

分类号：
学号：20212114023

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



LncTUG1 靶向 miR-181a 调控 BPIFB4 在
慢阻肺巨噬细胞中的表达和机制初探

学位申请人	陶利
指导教师	李黎
申请学位类别	专业硕士
专业名称	内科学
研究领域	呼吸系统疾病
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子

2024年5月

分类号：
学号：20212114023

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



LncTUG1 靶向 miR-181a 调控 BPIFB4 在慢阻肺巨噬细胞中的表达和机制初探

学位申请人	陶利
指导教师	李黎
申请学位类别	专业硕士
专业名称	内科学
研究领域	呼吸系统疾病
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子

2024年5月

**LncTUG1 targets miR-181a to regulate
BPIFB4 Expression and mechanism in COPD macrophages**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Medicine

By

TaoLi

(Internal medicine)

Dissertation Supervisor: Prof. LiLi

May, 2024

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：陶利

时间：2024年4月27日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：陶利

时间：2024年4月27日

导师签名：李磊

时间：2024年4月27日

摘要

目的：本研究通过验证 LncTUG1、miR-181a 和 BPIFB4 在 COPD 患者诱导痰巨噬细胞中表达水平，明确 LncTUG1 与 miR-181a 及 miR-181a 与 BPIFB4 之间的靶向关系，初步探明 BPIFB4 对 M1、M2 型巨噬细胞极化的调控作用以及在 COPD 疾病发生发展中临床意义。

方法：1.以喀什地区第一人民医院收治的 COPD 患者为研究对象，以年龄和性别相匹配的健康人作为对照，收集各 20 人的诱导痰标本，分离痰液中的巨噬细胞并提取总 RNA。应用 RT-qPCR 检测巨噬细胞中 LncTUG1、miR-181a、BPIFB4 的 mRNA 表达水平。2.利用双荧光素酶报告实验检测 LncTUG1 与 miR-181a 以及 miR-181a 与 BPIFB4 之间的靶向关系。3.通过将 BPIFB4 过表达/沉默处理，并用 3%CSE 干预 THP-1 细胞，利用 RT-qPCR 和 Western blot 方法分别检测 BPIFB4 的 mRNA 和蛋白表达水平，采用流式细胞术检测 M1、M2 巨噬细胞表型的比例。4.应用 ELISA 方法检测 M1、M2 型巨噬细胞极化相关细胞因子的表达水平，进一步分析过量表达/沉默 BPIFB4 基因的表达对 3%CSE 处理的 THP-1 细胞极化的影响。

结果：

1. COPD 患者诱导痰巨噬细胞中，LncTUG1 表达下调、miR-181a 表达上调、BPIFB4 表达下调 ($P < 0.001$)。
2. LncTUG1-WT 和 BPIFB4-WT 质粒均可以与 miR-181a 发生结合，荧光值显著降低 ($P < 0.05$)，突变体不受影响。
3. 3%CSE 与对照组相比 THP-1 细胞中 BPIFB4 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。3%CSE 组 M1、M2 型巨噬细胞百分数均显著高于对照组 ($P < 0.001$)。CSE+siBPIFB4 组 M1 型巨噬细胞显著高于 3%CSE 组 ($P < 0.001$)。CSE+OE-BPIFB4 组 M2 型巨噬细胞显著高于 3%CSE 组 ($P < 0.001$)。
4. (1) 3%CSE 组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.001$)。CSE+siBPIFB4 组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达水平显著高于 3%CSE 组 ($P < 0.001$)。CSE+OE-BPIFB4 组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达水平显著低于 3%CSE 组 ($P < 0.001$)。(2) 3%CSE 组 IL-10、TGF- β 表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)，3%CSE 组 Arg-1 表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$)。CSE+OE-BPIFB4 组 IL-10、TGF- β 、Arg1 表达水平均显著高于 3%CSE 组 ($P < 0.001$)。CSE+siBPIFB4 组 IL-10、TGF- β 表达水平显著低于 3%CSE 组 ($P < 0.05$)。

