



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101788563 A

(43) 申请公布日 2010.07.28

(21) 申请号 201010104575.X

G01N 33/535 (2006.01)

(22) 申请日 2010.02.03

G01N 21/78 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

G01N 1/28 (2006.01)

CCTCC NO:C200966 2009.12.01

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街
1号

(72) 发明人 郭爱珍 刘颖 张广智 廖娟红

刘冬光 于清龙 王冰 邹新峰

熊家军 杨利国 陈焕春

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 3 页

(54) 发明名称

梅花鹿 γ -干扰素双抗体夹心 ELISA 检测方法
及试剂盒与应用

(57) 摘要

本发明属于农业微生物基因工程和动物传染病领域。涉及一种梅花鹿 γ -干扰素双夹心 ELISA 检测方法及试剂盒与应用。获得一株能稳定分泌梅花鹿 γ -干扰素单克隆抗体的细胞株 CerIFN- γ 4C, 其保藏号为 CCTCC NO :C200966。本发明还建立了梅花鹿 γ -干扰素双夹心 ELISA 检测方法, 核心是, 构建梅花鹿 γ -干扰素的单克隆抗体, 制备梅花鹿 γ -干扰素多克隆抗体等。本发明的试剂盒包含梅花鹿 γ -干扰素的单克隆抗体, 梅花鹿 γ -干扰素的多克隆抗体, 牛结核特异性三基因融合抗原蛋白 RCE 及其他试剂。本发明还公开了所述检测方法和试剂盒的应用。本发明特异性强、灵敏度高、操作简便和诊断快速。

1. 一株能够稳定分泌梅花鹿 γ -干扰素单克隆抗体的细胞株 CerIFN- γ 4C, 保藏在中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC NO :C200966。

2. 一种由权利要求 1 所述细胞株分泌的梅花鹿 γ -干扰素的特异性单克隆抗体。

3. 一种梅花鹿 γ -干扰素的双抗体夹心 ELISA 检测方法, 其步骤包括:

(1) 用包被液将保藏号为 CCTCC NO :C200966 梅花鹿 γ -干扰素单克隆抗体按 50ng/孔 的量加入酶标板孔内, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h 后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;

(2) 弃去孔内液体, 用冲洗液洗酶标板 3 次, 每次 3min, 用吸水纸拍干;

(3) 在各酶标板孔的孔中加入封闭液 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 按步骤 (2) 的方法洗涤;

(4) 将诱导的待测的梅花鹿全血培养上清, 加入包被有梅花鹿 γ -干扰素单克隆抗体的 ELISA 板孔中, 每孔 100 μ l; 同时将收集的阴性和阳性对照培养上清分加加入孔中, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 重复步骤 (2) 的方法洗涤;

(5) 用冲洗液将兔抗梅花鹿 γ -干扰素多克隆抗体按照 50ng/孔 的量加入 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 重复步骤 (2) 的方法洗涤;

(6) 用冲洗液将辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG 按体积比为 1 : 5000 稀释, 每孔加入 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 重复步骤 (2) 的方法洗涤;

(7) 在酶标板孔的每孔中加入显色液 100 μ l, 室温避光显色 10min;

(8) 在酶标板孔的每孔中加入 50 μ l 终止液使其终止反应;

(9) 在酶联免疫检测仪上于 630nm 波长处测定步骤 (8) 酶标板孔混合溶液的吸光度值;

其中:

步骤 (1) 所述的包被液配制如下:

碳酸钠 1.59g, 碳酸氢钠 2.93g, 用蒸馏水定容至 1000ml;

步骤 (2) 所述的冲洗液配制如下: 氯化钠 8.0g, 氯化钾 0.2g, 磷酸氢二钠 0.2g, 磷酸二氢钾 2.9g, 吐温 -20 0.5ml, 用蒸馏水定容至 1000ml, pH7.4;

步骤 (3) 所述的封闭液配制如下: 冲洗液 100ml, 脱脂牛奶 10g;

步骤 (7) 所述的显色液配制如下: 磷酸氢二钠 7.16g, 柠檬酸 1.92g, 用蒸馏水定容至 100ml, 得到显色液 A; 磷酸氢二钠 7.16g, 柠檬酸 1.92g, 用蒸馏水定容至 100ml, 调 pH 至 5.0, 得到 0.1mol/L 的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液 100ml, 再添加邻苯二胺 40mg, 30% 浓度的过氧化氢 0.15ml, 得到显色液 B, 混合所述的显色液 A 和显色液 B, 得到显色液;

