

# 牛 IFN- $\gamma$ 原核表达、单克隆抗体制备及其 ELISA 检测方法的建立 Preparation of Monoclonal Antibodies Against Recombinant Bovine IFN-gamma and Development of Sandwich ELISA for Bovine IFN-gamma Detection

李 川<sup>1</sup>, 谭亚娣<sup>1,2</sup>, 陈颖钰<sup>1</sup>, 胡巧云<sup>1</sup>, 马 艳<sup>1</sup>, 张桂荣<sup>1</sup>, 钦 博<sup>1</sup>, 晁彦杰<sup>1</sup>, 陈焕春<sup>1,2</sup>, 郭爱珍<sup>1,2\*</sup>

LI Chuan<sup>1</sup>, TAN Ya-Di<sup>1,2</sup>, CHEN Ying-Yu<sup>1</sup>, HU Qiao-Yun<sup>1</sup>, MA Yan<sup>1</sup>, ZHANG Gui-Rong<sup>1</sup>, QIN Bo<sup>1</sup>, CHAO Yan-Jie<sup>1</sup>, CHEN Huan-Chun<sup>1,2</sup> and GUO Ai-Zhen<sup>1,2\*</sup>

1 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

2 华中农业大学动物医学院预防兽医学省重点实验室, 武汉 430070

1 The State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China

2 College of Veterinary Medicine, Hubei Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**摘 要** 实验旨在建立牛重组 IFN- $\gamma$  (BovIFN- $\gamma$ ) 的 ELISA 检测技术, 为牛传染病的免疫学诊断提供新方法。PHA 刺激体外培养的奶牛外周血白细胞, 从培养细胞中提取总 RNA, 经过 RT-PCR 扩增出 BovIFN- $\gamma$  基因 cDNA, 进一步克隆至 pET28a, 转化大肠杆菌, 经 IPTG 诱导, 表达出预期大小(18kD 左右) 组氨酸标记蛋白, 经鉴定为 BovIFN- $\gamma$ , 以纯化的重组 BovIFN- $\gamma$  为免疫原, 应用淋巴细胞杂交瘤技术, 获得 4 株能稳定分泌抗 BovIFN- $\gamma$  单克隆抗体的细胞株, 分别命名为 A7、A10、G6 与 G10。免疫球蛋白亚类鉴定证明杂交瘤细胞所分泌的抗体均为 IgG<sub>1</sub>, 腹水效价在  $1:2^{10} \times 100 \sim 1:2^{11} \times 100$  之间。Western-blot 分析显示 4 株单抗均能特异性结合重组 BovIFN- $\gamma$ 。ELISA 试验表明, 4 株单抗只与融合蛋白 BovIFN- $\gamma$  反应, 而不与非相关性蛋白 Ag85B、ESAT-6、CFP-10、GM-CSF 等发生反应。选取 A10 细胞株分泌的单克隆抗体、纯化的多克隆抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG, 建立了检测 BovIFN- $\gamma$  的双抗体夹心 ELISA 方法。实验结果表明, 此方法检测敏感性达到 2ng/mL, 特异性良好, 为进一步建立灵敏、特异的病原感染诊断方法奠定了基础。

**关键词** 牛 IFN- $\gamma$ , 单克隆抗体, ELISA, 克隆, 表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0040-06

**Abstract** This study was aimed to establish ELISA for recombinant bovine IFN- $\gamma$  (BovIFN- $\gamma$ ) detection and provide a new method for diagnosis of pathogenic infection. The total RNA was isolated from peripheral blood leucocytes cultured with PHA mitogen stimulation. Then bovine IFN- $\gamma$  (BovIFN- $\gamma$ ) gene cDNA was amplified by RT-PCR and cloned into pET28a to obtain the expression plasmid designated as pETBovIFN- $\gamma$ . The pETBovIFN- $\gamma$  was further transformed into competent *E. coli* BL21 cells and a 18kD His-tagged protein as expected was expressed after IPTG induction. By using purified recombinant BovIFN- $\gamma$  as antigen and lymphocyte-hybridoma technique, four hybridoma cell lines which stably secreted monoclonal antibodies against

Received: August 3, 2006; Accepted: September 21, 2006.

The work was supported by a grant from Wuhan Key Technologies R & D Programme (No. 20066002056); China "The Fenth Five-Years" National Key Technologies R & D Programme in Dairy Industry (No. 2002BA518A24).