结论：

1. LncTUG1 可靶向调控 miR-181a 抑制 BPIFB4 的表达参与 COPD 炎症反应。
2. CSE 促使 BPIFB4 表达下调引起巨噬细胞 M2 型向 M1 型转化，从而导致 COPD 炎症反应发生。

关键词：慢性阻塞性肺疾病；巨噬细胞 M1 M2 极化；BPIFB4；LncTUG1；miR-181a

Abstract

Objective: In this study, the expression levels of LncTUG1, miR-181a and BPIFB4 in the induced sputum macrophages of patients with COPD were verified to clarify the targeting relationship between LncTUG1 and miR-181a and between miR-181a and BPIFB4. The regulatory effect of BPIFB4 on the polarization of M1 and M2 macrophages and its clinical significance in the occurrence and development of COPD diseases were preliminarily investigated.

Method: 1. COPD patients admitted to the First People's Hospital of Kashi Region were taken as the study objects, and healthy people matched by age and sex were taken as controls. Induced sputum samples from 20 people in each group were collected, and macrophages in the sputum were isolated and total RNA was extracted. The mRNA expression levels of LncTUG1, miR-181a and BPIFB4 in macrophages were detected by RT-qPCR. 2. The targeting relationship between LncTUG1 and miR-181a and between miR-181a and BPIFB4 was detected by Dual-luciferase reporter assay reporting assay. 3. THP-1 cells were treated by treating BPIFB4 overexpression / silencing and intervening with 3% CSE, RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of BPIFB4, and the proportion of M1 and M2 macrophage phenotypes was detected by flow cytometry 4. ELISA was used to detect the expression levels of polarization-related cytokines in M1 and M2 macrophages, and to further analyze the effect of overexpression/silenced expression of BPIFB4 gene on the polarization of THP-1 cells treated with 3%CSE.

Results:

1. In induced sputum macrophages in COPD patients, LncTUG1 expression was down-regulated, miR-181a expression was up-regulated, and BPIFB4 expression was down-regulated ($P < 0.05$).

2. Both LncTUG1-WT and BPIFB4-WT plasmids could bind to miR-181a, and their fluorescence values were significantly decreased ($P < 0.05$), but the mutants were not affected.

3. Compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of BPIFB4 in THP-1 cells of 3% CSE were significantly decreased ($P < 0.05$). The percentages of M1 and M2 macrophages in 3%CSE group were significantly higher than those in control group ($P < 0.001$). M1 macrophages in CSE+BPIFB4 silenced group were significantly higher than those in 3%CSE group ($P < 0.001$). The M2-type macrophages in BPIFB4 overexpression group were significantly higher than those in 3%CSE group ($P < 0.001$).

4. (1) The expression levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were significantly higher in the 3% CSE group than that in the control group ($P < 0.001$). The expression levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the CSE+siBPIFB4 group were significantly higher than those in the 3% CSE group ($P < 0.001$). The

expression levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the CSE+OE-BPIFB4 group were significantly lower than those in the 3% CSE group ($P<0.001$). (2) The expression levels of IL-10 and TGF- β in the 3% CSE group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), and the expression levels of Arg-1 in the 3% CSE group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The expression levels of IL-10, TGF- β and Arg1 in the CSE+OE-BPIFB4 group were significantly higher than those in the 3% CSE group ($P<0.001$). The expression levels of IL-10 and TGF- β in the CSE+siBPIFB4 group were significantly lower than those in the 3% CSE group ($P<0.05$).

Conclusion:

1. LncTUG1 can target miR-181a to inhibit the expression of BPIFB4 and participate in COPD inflammation.
2. CSE promoted the down-regulation of BPIFB4 expression and caused the transformation of macrophages from M2 type to M1 type, thus leading to COPD inflammatory response.

Key words: COPD; Macrophage M1/M2 polarization; BPIFB4; LncTUG1; miR-181a.

