

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C12P 19/34

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310109558.5

[43] 公开日 2005 年 6 月 22 日

[11] 公开号 CN 1629312A

[22] 申请日 2003. 12. 19

[21] 申请号 200310109558.5

[71] 申请人 上海体育学院

地址 200438 上海市清源环路 650 号

[72] 发明人 陈佩杰 董强刚 王 茹

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 7 页

[54] 发明名称 生理状态下外周血中穿孔素基因表达的荧光定量 PCR 检测

[57] 摘要

本发明提供了一种对外周血中与免疫相关的细胞因子进行定量检测的方法。该方法可以直接从 2ml 外周血中特异性地检出细胞因子 (PFR) 基因表达, 并且在检测前无需任何刺激, 可直接在生理状态下检测上述细胞因子基因的表达, 从而用于判定早期疲劳, 避免过度运动负荷训练所造成的机体免疫功能下降。 本发明还提供了相应的检测试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种检测细胞因子基因表达的试剂盒，其特征在于，它包括以下扩增和检测穿孔素的引物对和探针：

5 (a)具有SEQ ID NO:23和24所示序列的引物对；

(b)具有SEQ ID NO:25所示序列的Taqman探针。

2.如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，它还含有以下试剂：

(c)穿孔素的DNA标准品。

3.如权利要求2所述的试剂盒，其特征在于，所述的DNA标准品是用SEQ ID
10 NO:21和22所示序列的引物对得到的扩增产物。

4.如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，它还含有扩增和检测GAPDH的引物对和探针：

(d)具有SEQ ID NO:28和29所示序列的引物对；

(e)具有SEQ ID NO:30所示序列的Taqman探针；

15 (f)GAPDH的DNA标准品，所述DNA标准品是用SEQ ID NO:26和27所示序列的引物对得到的扩增产物。

5.如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，它还含有1-4套选自下组的引物对和探针：

(1) γ 干扰素的引物对和探针：

20 (a1)具有SEQ ID NO:3和4所示序列的引物对；

(b1)具有SEQ ID NO:5所示序列的Taqman探针；

(c1) γ 干扰素的DNA标准品，所述DNA标准品是用SEQ ID NO:1和2所示序列的引物对得到的扩增产物；

(2)白细胞介素4的引物对和探针：

25 (a2)具有SEQ ID NO:13和14所示序列的引物对；

(b2)具有SEQ ID NO:15所示序列的Taqman探针；

(c2) 白细胞介素4的DNA标准品，所述DNA标准品是用SEQ ID NO:11和12所示序列的引物对得到的扩增产物；

(3)白细胞介素10的引物对和探针：

30 (a3)具有SEQ ID NO:18和19所示序列的引物对；

(b3)具有SEQ ID NO:20所示序列的Taqman探针；

(c3)白细胞介素10的DNA标准品，所述DNA标准品是用SEQ ID NO:16和

17所示序列的引物对得到的扩增产物;

(4)白细胞介素2的引物对和探针:

(a4)具有SEQ ID NO:8和9所示序列的引物对;

(b4)具有SEQ ID NO:10所示序列的Taqman探针

5 (c4)白细胞介素2的DNA标准品, 所述DNA标准品是用SEQ ID NO:6和7所示序列的引物对得到的扩增产物。

6.一种检测白细胞中穿孔素的mRNA数量的方法, 其特征在于, 包括步骤:

(1)抽提白细胞的mRNA;

(2)对mRNA进行反转录, 获得反转录产物cDNA;

10 (3)以步骤(2)的反转录产物为模板, 用具有SEQ ID NO:23和24所示序列的引物对进行PCR扩增, 并且用具有SEQ ID NO:25所示序列的Taqman探针进行荧光定量检测, 从而测得荧光信号;

(4)根据测得的荧光信号确定白细胞中穿孔素的mRNA数量。

7. 如权利要求6所述的方法, 其特征在于, 步骤(4)中通过与标准曲线比较而得出
15 穿孔素的mRNA数量, 并且与管家基因的mRNA数量相比较, 计算出经校正后的穿孔素 mRNA相对数量。

8. 如权利要求6所述的方法, 其特征在于, 所述的白细胞是通过以下方法制备的:
从待测对象抽取1-3毫升血液, 溶解血液中红细胞, 然后离心获得白细胞沉淀;

步骤(3)的PCR扩增条件是50 °C预热 300 秒; 95 °C 变性300秒; 95 °C 20秒,
20 60 °C 60 秒, 40个循环。

9. 一种调控运动员训练运动量的方法, 其特征在于, 包括步骤:

(i)用权利要求 6 所述的方法测定运动员的白细胞中穿孔素 mRNA 数量, 计为
N₁;

(ii)按 2-10 天的时间间隔, 用权利要求 6 所述的方法测定运动员的白细胞中穿
25 孔素的 mRNA 数量, 依次计为 N₂....N_n, 其中 n 表示 2-10000 的正整数;

(iii)在满足以下条件下, 减少运动量或停止运动:

(a)N_n<N_{n-1}, 且

(b)N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于 5%,

其中 n 为 2-10000 的正整数, N_n 和 N_{n-1} 为第 n 次和第 n-1 次的测量值,

30 否则维持或加大运动量。

10. 如权利要求1所述试剂盒的用途, 其特征在于, 它用于测定运动员的白细胞
中穿孔素的mRNA数量, 从而作为调控运动量的指标。

生理状态下外周血中穿孔素基因表达的荧光定量 PCR 检测

5 技术领域

本发明涉及体育训练和运动医学领域。具体地说，本发明涉及对外周血中与免疫相关的细胞因子进行定量检测的方法。该方法可以直接从2 ml外周血中特异性地检出细胞因子(perforin，简称为PFR)基因表达，并且在检测前无需任何刺激，可直接在生理状态下检测上述细胞因子基因的表达，从而用于判定早期疲劳，避免过度运动负荷训练所造成的机体免疫功能下降。

背景技术

人类辅助性 T 细胞(Th)含有介导细胞免疫和体液免疫的两个亚群，即 Th1 与 Th2。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α ，调节细胞免疫功能；Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10，调节体液免疫功能。TH1 型细胞因子(INF- γ 、IL-2、TNF- β)介导迟发型过敏反应(DTH)、细胞毒 T 细胞(CTL)分化与激活等。TH2 型细胞因子(IL-4、IL-6、IL-10)促进 B 细胞分化与激活，介导体液免疫反应，是 IgG 和 IgE 类抗体生成的转换因子。

TH1 和 TH2 型细胞因子的平衡，是机体处于生理状态的保证。二者失衡，是感染、自身免疫病、变态反应、器官移植排斥反应、肿瘤的发生与恶化的重要促发因素。

近来，在运动医学界过度运动负荷训练后机体免疫功能下降、感染机会窗出现以及对病原体的抵抗力降低等理论上人们已达成共识。如果在机体免疫系统机能尚未完全恢复正常时又重复下一周期高强度的运动，则会加深对它的抑制。如此反复，则会深度抑制免疫机能。反之，短时间高强度运动则提高机体免疫机能，反复多次短时间高强度运动则诱导免疫系统机能的“超量恢复”。所以发现判定早期疲劳的免疫指标对合理的制定训练计划和运动处方是很有益的。

目前，对运动疲劳的判断主要从代谢角度入手，主要指标有：血乳酸浓度、血糖、血尿素氮等；至多再测试血中睾酮、皮质醇浓度，从主导合成代谢激素(睾酮)和分解代谢激素(皮质醇)的比值评判机体代谢状态、推断疲劳程度，但是这些指标出现异常与生理机能、运动能力的下降是同步的，缺乏前瞻性。总之，目前运动医学界尚缺乏判定早期疲劳的敏感指标。

此外，测定上述这些指标测定所需的血液样品数量较多，通常为 4-5ml。目前在检测细胞因子(如测量 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ 和 IL-12)时是通过刺激相应细胞并从蛋白水平观察细胞因子。但这种检测反映的是细胞对刺激的反应能力而不是其在体内的真实状况，所以要客观真实地反映体内细胞免疫机能，必须在无任何刺激状态下检测细胞因子的表达水平。但目前尚缺乏此类检测手段。

综上所述，目前缺乏对生理状态下免疫力水平的测定缺乏准确、有效的检测方法，导致在体育训练中无法有效避免过度运动负荷训练所造成的机体免疫功能下降。因此，本

领域迫切需要开发能准确、有效地判定早期疲劳，从而有效调控运动训练强度的方法。

发明内容

5 本发明的目的就是提供一种准确、有效地判定早期疲劳，从而有效调控运动训练强度的方法。

在本发明的第一方面，提供了一种检测细胞因子基因表达的试剂盒，它包括以下扩增和检测穿孔素的引物对和探针：

- (a)具有SEQ ID NO:23和24所示序列的引物对；
- 10 (b)具有SEQ ID NO:25所示序列的Taqman探针。

在另一优选例中，所述的试剂盒还含有以下试剂：

- (c)穿孔素的DNA标准品。

更佳地，所述的DNA标准品是用SEQ ID NO:21和22所示序列的引物对得到的扩增产物。

- 15 在另一优选例中，所述的试剂盒还含有扩增和检测GAPDH的引物对和探针：

- (d)具有SEQ ID NO:28和29所示序列的引物对；
- (e)具有SEQ ID NO:30所示序列的Taqman探针；
- (f)GAPDH的DNA标准品，所述DNA标准品是用SEQ ID NO:26和27所示序列的引物对得到的扩增产物。

- 20 在另一优选例中，所述的试剂盒还含有1-4套选自下组的引物对和探针：

- (1) γ 干扰素的引物对和探针：

- (a1)具有SEQ ID NO:3和4所示序列的引物对；
- (b1)具有SEQ ID NO:5所示序列的Taqman探针；
- (c1) γ 干扰素的DNA标准品，所述DNA标准品是用SEQ ID NO:1和2所示序列的引

- 25 物对得到的扩增产物；

- (2)白细胞介素4的引物对和探针：

- (a2)具有SEQ ID NO:13和14所示序列的引物对；
- (b2)具有SEQ ID NO:15所示序列的Taqman探针；
- (c2) 白细胞介素4的DNA标准品，所述DNA标准品是用SEQ ID NO:11和12所示

- 30 序列的引物对得到的扩增产物；

- (3)白细胞介素10的引物对和探针：

- (a3)具有SEQ ID NO:18和19所示序列的引物对；
- (b3)具有SEQ ID NO:20所示序列的Taqman探针；
- (c3)白细胞介素10的DNA标准品，所述DNA标准品是用SEQ ID NO:16和17所示

- 35 序列的引物对得到的扩增产物；

- (4)白细胞介素2的引物对和探针：

- (a4)具有SEQ ID NO:8和9所示序列的引物对；
- (b4)具有SEQ ID NO:10所示序列的Taqman探针

(c4)白细胞介素2的DNA标准品,所述DNA标准品是用SEQ ID NO:6和7所示序列的引物对得到的扩增产物。

更佳地,所述的试剂盒共含有5套引物和探针。

在本发明的第二方面,提供了一种检测白细胞中穿孔素的mRNA数量的方法,包括

5 步骤:

(1)抽提白细胞的mRNA;

(2)对mRNA进行反转录,获得反转录产物cDNA;

(3)以步骤(2)的反转录产物为模板,用具有SEQ ID NO:23和24所示序列的引物对进行PCR扩增,并且用具有SEQ ID NO:25所示序列的Taqman探针进行荧光定量检测,从而测

10 得荧光信号;

(4)根据测得的荧光信号确定白细胞中穿孔素的mRNA数量。

在另一优选例中,步骤(4)中通过与标准曲线比较而得出穿孔素的mRNA数量,并且与管家基因的mRNA数量相比较,计算出经校正后的穿孔素 mRNA相对数量。

在另一优选例中,所述的白细胞是通过以下方法制备的:从待测对象抽取1-3毫升血

15 液,溶解血液中红细胞,然后离心获得白细胞沉淀;并且

步骤(3)的PCR扩增条件是50 °C预热 300 秒;95 °C 变性300秒;95 °C 20秒,60 °C 60秒,40个循环。

在本发明的第三方面,提供了一种调控运动员训练运动量的方法,包括步骤:

(i)用本发明上述的方法测定运动员的白细胞中穿孔素 mRNA 数量,计为 N_1 ;

20 (ii)按 2-10 天的时间间隔,用本发明上述方法测定运动员的白细胞中穿孔素的 mRNA 数量,依次计为 $N_2, \dots, N_n$, 其中 n 表示 2-10000(更佳地 2-1000)的正整数;

(iii)在满足以下条件下,减少运动量或停止运动:

(a) $N_n < N_{n-1}$, 且

(b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于 5%,

25 其中 n 为 2-10000 的正整数, N_n 和 N_{n-1} 为第 n 次和第 $n-1$ 次的测量值,否则维持或加大运动量。

在另一优选例中,在步骤(iii)中所述的条件还包括:

(c)当 IL-4、IL-10、IFN- γ 和 IL-12 这 4 个细胞因子有至少一个满足免疫力下降指标;

(d)Th1/Th2比值T出现下降幅度为5-10%;或

30 (e)Th1/Th2 比值 T 的下降幅度为 10%-50%。

在本发明的第四方面,提供了本发明所述试剂盒的用途,它用于测定运动员的白细胞中穿孔素的mRNA数量,从而作为调控运动量的指标。

附图说明

35 图1显示了用本发明引物对扩增IFN- γ (A)、IL-2(B)、IL-4(C)、IL-10(D)和穿孔素(E)的检测结果。其中泳道1为各对应的细胞因子;泳道2为GAPDH;泳道3为分子量标准物(Marker)。

图2显示了对IFN- γ 进行荧光定量PCR检测的循环数-荧光值关系图(A)和对数浓度-循环数关系图(B)。

图3显示了对IL-2进行荧光定量PCR检测的循环数-荧光值关系图(A)和对数浓度-循环数关系图(B)。

5 图4显示了对IL-4进行荧光定量PCR检测的循环数-荧光值关系图(A)和对数浓度-循环数关系图(B)。

图5显示了对IL-10进行荧光定量PCR检测的循环数-荧光值关系图(A)和对数浓度-循环数关系图(B)。

10 图6显示了对穿孔素进行荧光定量PCR检测的循环数-荧光值关系图(A)和对数浓度-循环数关系图(B)。

图7显示了生理状态下和病例状态下细胞因子阳性率表达比较。

具体实施方式

15 本发明人通过广泛而深入的研究发现, 为了有效准确地判定早期疲劳, 可以采用改进的高度敏感和特异的荧光定量 PCR 技术, 通过直接检测外周血白细胞中细胞因子的自发性基因表达水平而实现。

众所周知, 免疫机能状态直接影响机体工作能力, 而免疫机能状态的维持有赖于 Th1 和 Th2 细胞机能的相互平衡, 通过观察它们各自特异的细胞因子 (IL-2, INF- γ , IL-4, IL-10) 可反映 Th1 细胞 (IL-2, INF- γ) 和 Th2 细胞 (IL-4, IL-10), 可能会比较客观地反映机体细胞免疫机能, 并且这种变化会先于其他生理学代谢学指标甚至常规免疫指标 (如淋巴细胞增殖机能) 的改变。所以检测细胞因子不仅是基础免疫研究的有效手段, 亦是临床上探索疾病发病机制、判断预后和考核疗效的指标, 更是评判早期运动疲劳的指标。而且免疫细胞之间存在错综复杂的调节关系, 细胞因子又是传递这种调节信号必不可少的信息分子。通过研究细胞因子的免疫网络调节, 可以更好地理解完整的免疫系统调节机制, 了解运动过程中机体生理机能状态, 并且在临床医学方面有助于指导细胞因子作为生物应答调节剂应用于临床治疗免疫性疾病。

25 白细胞介素 2 (interleukin 2, IL-2) 最初被认为是一种 T 细胞生长因子。分子量为 15.5KDa。IL-2 对 B 细胞的生长及分化均有一定的促进作用。另外, 单核-巨噬细胞受到 IL-2 的持续作用后, 其抗原递呈能力、杀菌力、细胞毒性均明显增强, 分泌某些细胞因子的能力也得到加强。IL-2 可以诱导 CTL、NK 和 LAK 等多种杀伤细胞的分化和效应功能, 并诱导杀伤细胞产生 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子。IL-2 还可增强 CTL 细胞穿孔素 (perforin) 基因的表达。

35 IL-4 是一种分子量为 18-20 KDa 的糖蛋白。在小鼠由 Th2 亚群产生。IL-4 可以促使抗原或丝裂原活化的 B 细胞分裂增殖, 但其作用远弱于 IL-2; IL-4 也是 CD4⁺T 细胞的自分泌性生长因子; 此外, IL-4 还能促进 Tc 细胞的活性。IL-4 不能刺激巨噬细胞增殖, 但可增强巨噬细胞的功能; 巨噬细胞受刺激后抗原和 Fc γ R 的表达量均明显增加; 同时巨噬细胞递呈抗原的能力及对肿瘤细胞的细胞毒素作用也显著增强。IL-4 与 IL-3 协同可维持和促进肥大细胞的增殖, 在某些起敏反应性疾病发生中具有一定的意义; 可与 CSF 协同作

用,促进骨髓造血前体细胞的增殖,诱导髓样细胞定向分化;诱导内皮细胞表达血管细胞粘附分子-1(VCAM-1),对淋巴细胞的迁移具有一定意义。

白细胞介素 10(IL-10)分子量为 35~40kD,通常为二聚体;主要由 TH2 细胞产生,也可由单核细胞、角质细胞及活化的 B 细胞产生。IL-10 能够抑制活化的 T 细胞产生细胞因子,因此曾称为细胞因子合成抑制因子(CSIF),特别是抑制 TH1 细胞产生 IL-2、IFN γ 和 LT 等细胞因子,从而抑制细胞免疫应答。IL-10 可降低单核-巨噬细胞表面 MHC 类分子的表达水平,损害了 APC 的抗原递呈能力,实际上这可能是其抑制细胞介导免疫的原因。此外,IL-10 还能抑制 NK 细胞活性,干扰 NK 细胞和巨噬细胞产生细胞因子;但可刺激 B 细胞分化增殖,促进抗体生成。

IFN- γ 是分子量为 20-25Kda 的糖蛋白。IFN- γ 可以诱导 MHC II 类抗原的表达,使其参与抗原提呈和特异性免疫的识别过程。IFN- γ 可上调内皮细胞 ICAM-1(CD54)表达,促进巨噬细胞 Fc γ R 表达,协同诱导 TNF 并促进巨噬细胞杀伤病原微生物,此外,还可协同 IL-2 诱导 LAK 活性,促进 T 细胞 IL-2R 表达;诱导急性期蛋白合成,诱导髓样细胞分化。IFN- γ 亦具有增强 NK 细胞活性等作用。

上述细胞因子(IL-2、INF- γ 、IL-4 和 IL-10)不仅在免疫系统中均发挥着重要的作用,而且通过观察他们的分泌量可以反映 TH1(IL-2 和 INF- γ)和 TH2 型细胞(IL-4 和 IL-10)的平衡,而 TH1 型细胞和 TH2 型细胞的平衡是机体处于生理状态的保证。近来的研究表明 TH2 型淋巴细胞上调的同时会抑制 TH1 型淋巴细胞的数量。TH1 型淋巴细胞和细胞免疫相关,所以细胞免疫的抑制将会促使机体对感染性疾病的易感性增加。目前,确定体液免疫(TH2)或细胞免疫(TH1)状态最准确的方法就是检测相应的细胞因子。运动医学界以前的研究表明运动后与 TH2 相关的细胞因子上调,特别是 IL-10 明显升高,这表明细胞免疫受到抑制。而以往的检测手段多使用流式细胞仪、ELISA 和 RT-PCR 半定量等,所以目前尚缺乏高度敏感性、高度特异性的早期诊断方法。

穿孔素(perforin, 简称为PFR)是一种蛋白毒素,存在于CTL和NK细胞的溶酶体内。成熟CTL识别抗原和MHC I 类分子复合物并被激活后,迅速向靶细胞贴近、两者细胞膜发生接触,CTL胞浆中的杀伤颗粒借助微管作用被集中在靠靶细胞的一侧,然后颗粒中的大分子内容物被释放至CTL和靶细胞的空隙中,其中的穿孔素在膜外钙离子的作用下,与靶细胞膜结合、聚合,最终在细胞膜上形成不同孔径(50~160 纳米)的跨膜孔道,从而导致靶细胞膜去极化,使细胞外水分进入胞内,一些电解质和大分子物质流出胞外,最终引起靶细胞渗透性坏死。所以PFR在保护机体抗胞内病原体如细菌、病毒、寄生虫感染、抗肿瘤和同种排斥应答中起重要作用,是免疫系统重要的效应分子。从理论上讲,当运动疲劳出现后,机体的免疫力下降,感染机会窗出现,所以机体对病毒的杀伤力也会不同程度的减弱。R.Staats等人的研究表明,训练有素的运动员外周血中PFR的百分比比较高,但是在耐力运动(过度疲劳)后PFR出现暂时性的下降。在R.Staats等人的研究中使用流式细胞仪,因此,不能用于早期精确地诊断机体免疫力的改变。

如本文所用,术语“Taqman 探针”是一种在其 5'端带有报告基团并且在 3'端带有猝灭基团的寡核苷酸,所述的猝灭基团会抑制报告基团产生可检测的信号(例如荧光)。Taqman 探针设计是现有技术,并且可以从公开途径获得有关信息(Heid CA, Stevens J,

Livak KJ, Williams PM; Real Time Quantitative PCR, *Genome Res.* 1996 Oct.; 6(10):986-94)。