\* Corresponding author. Tel: + 86-27-87286861; E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

武汉市科技攻关课题(No. 20066002056) 国家“十五”科技攻关奶业重大专项(No. 2002BA518A24) 期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

rBovIFN- $\gamma$  were generated, designated as A7, A10, G6, and G10. The immunoglobulin subset was identified as IgG<sub>1</sub>. Western blotting analysis and ELISA demonstrated that the monoclonal antibodies secreted by all the four hybridoma cell lines could react specifically to the recombinant BovIFN- $\gamma$ , but not irrelative proteins such as Ag85B, ESAT-6-CFP-10 and GM-CSF, suggesting that the four hybridoma cell lines were rBovIFN- $\gamma$  specific monoclonal antibodies. A sandwich ELISA was established by using A10 secreted monoclonal antibody and rabbit polyclonal antibodies against BovIFN- $\gamma$ , HRP labeled goat anti-rabbit IgG. The results indicated that the sensitivity was 2ng/mL. This sandwich ELISA to detect BovIFN- $\gamma$  paved the way to develop a sensitive method for specific infection detection such as bovine tuberculosis diagnosis.

**Key words** bovine IFN- $\gamma$ (BovIFN- $\gamma$ ), monoclonal antibody, ELISA, cloning, expression

$\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )主要由被抗原、有丝分裂素(ConA, PHA)等活化的 Th<sub>1</sub> 细胞、CD8<sup>+</sup> 细胞和 NK 细胞产生,除具有抗病毒、抗肿瘤活性外,还具有免疫调节作用,如活化巨噬细胞、提高 MHC I 类和 II 类分子的表达、促进抗原提呈等,在机体免疫控制和免疫病理中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。研究表明,外源性的 IFN- $\gamma$  既可以作为药剂用于感染性疾病或肿瘤等的治疗,又可以作为免疫佐剂,增强疫苗的免疫效果;内源性 IFN- $\gamma$  水平的高低在很大程度上可以反映机体的细胞免疫状态,而抗原特异性的 IFN- $\gamma$  反应则可以作为机体针对某种特定外来抗原的细胞免疫状态的指标<sup>[2]</sup>。IFN- $\gamma$  的免疫学检测(IFN- $\gamma$  试验)是在特异性抗 IFN- $\gamma$ McAb 的基础上建立的,用于样本中 IFN- $\gamma$  定性定量分析的实验方法<sup>[3]</sup>,已被广泛用于基础研究和临床免疫学<sup>[4]</sup>、疫苗免疫效果评估<sup>[5]</sup>、器官移植<sup>[6]</sup>、过敏反应<sup>[7]</sup>以及病原感染的诊断<sup>[8-11]</sup>等。IFN- $\gamma$  及其 McAb 在畜牧兽医领域也有着广泛的应用。国外已有学者将基因重组牛 IFN- $\gamma$  (rBovIFN- $\gamma$ )及其 McAb 用于牛病的研究,抗原特异性的牛 IFN- $\gamma$  检测已在很多发达国家被用于多种牛疫病的特异性检测,尤以在牛结核病诊断中的应用最为广泛<sup>[9-12]</sup>。国内学者研究了牛 IFN- $\gamma$  的克隆与表达<sup>[13,14]</sup>,但基于牛 IFN- $\gamma$  及其 McAb 的诊断方法尚未见报道。本研究在克隆与表达 BovIFN- $\gamma$  的基础上,制备了牛 IFN- $\gamma$  单克隆及多克隆抗体,并建立了检测牛 IFN- $\gamma$  的双抗体夹心 ELISA 方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司,原核表达载体 pET-28a 为 Novagen 公司产品,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3)均由本实验室保存提供。SPF 级 Balb/c 小鼠购自湖北省疾病预防控制中心实验动物中心。健康黑白花奶牛初生犊牛由华中农业大学实验牛场提供。商品化的重组 BovIFN- $\gamma$  购自 Endogen

公司。Ni<sup>2+</sup>-NTA HisBind Resin 为 Novagen 公司产品。

### 1.2 淋巴细胞的分离培养

无菌采集初生犊牛外周血,肝素抗凝,缓慢滴加在等量淋巴细胞分层液上,1000r/min 离心 20min 后,吸取血清与分层液之间的黄白色细胞层。PBS 洗涤 2 次后,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基(Gibco),37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 1h 后,弃去贴壁的单核细胞。调整细胞浓度为  $2.5 \times 10^6$ /mL,加入 500  $\mu$ g/mL PHA,37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 10h 后收集细胞。