目录

摘要.....	I
目录.....	IV
中英文缩略词表.....	VI
1 前言.....	1
1.1 COPD 流行病学现状.....	1
1.2 巨噬细胞 M1/M2 极化失衡调控 COPD 炎症发生发展.....	1
1.3 BPIFB4 及其对巨噬细胞 M1/M2 极化的调控作用.....	2
1.4 LncTUG1 与 miR-181 对 BPIFB4 的调控作用.....	3
2 材料与方法.....	4
2.1 实验材料.....	4
2.1.1 研究对象.....	4
2.1.2 纳入和排除标准.....	4
2.1.3 实验细胞.....	4
2.1.4 主要仪器.....	5
2.1.5 主要试剂及其配制.....	6
2.2 实验方法.....	7
2.2.1 人诱导痰液的收集及巨噬细胞分离.....	7
2.2.2 实时荧光定量 PCR 检测人诱导痰巨噬细胞中 LncTUG1、miR-181a 和 BPIFB4 的 mRNA 表达水平.....	8
2.2.3 双荧光素酶报告实验验证靶向关系.....	9
2.2.4 THP-1 细胞中 BPIFB4 的 mRNA 过表达/沉默.....	13
2.2.5 流式细胞术检测 BPIFB4 过表达/沉默条件下 3%CSE 处理的巨噬细胞 M1/M2 型的百分比.....	16
2.2.6 ELISA 检测 BPIFB4 过表达/沉默处理条件下 3%CSE 处理的巨噬细胞 M1/M2 型极化相关因子表达水平.....	16
2.3 统计学方法.....	16
2.4 技术路线图.....	17
3 结果.....	19
3.1 一般资料比较.....	19
3.2 LncTUG1、miR-181a 和 BPIFB4 的 mRNA 在人诱导痰巨噬细胞中的表达水平.....	19

3.3 双荧光素酶报告实验验证 LncTUG1 与 miR-181a 以及 miR-181a 与 BPIFB4 的靶向关系	20
3.4 BPIFB4 过表达/沉默条件下 3%CSE 处理的巨噬细胞 M1/M2 型比例变化	21
3.5 BPIFB4 过表达/沉默条件下 3%CSE 处理的巨噬细胞 M1/M2 型极化相关因子表达水平	23
4 讨论	25
4.1 LncTUG1、miR-181a、BPIFB4 与 COPD 关系	25
4.2 COPD 中 M1/M2 型巨噬细胞极化失衡及相关因子影响	26
4.3 BPIFB4 调控 M1/M2 型巨噬细胞极化失衡	27
5 结论	29
参考文献	30
文献综述	34
参考文献	41

中英文缩略词表 (Abbreviation)

英文缩写	英文全名	中文名称
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease	慢性阻塞性肺疾病
BPIFB4	Bactericidal/Permeability-Increasing Fold-Containing Family B member 4	含有杀菌/渗透性增加折叠的 B 族成员 4
CSE	cigarette smoke extract	烟草烟雾提取物
M ϕ	Macrophages	巨噬细胞
THP-1	human myeloid leukemia mononuclear cells	人髓系白血病单核细胞
miRNA	microRNA	微小 RNA
LncRNA	long non-coding RNAs	长链非编码 RNA
FEV1	Forced Expiratory Volume in one second	一秒用力呼气容积
FVC	forced vital capacity	用力肺活量
IL	Interleukin	白介素
TNF- α	Tumor necrosis factor α	肿瘤坏死因子 α
Arg-1	Arginase-1	精氨酸酶-1
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction	实时荧光定量 PCR
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
WB	Western Blot	蛋白免疫印迹实验
DR	Dual- Luciferase reporter assay	双荧光素酶报告基因检测
FCM	Flow Cytometry	流式细胞术

1 前言

(Introduction)

1.1 COPD 流行病学现状

慢性阻塞性肺病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种常见的以持续气流受限为特征的慢性肺部疾病,具有较高的死亡率和致残率。COPD 是世界范围内发病率和死亡率最高的疾病之一,是全球第三大死亡原因^[1]。据统计,全世界有 2.1 亿多人受到影响,每年至少造成 300 万人死亡,相当于总死亡率的 5%,造成经济和社会负担高达 65%,且有不断增加的趋势^[2]。中国 20 岁及以上成年人的 COPD 患病率为 8.6%,40 岁及以上人群的 COPD 患病率为 13.7%^[3]。随着吸烟率的上升和人口老龄化,未来 40 年中国人口 COPD 的患病率将继续上升^[4]。而随着 COPD 逐渐进展,这也给我国人民带来了严重的健康危害和沉重的经济负担。因各地气候、地理位置、居住环境及经济水平等因素具有较大差异,喀什地区位于新疆的西南部,靠近世界上第二大沙漠塔克拉玛干沙漠,春季和秋季经常发生沙尘暴,气候干燥,空气质量不佳,也为 COPD 的发生提供了便利条件^[5]。本团队前期对新疆喀什地区 COPD 流行现状进行调查时发现,喀什地区 40 岁以上人群 COPD 患病率为 17.01%^[6],显著高于全国平均水平。因此,本地区 COPD 患者将会面临极其高的死亡威胁及经济负担。但由于 COPD 发病机制错综复杂,至今仍未完全阐明其发病机制,治疗上多是以缓解症状为主,仍然缺乏有效的治疗手段。因此,深入探究 COPD 的发病机制,将有助于明确 COPD 疾病机理,并为 COPD 的治疗提供理论和实验依据。

