

## 牛结核 $\gamma$ 干扰素 ELISPOT 检测方法的建立

徐正中, 单法, 单锋丽, 孟闯, 解晓莉, 刘佳莹, 闵晶晶, 陈祥, 焦新安

扬州大学 江苏省人兽共患病学重点实验室 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

徐正中, 单法, 单锋丽, 等. 牛结核  $\gamma$  干扰素 ELISPOT 检测方法的建立. 生物工程学报, 2015, 31(2): 183–194.

Xu ZZ, Shan F, Shan FL, et al. Development of an interferon-gamma ELISPOT for bovine tuberculosis. Chin J Biotech, 2015, 31(2): 183–194.

**摘要:** 本研究旨在建立一种牛结核  $\gamma$  干扰素 ELISPOT 检测方法, 并评价该方法用于牛结核病检测的价值。通过筛选与天然牛  $\gamma$  干扰素特异性结合的单克隆抗体分别作为包被抗体和检测抗体, 并探索不同的实验条件确定最佳包被抗体浓度、最佳细胞数量和最佳检测抗体浓度等, 建立牛  $\gamma$  干扰素 ELISPOT 检测方法。采集 30 头奶牛尾静脉血并分离外周血单个核细胞, 以结核菌素作为刺激原, 使用建立的 ELISPOT 检测方法进行牛结核病检测, 并与 BOVIGAM<sup>TM</sup> ELISA 试剂盒检测结果进行比较。筛选到两株与天然牛  $\gamma$  干扰素特异性结合的单抗 2G5 和 5E11, 确定 ELISPOT 检测方法的最佳实验条件为: 包被抗体 2G5 浓度 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每孔细胞数量  $2.5 \times 10^5$  个, 检测抗体 Bio-5E11 浓度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。使用建立的 ELISPOT 检测方法与 BOVIGAM<sup>TM</sup> ELISA 试剂盒对 30 头奶牛进行同步检测, 结果显示, 以 BOVIGAM<sup>TM</sup> ELISA 试剂盒检测结果作为参考标准, 14 头 BOVIGAM<sup>TM</sup> ELISA 试剂盒检测阳性牛中, ELISPOT 方法检出的阳性牛为 11 头, 敏感性为 78.6% (11/14); 16 头 BOVIGAM<sup>TM</sup> ELISA 试剂盒检测阴性牛中, ELISPOT 方法检出的阴性牛为 12 头, 特异性为 75% (12/16)。应用结核菌素作为刺激原的牛结核  $\gamma$  干扰素 ELISPOT 检测方法可用于牛结核病辅助检测, 具有潜在的临床应用价值。

**关键词:** 牛  $\gamma$  干扰素, ELISPOT, 结核菌素, 牛结核病

**Received:** May 19, 2014; **Accepted:** September 11, 2014

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB518805), National Spark Program (No. 2014GA690017), NSF of Yangzhou (No. YZ2014027), Jiangsu Training Program for College Students to Innovate and Start Enterprise (No. 201411117069X), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

**Corresponding author:** Xin'an Jiao. Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Xiang Chen. Tel: +86-514-87971136; E-mail: chenxiang@yzu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB518805), 国家星火计划 (No. 2014GA690017), 扬州市自然科学基金 (No. YZ2014027), 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目 (No. 201411117069X), 江苏高校优势学科建设工程项目资助。

# Development of an interferon-gamma ELISPOT for bovine tuberculosis

Zhengzhong Xu, Fa Shan, Fengli Shan, Chuang Meng, Xiaoli Xie, Jiaying Liu, Jingjing Min, Xiang Chen, and Xin'an Jiao

*Jiangsu Key Lab of Zoonosis, Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China*

**Abstract:** We established an ELISPOT for bovine interferon-gamma (BoIFN- $\gamma$ ), and applied it in the diagnosis of bovine tuberculosis (bTB). Monoclonal antibodies that can bind with native BoIFN- $\gamma$  were screened as the coating antibody and detecting antibody. After optimization of detecting conditions including coating antibody concentration, cell number, and detecting antibody concentration, the ELISPOT assay was established. Peripheral mononuclear cells (PBMCs) isolated from 30 cows were co-cultured with PPD, and detected with the ELISPOT assay. The optimal conditions of ELISPOT assay were 2.5  $\mu\text{g/mL}$  coating antibody 2G5,  $2.5 \times 10^5$  cells/well, and 1  $\mu\text{g/mL}$  detecting antibody Bio-5E11. In these 30 cows tested both with the ELISPOT assay and the BOVIGAM<sup>TM</sup> kit, 11 cows were proved to be positive in ELISOPT assay with the sensitivity of 78.6%, and 12 cows were proved to be negative in ELISOPT assay with the specificity of 75%. The ELISPOT assay for BoIFN- $\gamma$  could be used to detect bTB efficiently and it might be an alternative method for the diagnosis of bTB.

**Keywords:** bovine interferon-gamma, enzyme-linked immunospot assay, tuberculin, bovine tuberculosis

$\gamma$ 干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 主要是由被有丝分裂原或特异性抗原刺激而活化的CD4<sup>+</sup> Th1细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞及NK细胞等产生的一种重要的细胞因子, 具有抗病毒、抗肿瘤活性以及免疫调节功能, 是机体防御系统的重要组成部分<sup>[1]</sup>。内源性IFN- $\gamma$ 水平的高低在一定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重要指标。动物 $\gamma$ 干扰素及其单克隆抗体 (mAb) 在畜牧兽医领域有着广泛的应用<sup>[2]</sup>, 因此将基因重组牛IFN- $\gamma$  (rBoIFN- $\gamma$ ) 及其mAb用于牛病的研究, 建立抗原特异性BoIFN- $\gamma$  ELISPOT试验用于多种牛疫病的检测, 尤以在牛结核病诊断中的应用具有十分重要的意义。目前, IFN- $\gamma$ 释放试验已