步骤 (8) 所述的终止液配制如下: 2mol/L 的硫酸 22.2ml, 蒸馏水 177.8ml。

4. 一种梅花鹿 γ -干扰素的双抗体夹心 ELISA 检测试剂盒, 其特征在于, 该试剂盒包括保藏编号为 CCTCC NO :C200966 的梅花鹿 γ -干扰素单克隆抗体, 梅花鹿 γ -干扰素多克隆抗体, 保藏号为 CCTCC NO :M208244 的牛结核特异性三基因融合抗原蛋白 RCE, 辣根过氧化物标记羊抗兔 IgG, 显色液和终止液,

其中所述的显色液和终止液配制方法如下:

显色液: 磷酸氢二钠 7.16g; 柠檬酸 1.92g; 补足蒸馏水至 100ml, 得到 A 液; 磷酸氢二钠 7.16g; 柠檬酸 1.92g; 补足蒸馏水至 100ml, pH 5.0, 得到 0.1mol/L 的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液 100ml, 添加邻苯二胺 40mg; 30% 浓度的过氧化氢 0.15ml, 得到 B 液, 混合所述的 A 液和 B 液, 得到显色液。

终止液 :2mol/L 硫酸 (H_2SO_4) 22. 2ml ;蒸馏水 177. 8ml。

5. 权利要求 2 所述的单克隆抗体在制备梅花鹿 γ - 干扰素检测试剂盒中的应用。

梅花鹿 γ -干扰素双抗体夹心 ELISA 检测方法及试剂盒与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物基因工程技术领域和动物传染病技术领域。具体涉及梅花鹿 γ -干扰素检测方法及试剂盒与应用。

背景技术

[0002] 鹿结核病 (Cervus Tuberculosis, CTB) 主要是由牛型分枝杆菌 (Mycobacterium bovis) 引起的一种慢性人兽共患传染病。该病其易传染, 一年四季均可发生, 呈世界性流行, 曾经是引起人畜死亡数最多的疾病之一, 被世界动物卫生组织 (OIE) 定为 B 类动物传染病, 中国将其列为二类动物疫病。主要引起人和动物结核病的分枝杆菌有 3 种: 人型结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、禽型结核分枝杆菌。国内外结核病病原学调查均发现, 牛结核、人结核和鹿结核是相互传染的。因此, 控制牛结核病和人结核, 必须兼顾鹿等野生动物结核病的防治。由于目前为止尚未发现有效药物与疫苗用于鹿结核病的防治, 一些国家普遍采用的是“检疫-捕杀”政策, 即检疫出的阳性鹿一律捕杀来实现控制鹿结核病。因此, 准确而及时的诊断方法对于该病的防治显得尤为重要。

[0003] OIE 唯一推荐的方法是牛型结核菌素皮内变态反应 (Tuberculin skin test, TST)。但由于结核菌素可能包含有与其它分枝杆菌相同的非特异性抗原组份, 检测时容易出现假阳性; 结核菌素皮内变态反应对感染后期的开放性结核及全身性结核不敏感。此外, TST 程序繁琐、耗时费力、结果判断主观性强, 需专业人员操作, 使“检疫-扑杀”政策的实施效果大打折扣, 且其只能进行活体试验, 而不能对保存的样品进行回顾性分析, 更不适用于野生动物和边远山区的牛型结核病普查。因此, 人们致力于开发一种更加简便、快速、高特异性、高敏感性的新型诊断方法。

[0004] γ -干扰素 (简称 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。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。IFN- γ 体外释放检测法是用分枝杆菌特异性或非特异性抗原外刺激受检动物全血或外周单个核细胞 (PBMC), 使少量 T 细胞充分接受刺激, 从而分泌大量 IFN- γ , 然后用酶联免疫吸附法检测 IFN- γ 浓度的细胞方法, IFN- γ 体外释放检测法对结核病潜伏感染的早期诊断具有重要意义。

[0005] IFN- γ 试验较高的特异性将有助于低流行国家对结核隐性感染 (LTBI) 进行更加精确的诊断并对检出个体及时进行针对性的抗结核治疗, 减少耐药性结核分枝杆菌的传播及控制抗生素的滥用。抗原特异性 IFN- γ 试验可以用于检测抗结核治疗的效果。根据抗原特异性 IFN- γ 试验的试验原理, 在体内环境下, 最近接触过 TB 特异性抗原的效应淋巴细胞再次遇到相同的抗原时, 只需数小时即可产生 IFN- γ 。与效应淋巴细胞不同的是, 记忆 T