在本发明的一个实例中, 根据Genbank数据库中公开发表的IL-2(v00564)、IL-4(M13982)、IL-10(M57627)、IFN- γ (X13274)、PFR (NM_005041)和GAPDH(M33197)基因序列, 采用美国赛百盛公司提供的引物设计软件, 分别设计和筛选出了5组引物(见表1), PCR扩增后获得了相应的条带。对扩增产物进行核苷酸序列测定, 证实扩增产物序列与文献报道完全一致, 说明上述引物对选定的基因具有高度特异性。

用表1中所示的特异性引物, 通过荧光实时PCR检测方法, 能对细胞因子(IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR)基因表达水平进行绝对定量分析。具体而言, 先采用引物1(序列见表1)进行PCR扩增得到双链DNA片段, 经纯化后作为定量PCR分析的标准品。以引物2及探针组合对此标准品进行定量PCR检测, 经过条件优化, 获得了线性结果。

实验证明, 采用该项技术对IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR基因表达进行检测, 标准曲线的相关系数(R)均大于0.99。上述试剂保存于-20℃在6个月内非常稳定, 不同实验间的误差小于5%。

对25例肺部疾病患者以及25例健康人进行定量PCR分析。结果显示25例健康人中IL-2、IFN- γ 、IL-4、PFR和IL-10基因表达阳性率分别为100%、92%、88%、80%和12%。25例病人中均可检测到IFN- γ 、IL-2基因和PFR基因表达, 阳性率为100%; IL-4和IL-10表达阳性率分别为96%和72%; 实验结果证明应用本方法能够高灵敏度地直接检测出外周血白细胞中细胞因子基因的自发性表达, 并且在生理和病理状态下上述因子的基因表达有明显差异。

本发明在生理状态下的荧光定量PCR检测技术在运动医学上广泛的应用价值。可以比较运动前后PFR数量的改变从而对运动员的免疫机能状态进行评估, 调控运动员训练量。通过检测一定间隔(如2-14天, 较佳地3-10天, 更佳地5-7天)内运动员体内PFR数量的变化, 可以及时反映出运动员免疫机能的变化, 从而作为科学调控运动量的指标之一。

一种优选的训练方法是通过维持一定百分比的最大摄氧量来进行一定运动量的训练, 并通过监测PFR等细胞因子的变化水平来调控训练量。

人体需氧量取决于生理机能状态, 运动强度增大时, 需氧量相应改变。例如, 安静每分钟需氧量为200-300ml, 剧烈运动是每分钟需氧量可增加200倍以上。人的摄氧能力有一定局限性, 但需氧量却随运动强度的加大而上升。当人体进行长时间的剧烈运动时, 每分钟摄氧量达到最高水平, 称为最大摄氧量。这是反映心肺功能的重要指标, 也是有氧工作能力的重要指标。最大摄氧量的测定有许多方法, 比如试验方法: 受试者戴好呼吸口罩, 使呼出气体与气体分析仪相连。然后在功率跑台或功率自行车上进行递增负荷运动, 分析仪每分钟自动记录心率、通气量和吸氧量。此时, 吸氧量随负荷的递增而递增。当心率达到180次/分以上, 呼吸商超过1, 吸氧量不再升高(或比两次测量数值相差少于2毫升/分), 或者受试者极度疲劳不能再继续运动下去, 这时的吸氧量即最大吸氧量。得到最大吸氧量后, 可计算出60%的最大摄氧量, 然后可从气体分析仪上得到60%最大摄氧量对应的心率, 运动过程中通过控制心率而控制60%最大摄氧量的运动强度。

例如, 当间隔时间为7天时(当然, 每个间隔可以相同也可以不相同), 第一周以一定强度进行运动, 本周最后一次运动结束即刻抽血, 然后进行定量PCR测得的结果为N1;

接着第二周的运动负荷加大,仍连续运一周,再次进行PFR的定量PCR检测,其结果为N2,如果N2小于N1,且相对下降幅度大于一定数值(如大于5%,较佳地大于10%),则说明运动负荷过大,运动员免疫机能下降,应该减少运动量;否则说明运动员免疫机能没有下降,可以维持运动量或加大运动量。

5 第3周,比较第3周的PFR数量与第二周的PFR数量,如果N3小于N2,且相对下降幅度大于一定数值(如大于5%,较佳地大于10%),则说明运动负荷过大,运动员免疫机能下降,应该减少运动量;否则说明运动员免疫机能没有下降,可以维持运动量或加大运动量。

10 第4周至第n周,如果 N_n 小于 N_{n-1} ,且相对下降幅度大于一定数值(如大于5%,较佳地大于10%),则说明运动负荷过大,运动员免疫机能下降,应该减少运动量;否则说明运动员免疫机能没有下降,可以维持运动量或加大运动量。

综上所述,对于穿孔素,通常其表达量多少与细胞免疫状况成正相关。因此,可以在满足以下条件下,减少运动量或停止运动:

$$(a)N_n < N_{n-1}$$

15 (b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于5%(较佳地大于10%),其中

$$\text{相对变化}V_{\text{穿孔素}} = \frac{|N_n - N_{n-1}|}{N_{n-1}} \times 100\%$$

n为2-10000的正整数, N_n 和 N_{n-1} 为第n次和第n-1次的测量值。

此外,在以PFR数据为主的情况下,还可以参考一个或多个其他免疫相关的细胞因子的数量。

20 例如,对于IFN- γ ,通常其表达量多少与细胞免疫状况成正相关。因此,可以在满足以下条件下,减少运动量或停止运动:

$$(a)N_n < N_{n-1}$$

(b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于5%(较佳地大于10%),其中

$$\text{相对变化}V_{\text{IFN-}\gamma} = \frac{|N_n - N_{n-1}|}{N_{n-1}} \times 100\%$$

25 n为2-10000的正整数, N_n 和 N_{n-1} 为第n次和第n-1次的测量值。

对于IL-2,可以在满足以下条件下,减少运动量或停止运动:

$$(a)N_n < N_{n-1}$$

(b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于5%(较佳地大于10%),其中

$$\text{相对变化}V_{\text{IL-2}} = \frac{|N_n - N_{n-1}|}{N_{n-1}} \times 100\%$$

30 n为2-10000的正整数, N_n 和 N_{n-1} 为第n次和第n-1次的测量值。

对于IL-4,通常其表达量多少与细胞免疫状况成反相关。因此,可以在满足以下条件下,减少运动量或停止运动:

$$(a)N_n > N_{n-1}$$

(b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于 5%(较佳地大于 10%), 其中

$$\text{相对变化 } V_{IL-4} = \frac{|N_n - N_{n-1}|}{N_{n-1}} \times 100\%$$

n 为 2-10000 的正整数, N_n 和 N_{n-1} 为第 n 次和第 $n-1$ 次的测量值。

对于 IL-10, 通常其表达量多少与细胞免疫状况成反相关。因此, 可以在满足以下条件下, 减少运动量或停止运动:

(a) $N_n > N_{n-1}$

(b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于 5%(较佳地大于 10%), 其中

$$\text{相对变化 } V_{IL-10} = \frac{|N_n - N_{n-1}|}{N_{n-1}} \times 100\%$$

n 为 2-10000 的正整数, N_n 和 N_{n-1} 为第 n 次和第 $n-1$ 次的测量值。

此外, 还可以同时参考 Th1/Th2 比值 T 。该比值 T 可用下式计算:

$$T = (N_{IFN-\gamma} + N_{IL-2}) / (N_{IL-4} + N_{IL-10}) \quad (I-1)$$

由于, IL-2 的表达量远高于其他因子, 通常其拷贝数高于其他因子 10-50 倍, 因此, 为了更准确地计算 T 值, 也可用下式计算:

$$T = (N_{IFN-\gamma} + N_{IL-2}/20) / (N_{IL-4} + N_{IL-10}) \quad (I-2)$$

例如, 对于第 n 周, 可以在满足以下条件下, 减少运动量或停止运动:

(a) $T_n < T_{n-1}$

(b) T_n 与 T_{n-1} 的相对变化幅度大于 5%(较佳地大于 10%), 其中

$$T \text{ 值相对变化 } V_{T \text{ 值}} = \frac{|T_n - T_{n-1}|}{T_{n-1}} \times 100\%$$

此外, 本发明在生理状态下的荧光定量 PCR 检测技术还可用于多种疾病如感染、过敏、某些炎症、某些自身免疫病的诊断或辅助诊断, 用于预后和疗效判定以及对某些免疫调节性治疗进行指导。

本发明的主要优点在于:

(1) 检测灵敏度高, 可以直接从 2 ml 外周血中特异性地检出细胞因子 (PFR) 基因表达, 比现有的 RT-PCR 方法提高了 100 倍。

(2) 在检测前无需任何刺激, 可直接在生理状态下检测上述细胞因子基因的表达。

(3) 快速, 可以在数小时内获得检测结果。

(4) 引物设计极其合理, 反应条件均一性好。

下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

实施例1：引物设计及定量PCR产物检测方法

1.1 材料

淋巴细胞来自健康人体。胎牛血清及DMEM培养液均为GIBCO公司产品。经典法RNA抽提试剂盒由上海申能博采生物科技有限公司提供。RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒购自立陶宛 MBI Fermentas公司。各PCR引物及荧光素标记探针由上海申友生物技术有限责任公司合成。10 mM dNTP、Pfu高保真DNA聚合酶(5 Unit/μl)购自上海申能博采公司。PCR产物测序由上海申友公司完成。

1.2 方法

根据Genbank数据库中公开发表的IL-2(v00564)、IL-4(M13982)、IL-10(M57627)、IFN-γ(X13274)、PFR(NM_005041)和GAPDH(M33197)基因序列,采用美国赛百盛公司提供的引物设计软件,分别设计了6组引物(表1)。由上海申友公司合成各引物及荧光素标记探针。

