

人 IFN- γ 体外释放检测法的建立及其在结核病诊断中的应用

陈颖钰^{1,2}, 邓铨涛^{1,2}, 詹枝华³, 郭爱珍^{1,2}, 项杰³, 陈军⁴, 周金海³, 曾庆志⁴, 杜义祥⁴, 魏武⁵, 童庆伟⁵, 晁彦杰^{1,2}, 匡有吉^{1,2}, 陈焕春^{1,2}

- 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
- 3 武汉市结核病医院, 武汉 430083
- 4 武汉市结核病防治所, 武汉 430030
- 5 华中农业大学校医院, 武汉 430070

摘要: 本研究旨在建立人 IFN- γ 体外释放检测法, 用于人结核病的特异性诊断。克隆表达了人 IFN- γ 基因, 利用纯化的重组 IFN- γ 免疫小鼠, 获得两株高效价的单克隆抗体。用所获得的单克隆抗体及兔抗 IFN- γ 多克隆抗体建立了检测人 IFN- γ 的夹心 ELISA, 检测灵敏度达到 31.25 pg/mL。采集 111 位结核病阳性病人与 292 位临床健康对照者肝素抗凝全血, 利用结核菌特异性抗原 ESAT-6/CFP-10 融合蛋白体外刺激外周血淋巴细胞释放 IFN- γ , 用所建立的夹心 ELISA 及商品化试剂盒平行检测所有样本, 结果表明两种方法的检测结果相符。结核患者的检测灵敏度为 95.5%, 健康对照的阳性检出率为 16.7%, 患者与健康对照的阳性检出率差异极显著 ($P < 0.01$), 证实所建立的方法灵敏度与特异性均很高, 具有良好的应用前景。

关键词: 结核病, IFN- γ , 诊断, ELISA, ESAT-6/CFP-10, 单克隆抗体

Establishment of Human IFN- γ *in vitro* Release Assay and Its Application in Tuberculosis Diagnosis

Yingyu Chen^{1,2}, Quantao Deng^{1,2}, Zhihua Zhan³, Aizhen Guo^{1,2}, Jie Xiang³, Jun Chen⁴, Jinhai Zhou³, Qinzhi Zeng⁴, Wu Wei⁵, Qingwei Tong⁵, Yanjie Chao^{1,2}, Youji Kuang^{1,2}, and Huanchun Chen^{1,2}

- 1 The State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China
- 2 College of Veterinary Medicine, Hubei Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China
- 3 Wuhan Hospital for Tuberculosis, Wuhan 430083, China
- 4 Wuhan Institute of Tuberculosis Prevention and Treatment, Wuhan 430030, China
- 5 The Hospital of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: This study aimed to establish human IFN- γ (hIFN- γ) *in vitro* release assay and to apply it in diagnosis of human

Received: January 26, 2008; **Accepted:** March 26, 2008

Supported by: the National Basic Research Program(973)(No. 2006CB504401), Wuhan Municipality Key Technology R&D Program (No. 20066002056), "Eleventh Five-years" National Key Technology R&D Program Dairy Key Project (Nos. 2006BAD04A05, 2006BAD04A12).

Corresponding author: Aizhen Guo. Tel: +86-27-87286861; Fax: +86-27-87282608; E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

国家 973 项目(No. 2006CB504401), 武汉市科技攻关课题(No. 20066002056), 国家“十一五”科技攻关奶业重大专项(Nos. 2006BAD04A05, 2006BAD04A12)资助。

tuberculosis. Human IFN- γ gene was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant hIFN- γ was purified and used as immunogen to immunize mice and rabbits respectively. Monoclonal and polyclonal antibodies were respectively developed and a sandwich ELISA was established. The heparized whole blood from 111 active tuberculosis patients and 292 clinical healthy controls were collected. The blood was stimulated with tuberculosis specific fused antigen ESAT-6/CFP-10 and the plasma was collected for IFN- γ detection. The sensitivity for tuberculosis diagnosis was 95.5%, whereas the positive detection rate for the healthy controls was 16.7%. There was a significant difference between the patients and healthy controls ($P < 0.01$) indicating that this assay had a high sensitivity and specificity, and thus could be promising in tuberculosis diagnosis.