经在牛结核病检测中得到广泛应用, 包括免疫胶体金技术<sup>[3]</sup>、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)<sup>[4-7]</sup>。ELISPOT技术是上世纪80年代出现, 并逐渐发展和完善起来的可以从单细胞水平检测特异性抗体分泌细胞及特异性细胞因子分泌细胞的一种免疫学研究技术, 具有稳定性好、敏感性高、特异性好等一系列优点<sup>[8]</sup>。目前国内外有许多学者致力于以结核分枝杆菌特异性抗原为刺激原的ELISPOT方法的建立及其在人结核病诊断中的应用<sup>[9-13]</sup>, 用于人结核病诊断的ELISPOT商品化试剂盒也已问世并得到广泛应用, 由英国Oxford Immunotec公司生产的T-SPOT TB试剂盒是通过结核分枝杆菌特异的6 kDa早期分泌性抗原靶和培养滤液蛋白10多肽进行刺激结核致敏T淋巴细

胞分泌干扰素,并应用ELISPOT方法检测分泌IFN- $\gamma$ 的T淋巴细胞用于人类结核病的检测。到目前为止,关于建立牛 $\gamma$ 干扰素ELISPOT方法应用于牛结核病检测的相关研究,国内尚未见报道。因此本研究筛选出两株与天然牛 $\gamma$ 干扰素反应的特异性单抗2G5和5E11,并以结核菌素为刺激原,建立了牛结核 $\gamma$ 干扰素ELISPOT检测方法,并对该方法在牛结核病检测过程中的效果进行了初步评价。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及主要试剂

进行牛外周血单个核细胞分离制备的健康奶牛选择于扬州大学实验农牧场。

进行牛结核病检测的30头实验用黑白花奶牛(皮试变态反应结果初步显示其中9头为牛结核阳性,4头为牛结核疑似阳性,17头为牛结核阴性)选择于江苏地区某奶牛场。

牛外周血单个核细胞分离液购自天津灏洋生物有限公司;96孔滤膜板购自Millipore公司;1640培养基和胎牛血清购自GIBCO公司;美洲商陆(PWM)购自Sigma公司;亲和素-碱性磷酸酶结合物购自BD公司;底物液5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸和四唑硝基蓝(BCIP/NBT)购自eBioscience公司;BOVIGAM<sup>TM</sup> *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for cattle以及禽型PPD和牛型PPD均购自Prionics公司。

针对牛 $\gamma$ 干扰素特异性单抗为本实验室制备<sup>[14]</sup>。

### 1.2 牛外周血单个核细胞分离的制备

无菌采取5 mL健康奶牛尾静脉血加入含肝素钠的采血管,在采集血液后颠倒混匀得到抗凝

血。将抗凝血与灭菌PBS 1:1稀释后,再按1:1的比例将稀释牛血缓缓加入含牛淋巴细胞分离液的无菌离心管中,形成明显界面,在室温下2 000 r/min离心20–30 min。可见外周血单个核细胞存在于云雾状层中,用灭菌滴管吸取淋巴细胞层至干净的离心管中,加入灭菌PBS,将细胞混匀后,于室温2 000 r/min离心10 min,重复两次。弃去上清培养液,加入完全1640培养基重悬沉淀细胞,取10  $\mu$ L细胞悬液加入10  $\mu$ L台盼蓝混匀后,取样加入血球计数板,在显微镜下进行计数。

### 1.3 牛 $\gamma$ 干扰素 ELISPOT 检测方法的建立

#### 1.3.1 间接免疫荧光方法筛选抗体

参照文献[15]方法,将Sf9细胞铺于24孔板中,10<sup>5</sup>细胞/孔,于27  $^{\circ}$ C细胞培养箱中过夜培养12 h,使之贴壁,将P3代重组牛 $\gamma$ 干扰素杆状病毒保存液按1:100的体积比感染Sf9细胞,待细胞病变达90%以上时,弃去培养上清;PBS洗3次,加入预冷甲醇500  $\mu$ L/孔,固定15 min;PBS洗3次,加入1:1 000的牛 $\gamma$ 干扰素特异性单抗,37  $^{\circ}$ C孵育2 h;PBS洗涤3次,加入1:500稀释的FITC-羊抗鼠IgG,1 mL/孔,37  $^{\circ}$ C孵育2 h;PBS洗涤3次,于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

#### 1.3.2 阻断 ELISA 方法筛选抗体

在96孔细胞培养板中,将倍比稀释的牛 $\gamma$ 干扰素特异性单抗分别与含天然BoIFN- $\gamma$ 的阳性血浆(PWM刺激牛外周血制备)和阴性血浆混合,37  $^{\circ}$ C孵育2 h;把单抗与血浆的混合物相应地加入到已包被0.5  $\mu$ g/mL的rHis-BoIFN- $\gamma$ 的ELISA板中,100  $\mu$ L/孔,37  $^{\circ}$ C孵育2 h;PBST洗3次,拍干,加入工作浓度的HRP-羊抗鼠IgG,

100  $\mu\text{L}$ /孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h; PBST 洗 3 次, 拍干, TMB 显色, 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 酶标仪读出  $OD_{450}$  的吸光值。

### 1.3.3 相加 ELISA 方法鉴定抗原表位

通过相加 ELISA 实验确定不同牛  $\gamma$  干扰素特异性单抗是否针对同一抗原表位, 首先根据腹水效价确定每株单抗腹水与所选包被抗原量反应的饱和度, 然后将相加的两株单抗按饱和度分别进行稀释与包被的重组牛  $\gamma$  干扰素抗原反应, 同时将两株腹水混合使各自达到饱和再与包被的重组牛  $\gamma$  干扰素抗原反应, 测得 3 组 ELISA 反应  $OD$  值分别记为  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_1+2$ , 计算相加指数  $AI = (2 A_1+2 / A_1+ A_2) - 1$ , 若两株单抗  $AI > 50\%$ , 则表明两株单抗针对抗原表位不同。

### 1.3.4 ELISPOT 操作步骤的确定

参考文献[16]方法, 使用包被液稀释的捕获抗体 2G5 加入 96 孔滤膜板, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 4  $^{\circ}\text{C}$  无菌过夜包被; 弃包被液, 使用含有 0.05% 吐温的灭菌 PBST 洗板 3 次, 5 min/次; 加入含 10% 胎牛血清的完全 1640 培养基, 200  $\mu\text{L}$ /孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育封闭 2 h; 弃封闭液, 使用 PBST 洗板 1 次, 将 96 孔滤膜板直接用于检测或置 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。在上述包被的 96 孔滤膜板中加入 50  $\mu\text{L}$  刺激原, 并设立对照组, 然后每孔加入 50  $\mu\text{L}$  牛外周血单个核细胞悬液, 将 96 孔滤膜板置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 48 h; 将 96 孔滤膜板取出, 弃培养上清, 使用 PBST 洗板 5 次, 5 min/次, 洗板后甩干。加入稀释的牛  $\gamma$  干扰素检测抗体 Bio-5E11, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h; 用 PBS 洗板 3 次, 5 min/次, 洗板后甩干, 加入 1 : 1 000 稀释的亲和素-碱性磷酸酶结合物, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$