表1

基因	引物	SEQ ID NO:	核苷酸位置	序列(5' - 3')	Tm (°C)	产物(bp)
IFN-γ	上游1	1	35-54	agt cct ttg gac ctg atc ag	58.24	294
	下游1	2	307-328	aga caa ttt ggc tct gca tta t	57.91	
	上游2	3	139-158	cag ctc tgc atc gtt ttg gg	62.1	109
	下游2	4	234-257	gtt cca tta tcc gct aca tct gaa	61.5	
	探针	5	FAM-tct tgg ctg tta ctg cca gga ccc a-TAMRA		71.64	
IL-2	上游1	6	30-49	acc tca act cct gcc aca at	59.58	341
	下游1	7	351-370	ttg ctg att aag tcc ctg gg	60.07	
	上游2	8	147-168	ctg gag cat tta ctg ctg gat t	60.63	110
	下游2	9	236-256	gcc ttc ttg ggc atg taa aac	60.84	
	探针	10	FAM-aaa tgt gag cat cct ggt gag ttt ggg-TAMRA		70.68	
IL-4	上游1	11	84-102	gct tcc ccc tct gtt ctt c	58.8	371
	下游1	12	436-454	tct ggt tgg ctt cct tca c	58.79	
	上游2	13	207-227	cac cga gtt gac cgt aac aga	61.13	111
	下游2	14	295-317	ttc tca tgg tgg ctg tag aac tg	61.58	
	探针	15	FAM-agg aca gtc gca gcc ctg cag a-TAMRA		72.03	
IL-10	上游1	16	324-344	tga gaa cca aga ccc aga cat	59.56	350
	下游1	17	654-674	caa taa ggt ttc tca agg ggc	59.95	
	上游2	18	371-391	aga acc tga aga ccc tca ggc	62.06	78
	下游2	19	430-448	cct cgg cct tgc tct tgt t	62.78	
	探针	20	FAM-agg cta cgg cgc tgt cat cga ttt ct-TAMRA		72.18	
PFR	上游1	21	330-350	agt cag ctc cac tga agc tgt	59.27	341
	下游1	22	652-670	tga agt ggg tgc cgt agt t	59.15	
	上游2	23	418-438	acc agc aat gtg cat gtg tct	61.6	100
	下游2	24	530-550	cca cat gga aac tgt aga agc	61.97	
	探针	25	FAM-tgg ccg gct cac act cac agg-TAMRA		71.32	
GAPDH	上游1	26	44-63	cac atc gct cag aca cca tg	61.35	468
	下游1	27	491-511	agg cat tgc tga tga tct tga	60.76	
	上游2	28	65-84	gga agg tga agg tgc gag tc	61.03	219
	下游2	29	243-262	gaa gat ggt gat ggg att tc	56.78	
	探针	30	FAM-caa gct tcc cgt tct cag cc-TAMRA		64.51	

其中, 各探针在两端分别具有报告基团6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein, 6-FAM)(位于5'端), 和猝灭基团6-羧基-四甲基罗丹明(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine, TAMRA)(位于3'端)。

5 抽提RNA

应用Ficoll密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 加入1000U/ml IL-2培养1周, 选择活跃增殖期细胞, 按试剂盒要求抽提总RNA, 采用紫外分光光度计(Biophotometer, 德国Eppendorf 公司)测定A260及A280。

10 标准品制备

取2 µg RNA按试剂盒要求合成cDNA, 反应体积为20 µl。

PCR反应混合液为: 2 µl cDNA, 上游及下游引物1(50 µM)各1 µl, dNTP 1 µl, Pfu酶1 µl, buffer 5 µl, 加DEPC-H₂O 至50 µl, 石蜡油30 µl覆盖。

IL-2、IL-4、IL-10和PFR的PCR反应条件为: 95 °C变性 5 min; 95 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 40个循环; 72 °C延伸10 min。

IFN-γ 的PCR反应条件为: 95 °C变性 5 min; 95 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 40个循环; 72 °C延伸10 min。

分别把IL-2、IL-4、IL-10、IFN-γ 和PFR 的PCR产物经1.6% 琼脂糖电泳100 V 30 min, 然后, 使用数码凝胶图像分析系统(Tanon, GIS-120D)摄片。

20 扩增产物经PCR产物纯化试剂盒纯化后采用紫外分光光度计测定双链DNA含量, 纯化产物中的基因拷贝数按下述公式计算:

$$\text{基因拷贝数} / \mu\text{l} = [\text{A260} / 13.2 \times \text{片断长度 (kb)}] \times 6.02 \times 10^{11}$$

定量PCR检测

25 定量PCR反应母液为: 10 x PCR反应缓冲液2.5 µl, 25 mM MgCl₂ 1.5 µl, 100 µM 上游及下游引物2各0.1 µl, 50 µM 荧光素标记探针0.1 µl, 10 mM dNTP 0.5 µl, 0.5 µl Taq酶(5 units/µl), DEPC-H₂O 17.7 µl。上述反应母液保存于-20 °C。

定量PCR反应液: 23 µl反应母液中加入2 µl DNA标准品。

30 定量PCR反应条件: 50 °C预热 300 秒; 95 °C 变性300秒; 95 °C 20秒, 60 °C 60 秒, 40个循环, 60 °C检测; 37 °C 30 秒。

定量PCR仪为Rotor-Gene RG 3000型(澳大利亚Corbett公司)或LightCycler(瑞士Roche公司)。

1.3 结果

35 A、根据Genbank数据库中公开发表的基因序列以及设计的5组引物(IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-10、和PFR), 经PCR扩增后分别获得了相应的单一条带, 其结果分别如图1A-E所示。测序后证明其序列与预期相同。

B、IL-2、IL-4、IL-10、IFN-γ 和PFR的PCR扩增产物经纯化后作为定量PCR分析的标

准品,以引物2及探针组合进行定量PCR检测,获得了线性结果。IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10、和PFR的结果分别如图2-6所示,包括循环数-荧光值关系图(A)和对数浓度-循环数关系图(B)。

标准曲线分析结果表明,在基因拷贝数为 10^5 - 10^8 范围内,应用本方法能够给出线性结果,其标准曲线的相关系数R均 >0.99 ,扩增效率在 $0.68 - 1.00$ 之间。

此外,用于定量PCR的定量PCR反应母液,在保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,在6个月内非常稳定,不同实验间误差 $\leq 5\%$ 。将含250微升定量PCR反应母液的容器置于盒中,就构成了检测试剂盒。

10 实施例2: 生理状态下健康人外周血白细胞中IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR基因的表达

2.1 材料

25名健康志愿者来自上海市体育学院2003级入学新生。TriBlue RNA抽提试剂盒及糖原购自上海申能博采生物科技有限公司。RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒购自立陶宛
15 MBI Fermentas公司。Taq DNA聚合酶购自上海申友公司。

2.2 方法

抽提RNA及反转录成cDNA

取2ml肝素抗凝全血,溶解全血中的红细胞,制备成白细胞沉淀保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。按试剂盒
20 要求抽提抽提RNA。

取 $2\text{ }\mu\text{g}$ RNA 按试剂盒要求合成cDNA,反应体积为 $20\text{ }\mu\text{l}$ 。

定量PCR检测

定量PCR反应母液为: $10\times$ PCR反应缓冲液 $2.5\text{ }\mu\text{l}$, 25 mM MgCl_2 $1.5\text{ }\mu\text{l}$, $100\text{ }\mu\text{M}$
25 上游及下游引物2(表1)各 $0.1\text{ }\mu\text{l}$, $50\text{ }\mu\text{M}$ 荧光素标记探针 $0.1\text{ }\mu\text{l}$, 10 mM dNTP $0.5\text{ }\mu\text{l}$, $0.5\text{ }\mu\text{l}$ Taq酶($5\text{ units}/\mu\text{l}$), DEPC- H_2O $17.7\text{ }\mu\text{l}$ 。上述反应母液保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

定量PCR反应液: $23\text{ }\mu\text{l}$ 反应母液中加入 $2\text{ }\mu\text{l}$ cDNA。

定量PCR反应条件: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热 300 秒 ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 300 秒 ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 秒 , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 秒 , 40
个循环, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 检测; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 秒 。

30 定量PCR仪为Rotor-Gene RG 3000型(澳大利亚Corbett公司)或LightCycler(瑞士Roche公司)。按顺序对IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR进行定量PCR。

2.3 结果

35 A、25名健康人生理状态下外周血白细胞中IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR基因的表达状况见下表2:

表2

健康人外周血白细胞中细胞因子的基因表达($\times 10^3$ 拷贝/反应)								
编号	性别	年龄	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	穿孔素	GAPDH
101	男	19	1.48	30.73	0.98	0.25	0.95	2129
102	女	20	1.79	110.80	1.21	0.20	1.46	18450
103	男	19	1.57	89.12	-	-	0.56	1636
104	男	20	0.97	212.90	0.73	-	1.96	2904
106	男	17	1.77	479.20	1.47	0.15	1.28	39610
107	男	19	0.58	37.03	-	-	0.94	8070
108	女	18	1.81	785.95	1.469	0.05	0.87	11890
109	男	21	1.85	19.62	1.58	-	0.0003	831.3
111	男	20	1.39	505.30	1.78	-	1.66	228000
112	男	20	1.69	45.04	1.17	-	1.00	2991
113	女	19	1.73	143.90	1.14	-	2.03	12470
115	男	19	0.63	1.73	2.29	-	1.03	595.8
116	男	19	0.07	12.14	0.13	0.05	1.01	2890
118	女	20	1.74	20.49	0.89	-	0.29	1003
119	男	18	1.77	1.42	1.35	-	0.31	1851
120	男	21	-	35.61	6.72	-	1.80	21840
241	男	21	2.18	6.28	1.23	-	0.28	5482
242	男	19	0.74	17.53	1.29	-	1.62	16450
244	男	19	1.42	2.55	1.39	-	0.19	464.8
245	女	19	1.51	26.54	1.55	-	-	3641
246	男	18	0.21	13.42	1.91	-	0.28	2434
250	男	20	0.92	0.19	-	-	0.001	306.1
248	男	20	0.93	0.15	2.58	-	-	245.7
251	男	19	0.53	11.30	0.86	-	1.14	6514
252	男	21	-	1.39	1.36	-	-	121700

-:表示未能检测到基因表达。

B、结果分析

- 5 若以内参照基因GAPDH拷贝数作为基准, 25名健康人外周血白细胞中IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR基因的表达状况 [即: 靶基因拷贝数 / 10^3 GAPDH拷贝数] 见表3。

表3

基因表达(拷贝数 / 10 ³ GAPDH拷贝)							
编号	性别	年龄	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	穿孔素
101	男	19	0.70	14.43	0.46	0.12	0.45
102	女	20	0.10	6.01	0.07	0.01	0.08
103	男	19	0.96	54.47	0.00	0.00	0.34
104	男	20	0.33	73.31	0.25	0.00	0.67
106	男	17	0.04	12.10	0.04	0.00	0.03
107	男	19	0.07	4.59	0.00	0.00	0.12
108	女	18	0.15	66.10	0.12	0.00	0.07
109	男	21	2.22	23.60	1.91	0.00	0.00
111	男	20	0.01	2.22	0.01	0.00	0.01
112	男	20	0.57	15.06	0.39	0.00	0.34
113	女	19	0.14	11.54	0.09	0.00	0.16
115	男	19	1.05	2.90	3.85	0.00	1.74
116	男	19	0.03	4.20	0.05	0.02	0.35
118	女	20	1.73	20.43	0.89	0.00	0.29
119	男	18	0.96	0.77	0.73	0.00	0.17
120	男	21	0.00	1.63	0.31	0.00	0.08
241	男	21	0.40	1.15	0.22	0.00	0.05
242	男	19	0.04	1.07	0.08	0.00	0.10
244	男	19	3.05	5.48	2.99	0.00	0.40
245	女	19	0.42	7.29	0.42	0.00	0.00
246	男	18	0.09	5.51	0.79	0.00	0.11
250	男	20	3.02	0.62	0.00	0.00	0.00
248	男	20	3.76	0.63	10.52	0.00	0.00
251	男	19	0.08	1.74	0.13	0.00	0.17
252	男	21	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00
范围			0.00~3.76	0.01~73.31	0.00~10.52	0.00~0.12	0.00~1.74
中位值			0.33	5.48	0.22	0.00	0.11
阳性率			92%	100%	88%	12%	80%
阳性标本 均数±			0.87	13.47	1.11	0.05	0.29
标准差			1.12	20.49	2.33	0.06	0.38