Keywords: tuberculosis, IFN- γ , diagnosis, ELISA, ESAT-6/CFP-10, monoclonal antibody

干扰素- γ (IFN- γ) 是 CD₄⁺ Th1 细胞、CD₈⁺ 细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞等在抗原(细菌、病毒等)及有丝分裂原(ConA 和 PHA 等)刺激下产生的一种细胞因子。IFN- γ 具有抗感染、抗肿瘤活性和免疫调节作用,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,在机体抗感染与免疫中发挥重要作用^[1]。基于 IFN- γ 与感染之间的密切联系,医学及兽医学上均利用病原体特异性抗原体外刺激单核细胞产生 IFN- γ 进行传染病诊断。该方法灵敏度与特异性均高,显示出很大的应用前景^[2, 3-7]。

结核病是由结核分枝杆菌引起的、人兽共患的慢性消耗性传染病,给人类健康带来严重威胁。据世界卫生组织 2005 年统计数据,结核病造成了全球 880 万新发病例和 160 万例死亡(WHO/HTM/TB/2006.362)。运用新型诊断方法对结核病进行早期诊断与治疗具有十分重要的意义,对痰涂阴性病例与肺外结核病例(结核性脑膜炎和胸腔积液病例等)这类难于诊断的结核病尤其重要。业已表明经典方法诊断这类病例较为困难。而 IFN- γ 体外释放检测具有很高的准确性^[5-7]。结核病潜伏感染的早期诊断与治疗性干预对结核病的防治也具有重要意义^[5, 8],为此,美国食品药品监督管理局(FDA)已批准将该方法用于结核病潜伏感染的检测^[9]。目前国际上已有 IFN- γ 体外释放检测商品试剂盒供应,如 Quanti-FERON-TB-GOLD(Cellestis Ltd.,Carnegie,Victoria, Australia)与 T-SPOT.TB test(Oxford Immunotec, Abingdon, UK),其原理是用致病型结核菌的特异性早期分泌蛋白 ESAT-6 和 CFP-10 作为诊断抗原,刺激外周血淋巴细胞产生 IFN- γ ,通过检测 IFN- γ 浓度诊断结核病。我国也有少数临床应用该类试剂盒的报道^[10,11],而这些试剂盒价格昂贵,普通消费者难以承受。为此,本研究克隆、表达和纯化了人 IFN- γ 基因,制备了 IFN- γ 单克隆与多克隆抗体,建立了检测人 IFN- γ 的

双抗体夹心 ELISA 方法,并在活动性肺结核的诊断中进行了初步应用。

1 材料和方法

1.1 材料

原核表达载体 pET28a 购自 Novagen 公司, EcoR I、Hind III、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)均由本实验室保存。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。羊抗鼠 IgG-HRP 和羊抗兔 IgG-HRP 购自 PIERCE 公司。牛结核菌素与禽结核菌素购自中国兽药监察所。牛重组 IFN- γ 为本实验室表达与保存。