1.2 巨噬细胞 M1/M2 极化失衡调控 COPD 炎症发生发展

COPD 是一种常见的慢性肺部炎症性疾病,主要由吸入香烟烟雾(cigarette smoke, CS)或其他有害外部颗粒(如空气污染和生物质燃料)后的炎症反应引起^[7]。炎症反应引起的气道重塑是 COPD 发病的重要机制^[8]。不同类型的炎症细胞参与其形成慢性阻塞性肺病。炎症反应参与 COPD 发病机制的一个重要特征是大量炎症介质的释放,如精氨酸酶-1(Arg-1)、白介素(IL) IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、转化生长因子 β (TGF β)和趋化因子 8(CXCL-8)。这些介质以自分泌和旁分泌的方式起作用^[9]。巨噬细胞(Macrophages, M ϕ)增加和活化是 COPD 患

者肺部慢性炎症的典型特征^[10]。大量证据表明, COPD 患者支气管肺泡灌洗液及肺组织中数量显著增加^[11-12], 且与 COPD 的严重程度和预后有关。M ϕ 在肺微环境中大量存在, 主要以肺泡巨噬细胞 (Alveolar macrophages, AMs) 和间质巨噬细胞 (Interstitial macrophages, IMs)^[13]为主。AMs 在肺损伤区域被大量发现, 并在慢性支气管炎和肺气肿的发展中发挥重要作用^[14]。此外, AMs 和 IMs 在 COPD 发病过程中, 通过分泌趋化因子募集大量单核细胞从血液聚集到肺泡, 参与炎症反应。AMs 极化为 M1 和 M2 表型 M ϕ , 其中 M1 型在宿主防御的促炎反应中起关键作用, M2 型有助于抗炎反应和组织重塑^[15]。因此, 巨噬细胞的调节对促炎和抗炎作用都很重要。

M1、M2 型 M ϕ 对 COPD 炎症的调节作用主要通过释放促炎/抗炎细胞因子来实现。吸烟者和 COPD 患者气道和肺泡内巨噬细胞数量增加已被证实, M1 型 M ϕ 被描述为细胞毒性和促炎细胞, 巨噬细胞有代谢精氨酸为一氧化氮(NO)的基本能力, 分别利用相互底物竞争酶诱导的一氧化氮合酶(iNOS)或精氨酸酶 1(Arg-1)^[16]。表型上 M1 型 M ϕ 表现出 iNOS 表达上调, 使用香烟烟雾(CS)、香烟烟雾提取物(CSE)、LPS 建立的 COPD 实验动物模型中均发现, 随着气道炎症、粘液分泌和肺气肿的进展, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MCP-1、ROS 的表达均上调, M1 巨噬细胞数量显著增加, 当抑制 M1 极化后, 肺部炎症因子表达水平明显降低^[17]。因此, M1 型 M ϕ 是 COPD 产生炎性介质的主要细胞。但是 M1 型 M ϕ 所产生的炎症因子是抵抗病原体的主要因子, M1 型 M ϕ 过低会引起免疫抑制。相比之下, M2 型 M ϕ 被认为是抗炎性介质的主要细胞, 与组织修复和纤维化有关, 分泌前 Th2 细胞因子, 包括 CCL22、IL-4、IL-13 和 IL-10^[18]。但是在 COPD 中 M2 型 M ϕ 的数量还存在争议。在 COPD 发展的不同阶段会出现 M2 型 M ϕ 减少或增多的情况。一方面, 在 M2 型 M ϕ 极化减少的情况下, 抗炎因子分泌减少, 将进一步加重局部的炎症情况; 另一方面, 如果 M2 型 M ϕ 过多, 会引起 IL-10、Arg-1 等因子的表达水平升高, Arg-1 通过使氨基酸脯氨酸可用于成纤维细胞促进胶原合成, 同时 M2 型 M ϕ 相关细胞因子 TGF- β 将促进组织纤维化^[19]。因此, 对 COPD 而言, M2 型 M ϕ 数量上升或降低均会对患者造成不可逆的伤害。因此, 我们认为 M2 型 M ϕ 的最佳调节方式应为既可以产生一定量的抑炎因子, 避免炎症的加重, 又可以尽量少的产生 Arg-1、TGF- β 等因子诱导肺部纤维化发生。