淋巴细胞往往需要几天时间才能生成 IFN- γ 。因此,如果在检测中全血的培养时间为 24 小时或者更短的时间,检测的主要是效应淋巴细胞产生的 IFN- γ ,而不是由记忆 T 淋巴细胞所产生。而如果延长培养时间,则检测的将主要是记忆 T 细胞产生的 IFN- γ ,这可能使得经过治疗或者感染已被清除的患者产生阳性结果。因此,抗原特异性 IFN- γ 试验可以用来作为 TB 机体病情发展及治疗效果的进行评价。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,提供一种梅花鹿 γ -干扰素双抗体夹心 ELISA 检测方法、试剂盒及在梅花鹿结核病原体体外诊断中的应用。

[0007] 本发明的要点是获得具有很好特异性、敏感性和稳定性的单克隆抗体细胞株,通过对梅花鹿 γ -干扰素 (IFN- γ) 单/多克隆抗体最佳工作浓度的确定、最佳封闭浓度和时间的确定、最佳抗体结合(孵育)时间的确定、最佳待检血浆刺激浓度和时间的确定和最佳待检细胞因子(IFN- γ)浓度的确定,最终建立梅花鹿 IFN- γ 结核病的检测方法和专用试剂盒与应用。

[0008] 本发明通过以下技术方案实现:

[0009] 本发明将构建的重组融合载体质粒 pET-32a-IFN- γ 转移到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,诱导表达获得一种具有抗病毒、抗肿瘤活性、免疫调节作用和强耐热性的可溶性 IFN- γ 蛋白。利用纯化的 IFN- γ 蛋白免疫小鼠,用真核细胞系稳定分泌表达上清筛选阳性杂交瘤细胞,获得一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 多克隆抗体建立了梅花鹿 IFN- γ 的双抗体夹心 ELISA 检测方法及其专用试剂盒,其检测灵敏度达到 24.9pg/ml。

[0010] 申请人将获得的一株能够稳定分泌梅花鹿干扰素- γ 单克隆抗体的细胞株 CerIFN- γ 4C 于 2009 年 12 月 1 日送交湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏,保藏编号为 CCTCC NO :C200966。

[0011] 申请人建立了一种梅花鹿 γ -干扰素的双抗体夹心 ELISA 检测方法,其步骤包括:

[0012] (1) 用包被液将保藏号为 CCTCC NO :C200966 的梅花鹿 γ -干扰素单克隆抗体稀释到工作浓度(50ng/孔)加入酶标板孔内,每孔 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 作用 1h 后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;

[0013] (2) 弃去孔内液体,用冲洗液洗酶标板 3 次,每次 3min,用吸水纸拍干;

[0014] (3) 在各酶标板孔的孔中加入封闭液 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 作用 1h,按步骤(2)的方法洗涤;

[0015] (4) 将诱导的待测的梅花鹿全血培养上清,加入包被有梅花鹿 γ -干扰素单克隆抗体的 ELISA 板孔中,每孔 100 μ l;同时将收集的阴性和阳性对照培养上清分加加入孔中,37 $^{\circ}$ C 作用 1h,重复步骤(2)的方法洗涤;

[0016] (5) 用冲洗液将兔抗梅花鹿 γ -干扰素多克隆抗体按工作浓度(50ng/孔)稀释,每孔加入 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 作用 1h,重复步骤(2)的方法洗涤;

[0017] (6) 用冲洗液将辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG 按工作浓度稀释(按照体积比 1 : 5000),每孔加入 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 作用 1h,重复步骤(2)的方法洗涤;

[0018] (7) 在酶标板孔的每孔中加入显色液 100 μ l,室温避光显色 10min;

