGAAGGATGGT-3’；IFITM1-1上游引物：5’-GAGAGAGGCCTGCGACAA-3’，下游引物：5’-CGTTTCAGTTTCTCAGAAGTGTG-3’；IFITM1-2上游引物：5’-AGGCCTGCGACAAGTGAG-3’，下游引物：5’-TGGAACCTTGGAAGGATGGT-3’；IFITM1-3上游引物：5’-TCGCCTACTCCGTGAAGTCT-3，下游引物：5’-ATGAGGATGCCCAGAATCAG-3’；IFITM1-4上游引物：5’-CCGTGAAGTCTAGGGACAGG-3’，下游引物：5’-GTCATGAGGATGCCCAAGAAT-3’。

IFITM2(NM_006435)，IFITM2-1上游引物：5’-GCCTGGGCTTCATAGCATT-3’，下游引物：5’-CATGGGGTGAAGTCACCTGT-3’；IFITM2-2上游引物：5’-CTCCGTGCCTGACCATGT-3’，下游引物：5’-ACGTCGCCAACCATCTTC-3’。IFITM3(NM_021034)，IFITM3-1上游引物：5’-GCCTGGGCTTCATAGCATT-3’，下游引物：5’-CATGGGGTGAAGTCACCTGT-3’；IFITM3-2上游引物：5’-TCCCTGTTCAACACCCTCTT-3’，下游引物：5’-CGCCAACCATCTTCCTGT-3’。

IFITM5(NM_001025295)，IFITM5-1上游引物：5’-TTGATCTGGTCGGTGTTCAG-3’，下游引物：5’-CAGGTCACCAACCACCTTCT-3’；IFITM5-2上游引物：5’-GGTGTTCAGCACCCTCTACC-3’，下游引物：5’-CAGGTCACCAACCACCTTCT-3’；IFITM5-3上游引物：5’-CGGTGTTCAGCACCCTCTAC-3’，下游引物：5’-CCAACCACCTTCTGATCTCG-3’；IFITM5-4上游引物：5’-GGTGTTCAGCACCCTCTACC-3’，下游引物：5’-TGTAGCACTTGGCTTTGGAG-3’。

IFITM10(NM_001170820)，IFITM10-1上游引物：5’-GCCATGCATCCTCAGCTT-3’，下游引物：5’-CTCCAGCTCCCACTGAGC-3’；IFITM10-2上游引物：5’-CCACCGAGGTGAACGACTAT-3’，下游引物：5’-TCGCACTTTGAGGGAGTAGG-3’；IFITM10-3上游引物：5’-TGGTCCATCTTCAACTTCGTC-3’，下游引物：5’-TCGCACTTTGAGGGAGTAGG-3’；IFITM10-4上游引物：5’-TGGTCCATCTTCAACTTCGTC-3’，下游引物：5’-TCTTGTCTCGCACTTTGAGG-3’。

1.3.2 核酸提取及定量：通过QIAamp MinElute Virus Spin Kit提取肺泡灌洗液中的游离核酸。用60μl洗脱两次，并分别用Nanodrop2000核酸蛋白检测仪进行核酸定量，标记后于-80℃储存备用。

1.3.3 RT-qPCR：应用One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit，10μl体系，每个反应加2xOne Step SYBRRT-PCR Buffer 5μl；PrimeScript Rtase 0.2μl； Mix TaKaRa Ex Taq HS Mix 0.6μl；上游、下游引物(10μm)均为0.5μl；Template，20ng；RNase- free ddH2O，补充至10μl。

首先反转录反应，在42℃下反应5min；其次预变性，在95℃下反应10s；然后引物扩增反应45个循环(95℃，10s；60℃，10s；72℃，10s)，熔解曲线反应1个循环(95℃，5s；65℃，1min；97℃，0.11℃/s)。冷却40℃，30s。

2 结 果

IFITM1熔解曲线见图1。IFITM1-1重合度不好，IFITM1-2无扩增，IFITM1-4无特异性。IFITM2熔解曲线见图2。IFITM2-1引物Ct值为38.06＞35。IFITM3熔解曲线见图2。IFITM3-1引物无扩增，IFITM3-2平行反应引物重合度好，无双峰。

IFITM5熔解曲线见图3。IFITM5-1、IFITM5-2特异性差，有双峰。除IFITM5-4Ct值为24.96，其余引物Ct值均大于35。IFITM10熔解曲线见图4。除IFITM10-4无特异性外，其余引物特异性均较好。

3 结 论

IFITM家族蛋白之间的功能有区别，如Everitt等[5]发现IFITM3尤其对甲型流感病毒有显著限制作用。本实验通过设计IFITMs相关引物，利用呼吸道感染患者肺泡灌洗液中的游离核酸，根据Ct值大小及熔点曲线峰特异性等结果筛选扩增引物。旨在为分析呼吸道感染样本中IFITM家族在mRNA水平上的表达提供依据。

通过分析IFITM1-3优于该基因的其它引物；IFITM2-2优于IFITM2-1；IFITM3-2熔解曲线特异性好，而IFITM3-1无扩增，IFITM3-2优于IFITM3-1；IFITM5-4熔解曲线特异性好。IFITM10-1、IFITM10-2和IFITM10-3均有较好特异性，而IFITM10-4特异性差，出现了双峰且Ct＞35。

（下转第 40 页）