实施例3: 肺部疾病患者外周血白细胞中IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR基因的表达

5 3.1 材料

25名肺部疾病患者来自上海市肺科医院住院病人。TriBlue RNA抽提试剂盒及糖原购自上海申能博采生物科技有限公司。RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒购自立陶宛 MBI Fermentas公司。Taq DNA聚合酶购自上海申友公司。

10 3.2 方法(与实施例2方法相同)

抽提RNA及反转录成cDNA

取2ml肝素抗凝全血, 溶解全血中的红细胞, 制备成白细胞沉淀保存于-20℃。按试

试剂盒要求抽提抽提RNA。然后取2 μg RNA 按试剂盒要求合成cDNA, 反应体积为20 μl 。

定量PCR

定量PCR反应母液为: 10 x PCR反应缓冲液2.5 μl , 25 mM MgCl_2 1.5 μl , 100 μM 上游及下游引物2各0.1 μl , 50 μM 荧光素标记探针0.1 μl , 10 mM dNTP 0.5 μl , 0.5 μl Taq 酶(5 units/ μl), DEPC- H_2O 17.7 μl 。上述反应母液保存于-20 $^\circ\text{C}$ 。

定量PCR反应液: 23 μl 反应母液中加入2 μl cDNA。

定量PCR反应条件: 50 $^\circ\text{C}$ 预热 300 秒; 95 $^\circ\text{C}$ 变性300秒; 95 $^\circ\text{C}$ 20秒, 60 $^\circ\text{C}$ 60 秒, 40 个循环, 60 $^\circ\text{C}$ 检测; 37 $^\circ\text{C}$ 30 秒。

定量PCR仪为Rotor-Gene RG 3000型(澳大利亚Corbett公司)或LightCycler(瑞士Roche公司)。按顺序对IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR进行定量PCR。

3.3 结果

A、25名肺部疾病患者外周血白细胞中IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR基因的表达状况见下表4:

表4

肺部疾病患者外周血白细胞中基因的表达($\times 10^3$ 拷贝/反应)								
住院号	性别	年龄	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	穿孔素	GAPDH
1	男	49	0.80	5.03	1.02	-	1.47	347.6
2	女	36	2.72	43.44	1.5	0.08	57.41	2020
3	男	57	37.56	1053	0.67	56.24	193.6	38440
4	男	67	2.87	350	0.70	7.86	92.50	20910
5	男	48	1.28	0.86	0.12	-	1.30	154.7
6	男	71	32.42	710.5	2.05	30.63	136.5	16230
7	男	50	2.49	923.5	1.76	19.69	199.9	41160
8	女	6	11.57	573.6	0.58	-	39.48	13190
9	女	70	11.43	492.6	1.75	3.61	59.40	10300
10	男	58	1.40	9.35	1.68	-	4.88	827.9
11	女	19	5.61	789.2	3.13	3.47	101.4	13970
12	男	57	2.00	171.9	5.24	0.55	29.80	20330
13	男	61	53.24	816.7	2.63	10.22	69.13	65470
14	男	66	10.34	700.8	1.78	9.63	104.9	10350
15	男	57	23.20	760	3.39	15.61	48.57	27220
16	男	60	9.75	622.4	2.11	5.88	88.60	52620
17	男	70	18.16	363.2	2.40	1.12	124.3	20220
18	女	24	10.10	158.7	1.28	-	43.46	6666
19	男	41	43.68	352.4	1.70	17.03	57.15	18250
20	男	78	6.82	400.4	0.75	24.86	69.00	12250
21	女	14	4.83	195.4	1.68	4.50	38.33	9647
22	男	42	2.13	70.81	2.64	-	18.24	4209
23	男	19	7.43	625.2	1.66	15.07	76.76	19030
24	女	17	3.70	219.9	1.86	8.80	22.73	5458
25	男	69	1.24	4.09	-	-	5.43	480.6

-:表示未能检测到基因表达。

B、结果分析

若以内参照基因GAPDH拷贝数作为基准，25名肺部疾病患者外周血白细胞中IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR基因的表达状况〔即：靶基因拷贝数 / 10^3 GAPDH拷贝数〕见表5。

表5

基因表达(拷贝数 / 10^3 GAPDH拷贝)							
住院号	性别	年龄	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	穿孔素
1	男	49	2.31	14.47	2.94	0.00	4.21
2	女	36	1.35	21.50	0.75	0.04	28.42
3	男	57	0.98	27.39	0.02	1.46	5.04
4	男	67	0.14	16.74	0.03	0.38	4.42
5	男	48	8.29	5.58	0.77	0.00	8.42
6	男	71	2.00	43.78	0.13	1.89	8.41
7	男	50	0.06	22.44	0.04	0.48	4.86
8	女	6	0.88	43.49	0.04	0.00	2.99
9	女	70	1.11	47.83	0.17	0.35	5.77
10	男	58	1.69	11.29	2.03	0.00	5.90
11	女	19	0.40	56.49	0.22	0.25	7.26
12	男	57	0.10	8.46	0.26	0.03	1.47
13	男	61	0.81	12.47	0.04	0.16	1.06
14	男	66	1.00	67.71	0.17	0.93	10.14
15	男	57	0.85	27.92	0.12	0.57	1.78
16	男	60	0.19	11.83	0.04	0.11	1.68
17	男	70	0.90	17.96	0.12	0.06	6.15
18	女	24	1.52	23.81	0.19	0.00	6.52
19	男	41	2.39	19.31	0.09	0.93	3.13
20	男	78	0.56	32.69	0.06	2.03	5.63
21	女	14	0.50	20.26	0.17	0.47	3.97
22	男	42	0.51	16.82	0.63	0.00	4.33
23	男	19	0.39	32.85	0.09	0.79	4.03
24	女	17	0.68	40.29	0.34	1.61	4.16
25	男	69	2.57	8.51	0.00	0.00	11.30
范围			0.06~8.29	5.58~67.71	0.00~2.94	0.00~2.03	1.06~28.42
中位值			0.88	21.50	0.13	0.25	4.86
阳性率			100%	100%	96%	72%	100%
阳性标本 均数±			1.29	26.07	0.39	0.70	6.04
标准差			1.63	16.05	0.69	0.65	5.33

表3和表5的阳性率结果总结于图7。分别用25例肺部疾病患者以及25例健康人进行定量PCR分析,以便证明本发明方法不仅可以在病人(非生理状态下)当中对细胞因子进行定量,而且也可以在健康人(生理状态下)对细胞因子进行定量。总的阳性率如下:IFN- γ 总阳性率为96%;IL-2总阳性率为100%;IL-4总阳性率为92%;IL-10总阳性率42%;PFR为总阳性率为90%。阳性率表明了本发明方法的敏感性很高。

目前,用荧光定量PCR检测细胞因子的报道中均需体外刺激才能测出,且阳性率较低,如IL-4的阳性率为81%,而本发明方法检测到IL-4的阳性率较高为92%。

其中,IL-10阳性率较低的原因是因为IL-10是最具有免疫抑制效应的细胞因子,正常情况下很难检测到。在健康自愿测试者处于健康的生理状态下时,所以具有免疫抑制效应的细胞因子表达率很低,故阳性率低。而检测病人的结果表达率为92.6%。从理论上讲,随着运动量的加大,运动疲劳的出现,IL-10的表达量会升高。这样通过对运动前和运动后的IL-10表达量进行比较,或与TH1型细胞因子(IFN- γ 和IL-2)的表达量进行比较,可能会得出较有意义的结论。如Nieman DC(2001)的研究中指出:总体来讲马拉松运动前很难检测到IL-10(几乎为0),但是在运动后(约为:75pg/ml)以及运动后1.5小时(约为:28pg/ml)会出现明显的升高。但是,Nieman DC使用的方法是ELISA,他是从蛋白水平对IL-10进行定量,所以敏感性及前瞻性均不如本发明方法。

实施例4

通过对穿孔素基因表达的荧光定量 PCR 检测来调控运动员的训练量

在本实施例中,用实施例2中相同的检测方法,对测试组运动员(10人),共进行训练(并非完全进行完如下的运动负荷,但是在发现运动员免疫机能下降前必须按照此方案进行)。第一周以60%最大摄氧量运动30分钟 $\times$ 2次,间歇5分钟;第二周以70%最大摄氧量运动20分钟 $\times$ 3次,间歇5分钟;第三周以80%最大摄氧量运动15分钟 $\times$ 4次,间歇5分钟;第四周以90%最大摄氧量运动10分钟 $\times$ 6次,间歇5分钟;第五周以95%最大摄氧量运动3分钟 $\times$ 10次,间歇5分钟。每周运动前和运动后即刻取2ml外周血,对穿孔素基因表达的荧光定量PCR检测。比较运动前后PFR数量的改变从而对运动员的免疫机能状态进行评估,调控运动员训练量。如:第一周运动后即刻抽血,然后进行定量PCR测得的结果为N1;第二周运动后即刻抽血进行定量PCR的结果为N2;第三周运动后即刻抽血,然后进行定量PCR测得的结果为N3,依次类推为N4—N_n。如果 $((N_n - N_{n-1}) / N_{n-1}) > 5\%$,则说明运动负荷过大,运动员免疫机能下降,应该减少运动量;当 $((N_n - N_{n-1}) / N_{n-1}) > 5\%$,说明运动员免疫机能增强,应维持运动量或加大运动量。

对照组运动员(10人)运动方案同前,但是根据教练员经验判定运动员是否过度疲劳,或者根据医生的诊断确定是否免疫力下降。一旦判定运动员过度疲劳或免疫力下降,则减少运动量,否则维持运动量。

结果表明,测试组运动员患感冒等病症的次数远低于对照组(低35%以上),同时运动成绩也优于对照组。这表明,本发明方法可准确地判定早期疲劳,有效地避免过度运动负荷训练所造成的机体免疫功能下降。

实施例5

通过对多个细胞因子基因表达的荧光定量PCR检测来调控运动员的训练量

本实施例的方法同实施例4，不同点仅在于同时对IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10和PFR基因的表达进行荧光定量PCR检测，并根据表6调控测试组运动员的运动量。测试组运动员为10人，对照组运动员10人。试验持续5周。