1.2 人 IFN- γ 基因的克隆与表达

参考 GenBank 人 IFN- γ 的基因序列(GenBank Accession No. NM000619),在上海捷瑞生物工程有 限公司人工合成 IFN- γ 基因,克隆至 pUC-59 载体中,获得 pUC-59-hIFN- γ 。通过 EcoR I 和 Hind III 双酶切进一步将该基因亚克隆至表达载体 pET28a 中,构建的重组质粒命名为 pET28a-hIFN- γ 。质粒经酶切与测序(大连宝生物工程公司)鉴定正确。将空白载体和重组质粒分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)中,待细菌生长至对数期时,用 1.0 mmol/L IPTG 诱导 3 h,用 10% SDS-PAGE 检测重组人 IFN- γ (hIFN- γ)的表达,包涵体提取与纯化按常规方法进行^[12]:表达菌株扩大培养并诱导表达,离心收集菌体。菌体用 PBS(pH 7.4)洗涤 3 次,反复冻融 3 次,加溶菌酶至 50 g/mL,37°C 作用 30 min。超声波间隔破碎至溶液呈半透明。4°C 离心后弃上清,沉淀用 PBS 洗涤 2 次,用相当于原细菌培养液体积 1/10 的 PBS/十二烷基肌氨酸钠(0.3 mg/mL)溶液重悬。室温静置 1~2 h,使沉淀缓慢溶解。4°C 离心,收集上清,加入 PEG4000 至 0.2% (W/V)、氧化型谷光苷肽至 1 mmol/L、还原性谷光苷

肽至 2 mmol/L, 静置 30 min 以上。上述蛋白抽提液于 PBS(pH7.4)中透析 3 d, 分装, -20°C 保存备用。

1.3 人 IFN- γ 单克隆抗体及多克隆抗体制备

4 周龄的雌性 Balb/C 小鼠 5 只, 按 100 μ g/只皮下接种纯化的重组 IFN- γ , 首免等量福氏完全佐剂重组抗原, 2 周后加强免疫等量福氏不完全佐剂抗原, 2 周后再次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 300 μ g/只抗原剂量每天进行腹腔注射, 连续免疫 3 天后, 对小鼠进行尾静脉采血, 间接 ELISA 检测血清抗 hIFN- γ 抗体的效价。以 hIFN- γ 重组蛋白为抗原检测杂交瘤细胞上清抗 hIFN- γ 单克隆抗体以筛选阳性克隆孔, 用有限稀释法克隆 3 次后筛选能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞, 通过杂交瘤细胞染色体计数鉴定杂交瘤细胞的特征。进一步按常规方法进行细胞融合、杂交瘤细胞的筛选鉴定及单克隆抗体鉴定并制备腹水^[4]。用辛酸-硫酸铵法进行腹水单克隆抗体的提取与纯化^[13]。

同时, 将纯化的 hIFN- γ 按以上程序免疫 2 只 2.0 kg 体重的雌性日本长耳兔, 抗原免疫剂量为 500 μ g/只, 三免后通过间接 ELISA 测定血清抗体效价, 抗体滴度达到要求后放血, 制备高免血清, 抗体滴度大于 5×2^8 。

1.4 人 IFN- γ 体外释放方法的建立

1.4.1 IFN- γ 体外特异性释放

抽取全血于肝素抗凝管中, 将全血与 RPMI 1640 完全培养基(含 10%小牛血清, 100 u 青霉素, 100 μ g 链霉素)1:1 混合, 按 2 mL/孔分别加入 24 孔细胞培养板的 3 个孔中, 其中阳性对照含有 20 μ g 植物血凝素(PHA), 测试孔 20 μ g 结核菌特异性蛋白 CFP10/ESAT6 融合蛋白, 空白对照孔含 10 μ L 生理盐水。轻微振荡培养板, 使各孔试剂与血液充分混合, 于含 5% CO₂的细胞培养箱中 37°C 培养过夜。次日收集培养上清液, 夹心 ELISA 检测 IFN- γ 浓度^[4]。CFP10/ESAT6 融合蛋白为本实验室自行制备^[14]。

1.4.2 IFN- γ 检测夹心 ELISA 的建立

夹心 ELISA 的反应程序如下: 用包被液(25 mmol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6)适当稀释单克隆抗体, 按每孔 100 μ L 加入 ELISA 板孔中, 4°C 包被过夜。次日用 PBST(含 0.05% Tween20 的 PBS, pH7.4)充