### 1.3 RT-PCR 扩增 BovIFN- $\gamma$ 基因

根据 GenBank 中 BovIFN- $\gamma$  已知序列(GenBank accession: M29867)设计引物,由大连宝生物工程公司合成。上游引物为 P1:5'-gtcatgggagccaggcccaatttttagag-3',下划线为 BamH I 酶切位点。下游引物为 P2:5'-gctgcagaattcttacgttgatgctctccg-3',下划线为 HindIII 酶切位点。引物 P1 与 P2 扩增产物包括去除信号肽后的成熟肽编码区,预计长度为 446bp。按 Gibco 公司 TRIZOL 试剂提供的程序提取上述淋巴细胞的总 RNA。在 PCR 管加入总 RNA 5 $\mu$ L,70 $^{\circ}$ C 作用 5min 后冷却到 0 $^{\circ}$ C,依次加入 9.5 $\mu$ L 超纯水,5 $\mu$ L 5 $\times$  AMV 缓冲液,10mmol/L 2.5 $\mu$ L dNTP,1 $\mu$ L RNasin 和 1 $\mu$ L AMV 反转录酶,于 50 $^{\circ}$ C 反转录 60min,95 $^{\circ}$ C 5min 灭活反转录酶。PCR 扩增在 PCR 管中依次加入超纯水 34 $\mu$ L,10 $\times$  PCR 缓冲液 5 $\mu$ L,反转录产物 2 $\mu$ L,10mmol/L dNTP 1 $\mu$ L,引物 P1 和 P2 各 1 $\mu$ L(50 pmol),25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 25 $\mu$ L, TaqDNA 聚合酶 1 $\mu$ L。PCR 循环条件为 95 $^{\circ}$ C 5min,然后 94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1.5min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min,4 $^{\circ}$ C 10min。1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

### 1.4 BovIFN- $\gamma$ 基因的克隆与表达

用 EcoR I 和 BamH I 分别双酶切质粒载体 pET-28a 与 BovIFN- $\gamma$  基因的 PCR 产物,用试剂盒回收目的片段和载体, T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 水浴连接过夜,转化 DH5 $\alpha$  构建的重组质粒命名为

pETBovIFN- $\gamma$  酶切与测序(大连宝生物工程公司)鉴定。将空白载体和重组质粒分别转化大肠杆菌 BL21( DE3 ),用 IPTG 诱导对数生长期细菌表达。IPTG 终浓度为 1.0mmol/L,诱导时间为 3h。包涵体提取与纯化按常规方法<sup>[15]</sup>进行,10% SDS 鉴定重组蛋白的表达与纯度。溶解蛋白进一步用 Ni<sup>2+</sup>-NTA HisBind Resin 柱层析纯化。

### 1.5 动物免疫

用 BovIFN- $\gamma$  免疫 4 周龄的雌性 Balb/C 鼠各 5 只,按 100 $\mu$ g/只皮下注射福氏完全佐剂重组抗原,2 周后皮下注射等量福氏不完全佐剂抗原,2 周后皮下注射无佐剂的等量抗原。至少间隔 1 个月后,在融合前的第 3~5 天,选择抗体滴度高的 Balb/C 小鼠,按 200~300 $\mu$ g/只剂量脾内和尾静脉注射重组抗原,连续免疫 3d 后进行细胞融合与杂交瘤细胞的筛选鉴定。

用 BovIFN- $\gamma$  作为免疫抗原,按以上方法免疫两只 1.3kg 重的雌性日本长耳兔,首免抗原剂量为 100 $\mu$ g/只,二免与三免的抗原剂量为 150 $\mu$ g/只。三免后通过间接 ELISA 测定血清滴度。

### 1.6 细胞融合与筛选

无菌取小鼠脾细胞,将 SP2/O 和脾细胞按 1:5~1:10 比例混合后离心。弃上清,于 37 $^{\circ}$ C 水浴中加入预温的 50% PEG,静置 1.5min,滴加不含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 不完全培养基,然后 1000r/min 离心 10min,弃上清。加 RPMI 1640 完全培养基,接种 96 孔细胞培养板,置 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养。第 2 天换含 1% HAT RPMI 1640 完全培养基。14d 后换 1% HT 的完全培养基,挑选克隆。用牛 IFN- $\gamma$  蛋白作包被抗原,ELISA 检测培养液中的抗体,筛选阳性杂交瘤细胞,进一步克隆建株,并进行染色体数量鉴定<sup>[16]</sup>。

