



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106596916 B

(45)授权公告日 2018.04.20

(21)申请号 201611167672.7

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2016.12.16

C12Q 1/6883(2018.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 赵晓明

申请公布号 CN 106596916 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(73)专利权人 石河子大学

地址 832000 新疆维吾尔自治区石河子市
北四路石河子大学医学院

(72)发明人 马克涛 李新芝 司军强

(74)专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理
有限公司 11385

代理人 董芙蓉

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页
序列表2页

(54)发明名称

一种外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法,该方法包括以下步骤:选取SHR和正常血压的WKY大鼠各20只。采集腹主动脉外周血离心,血浆用于ELISA法检测IL-2和IL-6表达水平;下层血细胞用于分离外周血淋巴细胞。收集 5×10^5 个淋巴细胞,采用流式细胞仪检测CD4⁺和CD8⁺T细胞C α 43阳性表达率。将淋巴细胞分为空白对照组、刀豆蛋白组和Gap27+ConA组。提取淋巴细胞RNA,采用实时荧光定量PCR检测各组细胞IL-2mRNA与IL-6mRNA相对表达量。

1. 一种外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1、大鼠血压测定

应用BP-6无创血压监测仪测量大鼠尾动脉血压,避免大鼠躁动,于大鼠清醒安静状态下连续测量3次,每次间隔至少1min,取测量3次平均值即为大鼠收缩压;

步骤2、样本采集

3%戊巴比妥钠麻醉大鼠,乙二胺四乙酸抗凝管采集腹主动脉外周血5mI,1 500r/min离心5min,取血浆于-20℃保存,离心后的下层血细胞用于分离外周血淋巴细胞;

步骤3、炎症因子IL-2和IL-6表达

取冻存于-20℃的血浆样品,ELISA法检测IL-2和IL-6表达水平,操作严格按照试剂盒说明书进行;

步骤4、淋巴细胞分离

将血细胞与0.9%氯化钠溶液1:1等体积稀释,吹打混匀;取无菌15mI离心管,加入淋巴细胞分离液,将细胞悬液缓慢按照1:1比例加到淋巴细胞分离液上层,保证血液置于淋巴细胞分离液上层;根据密度梯度离心法分离淋巴细胞,低速离心机水平离心30min,1 500r/min,缓升缓降;将分离的白色浑浊淋巴细胞层吸出至无菌15mI离心管内,加入3倍0.9%氯化钠溶液洗涤,以1 800r/min离心6min;洗涤2次,弃上清,沉淀即淋巴细胞;加入1mI培养基重悬,吸取50μI到1.5mI离心管,加450μI磷酸盐缓冲液稀释10倍,显微镜下计数并用台盼蓝染色观察细胞活性;细胞活性为95%以上,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mI,将细胞接种在24孔板中;

步骤5、流式细胞术检测CD4⁺和CD8⁺T细胞Cx43表达收集 5×10^5 个细胞于EP管内,100μI PBS重悬细胞,分别加入相应流式抗体1μI,CD4-APC,APC同型对照;CD8-PE,PE同型对照,并设立阴性对照;125μI固定剂固定淋巴细胞,4℃孵育20min,Cx43一抗1μI抗体与99μI 1×破膜剂破膜,37℃孵育20min;FITC二抗1μI,37℃孵育20min;1mI 1×破膜剂洗涤,弃上清液,PBS重悬细胞,流式细胞仪检测,流式CELLQuest软件进行分析;

步骤6、实时荧光定量PCR检测IL-2mRNA和IL-6mRNA表达计数分离出的淋巴细胞,调整培养基至细胞浓度为 1×10^6 个/mI;将淋巴细胞分为空白对照组、刀豆蛋白组和Gap27+ConA组;加入10%自体血清,血清处理步骤:56℃灭活30min,以4 000r/min离心30min,4℃保存,于37℃,5%CO₂培养箱中培养48h;

TRIzolI法提取上述培养的淋巴细胞mRNA,核酸蛋白含量检测仪测定A₂₆₀/A₂₈₀值,1%甲醛变性凝胶电泳检测提取质量;选用GADPH作为内参基因,根据大鼠IL-2、IL-6基因cDNA序列,设定引物序列;将提取的mRNA样品、随机引物、Rtmix、dNTP混合液、焦碳酸二乙酯水按照反转录体系配制反应体系,按照37℃反转录60min,90℃灭活反转录酶5min的反应程序进行反转录合成cDNA;将2×QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix,10×miScript NucLeics Mix通用引物,模板cDNA和RNase-Free water置于冰上,并轻轻混匀,配制反应体系,按照95℃预变性2min,1个循环;95℃变性5s,60℃退火加延伸10s,40个循环设置Bio-Rad荧光定量PCR仪,记录IL-2mRNA与IL-6mRNA相对表达量;