分洗涤后加入 1%卵清白蛋白(OVA)37°C 封闭 1 h。用洗涤液稀释抗原(hIFN- γ 标准品或上述全血刺激培养上清), 每孔 100 μ L, 37°C 孵育 1 h, 重复洗涤。用洗涤液适当稀释的兔抗 hIFN- γ 多克隆抗体, 每孔 100 μ L, 37°C 孵育 1 h 后充分洗涤。加 1:10 000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG, 每孔 100 μ L, 37°C 30 min, 充分洗涤后每孔 100 μ L TMB/H₂O₂ 底物液, 室温避光反应 10 min 后, 每孔加入 50 μ L 终止液 (0.25%氢氟酸)终止反应, 读取波长 630 nm 的光密度值(OD)^[2]。方阵滴定确定最佳反应条件。单克隆抗体自 1 万倍起始、2 倍递增稀释至 16 万倍, 兔抗 hIFN- γ 多克隆抗体自 100 倍起始、2 倍递增稀释至 1600 倍, hIFN- γ 标准品(120 ng/mL)(R & D System)稀释度为 100、200、400、1000、2000、4000、10 000 和 50 000 倍。

1.5 结核病临床样本检测

111 例结核阳性病例为武汉市结核病医院与武汉市结核病防治所 2006 年 11 月至 2007 年 11 月间住院的典型活动性肺结核患者, 均经 HIV 筛查阴性, 排除有严重合并症者。292 位健康对照组者为某大学入学新生, 临床健康, 无结核病人接触史, 胸透无异常状况。商品化试剂盒 Duoset Human IFN- γ (R & D System)与本研究建立的 hIFN- γ 夹心 ELISA 对上述样本进行平行检测, 以比较方法的准确性。Duoset Human IFN- γ 的结果判断标准为: 当 $OD_{\text{阳性对照}} - OD_{\text{空白对照}} \geq 0.5$, $OD_{\text{(ESAT6/CFP10)抗原刺激}} - OD_{\text{空白对照}} \geq 0.35$ 时, 判为阳性; 当 $OD_{\text{阳性对照}} - OD_{\text{空白对照}} \geq 0.5$, $OD_{\text{(ESAT6/CFP10)抗原刺激}} - OD_{\text{空白对照}} < 0.35$ 时, 判为阴性。与本研究建立的 hIFN- γ 夹心 ELISA 判断标准参照 Duoset Human IFN- γ 的相关标准。

2 结果与分析

2.1 hIFN- γ 基因的克隆、表达纯化及抗体制备

对 hIFN- γ 重组质粒(pET28a-hIFN- γ)进行双酶切鉴定, 结果酶切片段的大小与预期相符(图 1A)。对重组质粒进行测序分析, 结果所克隆的基因序列与已知序列(GenBank Accession No. NM000619)的同源性为 100%。重组质粒转化菌 BL21 (DE3)/pET28a-hIFN- γ 经 IPTG 诱导后, 10% SDS-PAGE 证实 hIFN- γ 得以成功表达, 目标蛋白主要存在于包涵体中。

纯化后浓度为 500 μ g/mL, 大小约为 22 kD, 与预期大小相符(图 1B)。

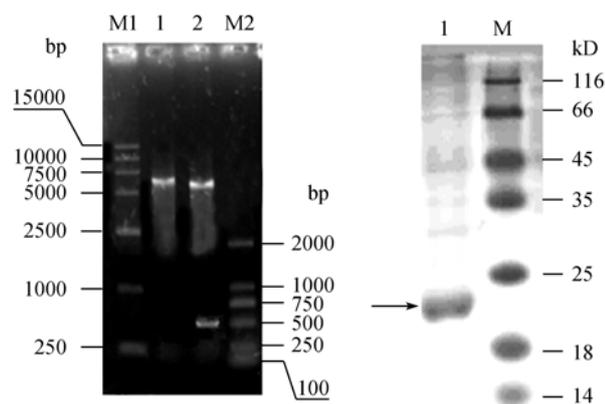


图 1 人 IFN- γ 基因的克隆与表达鉴定

Fig. 1 Cloning and expression of human IFN- γ

(A) Double digestion of pET28a-IFN- γ with *EcoR* I and *Hind* III
M1: 15000DL DNA ladder; 1: pET28a-IFN- γ undigested;
2: pET28a-IFN- γ digested by *EcoR* I and *Hind* III;
M2: 2000DL DNA ladder.

