



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101914627 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 201010267606.3

(22) 申请日 2010.08.31

(71) 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街 59 号

(72) 发明人 姜毓君 吕学娜 王明娜 韩琳琳  
张光辉 满朝新 刘颖 曲行光

(74) 专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事务所 23109

代理人 金永焕

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12Q 1/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法

(57) 摘要

一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法,涉及一种评价免疫调节作用的方法。方法:一、将待评价的嗜酸乳杆菌培养到对数生长后期,制得菌悬液;二、将极化状态的人结肠腺癌细胞 Caco-2 与菌悬液共同孵育;三、采用 Trizol 法抽提孵育后的人结肠腺癌细胞 Caco-2 的总 RNA,再提取蛋白质;四、利用 Real Time RT-PCR 法和 Western blot 法对免疫调节相关基因的表达情况分别在总 RNA 和蛋白质水平进行检测和比对即可。本发明通过对免疫调节相关基因的检测,可以更加客观的评价嗜酸乳杆菌对宿主可能产生的不良炎症反应等,以排除其潜在的致病危险。

1. 一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法,其特征就在于评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法按以下步骤实现:一、将待评价的嗜酸乳杆菌培养到对数生长后期,离心后弃去上清,用冷的 PBS 洗 3 次,然后用 DMEM 细胞培养液重悬菌体,得菌浓度为  $3 \times 10^8$  cfu/ml 的菌悬液;二、将极化状态的人结肠腺癌细胞 Caco-2 用 PBS 洗 2 次,然后加入 1ml 的菌悬液作为实验组,加入 1ml 的 DMEM 细胞培养液作为空白对照组,在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱里共同孵育 2h;三、采用 Trizol 法抽提实验组和空白对照组孵育后的人结肠腺癌细胞 Caco-2 的总 RNA,再提取蛋白质;四、利用 Real Time RT-PCR 法和 Western blot 法对免疫调节相关基因的表达情况分别在总 RNA 和蛋白质水平进行检测,检测结果通过与表 1 和表 2 中各免疫调节相关基因的表达上调或表达下调情况及生物学功能进行比对,即可评价嗜酸乳杆菌是否具有免疫调节作用;

表 1

免疫调节相关基因的名称	序列号	基因变化
CCL2 (chemokine(C-C motif) ligand 2)	NM_002982	表达上调
IL1a (interleukin 1, alpha)	NM_000575	表达上调
LTB (lymphotoxin beta)	NM_002341	表达上调
PTX3 (pentraxin-related gene)	NM_002852	表达上调
IL1 $\beta$ (interleukin 1, beta)	NM_002184	表达上调
TNFRSF9 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9)	NM_001561	表达上调
CCL20 (chemokine (C-C motif) ligand 20)	NM_000576	表达上调
IL6ST (interleukin 6 signal transducer)	NM_004591	表达上调
IL8 (interleukin 8)	NM_000584	表达基本无变化
CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor4)	NM_003467	表达下调

表 2

免疫调节相关基因的名称	生物学功能
CCL2	CCL2 通过积聚 T 细胞和巨噬细胞促进自身免疫力的提高,并能调节趋化因子的产生,诱导 IL1 和 IL6 的产生
IL1a	IL1a 促进胸腺细胞、T 细胞的活化、增殖和分化,增加 NK 细胞的杀伤活性等,具有广泛的免疫调节作用

LTB	LTB 调节免疫应答, 并对某些肿瘤细胞有杀伤作用
PTX3	PTX3 可以结合多种可溶性受体配基参与机体免疫防御
IL1 $\beta$	IL1 $\beta$ 促进胸腺细胞、T 细胞的活化、增殖和分化, 增加 NK 细胞的杀伤活性等, 具有广泛的免疫调节作用
TNFRSF9	TNFRSF9 广泛分布于组织细胞和免疫细胞表面, 在维持免疫系统, 提高机体免疫方面发挥作用
CCL20	CCL20 可以趋化 T 细胞、单核细胞和树突状细胞
IL6ST	IL6ST 对多种细胞的生长和分化都有调节作用
IL8	IL8 属于炎症因子, 可以趋化和激活中性粒细胞、嗜碱性粒细胞, 趋化 T 细胞等
CXCR4	CXCR4 在肿瘤的发生及炎症反应等方面发挥作用