### 1.7 单克隆抗体的生产和效价测定

建株后的杂交瘤细胞扩大培养,收集上清液,用间接 ELISA 测定效价。取 8~10 周龄的小鼠,腹腔注射灭菌的液体石蜡 0.5mL/只,7~10d 后腹腔注射杂交瘤细胞  $5 \times 10^5 \sim 10^6$ /只,7~10d 后抽取小鼠腹水,离心取上清,用间接 ELISA 测定抗体效价,并冻存杂交瘤细胞。

### 1.8 单克隆抗体鉴定

单克隆抗体的亚类用间接 ELISA 鉴定,使用的二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG、G1 与 G2 $\alpha$ -HRP。

提取 BovIFN- $\gamma$  重组蛋白作为包被抗原,用间接 ELISA 和 Western blot 对 BovIFN- $\gamma$  单克隆抗体进行

特异性鉴定。用于特异性鉴定的非相关抗原包括: Ag85B、ESAT-6/CFP-10、PPD 与 GM-CSF 等。将 BovIFN- $\gamma$  蛋白进行 SDS-PAGE,转印硝酸纤维素膜,与单克隆抗体杂交,DAB 显色。

### 1.9 牛 IFN- $\gamma$ 的双抗体夹心 ELISA 的建立

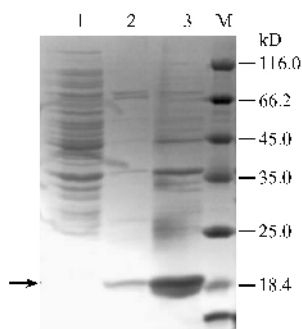
**1.9.1 抗体包被量和血清稀释度的确定** 选取 3 个单克隆抗体包被浓度(1 万、5 万和 10 万倍),及 4 个夹心抗体(兔抗 IFN- $\gamma$  多克隆抗体)浓度(1000、5000、1 万和 10 万),将 BovIFN- $\gamma$  稀释 100、200、400、1000、2000、4000、10000 和 50000 倍,进行夹心 ELISA 方阵滴定。以阳性对照 OD 值( $P$ ) $\geq 0.4$ 、阴性 OD<sub>630</sub> 值 $\leq 0.2$  为有效测试。以 OD<sub>630</sub> 值 $\geq 0.4$  时的最大稀释度为最佳稀释度。

**1.9.2 BovIFN- $\gamma$  的双抗体夹心 ELISA 操作程序** 按滴定结果用包被液(25mmol/L 碳酸盐缓冲液,pH9.6)适当稀释单克隆抗体 A10,每孔 100 $\mu$ L,置 4 $^{\circ}$ C 包被过夜,按常规方法洗涤(洗涤液:0.05% Tween-20 的 PBS,pH7.4)与封闭(封闭液:0.2% BSA)。用保温液(含 0.2% BSA、0.05% Tween-20 的 PBS,pH7.4)稀释抗原(重组 BovIFN- $\gamma$  纯化蛋白或全血刺激产物),每孔 100 $\mu$ L,置 37 $^{\circ}$ C 1h,洗涤 3 次。加保温液适当稀释的夹心兔抗 BovIFN- $\gamma$  多克隆抗体,每孔 100 $\mu$ L,置 37 $^{\circ}$ C 1h。洗涤 3 次,加封闭液稀释(1:10000)的 HRP 标记羊抗兔 IgG,每孔 100 $\mu$ L,置 37 $^{\circ}$ C 30min,洗涤 4 次。每孔 100 $\mu$ L TMB 底物液室温避光反应 10min,每孔加 50 $\mu$ L 终止液(0.25% 氢氟酸),室温 5min 后读取 630nm 处的吸光值(OD<sub>630nm</sub>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 BovIFN- $\gamma$ 基因的克隆鉴定与表达