表6

	变化幅度出现免疫力下降趋势	相对拷贝数表明免疫力下降
IFN- γ	(a) $N_n < N_{n-1}$ (b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于5%	IFN- γ 拷贝数 / 10^3 GAPDH拷贝数小于2(过低)
IL-2	(a) $N_n < N_{n-1}$ (b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于5%	IL2拷贝数 / 10^3 GAPDH拷贝数小于2(过低)
IL-4	(a) $N_n > N_{n-1}$ (b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于5%	IL4拷贝数 / 10^3 GAPDH拷贝数大于2(过高)
IL-10	(a) $N_n > N_{n-1}$ (b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于5%	IL-10拷贝数 / 10^3 GAPDH拷贝数大于2(过高)
PFR	(a) $N_n < N_{n-1}$ (b) N_n 与 N_{n-1} 的相对变化幅度大于5%	PFR拷贝数 / 10^3 GAPDH拷贝数小于2(过低)

具体地，通常维持或加大测试组运动员的运动量，但当运动员处于以下情况之一时，减少运动量甚至停止。

- 10 (a)PFR 基因的出现免疫力下降指标(即变化幅度出现免疫力下降趋势或绝对拷贝数过低表明免疫力下降)，且另外 4 个细胞因子有至少一个出现免疫力下降指标(变化幅度出现免疫力下降趋势或绝对拷贝数表明免疫力下降)；
- (b)5个细胞因子有至少3个出现免疫力下降的指标。
- (c)PFR基因的出现免疫力下降指标，且Th1/Th2比值T出现下降幅度为5-10%。
- 15 (d)Th1/Th2比值T的下降幅度大于10%。

对照组运动员(10人)根据教练员经验判定运动员是否过度疲劳，或者根据医生的诊断确定是否免疫力下降。一旦判定运动员过度疲劳或免疫力下降，则减少运动量，否则维持运动量。

- 20 结果表明，测试组运动员患感冒等病症的次数远低于对照组(低60%以上)，同时运动成绩也优于对照组。这表明，本发明方法可准确地判定早期疲劳，有效地避免过度运动负荷训练所造成的机体免疫功能下降。

- 25 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110>	上海体育学院	
<120>	生理状态下外周血中穿孔素基因表达的荧光定量 PCR 检测	
<130>	036347	
<160>	30	
<170>	PatentIn version 3.1	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	寡核苷酸	
<400>	1	
	agtcctttgg acctgatcag	20
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	寡核苷酸	
<400>	2	
	agacaatttg gctctgcatt at	22
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	寡核苷酸	
<400>	3	
	cagctctgca tcgttttggg	20
<210>	4	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	寡核苷酸	
<400>	4	
	gttccattat ccgctacatc tgaa	24
<210>	5	
<211>	25	
<212>	DNA	

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 5

tcttggtgt tactgccagg accca

25

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 6

acctaactc ctgccacaat

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 7

ttgctgatta agtcctggg

20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 8

ctggagcatt tactgctgga tt

22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 9

gccttcttgg gcatgtaaaa c

21

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 10
aaatgtgagc atcctggtga gtttggg 27

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 11
gcttccccct ctgttcttc 19

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 12
tctggttggc ttccttcac 19

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 13
caccgagttg accgtaacag a 21

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 14
ttctcatggt ggctgtagaa ctg 23

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 15 agcacagtcg cagccctgca ga	22
<210> 16 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> misc_feature <223> 寡核苷酸	
<400> 16 tgagaaccaa gaccagaca t	21
<210> 17 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> misc_feature <223> 寡核苷酸	
<400> 17 caataaggtt tctcaagggg c	21
<210> 18 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> misc_feature <223> 寡核苷酸	
<400> 18 agaacctgaa gaccctcagg c	21
<210> 19 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> misc_feature <223> 寡核苷酸	
<400> 19 cctcgccctt gctcttggt	19
<210> 20 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> misc_feature <223> 寡核苷酸	
<400> 20 aggctacggc gctgtcatcg atttct	26