其中步骤四中评价嗜酸乳杆菌是否具有免疫调节作用的标准:若总 RNA 和蛋白质水平检测结果与表 1 中各免疫调节相关基因的表达上调或表达下调情况全部吻合,则待评价的嗜酸乳杆菌具有免疫调节作用;若总 RNA 和蛋白质检测结果与表 1 中免疫调节相关基因的表达上调或表达下调情况只有部分符合的话,则对不符合的基因参照表 2 中免疫调节相关基因的生物学功能来评价是否会产生不良的生物学效应,若不产生不良的生物学效应,则待评价的嗜酸乳杆菌仍具有免疫调节作用;若产生不良的生物学效应,则待评价的嗜酸乳杆菌不具有免疫调节作用。

2. 根据权利要求 1 所述的一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法,其特征在于离心是以 5000r/min 的转速离心 10min。

3. 根据权利要求 1 所述的一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法,其特征在于步骤二中极化状态的人结肠腺癌细胞 Caco-2 的培养过程:a、人结肠腺癌细胞 Caco-2 用细胞生长培养液培养,隔天换液,5 天传代;b、将生长状态良好的人结肠腺癌细胞 Caco-2 以  $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 的初始量接种于六孔细胞培养板上,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱下连续培养 15 天,即获得极化状态的人结肠腺癌细胞 Caco-2;其中步骤 a 中细胞生长培养液由 90ml 的 DMEM 细胞培养液、10ml 的胎牛血清、1g 的青霉素钠和 1g 的链霉素组成。

4. 根据权利要求 1 所述的一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法,其特征在于步骤三中采用 Trizol 法抽提实验组和空白对照组孵育后的人结肠腺癌细胞 Caco-2 的总 RNA 的过程:1、人结肠腺癌细胞 Caco-2 加 Trizol 后,室温放置 5min,使其充分裂解;2、以 12000r/min 离心 5min,弃沉淀;3、按 200 $\mu$ l 氯仿/ml Trizol 加入氯仿,振荡混匀后室温放置 15min;4、4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 15min;5、吸取上层水相,至另一离心管中,若同时提取 RNA 和蛋白质,则保留下层酚相存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱,若只提 RNA,则弃下层酚相;6、按 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀,室温放置 5-10min;7、4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 10min,弃上清, RNA 沉于管底;8、按 1ml 75%乙醇/ml Trizol 加入 75%乙醇,振荡离心管,悬浮沉淀;9、4 $^{\circ}$ C、8000r/min 离心 5min,弃上清;10、室温晾干或真空干燥 5-10min,即完成。

5. 根据权利要求 1 所述的一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法,其特征在于步骤三中提取蛋白质的过程:1、实验组和空白对照组的人结肠腺癌细胞 Caco-2 加入冰的 200ul 细胞裂解液冰上作用 30min,刮取细胞于离心管中;2、4℃、14000r/min 离心 15min 后,吸取上层澄清液,即为细胞蛋白质;3、紫外分光光度计测定实验组和空白对照组的总蛋白浓度,并调节浓度一致。

## 一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种评价免疫调节作用的方法。

### 背景技术

[0002] 益生乳酸菌是人及动物肠道中极为重要的生理菌群之一,与机体的多种生理功能有着密切的关系。因为具有诸多健康功效,其在食品和保健品中的应用日益剧增。应用含有益生菌的功能性食品来促进健康和预防疾病已经取得了很多成果,其中研究益生菌在免疫方面的作用报道较多。虽然大多数益生菌,尤其是乳杆菌“通常被认为是安全的”(generally regarded as safe, GRAS) 菌株,但是不能排除其可能存在的致病风险。