利用 RT-PCR 技术,从 PHA 体外刺激培养的奶牛外周血淋巴细胞中扩增到预期大小(446bp)的目的条带。PCR 纯化产物经 EcoR I 和 BamH I 双酶切克隆至 pET-28a,获得重组质粒 pETBovIFN- $\gamma$  酶切鉴定与测序分析证实,所克隆基因为 BovIFN- $\gamma$  基因,与已知序列(GenBank 编号 M29867)的同源性为 100%。IPTG 诱导表达后,目标蛋白主要存在于包涵体中,纯化后浓度为 150 $\mu$ g/mL。10% SDS-PAGE 检测证实,其蛋白大小约为 18kD,与预期大小相符(图 1)。上清液中的表达蛋白用 Ni<sup>2+</sup>-NTA HisBind Resin 层析纯化。Western blot 表明重组蛋白含组氨酸标签。

图1 SDS-PAGE 鉴定 BovIFN- $\gamma$  的表达Fig.1 SDS-PAGE analysis of BovIFN- $\gamma$  expression

M:Protein marker SM-0431(MBI);1:Lysate of the BL21(DE3) transformed by pET-28a 2:Supernatant of the BL21(DE3) transformed by pETIFN- $\gamma$  encoding BovIFN- $\gamma$  gene 3:Inclusion bodies extracted from the BL21(DE3) transformed by pETIFN- $\gamma$  encoding BovIFN- $\gamma$  gene. The arrow shows the recombinant His-tagged BovIFN- $\gamma$  about 18kD.

## 2.2 BovIFN- $\gamma$ 单克隆抗体的鉴定

用提纯 BovIFN- $\gamma$  蛋白 3 次免疫 Balb/C 小鼠后,取尾静脉血进行 ELISA 分析。血清以 100 倍预稀释,之后倍比稀释。结果表明血清中抗 BovIFN- $\gamma$  抗体的效价为  $2^9 \times 100$ 。将免疫小鼠与 SP2/O 细胞融合,用 BovIFN- $\gamma$  包被酶板标,ELISA 检测杂交瘤细胞上清抗 BovIFN- $\gamma$  抗体以筛选阳性克隆孔,同时以空表达载体转化菌 BL21(DE3)裂解液及标准的提纯 BovIFN- $\gamma$  作为对照。经过多次检测,用有限稀释法克隆 3 次后获得 4 株稳定分泌抗 BovIFN- $\gamma$  单克隆抗体的杂交瘤细胞,将其分别命名为克隆 A7、A10、G6、G10。进一步以杂交瘤细胞诱生小鼠腹水,ELISA 检测 A7、G6 与 G10 的腹水抗体效价分别为  $100 \times 2^{11}$ 、 $100 \times 2^{10}$  与  $100 \times 2^{11}$ ,而 A10 的抗体效价高于  $100 \times 2^{11}$ (图 2)。以羊抗鼠 IgG、G1、G2 $\alpha$ -HRP 为酶标二抗,用间接 ELISA 鉴定单克隆抗体的亚类,结果表明四株单抗均为 IgG1。

杂交瘤细胞染色体计数表明,SP2/O 的染色体平均数为 70,脾细胞染色体为 40 条,而杂交瘤细胞的染色体数目在 79~94 之间。均高于两亲本细胞的染色体数目,证实这四株细胞均为杂交瘤细胞。

## 2.3 多克隆抗体的生产和效价测定

用重组 BovIFN- $\gamma$  免疫日本长耳兔,三免之后用间接 ELISA 测定血清效价。血清初始稀释度为 1:100,之后倍比稀释。结果表明,多克隆抗体的 ELISA 滴度达  $2^{10} \times 100$ 。

## 2.4 BovIFN- $\gamma$ 抗体的结合活性与特异性

Western-blot 与 ELISA 被用于鉴定抗体的结合特性。将 BovIFN- $\gamma$  进行 SDS-PAGE 分离,转印至硝酸

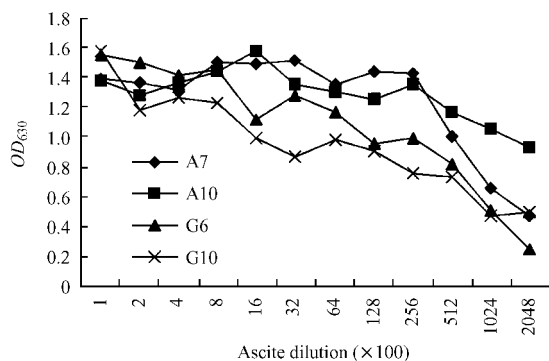
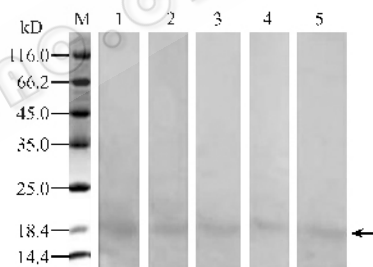