底物液 BCIP/NBT, 放置于室温避光显色。在 96 孔滤膜板中加入纯净水终止反应, 去除液体, 室温下过夜或 37  $^{\circ}\text{C}$  烤箱中 2-3 h 烘干; 将 96 孔滤膜板放入 ELISPOT 仪中, 对实验结果进行扫描计数和分析。

### 1.3.5 最佳包被抗体浓度的确定

使用包被液稀释捕获抗体 2G5 至 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 加入 96 孔滤膜板, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 各设 3 个重复孔, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜包被, 弃包被液, 进行洗涤和封闭后备用。其他步骤均按照 1.3.4 中 ELISPOT 操作程序。

### 1.3.6 最佳细胞数量的确定

在上述包被的 96 孔滤膜板中加入 50  $\mu\text{L}$  完全 1640 培养基至每个对照孔, 加入 50  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PWM 至每个检测孔。每孔加入 50  $\mu\text{L}$  牛外周血单个核细胞悬液, 细胞数量分别为  $1.25 \times 10^5$  细胞/孔、 $2.5 \times 10^5$  细胞/孔、 $5 \times 10^5$  细胞/孔和  $1 \times 10^6$  细胞/孔, 各设 3 个重复孔, 将 96 孔滤膜板置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 48 h。其他步骤均按照 1.3.4 中 ELISPOT 操作程序。

### 1.3.7 最佳检测抗体浓度的确定

将 96 孔滤膜板取出, 弃培养上清, 使用 PBST 洗板 5 次, 5 min/次, 洗板后甩干。分别加入稀释至 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的牛  $\gamma$  干扰素检测抗体 Bio-5E11, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 各设 3 个重复孔, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。其他步骤均按照 1.3.2 中 ELISPOT 操作程序。

## 1.4 ELISPOT 方法和 BOVIGAM<sup>TM</sup> ELISA 试剂盒同步进行牛结核病检测

无菌采集 30 份奶牛尾静脉血, 将抗凝血加入到 24 孔细胞培养板, 每头牛抗凝血分装 3 孔, 1 mL/孔, 各孔分别加入相应的刺激原 (PBS、

Avian PPD、Bovine PPD), 充分混匀,  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 24 h, 吸取 50  $\mu\text{L}$  上层血浆作为待检样品用于牛结核外周血 IFN- $\gamma$  释放试验的检测<sup>[16]</sup>, 参照 BOVIGAM™ *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for cattle 说明书进行。

在 96 孔滤膜板中分别加入 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的捕获牛  $\gamma$  干扰素抗体 2G5, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 4  $^\circ\text{C}$  过夜包被。弃包被液, 进行洗涤和封闭后备用。对上述奶牛场 30 头奶牛分别无菌采取 5 mL 尾静脉血加入含肝素钠的抗凝管, 进行牛外周血单个核细胞的制备和计数。在上述包被的 96 孔滤膜板中分别加入 50  $\mu\text{L}$  培养液至每个对照孔、50  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的禽型 PPD、50  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的牛型 PPD 至每个检测孔。分别加入 50  $\mu\text{L}$  每头牛的外周血单个核细胞悬液至培养液对照孔、禽型 PPD 和牛型 PPD 检测孔, 将 96 孔滤膜板置于 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 48 h。将 96 孔滤膜板取出, 弃培养上清并进行洗涤, 加入 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的牛  $\gamma$  干扰素检测抗体 Bio-5E11, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 置于 37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h。用 PBS 洗板 3 次, 5 min/次, 洗板后甩干, 加入 1 : 1 000 稀释的亲合素-碱性磷酸酶结合物, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 置于 37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  底物液 BCIP/NBT, 放置于室温避光显色。在 96

孔滤膜板中加入纯水终止反应, 对实验结果进行扫描计数和分析。

## 2 结果

### 2.1 牛 $\gamma$ 干扰素 ELISPOT 检测方法的建立

#### 2.1.1 间接免疫荧光方法筛选抗体

为了鉴定制备的牛  $\gamma$  干扰素特异性单抗是否与真核系统表达的牛  $\gamma$  干扰素蛋白有较好的反应性, 本实验以制备的牛  $\gamma$  干扰素特异性单抗为一抗分别检测重组牛  $\gamma$  干扰素杆状病毒感染 Sf9 细胞, 结果显示, 2G5 和 5E11 等单抗检测的感染重组杆状病毒的 Sf9 细胞出现明显绿色荧光, 而 4D3 和 5B8 等单抗检测的感染重组杆状病毒的 Sf9 细胞没有出现明显绿色荧光 (图 1)。

#### 2.1.2 阻断 ELISA 方法筛选抗体

为了进一步筛选具有高亲和力, 与天然牛  $\gamma$  干扰素可以特异性结合的单抗, 本实验采用阻断 ELISA 方法, 检测各株单抗与阳性血浆中天然牛  $\gamma$  干扰素蛋白的反应性。结果表明, 2G5 和 5E11 等单抗与阳性血浆具有一定的反应性, 而 6F8 和 8F8 等单抗与阳性血浆混合后, 并没有明显的阻断效果 (图 2)。表明 2G5 和 5E11 等单抗与天然牛  $\gamma$  干扰素蛋白有着更好的反应性。

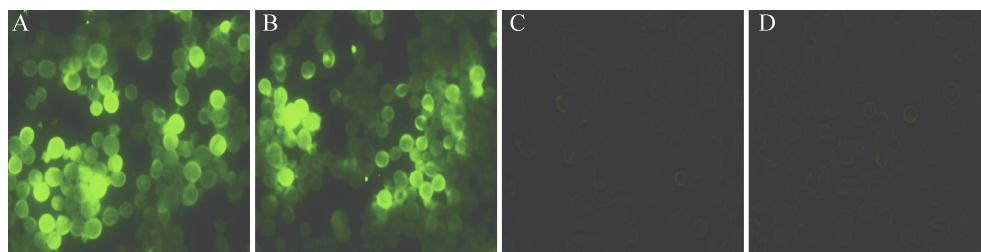


图 1 间接免疫荧光鉴定单抗

Fig. 1 Identification of mAbs in IFA. (A, B) Sf9 cells detected with antibody 2G5 and 5E11. (C, D) Sf9 cells detected with antibody 4D3 and 5B8.