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 寡核苷酸

 <400> 21
 agtcagctcc actgaagctg t 21

 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 寡核苷酸

 <400> 22
 tgaagtgggt gccgtagtt 19

 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 寡核苷酸

 <400> 23
 accagcaatg tgcattgtgc t 21

 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 寡核苷酸

 <400> 24
 ccacatggaa actgtagaag c 21

 <210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 寡核苷酸

 <400> 25
 tggccggctc acactcacag g 21

 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 26

cacatcgctc agacaccatg

20

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 27

aggcattgct gatgatcttg a

21

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 28

ggaaggtgaa ggtcggagtc

20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 29

gaagatgggtg atgggatttc

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 30

caagcttccc gttctcagcc

20

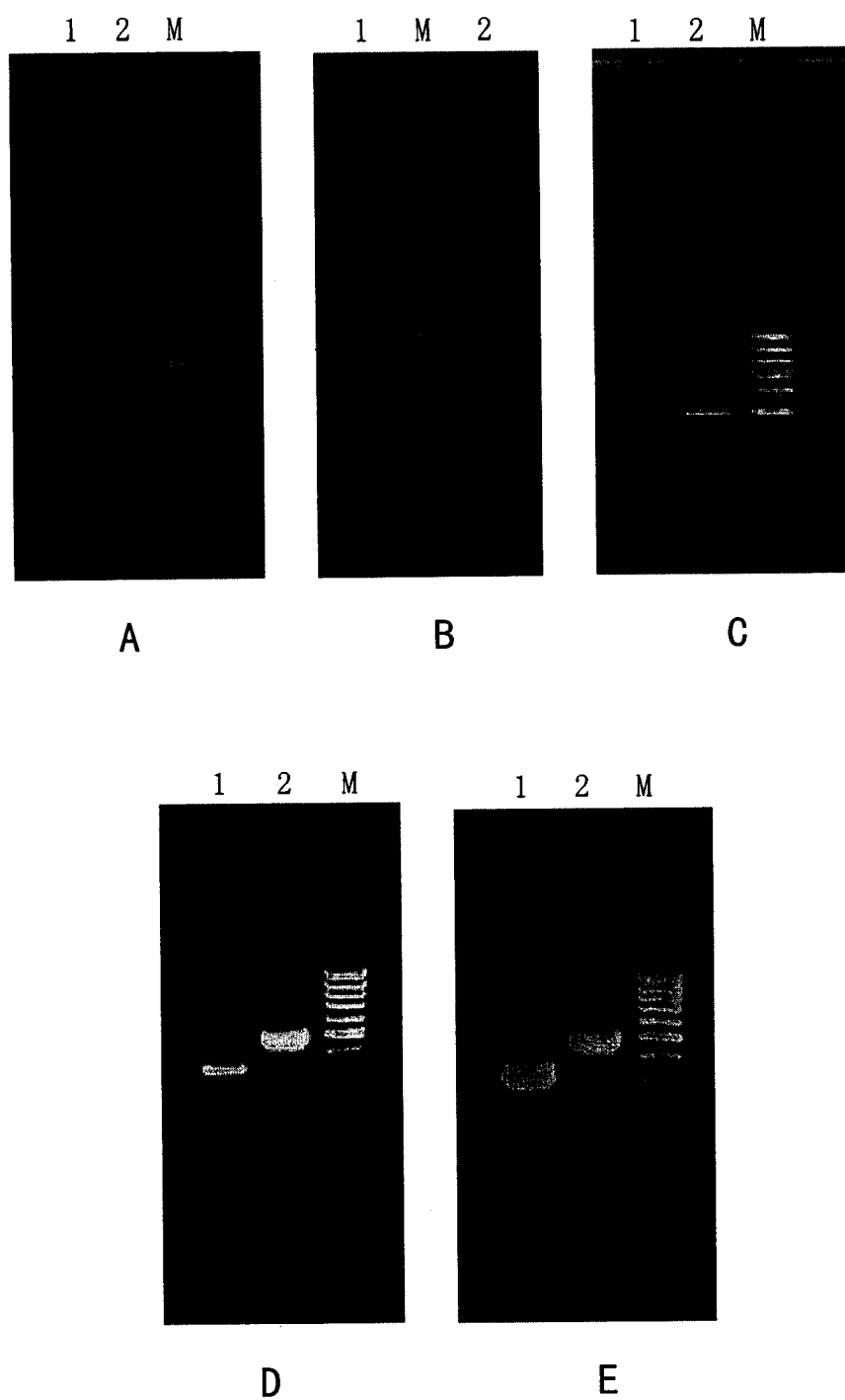


图 1

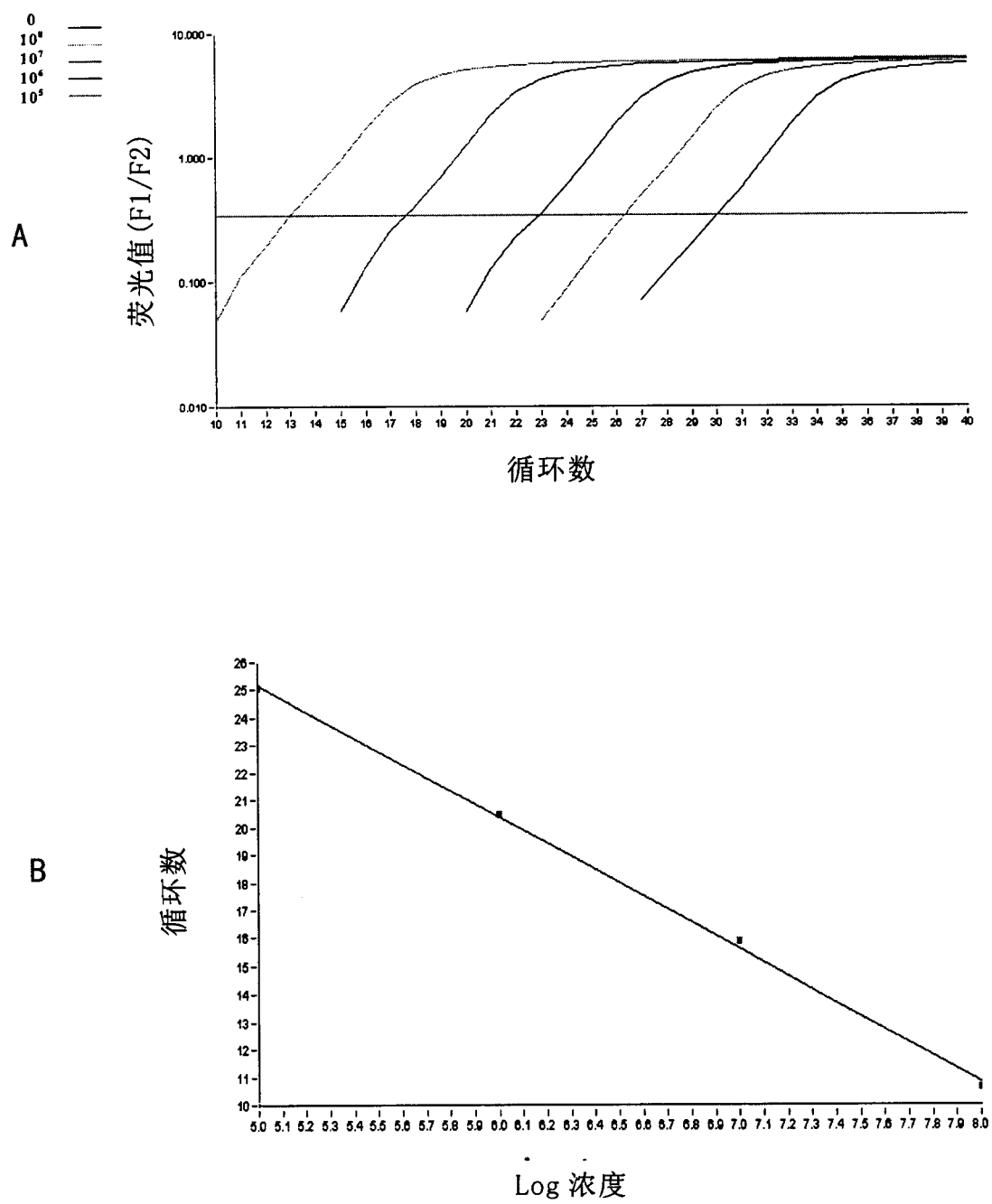


图 2

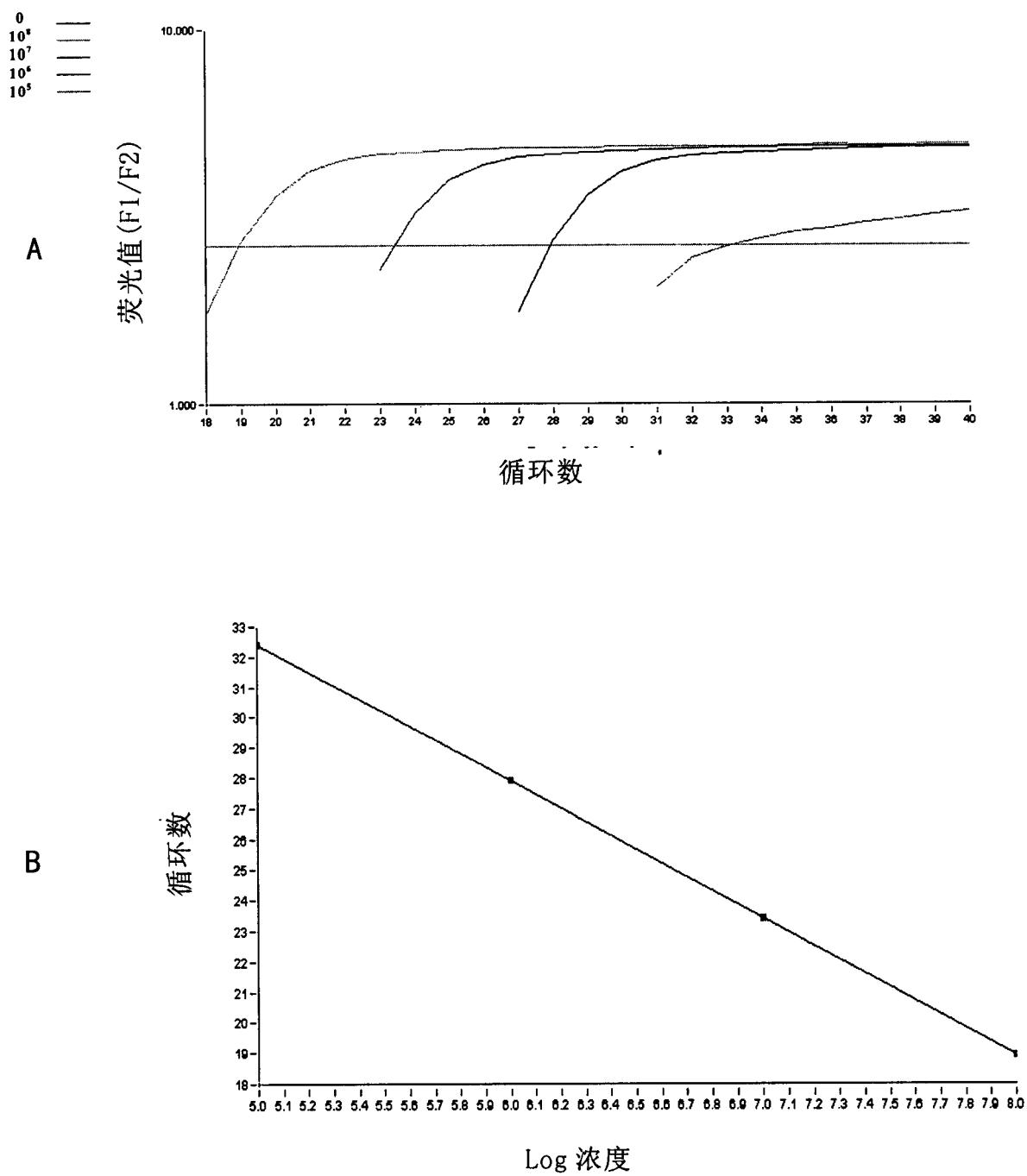


图 3

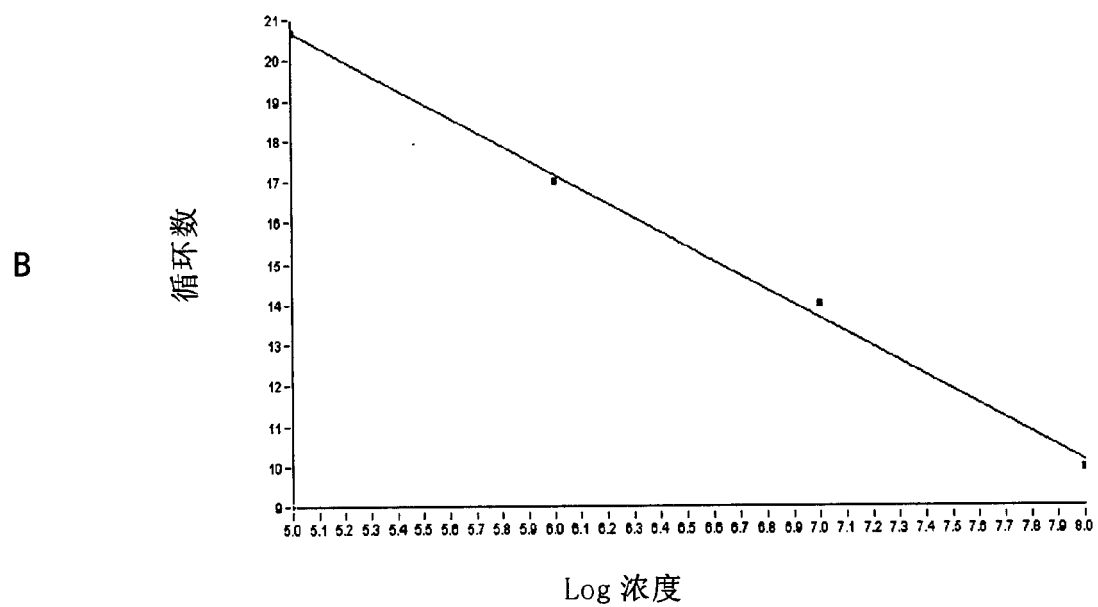
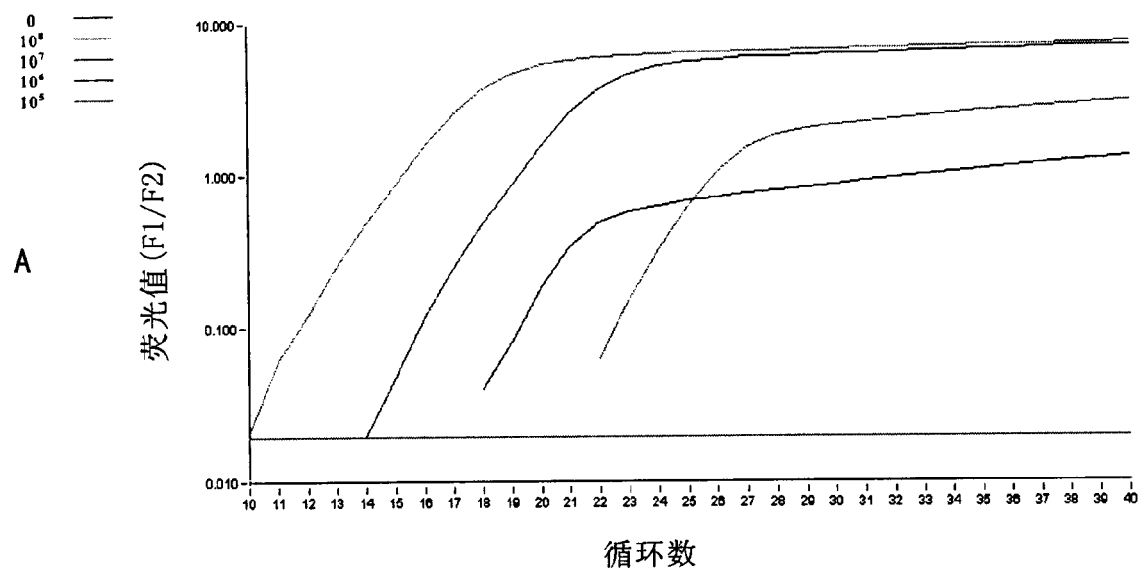