Gap27使淋巴细胞炎症因子IL-2mRNA和IL-6mRNA表达下调,提示缝隙连接阻断剂通过改变Cx43通道结构或抑制细胞内Ca²⁺浓度进而改变通道通透性,从而影响细胞因子的释

放。

一种外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法,具体地说,涉及一种自发性高血压大鼠外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法。

背景技术

[0002] 高血压作为多因素引起的慢性疾病,其病因和发病机制十分复杂。ARIMA等研究发现,高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病均与机体免疫系统功能关系密切。免疫系统,尤其外周血T细胞、B细胞及自然杀伤细胞中均表达连接蛋白(connexin, Cx)。Cx是缝隙连接的基本组成单位,在相邻细胞间传递信息物质,构成缝隙连接细胞间通讯。MATSUE等研究发现,在脂多糖和肿瘤坏死因子 α 刺激下,单核细胞中Cx43表达可显著上调。因此,缝隙连接与机体免疫炎性反应相关,参与免疫系统细胞间通讯。CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞作为外周血T细胞的主要亚群细胞,参与调节机体免疫炎性反应,在抗感染、抗肿瘤方面发挥重要的免疫调节作用。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于克服现有技术中存在的缺陷,提供一种外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法,初步探讨Cx43与高血压大鼠炎性反应间的关系,为阐明Cx43对高血压患者炎性反应的作用机制提供理论依据。

[0004] 其具体技术方案为:

[0005] 一种外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法,包括以下步骤:

[0006] 步骤1、大鼠血压测定 应用BP-6无创血压监测仪测量大鼠尾动脉血压,避免大鼠躁动,于大鼠清醒安静状态下连续测量3次,每次间隔至少1min,取测量3次平均值即为大鼠收缩压。

[0007] 步骤2、样本采集 3%戊巴比妥钠麻醉大鼠,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管采集腹主动脉外周血5mI,1 500r/min离心5min,取血浆于-20℃保存,离心后的下层血细胞用于分离外周血淋巴细胞。

[0008] 步骤3、炎性因子IL-2和IL-6表达 取冻存于-20℃的血浆样品,ELISA法检测IL-2和IL-6表达水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。

[0009] 步骤4、淋巴细胞分离 将血细胞与0.9%氯化钠溶液1:1等体积稀释,吹打混匀。取无菌15mI离心管,加入淋巴细胞分离液,将细胞悬液缓慢按照1:1比例加到淋巴细胞分离液上层,保证血液置于淋巴细胞分离液上层。根据密度梯度离心法分离淋巴细胞,低速离心机水平离心30min(1 500r/min,缓升缓降)。将分离的白色浑浊淋巴细胞层吸出至无菌15mI离心管内,加入3倍0.9%氯化钠溶液洗涤,以1 800r/min离心6min洗涤2次,弃上清,沉淀即淋

巴细胞。加入1ml培养基重悬,吸取50 μ l到1.5ml离心管,加450 μ l磷酸盐缓冲液(PBS)稀释10倍,显微镜下计数并用台盼蓝染色观察细胞活性。细胞活性为95%以上,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,将细胞接种在24孔板中。

[0010] 步骤5、流式细胞术检测CD4⁺和CD8⁺T细胞Cx43表达 收集 5×10^5 个细胞于EP管内,100 μ l PBS重悬细胞,分别加入相应流式抗体(CD4-APC,APC同型对照;CD8-PE,PE同型对照)1 μ l,并设立阴性对照。125 μ l固定剂固定淋巴细胞,4 $^{\circ}$ C孵育20min,Cx43一抗1 μ l抗体与99 μ l 1 \times 破膜剂破膜,37 $^{\circ}$ C孵育20min;FITC二抗1 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育20min;1ml 1 \times 破膜剂洗涤,弃上清液,PBS重悬细胞,流式细胞仪检测,流式CELLQuest软件进行分析。

[0011] 步骤6、实时荧光定量PCR检测IL-2mRNA和IL-6mRNA表达 计数分离出的淋巴细胞,调整培养基至细胞浓度为 1×10^6 个/ml。将淋巴细胞分为空白对照组、刀豆蛋白(Concanavalin A,ConA)组(培养48h后加入5 μ g/ml ConA)和Gap27+ConA组(培养前加入500 μ mol/L Gap275,培养48h后加入5 μ g/ml ConA)。加入10%自体血清(血清处理步骤:56 $^{\circ}$ C灭活30min,以4000r/min离心30min,4 $^{\circ}$ C保存),于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养48h。