[0003] 肠道菌群在正常免疫反应中的重要作用说明改变和调节微生物群能够起到明显的免疫调节作用。并且研究已经证实益生菌可以调节机体的免疫反应,其中,嗜酸乳杆菌是益生菌中常见的一个种,广泛应用于食品工程技术和生产中。嗜酸乳杆菌能够调节宿主体液的、细胞的和非特异性的免疫反应并且可能对局部细胞因子分泌以及局部免疫反应有影响。然而,嗜酸乳杆菌引起的这些调节对宿主产生的长期的作用很难预测,仍然存在对免疫反应有不良影响的可能性。故对其免疫调节作用的评价不容忽视。

[0004] 目前,对嗜酸乳杆菌免疫调节作用的评价主要依据《保健食品功能学评价程序和检验方法》中所规定的脏器/体重比值;细胞免疫功能测定中的淋巴细胞转化实验、迟发型变态反应;体液免疫功能测定中的抗体生成细胞检测、血清溶血素测定;巨噬细胞功能测定和NK细胞活性测定。这些评价方法只是根据某一检测指标的阳性或阴性结果来判断是否具有免疫调节作用,对全面、有效、整体的评价免疫调节功能有一定的局限性;并且缺少与免疫调节功能紧密相关的细胞因子和趋化因子等的检测,无法检验其对宿主可能产生的不良的炎症反应。因此,尚需进一步探索和建立一种全面的、有效的、整体的评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明提供一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法。

[0006] 评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法按以下步骤实现:一、将待评价的嗜酸乳杆菌培养到对数生长后期,离心后弃去上清,用冷的PBS(磷酸盐缓冲液)洗3次,然后用DMEM细胞培养液重悬菌体,得菌浓度为 $3 \times 10^8$ cfu/ml的菌悬液;二、将极化状态的人结肠腺癌细胞Caco-2用PBS洗2次,然后加入1mL的菌悬液作为实验组,加入1ml的DMEM细胞培养液作为空白对照组,在37°C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱里共同孵育2h;三、采用Trizol法抽提实验组和空白对照组孵育后的人结肠腺癌细胞Caco-2的总RNA,再提取蛋白质;四、利用Real Time RT-PCR法和Western blot法对免疫调节相关基因的表达情况分别在总RNA和蛋白质水平进行检测,检测结果通过与表1和表2中各免疫调节相关基因的表达上调或表达下调情况及生物学功能进行比对,即可评价嗜酸乳杆菌是否具有免疫调节作用;

[0007] 表1

[0008]

免疫调节相关基因的名称	序列号	基因变化
CCL2 (chemokine(C-C motif)ligand 2)	NM_002982	表达上调
IL1a (interleukin 1, alpha)	NM_000575	表达上调
LTB (lymphotoxin beta)	NM_002341	表达上调
PTX3 (pentraxin-related gene)	NM_002852	表达上调
IL1 $\beta$ (interleukin 1, beta)	NM_002184	表达上调
TNFRSF9 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9)	NM_001561	表达上调
CCL20 (chemokine (C-C motif) ligand 20)	NM_000576	表达上调
IL6ST (interleukin 6 signal transducer)	NM_004591	表达上调
IL8 (interleukin 8)	NM_000584	表达基本无变化
CXCR4(chemokine(C-X-C motif)receptor4)	NM_003467	表达下调

[0009] 表 2

[0010]

免疫调节相关基因的名称	生物学功能
CCL2	CCL2 通过积聚 T 细胞和巨噬细胞促进自身免疫力的提高, 并能调节趋化因子的产生, 诱导 IL1 和 IL6 的产生
IL1a	IL1a 促进胸腺细胞、T 细胞的活化、增殖和分化, 增加 NK 细胞的杀伤活性等, 具有广泛的免疫调节作用
LTB	LTB 调节免疫应答, 并对某些肿瘤细胞有杀伤作用
PTX3	PTX3 可以结合多种可溶性受体配基参与机体免疫防御
IL1 $\beta$	IL1 $\beta$ 促进胸腺细胞、T 细胞的活化、增殖和分化, 增加 NK 细胞的杀伤活性等, 具有广泛的免疫调节作用
TNFRSF9	TNFRSF9 广泛分布于组织细胞和免疫细胞表面, 在维持免疫系统,