- [0019] (8) 在酶标板孔的每孔中加入 50 μ l 终止液使其终止反应；
- [0020] (9) 在酶联免疫检测仪上于 630nm 波长处测定步骤 (8) 光吸收值；
- [0021] 其中：
- [0022] 步骤 (1) 所述的包被液配制如下：碳酸钠 1.59g；碳酸氢钠 2.93g；用蒸馏水定容至 1000ml；
- [0023] 步骤 (2) 所述的配制如下：氯化钠 8.0g；氯化钾 0.2g；磷酸氢二钠 0.2g；磷酸二氢钾 2.9g；吐温 -200.5ml；用蒸馏水定容至 1000ml，pH7.4；
- [0024] 步骤 (3) 所述的封闭液配制如下：冲洗液 100ml；脱脂牛奶 10g；
- [0025] 步骤 (7) 所述的显色液配制如下：磷酸氢二钠 7.16g；柠檬酸 1.92g；用蒸馏水定容至 100ml，得到 A 液；磷酸氢二钠 7.16g；柠檬酸 1.92g；用蒸馏水定容至 100ml，pH 5.0，得到 0.1mol/L 的磷酸盐 - 柠檬酸盐缓冲液 100ml，再添加邻苯二胺 40mg；30% 浓度的过氧化氢 0.15ml，得到 B 液，混合所述的 A 液和 B 液，得到显色液。
- [0026] 步骤 (8) 所述的终止液配制如下：2mol/L 的硫酸 22.2ml，蒸馏水 177.8ml。
- [0027] 申请人还组装了与上述检测方法相适应的梅花鹿 γ -干扰素的双抗体夹心的 ELISA 检测试剂盒，它包括：保藏编号为 CCTCC NO：C200966 的梅花鹿 γ -干扰素单克隆抗体，梅花鹿 γ -干扰素多克隆抗体，保藏号为 CCTCC NO：M208244（专利申请号为 2009100609131，专利公开号为 CN101538578A）牛结核特异性三基因融合抗原蛋白 RCE，辣根过氧化物标记羊抗兔 IgG，显色液和终止液。
- [0028] 其中所述的显色液和终止液的组分及配制方法如下：
- [0029] 显色液：磷酸氢二钠 7.16g；柠檬酸 1.92g；用蒸馏水定容至 100ml，得到 A 液；磷酸氢二钠 7.16g；柠檬酸 1.92g；用蒸馏水定容至 100ml，pH 5.0，得到 0.1mol/L 的磷酸盐 - 柠檬酸盐缓冲液 100ml，添加邻苯二胺 40mg；30% 浓度的过氧化氢 0.15ml，得到 B 液，混合所述的 A 液和 B 液，得到显色液。
- [0030] 终止液：2mol/L 硫酸 22.2ml；蒸馏水 177.8ml。
- [0031] 更详细的技术方案如《具体实施方式》所述。

附图说明

- [0032] 序列表 SEQ ID NO：1 是本发明的梅花鹿 IFN- γ 基因片段的 DNA 序列。
- [0033] 序列表 SEQ ID NO：3-4 是本发明中扩增梅花鹿 IFN- γ 基因片段的引物序列。
- [0034] 图 1：是本发明的总体技术路线图。
- [0035] 图 2：是本发明所用原核表达载体 pET32a(+) 图谱。
- [0036] 图 3：是本发明 PCR 扩增梅花鹿 IFN- γ 电泳图谱。图中：M、DNA 标准 DL2000；1、阴性对照；2、RT-PCR 产物
- [0037] 图 4：是本发明制备的 SDS-PAGE 检测梅花鹿 IFN- γ 蛋白表达形式鉴定图谱。图中：M、蛋白分子质量标准；1、CerIFN- γ 上清蛋白；2、纯化 CerIFN- γ 蛋白。
- [0038] 图 5：是本发明制备的梅花鹿 IFN- γ 蛋白 Western-Blot 图。图中 1、重组 pET32 α -CerIFN- γ ；2、阴性质对照；M、蛋白标准品。
- [0039] 图 6：是本发明通过间接 ELISA 检测检测梅花鹿 IFN- γ 单克隆抗体 (McAb) 效价滴度图。

[0040] 图 7:是本发明通过间接 ELISA 检测检测梅花鹿 IFN- γ 多克隆抗体 (PcAb) 效价滴度图。

[0041] 图 8:是本发明通过间接 ELISA 检测检测梅花鹿 IFN- γ 单克隆抗体 (McAb) 灵敏度滴度图。

具体实施方式

[0042] 实施例 1:目的基因梅花鹿 IFN- γ 的克隆

[0043] 1、质粒与宿主菌来源

[0044] 本实施例所用的 pET-32a(+) 质粒载体购自 Novagen 公司。大肠埃希氏菌 BL21 (DE3) 感受态细胞购自湖北省武汉生命技术有限公司。

[0045] 2、引物设计与合成

[0046] 根据根据 GenBank 上发布的梅花鹿 IFN- γ cDNA 序列 (GenBank accession No: X63079) 设计原核表达引物。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

[0047] 原核表达引物序列如下:上游引物:5' ATATGGATCCGATCTTATGGCCAGGGCCCA3' (下画线为 BamHI 位点);下游引物:5' TAATAAGCTTTTACGTTGATGCTCTCCGGCCTCG3' (下画线为 HindIII 位点)。