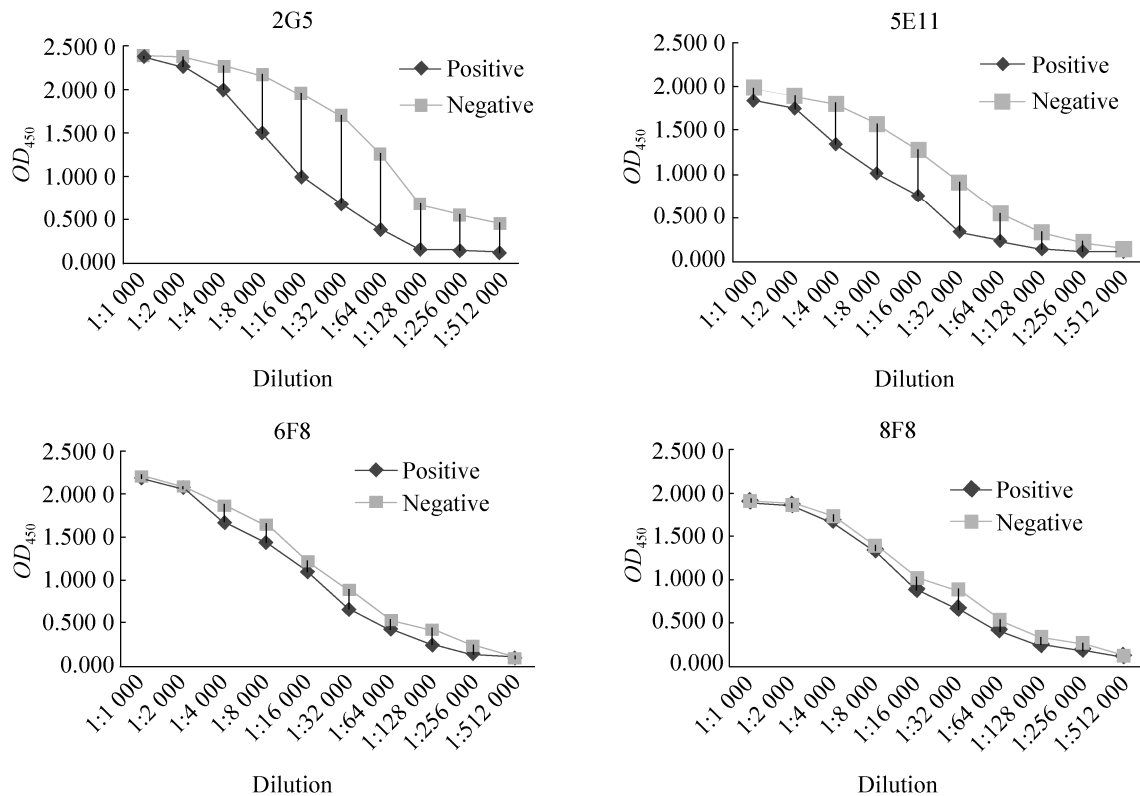


图2 阻断 ELISA 方法鉴定单抗

Fig. 2 Identification of mAbs in blocking ELISA.

### 2.1.3 相加 ELISA 方法鉴定抗原表位

为了鉴定筛选到的高亲和力单抗 2G5 和 5E11 是否针对牛  $\gamma$  干扰素同一抗原表位及便于单抗的进一步应用,本实验采用相加 ELISA 方法,检测各株单抗针对牛  $\gamma$  干扰素抗原表位情况。结果显示,单抗 2G5 和 5E11 进行相加 ELISA 检测 AI 值  $> 50\%$ , 表明两株单抗对抗原表位不同。

### 2.1.4 最佳包被抗体浓度的确定

为了确定最佳包被抗体浓度,将捕获牛  $\gamma$  干扰素抗体 2G5 分别稀释至  $1.25 \mu\text{g/mL}$ 、 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $5 \mu\text{g/mL}$  和  $10 \mu\text{g/mL}$  进行包被,结果显示在非特异性刺激原 PWM 的作用下,实验组斑点数随着包被浓度的提高而有所增加,但是

并不明显,包被浓度为  $2.5 \mu\text{g/mL}$  时,检测孔的斑点数在 100 个左右,便于计数,而且阴性对照组斑点数较少,因此选择  $2.5 \mu\text{g/mL}$  包被浓度比较合适 (图 3)。

### 2.1.5 最佳细胞数量的确定

为了确定最佳刺激细胞数量,在 96 孔滤膜板中分别加入了  $1.25 \times 10^5$ 、 $2.5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $10 \times 10^5$  制备的牛外周血单个核细胞,并加入刺激原进行孵育培养和检测。结果显示,随着细胞数量的增加,斑点数目显著增多,加入细胞数量为  $2.5 \times 10^5$  时,96 孔滤膜板中斑点数目在 100 左右,便于计数。随着细胞数量的增多,阴性对照孔中的斑点数也有所增加,因此确定  $2.5 \times 10^5$  为最佳细胞数目 (图 4)。

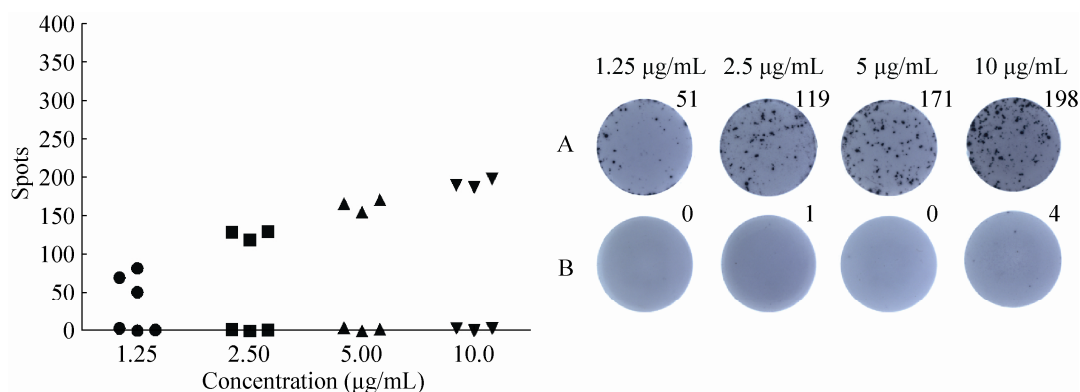


图3 包被抗体浓度对于检测斑点数的影响

Fig. 3 Effects of concentrations of coating antibody on spot numbers. Spot numbers (Left) and spot forming pictures (Right) of ELISPOT assay using different concentration of coating antibody. (A) Peripheral mononuclear cells with PWM. (B) Peripheral mononuclear cells without PWM.