图 4

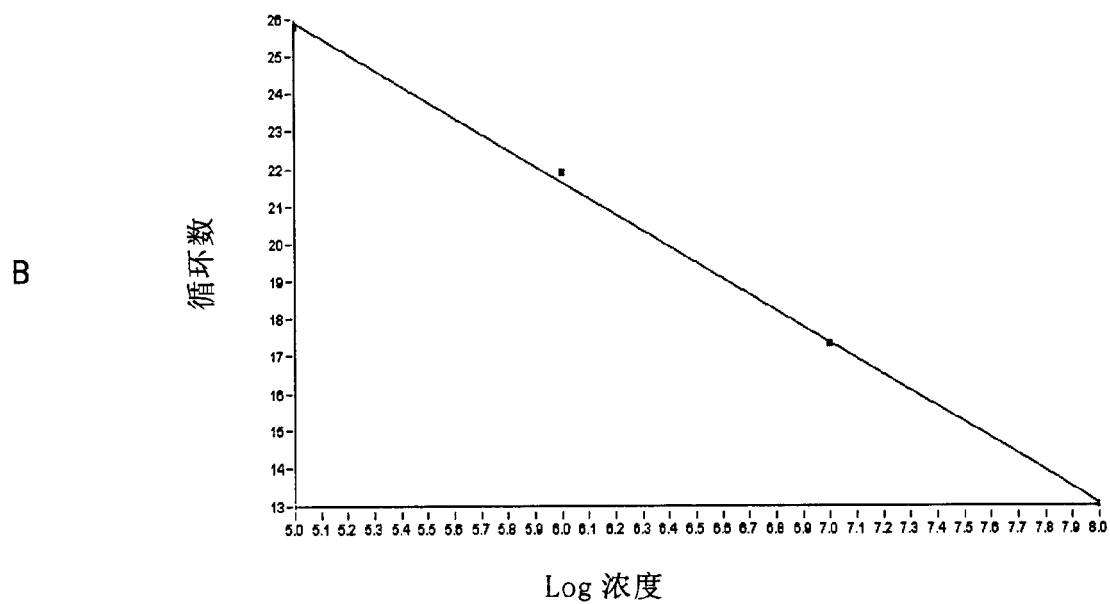
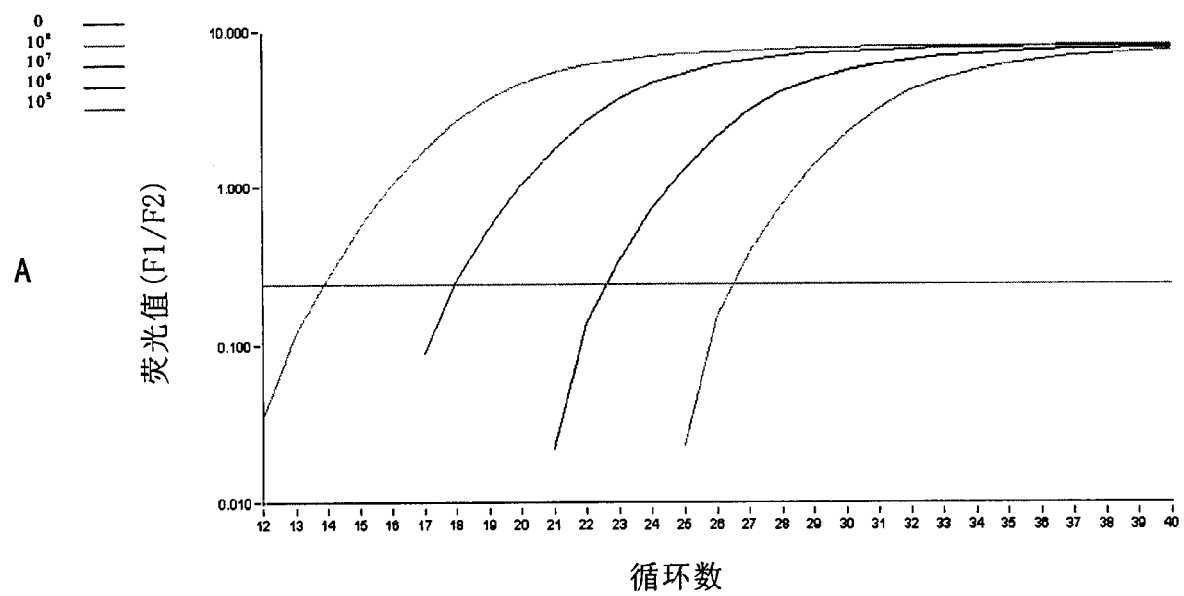


图 5

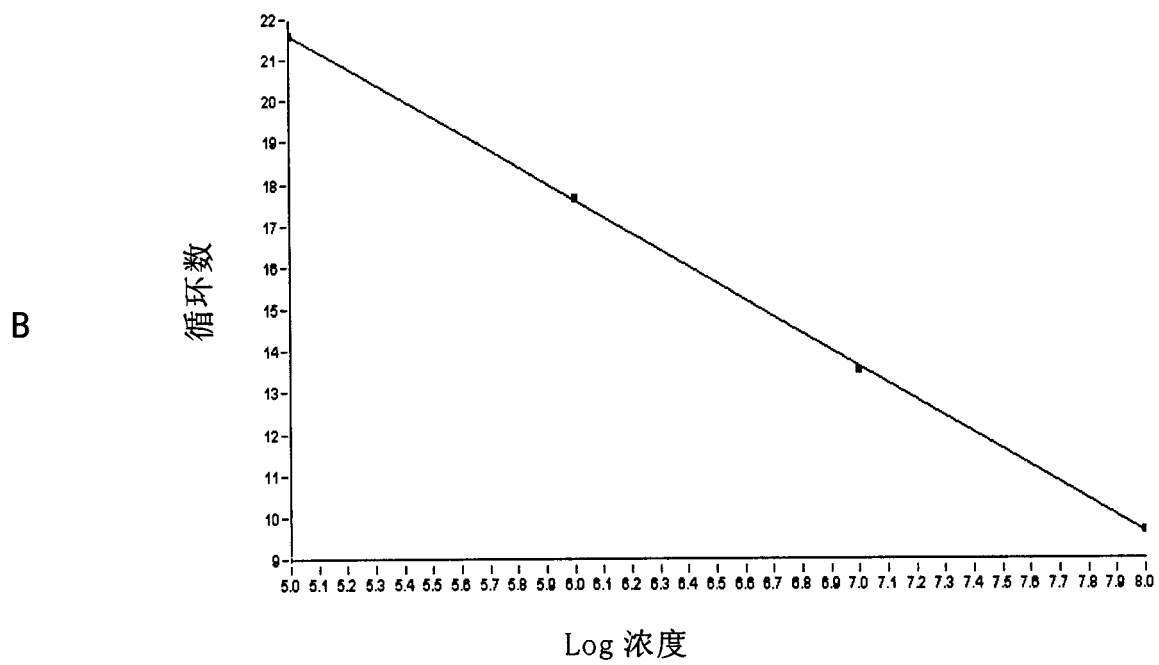
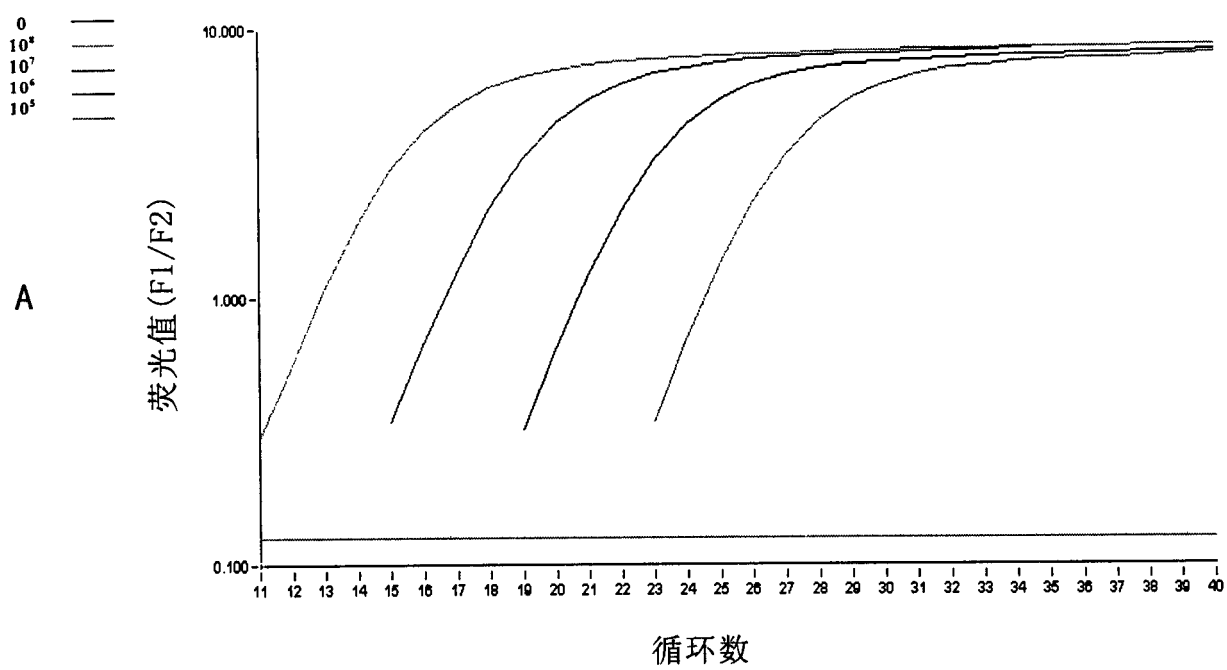


图 6

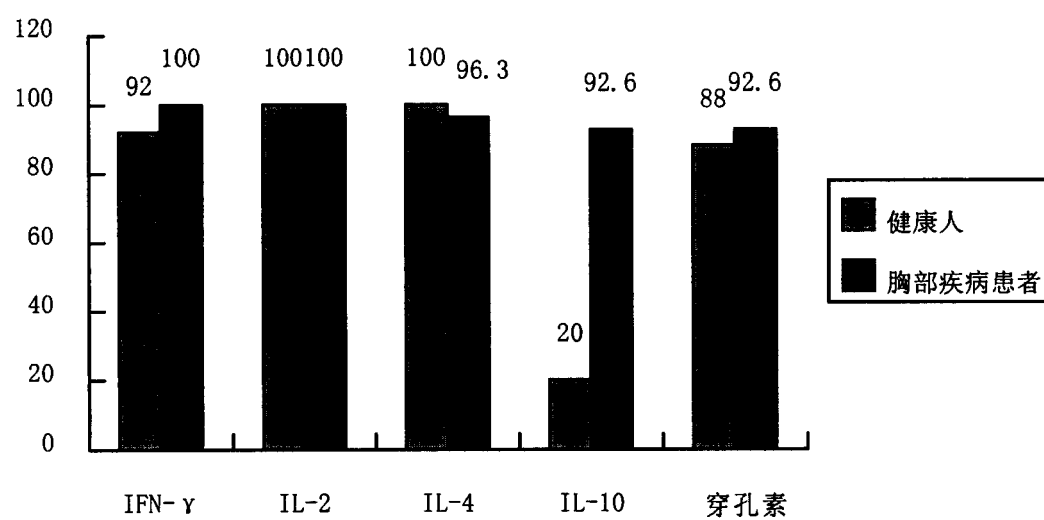


图 7

专利名称(译)	生理状态下外周血中穿孔素基因表达的荧光定量PCR检测		
公开(公告)号	CN1629312A	公开(公告)日	2005-06-22
申请号	CN200310109558.5	申请日	2003-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	上海体育学院		
申请(专利权)人(译)	上海体育学院		
[标]发明人	陈佩杰 董强刚 王茹		
发明人	陈佩杰 董强刚 王茹		
IPC分类号	C12P19/34 C12Q1/68 G01N33/53		
代理人(译)	徐迅		
其他公开文献	CN1284862C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种对外周血中与免疫相关的细胞因子进行定量检测的方法。该方法可以直接从2ml外周血中特异性地检出细胞因子(PFR)基因表达，并且在检测前无需任何刺激，可直接在生理状态下检测上述细胞因子基因的表达，从而用于判定早期疲劳，避免过度运动负荷训练所造成的机体免疫功能下降。本发明还提供了相应的检测试剂盒。