[0048] 3、目的基因的 PCR 扩增

[0049] 无菌采取梅花鹿颈静脉血,肝素抗凝,取 10mL 梅花鹿的全血,加刀豆球蛋白 A (英文缩写:Con A,购自 Sigma 公司)60 μ g/mL 于 37°C 和 5% CO₂ 环境下培养 24h。提取 Con A 刺激的外周血白细胞总 RNA 作为 RT-PCR 的模板,利用一步法扩增得到梅花鹿 IFN- γ 成熟肽序列,见序列表 SEQ ID NO:1 所示,序列全长为 438bp。

[0050] PCR 扩增反应体系为:10 \times Taq Buffer 5.0 μ L, 25mmol/L MgCl₂1.0 μ L, 2mmol/L dNTPs 1.5 μ L, 20 μ mol/L 上、下游引物各 1.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 1.0 μ L, 模板 3 μ L, 无菌双蒸水加至 50 μ L。扩增的循环参数:95°C 预变性 5min;然后 95°C 变性 30s, 59°C 退火 30s, 72°C 延伸 45s, 30 个循环;最后 72°C 延伸 10min。扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收试剂盒 (购自上海生工生物工程技术有限公司,参照该试剂盒说明书) 纯化 PCR 产物。

[0051] 4、PCR 产物回收:

[0052] 采用上海生工生物技术有限公司生产的 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 DNA 片段,按照该 UNIQ-10 柱式离心式 DNA 凝胶回收试剂盒的说明书的提供步骤进行,具体操作如下:

[0053] 用 0.8% 的琼脂糖胶电泳,使目的 DNA 片段与其它 DNA 尽可能分开,在长波紫外灯下,用在酒精灯火焰上烧过的手术刀片切下含有目的 DNA 片段的琼脂块,放入 1.5mL 灭菌离心管中。

[0054] 按每 100mg 琼脂糖胶加入 400 μ L Binding Buffer,置 50-60°C 水浴中 10min,使琼脂糖凝胶彻底融化 (加热溶胶时,每 2min 混匀一次)。

[0055] 将 UNIQ-10 柱放入收集管中,将融化的胶溶液转移到 UNIQ-10 柱中,室温静置 2min,室温 8000r/min 离心 1min。

[0056] 取下 UNIQ-10 柱,倒掉收集管中的废液,将 UNIQ-10 柱放入同一个收集管中,加入

500 μ L WashSolution, 室温 8000r/min 离心 1min。

[0057] 再加入 500 μ L Wash Solution, 取下 UNIQ-10 柱, 倒掉收集管中的废液, 将 UNIQ-10 柱放入同一个收集管中, 室温 12000r/min 离心 15sec。

[0058] 将 UNIQ-10 柱放入一个灭菌的 1.5mL 离心管中, 根据 PCR 产物量的相对多少, 在柱子底部的膜中央加 10-20 μ L Elution Buffer 或 ddH₂O, 室温或 37°C 放置 2min 室温 12000r/min 离心 1min, 离心管中的液体即为回收的 DNA 片段, 可立即使用或保存于 -20°C 备用。

[0059] 实施例 2、重组质粒 pET-32a-IFN- γ 的构建

[0060] 1、载体质粒 pET-32a 和 IFN- γ PCR 回收产物的连接

[0061] 通过限制性内切酶 BamH I 和 Hind III (购自宝生物工程(大连)有限公司) 分别同时双酶切原核表达载体 pET32a 和回收得到的 IFN- γ PCR 产物, 酶切产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收试剂盒纯化酶切产物。将纯化的酶切产物用 T4DNA Ligase (购自 Fermentas 公司) 进行粘末端连接, 16°C 水浴连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。

[0062] 2、连接产物的转化

[0063] 取感受态细胞 DH5 α 100 μ L 加入到灭菌 1.5mL EP 管中, 将连接后的中间质粒 pET-32a-IFN- γ 各 10 μ L 加入并混匀。置冰上 30min 后, 42°C 热激 90sec, 冰浴 3-5min。加入 400 μ L LB 液体培养基 (每升含酵母提取物 5g, 胰蛋白胨 10g, NaCl 10g, 用 10mol/L NaOH 调 pH 至 7.5, 121°C 高压灭菌 20min, 4°C 保存备用。在每 100 毫升 LB 液体培养基中加入 1.5g 琼脂粉即为固体 LB 培养基, 121°C 高压灭菌 20min, 4°C 保存备用), 于 37°C 恒温摇床 200r/min 振荡培养 45min 使其复苏。复苏后的重组大肠杆菌悬液于 4°C 5000r/min 离心 10min, 弃去 400 μ L 上清, 用剩余的 100 μ L 重悬沉淀涂布于含有 25 μ g/mL 卡那霉素 (购自 Invitrogen 公司) 的 LB 琼脂平板。37°C 增殖 1h, 再将平板翻过来, 倒置 37°C 培养 14-16h 至菌落出现。