[0011]

	提高机体免疫方面发挥作用
CCL20	CCL20 可以趋化 T 细胞、单核细胞和树突状细胞
IL6ST	IL6ST 对多种细胞的生长和分化都有调节作用
IL8	IL8 属于炎症因子, 可以趋化和激活中性粒细胞、嗜碱性粒细胞, 趋化 T 细胞等
CXCR4	CXCR4 在肿瘤的发生及炎症反应等方面发挥作用

[0012] 其中步骤四中评价嗜酸乳杆菌是否具有免疫调节作用的标准:若总 RNA 和蛋白质水平检测结果与表 1 中各免疫调节相关基因的表达上调或表达下调情况全部吻合,则待评价的嗜酸乳杆菌具有免疫调节作用;若总 RNA 和蛋白质检测结果与表 1 中免疫调节相关基因的表达上调或表达下调情况只有部分符合的话,则对不符合的基因参照表 2 中免疫调节相关基因的生物功能来评价是否会产生不良的生物效应,若不产生不良的生物效应,则待评价的嗜酸乳杆菌仍具有免疫调节作用;若产生不良的生物效应,则待评价的嗜酸乳杆菌不具有免疫调节作用。

[0013] 本发明是一套全面的、有效的、整体的评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法,它克服了现有的嗜酸乳杆菌免疫调节功能评价的不足,在《保健食品功能学评价程序和检验方法》所规定的免疫评价检测指标的基础上,根据对嗜酸乳杆菌的研究结果,对免疫调节相关基因(主要是一些细胞因子和趋化因子)进行检测;本发明通过对免疫调节相关基因的 RNA 和蛋白质水平的检测,可以更加客观的评价嗜酸乳杆菌对宿主可能产生的不良炎症反应等,以排除其潜在的致病危险。

### 具体实施方式

[0014] 具体实施方式一:本实施方式评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法按以下步骤实现:一、将待评价的嗜酸乳杆菌培养到对数生长后期,离心后弃去上清,用冷的 PBS(磷酸盐缓冲液)洗 3 次,然后用 DMEM 细胞培养液重悬菌体,得菌浓度为  $3 \times 10^8$  cfu/ml 的菌悬液;二、将极化状态的人结肠腺癌细胞 Caco-2 用 PBS 洗 2 次,然后加入 1ml 的菌悬液作为实验组,加入 1ml 的 DMEM 细胞培养液作为空白对照组,在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱里共同孵育 2h;三、采用 Trizol 法抽提实验组和空白对照组孵育后的人结肠腺癌细胞 Caco-2 的总 RNA,再提取蛋白质;四、利用 Real Time RT-PCR 法和 Western blot 法对免疫调节相关基因的表达情况分别在总 RNA 和蛋白质水平进行检测,检测结果通过与表 1 和表 2 中各免疫调节相关基因的表达上调或表达下调情况及生物功能进行比对,评价嗜酸乳杆菌是否具有免疫调节作用;

[0015] 表 1

[0016]

免疫调节相关基因的名称	序列号	基因变化
CCL2 (chemokine(C-C motif)ligand 2)	NM_002982	表达上调
IL1a (interleukin 1, alpha)	NM_000575	表达上调
LTB (lymphotoxin beta)	NM_002341	表达上调
PTX3 (pentraxin-related gene)	NM_002852	表达上调
IL1 $\beta$ (interleukin 1, beta)	NM_002184	表达上调
TNFRSF9 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9)	NM_001561	表达上调
CCL20 (chemokine (C-C motif) ligand 20)	NM_000576	表达上调
IL6ST (interleukin 6 signal transducer)	NM_004591	表达上调
IL8 (interleukin 8)	NM_000584	表达基本无变化
CXCR4(chemokine(C-X-C motif)receptor4)	NM_003467	表达下调

[0017] 表 2

[0018]