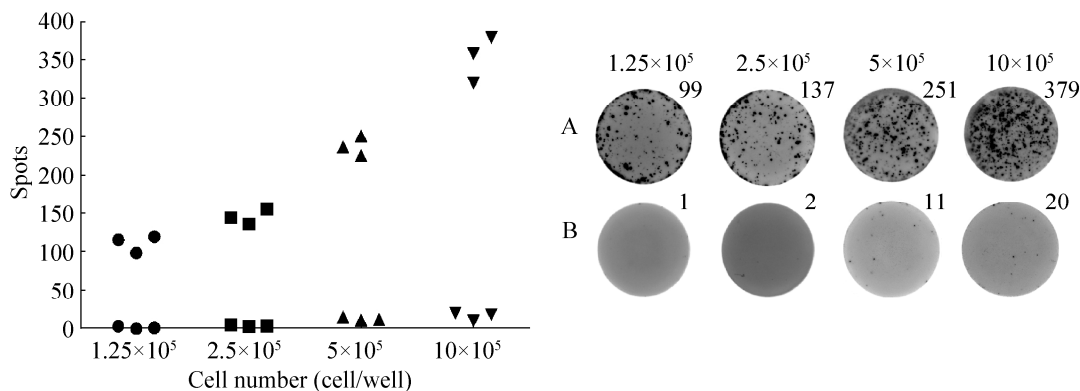


图4 细胞数量对于检测斑点数的影响

Fig. 4 Effects of cell number on spot numbers. Spot numbers (Left) and spot forming pictures (Right) of ELISPOT assay using different cell number. (A) Peripheral mononuclear cells with PWM. (B) Peripheral mononuclear cells without PWM.

### 2.1.6 最佳检测抗体浓度的确定

为了确定最佳检测抗体浓度, 本实验将牛  $\gamma$  干扰素检测抗体 Bio-5E11 分别稀释至 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、2  $\mu\text{g/mL}$  和 4  $\mu\text{g/mL}$  加入 96 孔滤膜板进行检测, 结果显示斑点数目随着检测抗体浓度的提高明显增多, 包被浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$  时检测孔的斑点数为较为合适, 并且随着检测抗体浓度的提高, 阴性对照孔中的斑点本底数也有所提高, 因此确定 1  $\mu\text{g/mL}$  为最佳检测抗体浓度 (图 5)。

### 2.2 ELISPOT 方法进行牛结核病的检测

本研究中使用牛结核  $\gamma$  干扰素 ELISPOT 方法对总共 30 头奶牛进行了牛结核病检测, 参考文献[8-10]并结合本研究实际设定判定标准, 如果牛型 PPD 刺激孔中斑点数减去 PBS 对照孔中的斑点数以及牛型 PPD 刺激孔中斑点数减去禽型 PPD 刺激孔中斑点数都大于或等于 6 个, 则可以判定为阳性; 如果牛型 PPD 刺激孔中斑点数减去 PBS 对照孔中的斑点数或牛型 PPD 刺激

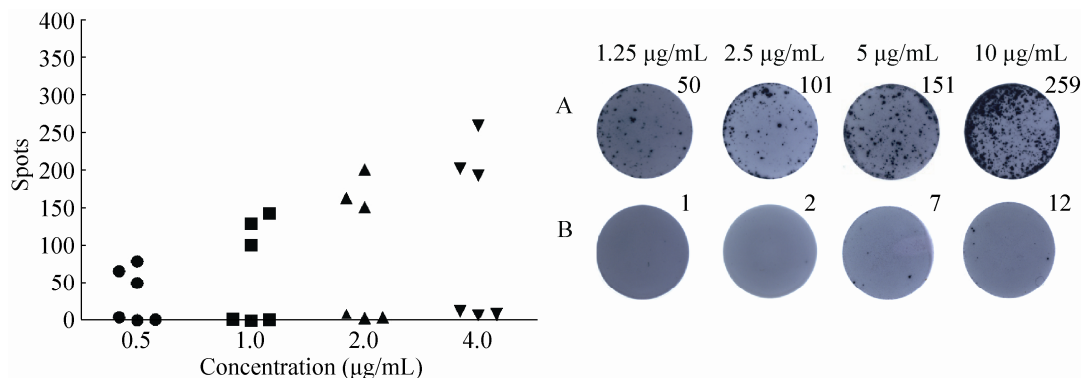


图5 检测抗体浓度对于检测斑点数的影响

Fig. 5 Effects of concentrations of detecting antibody on spot numbers. Spot number (Left) and spot forming pictures (Right) of ELISPOT assay using different concentration of detecting antibody. (A) Peripheral mononuclear cells with PWM. (B) Peripheral mononuclear cells without PWM.

孔中斑点数减去禽型 PPD 刺激孔中斑点数小于 6 个, 则可以判定为阴性。根据这一判定标准, 30 头奶牛中有 15 头可以判定为结核阳性, 阳性检出率为 50% (15/30) (图 6)。

### 2.3 ELISPOT 方法与 BOVIGAM™ ELISA 试剂盒检测效果的比较

同时使用 BOVIGAM™ ELISA 试剂盒 (图 7) 和牛结核  $\gamma$  干扰素 ELISPOT 方法对 30 头奶牛进

行了检测, 结果显示, 两种方法检出共同阳性数为 11 头, 检出共同阴性数为 12 头 (表 1)。以 BOVIGAM™ ELISA 试剂盒检测结果作为参考标准, 14 头 BOVIGAM™ ELISA 试剂盒检测阳性牛中, ELISPOT 方法检出的阳性牛为 11 头, 敏感性为 78.6% (11/14); 16 头 BOVIGAM™ ELISA 试剂盒检测阴性牛中, ELISPOT 方法检出的阴性牛为 12 头, 特异性为 75% (12/16)。