图2 A7、A10、G6、G10 杂交瘤细胞诱生的单克隆抗体腹水效价

Fig.2 ELISA titers of ascite induced by A7、A10、G6、G10 hybridoma cells

纤维膜上,分别用四株单抗与兔抗 BovIFN- $\gamma$  多抗作用,通过与相应的 HRP 标记二抗孵育及 DAB 显色后,结果表明抗体结合在预期大小的目标位置(18kD)(图 3)。

图3 Western-blot 检测单克隆抗体及多克隆抗体与 BovIFN- $\gamma$  结合能力Fig.3 Identification of affinity of the monoclonal (McAb) and polyclonal (PcAb) antibodies against BovIFN- $\gamma$  using Western blot analysis

M:protein marker(kD);1:PcAb;2:McAb A7;3:McAb A10;4:McAb G6;5:McAb G10. The arrow shows the recombinant His-tagged BovIFN- $\gamma$  about 18kD.

将 BovIFN- $\gamma$  或其它对照抗原(300ng/mL)包被 ELISA 板,检测与单克隆抗体的结合能力。结果表明,所有单克隆抗体均与 BovIFN- $\gamma$  反应良好, $OD_{630}$  值在 1 以上,而与其它非相关抗原(Ag85B,ESAT-6,CFP-10,GM-CSF)不反应, $OD$  值在 0.2 以下。

## 2.5 BovIFN- $\gamma$ 双抗体夹心 ELISA 条件优化

以抗体效价最高的 A10 株单抗为包被抗体,兔抗 BovIFN- $\gamma$  多抗为夹心抗体,HRP 标记羊抗兔 IgG 作为酶标二抗,进行 ELISA 方阵滴定,结果证明,在所选择的三个包被抗体稀释度 1 万、5 万与 10 万中,最佳稀释度为 1 万倍;夹心抗体四个稀释度 1 千、5 千、1 万与 10 万中,最佳稀释度为 1000 倍。在包被抗体 1 万倍稀释、夹心抗体 1000 稀释条件下

BovIFN- $\gamma$ 100 $\mu$ g/mL)稀释 50000 倍时,其 OD 值仍可达 0.8,此时 BovIFN- $\gamma$  的浓度为 2ng/mL(图 4)。

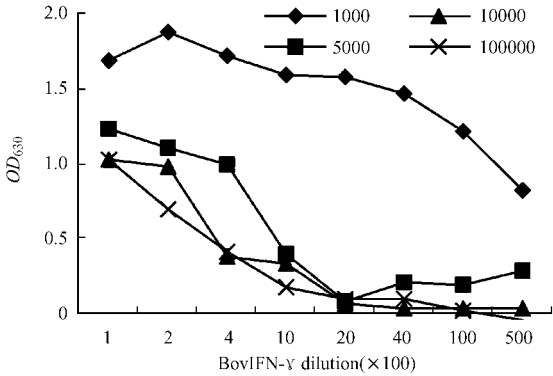


图 4 BovIFN- $\gamma$  与抗体最佳稀释度滴定

Fig.4 The titration of BovIFN- $\gamma$  and its antibodies. The figure represented 10000-fold diluted coated Monoclonal antibody reacted with different dilutions of BovIFN- $\gamma$  and the sandwich polyclonal antibody. The beginning concentration of BovIFN- $\gamma$  was 100 $\mu$ g/mL.

分别用 BovIFN- $\gamma$ 、Ag85B、ESAT-6/CFP-10、PPD 与 PHA 作为检测抗原,用建立的夹心 ELISA 方法测定,结果显示建立的间接夹心 ELISA 方法用于检测 BovIFN- $\gamma$  效果很好,而对其他抗原的检测均为阴性反应,证明建立的方法特异性良好。

### 3 讨论

由于 IFN- $\gamma$  在抗感染、调节免疫功能等方面的重要意义,国外学者对利用基因工程技术生产人重组 IFN- $\gamma$  进行了广泛研究<sup>[4-11]</sup>。BovIFN- $\gamma$  的体外表达研究方兴未艾。国内外学者分别对 BovIFN- $\gamma$  基因进行了大肠杆菌<sup>[3,13-14,17]</sup>、酵母<sup>[14,17-18]</sup>、昆虫细胞<sup>[19]</sup>等原核与真核表达,并证实了重组 BovIFN- $\gamma$  的抗感染活性<sup>[3,14,18,20]</sup>。本研究克隆并原核表达了 BovIFN- $\gamma$  基因,免疫学试验证明该重组蛋白具有免疫学活性。尽管未作抗病毒活性检测,相关研究已证实 BovIFN- $\gamma$  基因大肠杆菌表达产物具有抗病毒活性。该重组 BovIFN- $\gamma$  可望在牛感染性疾病的防治中发挥作用。