免疫调节相关基因的名称	生物学功能
CCL2	CCL2 通过积聚 T 细胞和巨噬细胞促进自身免疫力的提高, 并能调节趋化因子的产生, 诱导 IL1 和 IL6 的产生
IL1a	IL1a 促进胸腺细胞、T 细胞的活化、增殖和分化, 增加 NK 细胞的杀伤活性等, 具有广泛的免疫调节作用
LTB	LTB 调节免疫应答, 并对某些肿瘤细胞有杀伤作用
PTX3	PTX3 可以结合多种可溶性受体配基参与机体免疫防御
IL1 $\beta$	IL1 $\beta$ 促进胸腺细胞、T 细胞的活化、增殖和分化, 增加 NK 细胞的杀伤活性等, 具有广泛的免疫调节作用
TNFRSF9	TNFRSF9 广泛分布于组织细胞和免疫细胞表面, 在维持免疫系统, 提高机体免疫方面发挥作用
CCL20	CCL20 可以趋化 T 细胞、单核细胞和树突状细胞
IL6ST	IL6ST 对多种细胞的生长和分化都有调节作用
IL8	IL8 属于炎症因子, 可以趋化和激活中性粒细胞、嗜碱性粒细胞, 趋化 T 细胞等

[0019]

CXCR4	CXCR4 在肿瘤的发生及炎症反应等方面发挥作用
-------	--------------------------

[0020] 其中步骤四中评价嗜酸乳杆菌是否具有免疫调节作用的标准:若总 RNA 和蛋白质水平检测结果与表 1 中各免疫调节相关基因的表达上调或表达下调情况全部吻合,则待评价的嗜酸乳杆菌具有免疫调节作用;若总 RNA 和蛋白质检测结果与表 1 中免疫调节相关基因的表达上调或表达下调情况只有部分符合的话,则对不符合的基因参照表 2 中免疫调节相关基因的生物功能来评价是否会产生不良的生物学效应,若不产生不良的生物学效应,则待评价的嗜酸乳杆菌仍具有免疫调节作用;若产生不良的生物学效应,则待评价的嗜酸乳杆菌不具有免疫调节作用。

[0021] 本实施方式中 DMEM 细胞培养液和 PBS 均为市售的常规试剂。

[0022] 本实施方式步骤四中利用 Real Time RT-PCR 法和 Western blot 法对免疫调节相关基因的表达情况分别在总 RNA 和蛋白质水平进行检测的过程:

[0023] 1、反转录反应体系及反转条件

[0024] 将待检测的总 RNA 样品进行反转录反应,反转录成 cDNA,利用 ExScript™RT-PCR 试剂盒(购买自 TakaRa 公司)中的反转录部分进行反转录反应,具体反转录体系中试剂的名称及用量如下:

[0025]

5×PrimerScript™ Buffer(5× 反应缓冲液)	2.0 μ L
PrimerScript™ RT Enzyme MixI(反转录酶)	0.5 μ L
Oligo dT Primer 50mmol/L(Oligo dT 引物)	0.5 μ L
Random 6mers 50mmol/L(随机引物)	0.5 μ L
Total RNA(总 RNA)	2.0 μ L
RNase Free dH2O(无 RNA 酶的蒸馏水)	加至 10.0 μ L

[0026] RT(反转录)反应条件:

[0027] 37°C 15min

[0028] 85°C 5s

[0029] 2、Real Time RT-PCR 法在总 RNA 水平检测免疫调节相关基因的表达情况

[0030] 针对待检测基因和内参 GAPDH,利用 Primer5.0 软件设计各基因特异性上下游引物;

[0031] 利用 ExScript™RT-PCR 试剂盒(进行检测,反应体系为 20ul,具体试剂名称及用量如下:

[0032]

2×Premix Ex Taq™	10.0 μL
上游引物 (10mmol/L)	0.4 μL
下游引物 (10mmol/L)	0.4 μL
SYBY Green I	2.0 μL
Rox II	0.4 μL
cDNA	2.0 μL
ddH2O	4.8 μL