综上, COPD 肺组织中存在大量 M ϕ , 对于 COPD 炎症反应来说, M1 型 M ϕ 占据主导地位, 适量的 M2 型 M ϕ 对抑制 COPD 炎症具有一定帮助。但目前的研究针对 M1/M2 型 M ϕ 极化的上游调控机制还尚不十分明确。

1.3 BPIFB4 及其对巨噬细胞 M1/M2 极化的调控作用

本团队前期通过家系及人群队列研究发现, BPIFB4 (Bactericidal/Perme Ability-

Increasing Fold-Containing Family B member 4) 基因多态性 (rs4339026 A>G) 可显著增加吸烟人群 COPD 患病风险^[5]; 此外, 本课题组前期通过生信分析发现在肺组织基因芯片中 BPIFB4 的表达显著降低。然而, 目前尚未研究表明关于 BPIFB4 在 COPD 肺组织中表达异常的分子机制, 以及其影响 COPD 发病作用机制。

既往研究发现, BPIFB4 是呼吸道分泌物含量最丰富的蛋白之一, 在上呼吸道和气管近端高度集中^[20], 也在单核细胞中高表达^[21]。BPIFB4 具有调节细胞衰老的作用, 研究发现 BPIFB4 能够调节内皮功能以及促炎和抗炎平衡, 单核细胞来源的 M ϕ , 在 BPIFB4 富集的长寿的血浆中, 表现出更好的获得抗炎 M2 表型的趋势, 而高表达的 BPIFB4 能够促进单核细胞向 M2 型 M ϕ 分化, 减轻炎症反应^[22-23]。此外, BPIFB4 可以保护心血管疾病、神经退行性疾病免受慢性炎症的影响, 其中 M ϕ 的 M1 型向 M2 型转化在其中起到重要作用^[24-25]。综上, BPIFB4 可能在调控 M1/M2 型 M ϕ 失衡导致的 COPD 炎症机制方向具有一定作用, 但尚未有研究明确表示 BPIFB4 与 COPD 炎症机制是否存在关联。

1.4 LncTUG1 与 miR-181 对 BPIFB4 的调控作用

LncRNA 是一类核苷酸长度超过 200 bp 的非编码 RNA, 是一组高度异质的转录本, miRNA 是一种小型的非编码 RNA, 它们均在基因表达调控中起重要作用, 并可调节参与各种病理生理过程的不同信号通路, 与多种疾病发生发展有关^[26-28]。研究发现长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, LncRNA)^[29] 和 MicroRNA (miRNA)^[30] 与 COPD 发生发展密切相关。烟草烟雾提取物 (cigarette smoke extract, CSE) 暴露可通过调控不同的 LncRNA 及 miRNA 参与 COPD 发生。此外, miRNA 25nt 可通过粘附 LncRNA (>200nt), 调节 LncRNA 功能, 间接调控基因表达, 与 LncRNA 协同完成调控过程^[31]。

本课题组前期通过 Starbase 软件预测 BPIFB4 与 miR-181a 存在结合位点, miR-181a 与 LncTUG1 也存在结合位点, 结合文献查证, 发现, LncTUG1 可通过靶向 miR-145-5p^[32-33]、miR-34c 及 miR-9a-5p^[34] 调控 COPD 发病机制, 并且涉及机制多集中在炎症、凋亡方向, 但尚未明确 LncTUG1 与 COPD M ϕ 的关系。