(B) SDS-PAGE of the expressed hIFN- γ

1: Inclusion bodies extracted from the BL21 (DE3) transformed by pET-hIFN- γ ; M: Protein marker SM-0431 (MBI). The arrow shows the recombinant His-tagged hIFN- γ about 22 kD

将纯化的重组 hIFN- γ 免疫小鼠, 3次免疫后, 血清中抗 hIFN- γ 抗体的 ELISA 效价高于 1×2^{14} 。以 hIFN- γ 重组蛋白为抗原检测杂交瘤细胞上清抗 hIFN- γ 单克隆抗体以筛选阳性克隆孔, 用有限稀释法克隆 3次后获得 2株稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞, 将其分别命名为 2号与 3号。进一步以杂交瘤细胞诱生小鼠腹水, ELISA 检测 2号与 3号的腹水抗体的 ELISA 效价均大于 5×2^8 。染色体计数表明, SP2/O 瘤细胞的染色体平均数为 70, 脾细胞染色体数为 40, 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。

将纯化的重组 hIFN- γ 免疫日本长耳兔, 三免之后获得的高免血清抗体的 ELISA 滴度大于 5×2^8 。

2.2 IFN- γ 夹心 ELISA 检测 IFN- γ 灵敏度与特异性

以抗体效价最高的单抗(3号)为包被抗体, 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, 单克隆抗体最佳稀释度为 16 000 倍, 夹心抗体最佳稀释度为 200 倍。

将以上抗体稀释度作为工作浓度, 测定不同稀释度的 hIFN- γ 标准品, 以判断该方法的灵敏度, 结果所检测的 hIFN- γ 标准品最低浓度为 31.25 pg/mL。平行检测结果表明该灵敏度高于商品试剂盒 Duoset Human IFN- γ (R & D System)的检测结果。

分别用 ESAT-6/CFP-10、牛结核菌素、禽结核

菌素、牛重组 IFN- γ 作为检测抗原, 用建立的夹心 ELISA 方法测定, 结果均为阴性反应, 证明建立的方法特异性良好。

2.3 IFN- γ 体外释放法诊断活动性肺结核的灵敏度与特异性

商业化试剂盒 Duoset Human IFN- γ 与本研究所建立的夹心 ELISA hIFN- γ 方法对病例组 111 个阳性样本与健康对照组 282 个样本进行了检测, 结果两种方法检测结果相符。病例组检测阳性率为 95.5%, 即检测灵敏度达 95.5%。健康对照组的阳性率为 16.7%, 卡方检验二者差异极显著($P < 0.01$), 表明所建立的方法具有良好的特异性。本研究用结核病诊断的阳性判断值(OD 值 0.35), 相当于健康对照组 IFN- γ 含量(OD 值)均值加 $1.64 \times SD$ (表 1)。

表 1 IFN- γ 体外释放法检测活动性肺结核的结果

Table 1 The results of IFN- γ release assay for diagnosis of active tuberculosis

	Patient No.	Control No.	Positive rates (%)
Positive No.	106.0	47.0	95.5
Negative No.	5.0	235.0	16.7
Total No.	111.0	282.0	