- [0033] PCR 反应条件 : 预变性 95℃ 10s  
 [0034] 变性 95℃ 5s  
 [0035] 退火 60℃ 34s 40 次循环  
 [0036] 4℃ 保存

[0037] 3、利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法对 Real Time RT-PCR 的数据结果进行分析

[0038] 每种基因的 PCR 反应均进行扩增产物的融解曲线分析, 以确定扩增产物的特异性和纯度; 各基因表达比较均采用 GAPDH 作为内参基因; 实时荧光定量 PCR 最终分析的是阈值循环或 CT; 用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  将单个数据转化成线性形式来说明重复样本之间的变化和差异。

[0039] 实验数据均采用 SPSS13.0 软件进行 t 检验 (Student's t test) 及方差分析, 数据以平均数加减标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 的形式来表示;

[0040] 4、Western Blot 法在蛋白质水平检测免疫调节相关基因的表达情况

[0041] 样品在 12% SDS-PAGE 中电泳 1h, 转印于聚偏乙烯二氟膜上; 经封闭液封闭 2h 后, TBST (pH7.6) 洗涤 5 次, 分别于 1 : 1000 的一抗中孵育 1h; PBST 洗涤 5 次, 在 1 : 2000 的辣根过氧化物酶标记的二抗中孵育 1h; TBST 洗涤 5 次, 超敏发光液显光, 感光 X 光片后, 显影定影。

[0042] 体内实验:

[0043] 含嗜酸乳杆菌的脱脂乳悬液对小鼠进行灌胃

[0044] 1、实验动物的分组和饲养

[0045] 实验动物采用昆明属小鼠 (清洁级), 随机分为 2 组, 每组 10 只, 分别为空白对照组和实验组; 将培养到对数生长期的被评价的嗜酸乳杆菌用灭菌的脱脂乳进行悬浮, 使菌浓度为  $3 \times 10^8$  cfu/ml; 每日一次灌服给各实验组小鼠, 灌服 7 天, 其中空白对照组只灌服灭菌脱脂乳; 并于灌胃 7 天后处死小鼠;

[0046] 2、小鼠肠组织 RNA 和蛋白质的提取

[0047] 颈椎离断处死小鼠, 打开腹腔, 取回肠和空肠, 置于预冷的生理盐水溶液中, 冲洗干净肠内容物后, 置于液氮中保存;

[0048] RNA 的提取: 采用 Tizol RNA 提取方法抽提小鼠肠组织 RNA

[0049] (1) 液氮研磨, 组织块直接放入研钵中, 加入少量液氮, 待组织变软, 再加少量液

氮,再研磨,如此三次,每 50 ~ 100mg 组织加入 1ml Trizol ;

[0050] (2) 电动匀浆器充分匀浆 1 ~ 2min ;

[0051] (3) 按 200ul 氯仿 /ml Trizol 加入氯仿,振荡混匀后室温放置 15min ;

[0052] (4) 4℃、12000r/min 离心 15min ;

[0053] (5) 吸取上层水相,至另一离心管中,注 :千万不要吸取中间界面 ;若同时提取 RNA 和蛋白质,则保留下层酚相存于 4℃冰箱,若只提 RNA,则弃下层酚相 ;

[0054] (6) 按 0.5ml 异丙醇 /ml Trizol 加入异丙醇混匀,室温放置 5-10min ;

[0055] (7) 4℃、12000r/min 离心 10min,弃上清, RNA 沉于管底 ;

[0056] (8) 按 1ml 75%乙醇 /ml Trizol 加入 75%乙醇,温和振荡离心管,悬浮沉淀 ;

[0057] (9) 4℃、8000r/min 离心 5min,弃上清 ;

[0058] (10) 室温晾干或真空干燥 5-10min,即完成 ;注 :RNA 样品不要过于干燥,否则很难溶解 ;可用 50ul 水,TE buffer 或 0.5% SDS 溶解 RNA 样品,55-60℃,5-10min,再测 OD 值定量 RNA 浓度 ;其中水,TE 或 0.5% SDS 均须用 DEPC 处理并高压 ;