因此, 鉴于本团队前期实验基础以及上述研究结果, 由此推测, 在 COPD 发生发展中, LncTUG1 可能通过靶向 miR-181a 进一步调控 BPIFB4, BPIFB4 水平改变可能引起 M1 和 M2 型 M ϕ 失衡, 进而引发和促进 COPD 炎症反应。探究这一机制, 以期为 COPD 患者的诊断和治疗提供理论和实验依据。

2 材料与方法

(Materials & Methods)

2.1 实验材料

2.1.1 研究对象

以喀什地区第一人民医院收治的 COPD 稳定期患者为研究对象，以年龄和性别相匹配的健康人作为对照，收集 COPD 患者和健康对照各 20 人诱导痰标本为研究对象。（健康入组者：来自喀什地区第一人民医院体检中心体检的健康人群，无 COPD 以及其它肿瘤和免疫受损性疾病）所有入组者均了解研究内容并签署知情同意书，本研究经喀什地区第一人民医院伦理委员会批准。之后进行本研究痰液标本收集工作。（伦理号：[2022]GZR 第（07）号）

2.1.2 纳入和排除标准

COPD 患者的纳入标准：符合 2022 年最新 GOLD 指南的诊断标准：①有典型病史和临床表现并经体格检查及 X 胸片或胸部 CT 等确诊。②肺功能指标：吸入沙丁胺醇 400 μg ，30 分钟后 FEV1 改善绝对值小于 200 mL，百分数 $<12\%$ ，FEV1 / FVC $<70\%$ 。③在肺功能测定前 24h 小时内，患者必须停用茶碱类药物，且在 12 小时内停用 β_2 -受体激动剂，4 小时之内不能吸入抗胆碱能药和 β_2 -受体激动剂。

排除标准：患有支气管哮喘、支气管扩张、活动性肺结核、肺间质纤维化、气胸、胸腔积液、肺栓塞、影响呼吸运动功能的神经肌肉疾病者。

2.1.3 实验细胞

本实验室提供 293T 细胞株及 THP-1 细胞株。

2.1.4 主要仪器

表 2-1 主要仪器

仪器名称	生产公司
超净工作台	苏州集团安泰空气技术有限公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司
电热恒温鼓风干燥箱	常州中诚仪器制造有限公司
电子天平	湘仪天平仪器设备有限公司
-80℃超低温冰箱	赛默飞世尔（苏州）仪器有限公司
实时荧光定量 PCR 仪	ABI
超微量核酸分析仪	杭州奥盛仪器有限公司
反渗透超纯水机	科尔顿
立式圆形压力蒸汽灭菌锅	江阴滨江医疗设备有限公司
冷冻离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司
PCR 仪	北京东林昌盛科技有限公司
双垂直电泳仪	北京六一
快速转膜仪	金斯瑞生物科技有限公司
水平脱色摇床	海门其林贝尔
台式高速冷冻离心机	Thermo
酶标仪	BioTek
化学发光仪	上海勤翔
CO ₂ 恒温培养箱	Thermo Fisher
倒置荧光显微镜	尼康
凝胶成像系统	天能生物
恒温振荡器	常州中诚
恒温水浴锅	北京市永光明医疗仪器
流式细胞仪	Agilent NovoCyte Penton

2.1.5 主要试剂及其配制

表 2-2 实验试剂及耗材

试剂名称	生产公司
Trizol	天根
氯仿	福州市广博胶业
PerfectStart Green RT-qPCR SuperMix	全式金
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司
DEPC 水	Sigma
EP 管	百赛生物
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
oligdT	擎科
RNase inhibitor	Thermo
dNTPs	Thermo
RevertAid Reverse Transcriptase	Thermo
200 ul EP 管	百赛生物
RIPA 裂解液 (强)	碧云天
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	碧云天
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Bio-Platforms
BeyoECL Plus	碧云天
PVDF 膜	Merck Millipore
胰酶	Genview
双荧光素酶检测试剂盒	promega
6× Loading Buffer	擎科生物技术有限公司
质粒小量制备试剂盒	Axygen
DNA 凝胶回收试剂盒	擎科
Fly FastPfu Mix	全式金
Sosoo Cloning Kit	擎科