3 讨论

IFN- γ 又称 II 型干扰素, 是细胞免疫所分泌的细胞因子之一, 具有抗感染与免疫调节活性, 不仅能单独作为生物制剂应用于疾病的防治, 而且可作为免疫佐剂, 增强疫苗的免疫效果^[15]。同时, IFN- γ 作为感染特异性诱导产生的细胞因子, 被用于传染性疾病的诊断。该方法利用免疫细胞的记忆性, 将全血与特异性抗原共同孵育, 激发外周血淋巴细胞特异性产生 IFN- γ , 通过测定 IFN- γ 的释放量来判定是否感染。由于结果判断不依赖于临床症状, 可有效诊断潜伏感染并鉴别混合感染, 因而具有很高的灵敏度与特异性^[4,5]。本研究成功地克隆表达了人 hIFN- γ , 获得了两株高效价的 hIFN- γ 单克隆抗体, 建立了检测 hIFN- γ 的夹心 ELISA。与商业化试剂盒 Duoset Human IFN- γ 的平行检测表明该方法的检测灵敏度(31.25 pg/mL)达到市场上的同类产品。借助不同病原特异性抗原的体外刺激, 该方法可望用于人多种传染病的诊断^[15]。

细胞免疫在结核病的发病与免疫机理中具有十分重要的意义, hIFN- γ 是结核菌感染诱导的主要细

胞因子^[16]。国外已成功利用 IFN- γ 检测诊断活动性肺结核病, 诊断的准确性是现有各种方法中最高的, 并已开发了相应试剂盒供应市场^[4, 6, 9]。对于痰涂阴性、结核性脑膜炎和胸腔积液结核病例, 常规方法难以进行早期、快速与准确诊断, 因而急需新型诊断方法。相关研究表明: hIFN- γ 检测在这类结核病的诊断中具有重要价值^[3, 6, 10, 11]。