[0059] 蛋白质的提取 :

[0060] 称量小鼠结肠组织块直接放入研钵中,加入少量液氮研磨,待组织变软,再加少量液氮,再研磨,如此三次,按每份组织加 5 份裂解液 (m/V) 的比例加入细胞裂解液 (50mMTris.Cl pH 6.8、15mM NaCl、5mM EDTA、0.5% NP-40、1mM PMSF),于冰水中制备组织匀浆,在冰上孵育 10min 后,以 10000g,10min 离心,取上清即为蛋白质 ;紫外分光光度计测定实验组和空白对照组的总蛋白浓度,并调节浓度一致 ;

[0061] 3、Real Time RT-PCR 法在总 RNA 水平检测免疫调节相关基因的表达情况

[0062] 反转录反应体系及反转条件 ;将待检测的 RNA 样品进行反转录反应,反转录成 cDNA,利用 ExScript™RT-PCR 试剂盒中的反转录部分进行 RT 反应 ;

[0063] 利用 Real Time RT-PCR 法在总 RNA 水平对免疫调节相关基因进行检测 ;

[0064] 针对待检测基因和内参 GAPDH,利用 Primer5.0 软件设计各基因特异性上下游引物 ;利用 ExScript™RT-PCR 试剂盒 (TakaRa 公司) 进行检测 ;

[0065] 4、利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法对 Real Time RT-PCR 的数据结果进行分析

[0066] 每种基因的 PCR 反应均进行扩增产物的融解曲线分析,以确定扩增产物的特异性和纯度 ;各基因表达比较均采用 GAPDH 作为内参基因 ;实时荧光定量 PCR 最终分析的是阈值循环或 CT,用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  将单个数据转化成线性形式来说明重复样本之间的变化和差异更准确可靠 ;

[0067] 实验数据均采用 SPSS13.0 软件进行 t 检验 (Student' s t test) 及方差分析,数据以平均数加减标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 的形式来表示。

[0068] 5、Western Blot 法在蛋白质水平检测免疫调节相关基因的表达情况

[0069] 样品在 12% SDS-PAGE 中电泳 1h,转印于聚偏乙烯二氟膜上 ;经封闭液封闭 2h 后,TBST (pH7.6) 洗涤 5 次,分别于 1 : 1000 的一抗中孵育 1h ;PBST 洗涤 5 次,在 1 : 2000 的辣根过氧化物酶标记的二抗中孵育 1h ;TBST 洗涤 5 次,超敏发光液显光,感光 X 光片后,显影定影。

[0070] 检测结果通过与表 1 和表 2 中各免疫调节相关基因的表达上调或表达下调情况及生物学功能进行比对,即可评价嗜酸乳杆菌是否对机体具有免疫调节作用。

[0071] 具体实施方式二:本实施方式与具体实施方式一不同的是步骤一中离心是以 5000r/min 的转速离心 10min。其中步骤及参数与具体实施方式一相同。

[0072] 具体实施方式三:本实施方式与具体实施方式一不同的是步骤二中极化状态的人结肠腺癌细胞 Caco-2 的培养过程:a、人结肠腺癌细胞 Caco-2 用细胞生长培养液培养,隔天换液,5 天传代;b、将生长状态良好的人结肠腺癌细胞 Caco-2 以  $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 的初始量接种于六孔细胞培养板上,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱下连续培养 15 天,即获得极化状态的人结肠腺癌细胞 Caco-2;其中 a 中步骤细胞生长培养液由 90ml 的 DMEM 细胞培养液、10ml 的胎牛血清、1g 的青霉素钠和 1g 的链霉素组成。其中步骤及参数与具体实施方式一相同。