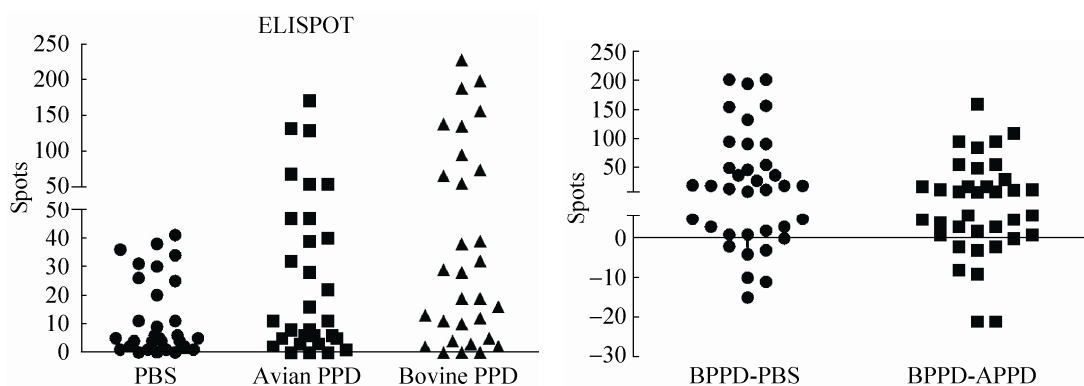


图6 ELISPOT 方法进行牛结核检测结果

Fig. 6 Diagnosis of bovine tuberculosis with the established ELISPOT assay. Spot number of peripheral mononuclear cells isolated from 30 cows stimulated by avian PPD and bovine PPD (Left). The difference value of spot number between avian PPD and bovine PPD stimulated group (Right).



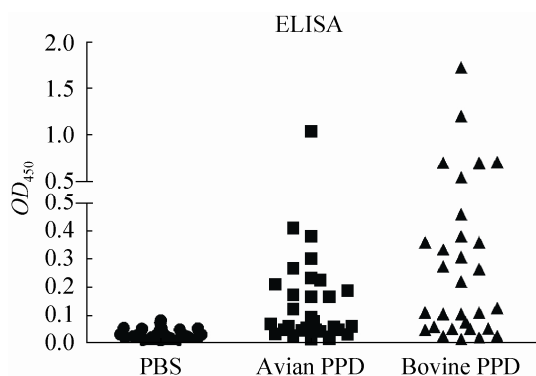


图7 BOVIGAM™ ELISA 试剂盒检测结果

Fig. 7 Diagnosis of bovine tuberculosis with BOVIGAM™ ELISA assay.

表1 ELISPOT 方法与 BOVIGAM™ ELISA 试剂盒的比较结果 (单位: 头)

Table 1 Comparative result of ELISPOT assay and BOVIGAM™ ELISA kit (Unit: head)

		ELISPOT		Total
		P	N	
BOVIGAM™ kit	P	11	3	14
	N	4	12	16
Total		15	15	30

### 3 讨论

牛结核病是一种重要的人兽共患病,可以通过吸入含菌气溶胶或食用受污染的乳制品而从牛传染到人,其传播和流行严重影响畜牧业的发展和人类的健康<sup>[18]</sup>。在一些畜牧业发达的西方国家,牛结核病疫情曾经也相当严重,通过实施“检疫-扑杀”措施后,疫情得到了一定程度的控制<sup>[19]</sup>。近年来,由于我国人民生活水平逐渐提高,人们对于牛乳制品需求量急速上升,进而带动了奶牛业的迅猛发展,因此我国的牛结核病疫情正受到广泛而密切的关注。

目前世界各国都在致力于研究开发牛结核病的快速检测方法,并已经建立了一些准确、可靠的新型检测技术,并且在生产实践中得到了广泛的应用。牛结核病的检测方法,主要分为三类:第一类是细菌学检测,如涂片镜检、细菌培养等<sup>[20]</sup>;第二类为分子生物学诊断技术<sup>[21-23]</sup>;第三类是免疫学检测,如皮试变态反应、IFN- $\gamma$ 释放试验(IGRA)等<sup>[24]</sup>。IGRA具有特异度高、快速的优点、是目前可取代皮试试验的最有效方法,包括免疫胶体金技术、酶联免疫吸附测定法、酶联免疫斑点法等。

免疫胶体金法适用于液体样品,如牛血浆样品中IFN- $\gamma$ 含量的测定,免疫胶体金法的特点在于使用方便快速,不需要特殊的仪器设备进行检测,便于基层使用和现场使用,可以进行多项检测,省去了酶标的致癌性底物及终止液的步骤,对人体无毒害,关于免疫胶体金方法的建立及在牛结核病检测中的应用,国内学者已经进行了相关研究<sup>[3]</sup>,但是该方法在检测灵敏度、特异性和稳定性方面有待提高,应用不是很广泛。牛结核IFN- $\gamma$  ELISA检测方法的特点在于实验操作更加准确,降低检测主观性误差,因此检测结果更加客观可靠,检测灵敏度也高于免疫胶体金方法,也可以实现一次采血多病检测,该方法的研究最多且应用较广泛<sup>[4-7]</sup>,用于牛结核病检测的商品化BOVIGAM® ELISA试剂盒也已问世并得到广泛应用<sup>[25-26]</sup>。

近年来随着免疫学检测技术的不断发展,以结核分枝杆菌特异性抗原为基础的ELISPOT实验作为一种新型的结核病免疫学诊断工具逐渐建立起来。ELISPOT方法同时具备细胞培养技术与ELISA技术的优点,能够分析经特异性抗原活

化后分泌细胞因子的单个效应细胞的数目,能从20万–30万细胞中检测出单个分泌细胞因子的细胞,敏感性高且特异性好,相关研究证明其敏感性比ELISA法高10–200倍<sup>[26]</sup>,这些独特优点使得ELISPOT技术成为公认的检测免疫效应细胞的一种重要研究方法。牛结核IFN- $\gamma$  ELISPOT检测方法相比于免疫胶体金法和ELISA方法,都是通过抗原抗体间特异性结合的原理,对特异性刺激牛全血后牛IFN- $\gamma$ 的产生水平进行测定,从而对牛结核感染状态进行检测。由于检测媒介体、显色方式、样品类型等方面的不同,3种方法在使用流程、检测特异性和灵敏度方面有所差别,ELISPOT方法凭借其敏感性高且特异性好的独特优势,在牛结核病的检测中具有重要的应用价值。