基于抗原特异性的 IFN- $\gamma$  反应可用于评价机体特异性细胞免疫状态的原理<sup>[2]</sup>,特异性抗原刺激的外周血淋巴细胞 IFN- $\gamma$  体外释放试验已被广泛用于抗感染诊断<sup>[8,9-11]</sup>。BovIFN- $\gamma$  诊断试验由于其高敏感度与特异性而在发达国家的牛结核病根除中发挥了重要作用<sup>[9-12]</sup>。这种诊断方法是以 BovIFN- $\gamma$  单

克隆抗体为基础建立的一种夹心 ELISA。将外周血淋巴细胞与特异性抗原共同孵育过夜,通过夹心 ELISA 检测培养上清中的 BovIFN- $\gamma$  浓度以诊断特异性感染。但目前国外公司生产的商品化试剂盒价格昂贵,每个样本的检测费用达数十元。为了进一步将 BovIFN- $\gamma$  应用于感染性诊断,本研究进行了单克隆抗体研制。以组氨酸标记的重组 BovIFN- $\gamma$  为抗原免疫小鼠,通过经典的杂交瘤技术,获得 4 株能稳定分泌高效价单克隆抗体的杂交瘤细胞系,利用这些细胞分别诱生了腹水。ELISA 与 Western blot 证明,所生产的单克隆抗体与 BovIFN- $\gamma$  结合效价高,特异性好。因此,这些单克隆抗体在牛感染性疾病诊断中具有重要的应用前景。

选用其中一株效价较高的单克隆抗体(A10)作为包被抗体,兔抗 BovIFN- $\gamma$  多克隆抗体作为夹心抗体,建立了检测 BovIFN- $\gamma$  的夹心 ELISA。通过方阵滴定获得了两种抗体的最佳稀释度。在该抗体稀释度条件下,对 BovIFN- $\gamma$  测定的灵敏度进行了检测,确定该夹心 ELISA 的检测灵敏度为 2ng/mL。国外的同类产品(Bovine IFN $\gamma$  Screening Set, Endogen 公司)可检测范围为 31.2pg/mL-2ng/mL。相比之下,本研究所建方法的灵敏度有待进一步提高。鉴于现研究结果中一抗(1 万倍)与夹心抗体(1000 倍)的最佳稀释度均为试验设置中的第一个稀释度,该方法可望通过方阵滴定进一步调整一抗与二抗的稀释度,充分优化反应条件,以提高检测灵敏度。