[0012] TRIzol法提取上述培养的淋巴细胞mRNA,核酸蛋白含量检测仪测定A₂₆₀/A₂₈₀值,1%甲醛变性凝胶电泳检测提取质量。选用GADPH作为内参基因,根据大鼠IL-2、IL-6基因cDNA序列,设定引物序列(见表1)。将提取的mRNA样品、随机引物、Rtmix、dNTP混合液、焦碳酸二乙酯(DEPC)水按照反转录体系配制反应体系,按照37 $^{\circ}$ C反转录60min,90 $^{\circ}$ C灭活反转录酶5min的反应程序进行反转录合成cDNA。将2 \times QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix,10 \times miScript Nucleic Mix通用引物,模板cDNA和RNase-Free water置于冰上,并轻轻混匀,配制反应体系,按照95 $^{\circ}$ C预变性2min,1个循环;95 $^{\circ}$ C变性5s,60 $^{\circ}$ C退火加延伸10s,40个循环设置Bio-Rad荧光定量PCR仪,记录IL-2mRNA与IL-6mRNA相对表达量。

[0013] 与现有技术相比,本发明的有益效果:

[0014] 本研究发现,SHR大鼠伴随炎症反应,促炎因子释放增加,同时构成T细胞间缝隙连接通道的Cx43表达显著上调,应用缝隙连接阻断剂阻断淋巴细胞间信息通讯后促炎因子的释放显著下降,提示缝隙连接参与高血压炎症反应。

具体实施方式

[0015] 下面结合具体实施方案对本发明的技术方案作进一步详细地说明。

[0016] 1材料与方法

[0017] 1.1材料

[0018] 1.1.1实验动物 于2015年4月—2016年4月,选取SHR和正常血压的WKY大鼠各20只,16~18周龄,雄性,体质量150~220g,均从北京维通利华实验动物有限责任公司购买(许可证编号SCXK京2007-0001),已达到清洁级标准,动物质量为一级标准。饲养环境要求:良好通风、空气过滤系统,环境安静,室温保持20 $^{\circ}$ C、湿度控制在45%左右,每日更换垫料和饮用水,自由摄取水和食物。

[0019] 1.1.2仪器及试剂 流式细胞仪(E6)购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,水浴锅(H216)购自上海博讯实业有限公司,低速大容量离心机(LC-4016)购自安徽中科中佳科学仪器有限公司,相差倒置显微镜(XD30)购自宁波舜宇有限责任公司,生物安全柜(BHC-1300 II A2)购自阿尔泰实验室设备(北京)有限公司,CO₂恒温培养箱(HF151)购自上海力申

科学仪器有限公司,凝胶成像仪(BioDoc Imaging)购自美国UVP公司,梯度PCR仪(TC-96/G/H(b)C)购自杭州博日科技有限公司,酶标仪、微量分光光度计(K5500)购自北京凯奥科技发展有限公司,荧光定量PCR仪(TIB-8000)购自泰普生物科技(中国)有限公司。

[0020] 别藻青蛋白(aIlophycocyanin,APC)标记小鼠抗大鼠CD₄抗体(B159112)、藻红蛋白(phycoerythrin,PE)标记小鼠抗大鼠CD_{8a}抗体(B166485)、PE标记IgG1、κIsotype CtrI同型对照(B179044)均购自BioLegend公司,小鼠来源抗大鼠Anti-Connexin 43(ab-79010)购自Abcam公司,山羊抗小鼠IgG/FITC标记二抗(ZF-0312)购自北京中杉金桥生物科技有限公司,大鼠IL-2(230240922)、IL-6(230641023)ELISA试剂盒均购自杭州联科生物有限责任公司,淋巴细胞分离液(LTS10770125)购自天津灏洋科技有限责任公司,RPMI 1640培养基(1279443)购自美国gibco公司,Concanavalin A(C-2010)购自美国Sigma公司,缝隙连接阻断剂Gap27(A1045)购自Apexbio公司,实时定量PCR(real-time quantitative PCR,qRT-PCR)试剂购自北京庄盟生物有限公司,TRIzol购自Life technologies公司,引物序列由生工生物工程股份有限公司设计合成。

[0021] 1.2方法

[0022] 1.2.1大鼠血压测定 应用BP-6无创血压监测仪测量大鼠尾动脉血压,避免大鼠躁动,于大鼠清醒安静状态下连续测量3次,每次间隔至少1min,取测量3次平均值即为大鼠收缩压。