目前许多学者进行了以结核分枝杆菌特异性抗原为刺激原的ELISPOT方法的建立相关研究<sup>[9–13]</sup>,而且用于人结核病诊断的ELISPOT商品化试剂盒也已问世并得到广泛应用,由英国Oxford Immunotec公司生产的T-SPOT TB试剂盒是通过结核分枝杆菌特异的6 kDa早期分泌性抗原靶和培养滤液蛋白10多肽进行刺激结核致敏T淋巴细胞分泌干扰素,并应用ELISPOT方法检测分泌IFN- $\gamma$ 的T淋巴细胞用于人类结核病的检测。但是目前关于牛 $\gamma$ 干扰素ELISPOT方法应用于牛结核病检测的相关研究,国内尚未见报道。

为了提高ELISPOT检测方法的灵敏度和特异性,以及该方法在牛结核病检测过程中的实际应用效果,本研究通过间接免疫荧光方法和阻断ELISA方法筛选到2G5、5E11等与天然牛 $\gamma$ 干扰素蛋白有着很好反应性和实际应用价值的单克隆抗体,并将这两株单抗分别作为包被抗体和

检测抗体,进行了牛 $\gamma$ 干扰素ELISPOT检测方法的建立,随后确定ELISPOT方法的最佳实验条件为:包被抗体浓度2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每孔细胞数量 $2.5 \times 10^5$ ,检测抗体浓度1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以结核菌素作为刺激原,使用建立的牛结核 $\gamma$ 干扰素ELISPOT检测方法对30头奶牛进行牛结核病检测,并与BOVIGAM<sup>TM</sup>ELISA试剂盒检测结果进行比较,结果显示,牛结核 $\gamma$ 干扰素ELISPOT检测方法与BOVIGAM<sup>TM</sup>ELISA试剂盒具有较高的符合率。应用结核菌素作为刺激原的牛结核 $\gamma$ 干扰素ELISPOT检测方法与免疫胶体金方法、ELISA等免疫学方法相比具有更好的灵敏度和特异性,可以应用于牛结核病检测,具有潜在的临床应用价值,为牛结核病的检疫提供了一种重要的辅助手段。

## REFERENCES

- [1] Billiau A. Interferon: The pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. *Cytokine Growth Fact Rev*, 2006, 17(5): 381–409.
- [2] Xu ZZ, Shan FL, Shan F, et al. Generation and application of a 293 cell line stably expressing bovine interferon-gamma. *Protein Expr Purif*, 2014, 99(7): 131–137.
- [3] Qian K, Yin TY, Zhao SX, et al. Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of bovine tuberculosis IFN- $\gamma$ . *Chin J Anim Infect Dis*, 2010, 18(1): 45–50 (in Chinese). 钱琨, 尹天燕, 赵士学, 等. 胶体金免疫层析检测牛结核 $\gamma$ -干扰素方法的建立. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(1): 45–50.
- [4] Chen X, Niu ZW, Xu ZZ, et al. Development and application of bovine interferon-gamma capture ELISA. *Chin J Anim Infect Dis*, 2010, 18(4): 54–59 (in Chinese). 陈祥, 牛中伟, 徐正中, 等. 牛 $\gamma$ -干扰素ELISA检测方法的建立与初步应用. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(4): 54–59.
- [5] Zhang MY, Chen WY, Ge JY, et al. Development of monoclonal antibodies against bovine gamma-IFN and establishment of antigen capture

- ELISA for bovine gamma-IFN detection. *Chin J Prev Vet Med*, 2009, 31(12): 954–957 (in Chinese).  
张月美, 陈伟业, 葛金英, 等. 牛  $\gamma$  干扰素单克隆抗体的制备与抗原捕获 ELISA 检测方法的建立. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(12): 954–957.
- [6] Hu WT, Chao R, Zhang XX, et al. Establishment of ELISA for bovine tuberculosis gamma-interferon detection and preliminary application. *Chin J Prev Vet Med*, 2009, 2011, 33(2): 123–125 (in Chinese).  
胡文婷, 曹瑞, 张旭霞, 等. 牛结核  $\gamma$  干扰素 ELISA 检测方法的建立及应用. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(2): 123–125.
- [7] Li C, Tan YD, Chen YY, et al. Preparation of monoclonal antibodies against recombinant bovine IFN-gamma and development of sandwich ELISA for bovine IFN-gamma detection. *Chin J Biotech*, 2007, 23(1): 40–45 (in Chinese).  
李川, 谭亚娣, 陈颖玉, 等. 牛 IFN- $\gamma$  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, 23(1): 40–45.
- [8] Zhang H, Pan ZM, Jiao XA. A new detecting method of cytokines-ELISPOT. *Prog Vet Med*, 2004, 25(6): 29–31 (in Chinese).  
张辉, 潘志明, 焦新安. 一种细胞因子检测新方法-ELISPOT 技术. *动物医学进展*, 2004, 25(6): 29–31.
- [9] Shams H, Weis SE, Klucar P. Enzyme-linked immunospot and tuberculin skin testing to detect latent tuberculosis infection. *Am J Resp Crit Care*, 2005, 172(9): 1161–1168.
- [10] Hill PC, Jacks SD, Fox A. ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2070–2074.
- [11] Xie FJ, Tan JY, Qiao M, et al. The CFP21 protein ELISPOT method of diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection and its diagnostic value. *J Path Biol*, 2011, 6(9): 647–649 (in Chinese).  
谢富家, 谭继英, 乔梅, 等. CFP21-ELISPOT 方法的建立及其在结核分枝杆菌感染诊断中的应用. *中国病原生物学杂志*, 2011, 6(9): 647–649.
- [12] Jiang LQ, Huang XY, Chen HB, et al. Establishing *Mycobacterium tuberculosis* antigen K6 IFN- $\gamma$  ELISPOT for diagnosis tuberculosis. *Chin J Immun*, 2013, 29(6): 600–604 (in Chinese).  
蒋丽气, 黄香玉, 陈红兵, 等. 建立结核分枝杆菌抗原 K6 IFN- $\gamma$  ELISPOT 用于结核病辅助诊断. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(6): 600–604.
- [13] Li QK, Wu XQ, Yang YR, et al. CFP10/ESAT6 fusion protein-ELISPOT method for *Mycobacterium tuberculosis* infection and its diagnosis value. *Chin J Zoon*, 2010, 26(6): 551–554 (in Chinese).  
李峤珂, 吴雪琼, 阳幼荣, 等. CFP10/ESAT6 融合蛋白-ELISPOT 方法的建立及其在结核分枝杆菌感染诊断中的应用价值. *中国人兽共患病杂志*, 2010, 26(6): 551–554.
- [14] Zhang CC, Chen X, Niu ZW, et al. Development of monoclonal antibodies against recombinant bovine interferon-gamma. *Chin J Anim Infect Dis*, 2009, 17(4): 15–19 (in Chinese).  
张成全, 陈祥, 牛中伟, 等. 重组牛  $\gamma$ -干扰素单克隆抗体的研制. *中国动物传染病学报*, 2009, 17(4): 15–19.
- [15] Xu ZZ, Chen X, Shan FL, et al. Expression and antiviral assay of bovine interferon- $\gamma$ . *Chin J Biotech*, 2011, 27(2): 269–276 (in Chinese).  
徐正中, 陈祥, 单锋丽, 等. 牛  $\gamma$  干扰素的表达及其抗病毒活性测定. *生物工程学报*, 2011, 27(2): 269–276.
- [16] Liu PP, Wang HF, Lü P, et al. Development of ELISPOT assay for IFN- $\gamma$ . *Chin J Immun*, 2012, 28(1): 62–66 (in Chinese).  
刘培培, 王洪芳, 吕品, 等. 一种 IFN- $\gamma$  ELISPOT 检测方法的建立. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(1): 62–66.
- [17] Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 2001, 81(1): 147–155.
- [18] Wedlock DN, Skinner MA, Lisle GW, et al. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect*, 2002, 4(4): 471–480.
- [19] William A. The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. *Tuberculosis*, 2006, 86(3): 330–335.
- [20] Giampaglia CM, Martins MC. Evaluation of a rapid differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with rho-nitrobenzoic acid and thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2005, 9(2): 206–209.
- [21] Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, et al. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(8): 2799–2806.