此外,本方法具有良好的特异性。由于目前市场上很难买到天然 BovIFN- $\gamma$ ,所以本研究应用的 BovIFN- $\gamma$  标准品及生产抗体用的抗原均为重组蛋白。但初步研究证明,所研制的 BovIFN- $\gamma$  单克隆抗体与多克隆抗体及建立的夹心 ELISA 同样适应于天然 BovIFN- $\gamma$ 。用该夹心 ELISA 方法测定了 22 头牛结核菌素皮内变态反应阳性牛的全血淋巴细胞体外 BovIFN- $\gamma$  的释放,结果 19 头为阳性,与皮试阳性符合率为 86.4%(资料未显示)。同时所建立的夹心 ELISA 对几种非相关性抗原的检测均为阴性,表明该方法的特异性良好。将该方法转化为特定感染的诊断方法将对牛重大疫病的防制具有重要意义。尤其是近年来,我国奶牛结核病发病呈上升趋势,而传统的结核菌素皮试检测对动物刺激大、操作复杂、与环境分枝杆菌间存在非特异性反应等缺点,开发具有自主知识产权的新型诊断方法对于我国结核病的根除具有深刻的现实意义与广阔的应用前景。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Liu H (刘皓), Jiao D (焦丹), Ge J (葛继乾). Current status and development analysis of interferon- $\gamma$  domestic market. *China Pharmaceuticals (中国药业)* 2001, **10**: 11 - 13.
- [ 2 ] Hao XS, Le JM, Vilcek J. Determination of human T cell activity in response to allogeneic cells and mitogens. An immunochemical assay for gamma-interferon is more sensitive and specific than a proliferation assay. *J Immunol Methods*, 1986, **92**: 59 - 63.
- [ 3 ] Xu J (许金俊), Qin AJ (秦爱建), Jin WJ (金文杰), et al. Cloning of bovine interferon-gamma gene and its expression in COS-1 cells. *Journal of Agricultural Biotechnology (农业生物技术学报)* 2004, **12**: 273 - 277.
- [ 4 ] Rodriguez MF, Patino PJ, Montoya F, et al. Interleukin 4 and interferon-gamma secretion by antigen and mitogen-stimulated mononuclear cells in the hyper-IgE syndrome: no TH-2 cytokine pattern. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1998, **81**: 443 - 447.
- [ 5 ] Agger EM, Andersen P. Tuberculosis subunit vaccine development: on the role of interferon-gamma. *Vaccine*, 2001, **19**: 2298 - 2302.
- [ 6 ] Tary-Lehmann M, Hricik DE, Justice AC, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay spot detection of interferon-gamma and interleukin 5-producing cells as a predictive marker for renal allograft failure. *Transplantation*, 1998, **66**: 219 - 224.
- [ 7 ] Kubota Y, Koga T, Nakayama J. *In vitro* released interferon-gamma in the diagnosis of drug-induced anaphylaxis. *Eur J Dermatol*, 1999, **9**: 559 - 560.
- [ 8 ] Sikand VK, Rothel JS, Martin RM. Diagnosis of Lyme borreliosis by a whole-blood gamma interferon assay for cell-mediated immune responses. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999, **6**: 445.
- [ 9 ] Desem N, Jones SL. Development of a human gamma interferon enzyme immunoassay and comparison with tuberculin skin testing for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1998, **5**: 531 - 536.
- [ 10 ] Perez AM, Ward MP, Ritacco V. Simulation-model evaluation of bovine tuberculosis-eradication strategies in Argentine dairy herds. *Prev Vet Med* 2002, **54**: 351 - 360.
- [ 11 ] Mylrea PJ. Eradication of bovine tuberculosis from New South Wales—a century of endeavour. *Aust Vet J*, 1990, **67**: 104 - 107.
- [ 12 ] Walravens K, Marche S, Rosseels V, Wellemans V, Boelaert F, Huygen K, Godfroid J. IFN-gamma diagnostic tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. *Vet Immunol Immunopathol* 2002, **87**: 401 - 406.
- [ 13 ] Pan Z (潘志明), Sun H (孙辉), Wang Y (王运吉). Cloning of bovine interferon- $\gamma$  gene in *E. coli*. *Journal of Dalian Institute of Light Industry (大连轻工业学院学报)* 2005, **24**(2): 106 - 109.
- [ 14 ] Shi X (史喜菊), Zhang C (张灿), Han CL (韩春来), et al. Expression of bovine interferon- $\gamma$  in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* and comparison of their antiviral activities. *Journal of Agricultural Biotechnology (农业生物技术学报)*, 2005, **13**(4): 461 - 467.
- [ 15 ] Sambrook J, Russell DW. *Molecule Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- [ 16 ] Guo A (郭爱珍), Chen W (陈万芳). Chromosome aberration of infertile colos. *Journal of Nanjing Agricultural University (南京农业大学学报)*, 1989, **12**(3): 65 - 70.
- [ 17 ] Kashima T, Morishita A, Iwata H, et al. Expression of bovine cytokines in *Escherichia coli*. *J Vet Med Sci*, 1999, **61**: 171 - 173.
- [ 18 ] Wedlock DN, Doolin EE, Parlane NA, et al. Effects of yeast expressed recombinant interleukin-2 and interferon-gamma on physiological changes in bovine mammary glands and on bactericidal activity of neutrophils. *J Dairy Res* 2000, **67**: 189 - 197.
- [ 19 ] Murakami K, Uchiyama A, Kokuho T, et al. Production of biologically active recombinant bovine interferon-gamma by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae. *Cytokine* 2001, **13**: 18 - 24.
- [ 20 ] Sentsui H, Murakami K, Inoshima Y, et al. Anti-viral effect of recombinant bovine interferon gamma on bovine leukaemia virus. *Cytokine* 2001, **16**: 227 - 231.