[0023] 1.2.2样本采集 3%戊巴比妥钠麻醉大鼠,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管采集腹主动脉外周血5mI,1 500r/min离心5min,取血浆于-20℃保存,离心后的下层血细胞用于分离外周血淋巴细胞。

[0024] 1.2.3炎症因子IL-2和IL-6表达 取冻存于-20℃的血浆样品,ELISA法检测IL-2和IL-6表达水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。

[0025] 1.2.4淋巴细胞分离 将血细胞与0.9%氯化钠溶液1:1等体积稀释,吹打混匀。取无菌15mI离心管,加入淋巴细胞分离液,将细胞悬液缓慢按照1:1比例加到淋巴细胞分离液上层,保证血液置于淋巴细胞分离液上层。根据密度梯度离心法分离淋巴细胞,低速离心机水平离心30min(1 500r/min,缓升缓降)。将分离的白色浑浊淋巴细胞层吸出至无菌15mI离心管内,加入3倍0.9%氯化钠溶液洗涤,以1 800r/min离心6min。洗涤2次,弃上清,沉淀即淋巴细胞。加入1mI培养基重悬,吸取50μI到1.5mI离心管,加450μI磷酸盐缓冲液(PBS)稀释10倍,显微镜下计数并用台盼蓝染色观察细胞活性。细胞活性为95%以上,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mI,将细胞接种在24孔板中。

[0026] 1.2.5流式细胞术检测CD₄⁺和CD₈⁺T细胞Cx43表达收集 5×10^5 个细胞于EP管内,100μI PBS重悬细胞,分别加入相应流式抗体(CD₄-APC,APC同型对照;CD₈-PE,PE同型对照)1μI,并设立阴性对照。125μI固定剂固定淋巴细胞,4℃孵育20min,Cx43一抗1μI抗体与99μI 1×破膜剂破膜,37℃孵育20min;FITC二抗1μI,37℃孵育20min;1mI 1×破膜剂洗涤,弃上清液,PBS重悬细胞,流式细胞仪检测,流式CELLQuest软件进行分析。

[0027] 1.2.6实时荧光定量PCR检测IL-2mRNA和IL-6mRNA表达计数分离出的淋巴细胞,调整培养基至细胞浓度为 1×10^6 个/mI。将淋巴细胞分为空白对照组、刀豆蛋白(Concanavalin A,ConA)组(培养48h后加入5μg/mI ConA)和Gap27+ConA组(培养前加入500μmoI/L Gap275,培养48h后加入5μg/mI ConA)。加入10%自体血清(血清处理步骤:56℃

灭活30min,以4 000r/min离心30min,4℃保存),于37℃,5%CO₂培养箱中培养48h。

[0028] TRIzol法提取上述培养的淋巴细胞mRNA,核酸蛋白含量检测仪测定A₂₆₀/A₂₈₀值,1%甲醛变性凝胶电泳检测提取质量。选用GADPH作为内参基因,根据大鼠IL-2、IL-6基因cDNA序列,设定引物序列(见表1)。将提取的mRNA样品、随机引物、Rtmix、dNTP混合液、焦碳酸二乙酯(DEPC)水按照反转录体系配制反应体系,按照37℃反转录60min,90℃灭活反转录酶5min的反应程序进行反转录合成cDNA。将2×QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix,10×miScript Nucleics Mix通用引物,模板cDNA和RNase-Free water置于冰上,并轻轻混匀,配制反应体系,按照95℃预变性2min,1个循环;95℃变性5s,60℃退火加延伸10s,40个循环设置Bio-Rad荧光定量PCR仪,记录IL-2mRNA与IL-6mRNA相对表达量。

[0029] 表1实时荧光定量PCR引物序列

[0030]

基因	引物序列(5'-3')
GADPH	F:CTCTCTGCTCCTCCCTGTTC
	R:GCCAAATCCGTTACACCG
IL-2	F:ACGCTTGTCCTCGCTA

[0031]

IL-6	R:GCACCTGTAAGTCCAGCAAC
	F:TGGGACTGATGTTGTTGAC
	R:TGTGGGTGGTATCCTCTGT

[0032] 1.3统计学方法 采用SPSS 18.0软件进行统计学分析,计量资料以(x±s)表示,两组间比较方差齐性者采用两样本t检验,方差非齐性者采用近似t检验;多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用SNK-q检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

[0033] 2结果

[0034] 2.1SHR和WKY大鼠收缩压比较 SHR大鼠收缩压为(211±15)mm Hg(1mm Hg=0.133kPa),高于WKY大鼠的收缩压(122±5)mm Hg,差异有统计学意义(t=25.22,P<0.01)。