- [22] Lee H, Park HJ, Cho SN, et al. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(8): 2966–2971.
- [23] Pang Y, Zhou Y, Wang S, et al. Rapid molecular identification of mycobacterial species in positive culture isolates using the biochip test. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2011, 15(12): 1680–1685.
- [24] Yang WC, Jiao XA. The research progress of bovine tuberculosis diagnosis technology. *Chin J Zoon*, 2004, 20(12): 1090–1093 (in Chinese).  
杨卫冲, 焦新安. 牛结核病诊断技术的研究进展. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(12): 1090–1093.
- [25] Gormley E, Doyle MB. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon assay. *Vet Microbiol*, 2006, 112(2/4): 171–179.
- [26] Faye S, Moyon JL. Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFN- $\gamma$  assay (Bovigam) in a low prevalence area in France. *Vet Microbiol*, 2011, 151(1/2): 60–67.
- [27] Xiong ZL, Deng XH, Ceng Z. A useful immunological detection technology. *Prog Vet Med*, 2004, 20(12): 1090–1093 (in Chinese).  
熊仲良, 邓小红, 曾政. 一种有效的免疫学检测技术-ELISPOT. *动物医学进展*, 2004, 20(12): 1090–1093.

(本文责编 郝丽芳)

## H10N8 禽流感病毒感染人的分子机制和跨种间传播趋势评估方面取得新进展

继 2013 年先后在 H5N1 和 H7N9 禽流感病毒跨种间传播研究上取得重大进展后, 中国科学院微生物研究所高福课题组在 H10N8 禽流感病毒感染人的分子机制和跨种间传播趋势评估上取得新的突破, 研究结果已经于 2015 年 1 月 9 日被国际著名杂志《自然通信》(*Nature Communications*) 在线发表。

自从 2013 年 2 月我国报道首例人感染 H7N9 禽流感病毒后, 我国已经发生多起人感染 H7N9 禽流感病毒病例。受体结合实验表明, H7N9 病毒的主要流行株系安徽株 (A/Anhui/1/2013) 具有双受体结合特性, 既能结合人源受体, 同时也保留着禽源受体结合能力。2013 年 12 月起, 我国先后发生 3 例人感染 H10N8 禽流感病毒病例, 并导致 2 人死亡。这种能感染人的 H10N8 病毒是否像 H7N9 病毒一样已经获得了人源受体结合能力呢? 是否存在引发大流行的潜在风险?

为了分析这次的 H10N8 病毒的受体结合特异性, 研究人员从病毒层面和 HA 蛋白层面, 对最早的分离株——江西东湖株 H10N8 禽流感病毒 (A/Jiangxi-Donghu/346/2013) 的受体结合特性进行了研究, 发现无论在病毒水平还是 HA 蛋白水平, H10 都特异性结合禽源受体, 而不像 H7N9 安徽株一样获得了人源受体结合能力。研究人员还利用免疫荧光的方法检测了多种 HA 蛋白对人气管组织及鸭子小肠组织的结合能力, 证明 H10 蛋白对表达禽源受体的鸭子小肠组织有很强的结合, 但不结合表达人源受体的人气管组织。

为了阐明 H10 蛋白特异性结合禽源受体的分子机制, 研究人员利用结构生物学的方法解析了 H10 蛋白与禽源受体和人源受体的复合物晶体结构。结构分析表明, 受体结合位点的 137 位精氨酸在 H10 对禽源受体的偏好性结合中起关键作用。

该研究表明这次的能感染人的 H10N8 病毒依然是一个典型的禽流感病毒, 对人源受体亲和力极弱, 暗示该病毒并不具备在人群中传播的能力。

该研究工作由高福课题组在中国农业大学的博士生王敏与微生物所的张蔚博士共同完成。同时, 该研究工作还得到了中国科学院北京生命科学研究所的施一、中国农业大学的李向东、刘金华和中国疾病预防控制中心病毒病所的舒跃龙、周剑芳等各位老师的帮助和支持。该项目得到了科技部、自然科学基金委和中科院的基金支持。

论文链接: <http://www.nature.com/ncomms/2015/150109/ncomms6600/full/ncomms6600.html>

(来源: 中国科学院微生物研究所)