[0073] 本实施方式中极化状态的人结肠腺癌细胞 Caco-2 可以模拟人的小肠微绒毛环境。

[0074] 具体实施方式四:本实施方式与具体实施方式一不同的是步骤三中采用 Trizol 法抽提实验组和空白对照组孵育后的人结肠腺癌细胞 Caco-2 的总 RNA 的过程:1、人结肠腺癌细胞 Caco-2 加 Trizol 后,室温放置 5min,使其充分裂解;2、以 12000r/min 离心 5min,弃沉淀;3、按 200ul 氯仿/ml Trizol 加入氯仿,振荡混匀后室温放置 15min;4、4℃、12000r/min 离心 15min;5、吸取上层水相,至另一离心管中,若同时提取 RNA 和蛋白质,则保留下层酚相存于 4℃冰箱,若只提 RNA,则弃下层酚相;6、按 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀,室温放置 5-10min;7、4℃、12000r/min 离心 10min,弃上清, RNA 沉于管底;8、按 1ml 75%乙醇/ml Trizol 加入 75%乙醇,振荡离心管,悬浮沉淀;9、4℃、8000r/min 离心 5min,弃上清;10、室温晾干或真空干燥 5-10min,即完成。其中步骤及参数与具体实施方式一相同。

[0075] 本实施方式中步骤 1 中人结肠腺癌细胞 Caco-2 充分裂解后也可放入 -70℃ 长期保存。

[0076] 本实施方式中总 RNA 抽提后可用 50ul 水, TE buffer 或 0.5% SDS 溶解 RNA 样品, 55-60℃, 5-10min, 再测 OD 值定量总 RNA 浓度;其中水, TE 或 0.5% SDS 均须用 DEPC 处理并高压。

[0077] 具体实施方式五:本实施方式与具体实施方式一不同的是步骤三中提取蛋白质的过程:1、实验组和空白对照组的人结肠腺癌细胞 Caco-2 加入冰的 200ul 细胞裂解液 (50mM Tris.Cl pH 6.8、15mM NaCl、5mM EDTA、0.5% NP-40、1mM PMSF) 冰上作用 30min,刮取细胞于离心管中;2、4℃、14000r/min 离心 15min 后,吸取上层澄清液,即为细胞蛋白质;3、紫外分光光度计测定实验组和空白对照组的总蛋白浓度,并调节浓度一致。其中步骤及参数与具体实施方式一相同。

[0078] 本实施方式中调节实验组和空白对照组的蛋白质浓度一致即可,不需要具体的浓度值。

专利名称(译)	一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101914627A</a>	公开(公告)日	2010-12-15
申请号	CN201010267606.3	申请日	2010-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
[标]发明人	姜毓君 吕学娜 王明娜 韩琳琳 张光辉 满朝新 刘颖 曲行光		
发明人	姜毓君 吕学娜 王明娜 韩琳琳 张光辉 满朝新 刘颖 曲行光		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53		
代理人(译)	金永焕		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种评价嗜酸乳杆菌免疫调节作用的方法，涉及一种评价免疫调节作用的方法。方法：一、将待评价的嗜酸乳杆菌培养到对数生长后期，制得菌悬液；二、将极化状态的人结肠腺癌细胞Caco-2与菌悬液共同孵育；三、采用Trizol法抽提孵育后的人结肠腺癌细胞Caco-2的总RNA，再提取蛋白质；四、利用Real Time RT-PCR法和Western blot法对免疫调节相关基因的表达情况分别在总RNA和蛋白质水平进行检测和比对即可。本发明通过对免疫调节相关基因的检测，可以更加客观的评价嗜酸乳杆菌对宿主可能产生的不良炎症反应等，以排除其潜在的致病危险。

免疫调节相关基因的名称	序列号	基因变化
CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2)	NM_002982	表达上调
IL1a (interleukin 1, alpha)	NM_000575	表达上调
LTB (lymphotoxin beta)	NM_002341	表达上调
PTX3 (pentraxin-related gene)	NM_002852	表达上调
IL1β (interleukin 1, beta)	NM_002184	表达上调
TNFRSF9 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9)	NM_001561	表达上调
CCL20 (chemokine (C-C motif) ligand 20)	NM_000576	表达上调
IL6ST (interleukin 6 signal transducer)	NM_004591	表达上调
IL8 (interleukin 8)	NM_000584	表达基本无变化
CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4)	NM_003467	表达下调