[0035] 2.2SHR和WKY大鼠炎症因子表达水平比较 SHR大鼠IL-2表达水平为(152.40±29.62)pg/mI,高于WKY大鼠的(73.41±20.16)pg/mI,差异有统计学意义(t=7.24,P<0.05);SHR大鼠IL-6表达水平为(29.74±1.90)pg/mI,高于WKY大鼠的(22.58±1.06)pg/mI,差异有统计学意义(t=14.72,P<0.05)。

[0036] 2.3SHR和WKY大鼠CD₄⁺和CD₈⁺T细胞C_x43表达 SHR大鼠CD₄⁺T细胞C_x43阳性表达率为(3.48±0.58)%,高于WKY大鼠的C_x43阳性表达率(1.36±0.18)%,差异有统计学意义(t=15.61,P<0.05)。SHR大鼠外周血CD₈⁺T淋巴细胞C_x43阳性表达率为(39.02±4.77)%,高于WKY大鼠的C_x43阳性表达率(27.48±1.90)%,差异有统计学意义(t=10.05,P<0.05)。

[0037] 2.4各组细胞IL-2mRNA、IL-6mRNA相对表达水平比较 5μg/mI ConA和500μmoI/L Gap27刺激淋巴细胞,qRT-PCR检测发现ConA活化组IL-2、IL-6表达均显著高于Gap27阻断后

再活化组 ($P < 0.01, n = 3$), 差异具有统计学意义 (见表2)。

[0038] 表2 SHR大鼠和WKY大鼠各组细胞IL-2mRNA、IL-6mRNA相对表达水平比较 ($x \pm s, n = 3$)

[0039]

组别	SHR 大鼠		WKY 大鼠	
	IL-2 mRNA	IL-6 mRNA	IL-2 mRNA	IL-6 mRNA

[0040]

空白对照组	2.40±0.08	2.31±0.01	1.07±0.21	1.09±0.04
ConA 组	6.21±0.46	2.81±0.08	3.55±0.38	1.35±0.24
Gap27+ConA 组	1.76±0.45	1.34±0.0.24	1.33±0.24	1.30±0.05
F 值	40.94	63.29	22.91	0.92
P 值	0.00	0.00	0.00	0.44

[0041] 以上所述, 仅为本发明较佳的具体实施方式, 本发明的保护范围不限于此, 任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内, 可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 石河子大学
- [0003] <120> 一种外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法
- [0004] <160> 6
- [0005] <170> PatentIn version 3.3
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 20
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列
- [0010] <400> 1
- [0011] ctctctgctc ctccctgttc 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 19
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列
- [0016] <400> 2
- [0017] gccaaatccg ttcacaccg 19
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 16
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <400> 3
- [0023] acgcttgctc tcgcta 16
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 20
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列
- [0028] <400> 4
- [0029] gcacctgtaa gtccagcaac 20
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 20
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列
- [0034] <400> 5
- [0035] ttgggactga tgttggtgac 20
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 19
- [0038] <212> DNA

-
- [0039] <213> 人工序列
[0040] <400> 6
[0041] tgtgggtggt atcctctgt 19

专利名称(译)	一种外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法		
公开(公告)号	CN106596916B	公开(公告)日	2018-04-20
申请号	CN201611167672.7	申请日	2016-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	石河子大学		
申请(专利权)人(译)	石河子大学		
当前申请(专利权)人(译)	石河子大学		
[标]发明人	马克涛 李新芝 司军强		
发明人	马克涛 李新芝 司军强		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/68 C12Q1/6883		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/53 G01N33/535 G01N33/68 G01N33/6869 G01N2800/321 G01N2800/7095		
代理人(译)	董芙蓉		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN106596916A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种外周血淋巴细胞连接蛋白43与IL-2和IL-6表达的相关性分析方法，该方法包括以下步骤：选取SHR和正常血压的WKY大鼠各20只。采集腹主动脉外周血离心，血浆用于ELISA法检测IL-2和IL-6表达水平；下层血细胞用于分离外周血淋巴细胞。收集5×10⁵个淋巴细胞，采用流式细胞仪检测CD4⁺和CD8⁺T细胞Cx43阳性表达率。将淋巴细胞分为空白对照组、刀豆蛋白组和Gap27+ConA组。提取淋巴细胞RNA，采用实时荧光定量PCR检测各组细胞IL-2mRNA与IL-6mRNA相对表达量。

基因

引物序列(5'-3')

GADPH

F:CTCTCTGCTCCTCCCTGTTC

R:GCCAATCCGTTACACCG

IL-2

F:ACGCTTGCTCCTGCTA