结核病潜伏感染检测是结核病诊断中的一大难题。结核菌感染者大部分(约 90%)处于潜伏感染状态, 临床检测及 X 光胸透不能发现异常状况^[4, 5]。此外, 由于儿童普遍实行卡介苗(BCG)计划免疫, 结核菌素(PPD)皮内变态反应因不能区分卡介苗免疫与结核菌感染而无法应用。我们对本研究的 58 位活动性肺结核病人与 46 健康对照者进行了 PPD 皮内变态反应, 以 PPD 皮内变态反应 ≥ 5 mm 为阳性标准, 病例组与健康对照组的阳性率分别为 79.3% (46/58) 和 74.2%(23/31), 二者无显著差异。因此, 用常规方法无法准确检测结核菌潜伏感染。基于以上原因, 本研究的健康对照组成员通过临床与 X 光胸透正常及无明显结核病接触史等条件入选。为了准确诊断结核病潜伏感染, 美国 FDA 已批准用 IFN- γ 体外释放检测法诊断人结核病潜伏感染^[9, 17]。国内这方面的研究较少, 只有少数国外试剂盒的应用报道^[10, 11]。本研究对结核病阳性病例灵敏度达 95.5%, 对健康对照者样本的阳性检出率为 16.7%, 二者具有显著差异。表明所建立的检测方法不但灵敏度高, 而且具有较好的特异性, 能区分感染者与健康对照者, 因而具有广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] Liu H, Jiao D. Current status and development analysis of interferon- γ domestic market. *China Pharmaceuticals*, 2001, **10**: 11–13.
- [2] Li C, Chen YY, Hu QY, *et al.* Preparation of Monoclonal Antibodies against recombinant bovine IFN-gamma and development of sandwich ELISA for bovine IFN-gamma detection. *Chin Biotech*, 2007, **21**: 40–45.
李川, 谭亚娣, 陈颖钰, 胡巧云, 马艳. 牛 IFN- γ 原核表达、单克隆抗体制备及其 ELISA 检测方法的建立. *生物工程学报*, 2007, **21**: 40–45.
- [3] Kösters K, Nau R, Bossink A, *et al.* Rapid diagnosis of CNS tuberculosis by a T-cell interferon-gamma release assay on cerebrospinal fluid mononuclear cells. *Infection*, 2008, **1**(12)[Epub ahead of print].
- [4] Karam F, Mbow F, Fletcher H, *et al.* Sensitivity of IFN-gamma release assay to detect latent tuberculosis infection is retained in HIV-infected patients but dependent on HIV/AIDS. *Progression*, 2008, **3**: 1441.
- [5] Brodie D, Lederer DJ, Gallardo JS, *et al.* Use of an interferon-gamma release assay to diagnose latent tuberculosis infection in the foreign-born. *Chest*, 2008, **1**: 869–874.
- [6] Ariga H, Kawabe Y, Nagai H, *et al.* Diagnosis of active tuberculous serositis by antigen-specific interferon-gamma response of cavity fluid cells. *Clin Infect Dis*, 2007, **45**: 1559–1567.
- [7] Beamer GL, Flaherty DK, Vesosky B, *et al.* Peripheral blood interferon-gamma release assays predict lung responses and *Mycobacterium tuberculosis* disease outcome in mice. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, **1**: 474–483.
- [8] Okada K, Mao TE, Mori T, *et al.* Performance of an interferon-gamma release assay for diagnosing latent tuberculous infection in children. *Epidemiol Infect*, 2007, **1**: 1179–1187.
- [9] U.S. Food and Drug Administration. 2005. Center for Devices and Radiological Health: QuantiFERON-TB-P010033-S006. Premarket approval database. [Online.] http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMA/PMA.cfm?ID_3372.
- [10] Wu SX, Chen XG, Li SM, *et al.* Significance of detecting interferon (IFN)-gamma in cerebrospinal fluid in the diagnosis of tuberculous meningitis. *Central China Med J*, 2006, **1**: 41–42.
巫顺秀, 陈显光, 李森美, 等. 脑脊液 γ -干扰素检测对结核性脑膜炎诊断价值的探讨. *中华医学杂志*, 2006, **1**: 41–42.
- [11] Li TX. The value of interferon- γ and adenosine deaminase in diagnosis of tuberculosis and malignant pleural fluid. *J Diagn Concepts Pract*, 2006, **2**: 1222–1223
李铁成. γ -干扰素、腺苷脱氨酶对结核和非结核性胸腔积液的诊断价值. *诊断学理论与实践*, 2006, **2**: 1222–1223
- [12] Sambrook J, Russell DW. *Molecule Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- [13] Lu XD, Zhang XY, Zhang YH. Production, characterization and purification of monoclonal antibodies against antigens of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. *Chinese J Tuberc Respir Dis*, 2000, **23**: 672–675.
陆学东, 张小艳, 张银辉. 结核分枝杆菌 H₃₇RV 菌株体抗原单克隆抗体制备、特性分析及纯化. *中华结核与呼吸杂志*, 2000, **23**: 672–675.
- [14] Zhang GR, Wan XJ, Chen YY, *et al.* Development and primary application of indirect ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium bovis*. *Chin J Prev Vet Med*, 2007, **29**: 555–560.
张桂荣, 万学济, 陈颖钰, 等. 间接 ELISA 检测牛分枝杆菌抗体方法的建立及初步应用. *中国预防兽医学报*, 2007, **29**: 555–560.
- [15] Wang SJ. Observation of supplementary treatment effect of IFN-Gamma in treating re-treatment pulmonary tuberculosis patients. *Chin J Misdiagn*, 2007, **19**: 4505–4506.
王守京. γ 干扰素辅助治疗复治肺结核近期疗效观察. *中国误诊学杂志* 2007, **19**: 4505–4506.
- [16] Xie L. IFN-Gamma and Tuberculosis. *In J Respir*, 2005, **1**: 7–13.
谢莉. γ 干扰素与结核病 结核病与胸部肿瘤, 2005, **1**: 7–13.
- [17] Mazurek GH, Villarino ME. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*, 2003, **52**: 15–18.