[0064] 3、质粒的提取

[0065] 使用碱裂解法 (参照萨姆布鲁克 . J, 弗里奇 . E. F, 曼尼阿蒂斯 . T 主编, 分子克隆实验指南, 黄培唐等译, 第三版, 科学出版社, 北京, 2002 版的方法) 进行, 具体操作如下:

[0066] 用灭菌牙签在 LB 平板上随机挑取数个单菌落, 分别接种于 3mL 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 恒温摇床 200r/min 振荡培养过夜。

[0067] 将菌液转入 1.5mL 离心管内, 于 4°C 8000r/min 离心 3min, 弃上清, 再将剩余的 1.5mL 菌液重复离心, 倒立离心管于吸水纸上, 使液体流尽。

[0068] 加入 100 μ L 冰预冷的溶液 I (0.05mol/L 葡萄糖, 0.025mol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.01mol/L EDTA), 涡旋使菌体充分悬浮, 再加入 200 μ L 新配制的溶液 II (0.2mol/L NaOH, 1% SDS, 现配现用), 反复颠倒离心管数次, 冰浴 5min, 最后加入 150 μ L 冰预冷的溶液 III (5mol/L 乙酸钠 60mL, 冰乙酸 11.5mL, 水 28.5mL, pH5.0), 温和颠倒离心管数次, 冰浴 10min。

[0069] 于 4°C 以 12000r/min 离心 10min, 吸取上清至另一支 1.5mL 离心管中, 加入等体积的异丙醇, 混和均匀, 室温静置 5min。

[0070] 室温 12000r/min 离心 10min, 弃上清, 沉淀用 75% 冷乙醇漂洗后, 真空干燥或自然干燥。

[0071] 沉淀用 200 μ L 含 20 μ L Rnase (20 μ g/mL) 的 TE (pH8.0) 溶解, 56°C 水浴 30min 或

37℃水浴 1h 以除去 RNA。

[0072] 加 7.5mol/L NH_4Ac 100 μL , 室温静置 5min, 再于室温 12000r/min 离心 5min。

[0073] 吸取上清到另一 1.5mL 的 EP 管中, 加入 2 倍体积的冷无水乙醇, 冰浴置 10min。

[0074] 于 4℃ 12000r/min 离心 10min, 弃上清, 沉淀用 75%冷乙醇漂洗后, 真空干燥后溶于 20 μL ddH₂O 或 TE(1mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris-Cl, pH8.0), 置 -20℃冰箱保存备用。

[0075] 4、重组质粒 pET-32a-IFN- γ 的酶切鉴定

[0076] 利用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 分别进行单酶切和双酶切中间质粒 pET-32a-IFN- γ , 酶切后出现预期大小的外源片段和载体片断, 将包含该中间质粒的大肠杆菌 DH5 α 菌液送上海生工生物技术工程有限公司测序, 测序结果与 Genbank(序列登录号: X63079) 中公布的梅花鹿 IFN- γ 的序列比对, 结果符合率 100%, 说明该发明中构建的重组质粒构建成功, 可以用于大肠杆菌中表达。

[0077] 实施例 3、目的融合基因在大肠杆菌中的表达及纯化

[0078] 1、目的基因的诱导表达

[0079] 将包含有重组表达载体的大肠杆菌菌株 DH5 α 接种于含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 3mL LB 液体培养基, 于 37℃摇床培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6-0.8。从培养好的菌液中取 100 μL 接种于 10mL 含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的新鲜 LB 液体培养基中, 于 37℃振荡培养约 3h, 至 OD₆₀₀ 达到 0.6-0.8, 加异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG, 购自 Invitrogen 公司) 至终浓度为 0.8mmol/L, 继续培养 3h 后收集菌体。

[0080] 2、表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

[0081] 2.1 SDS-PAGE 电泳样品的制备

[0082] 将诱导后的重组大肠杆菌 8000r/min 离心 15min。沉淀用 1/10 体积的 50mM Tris-HCl(pH8.0) 重悬, 冰浴 30min。冰浴条件下进行超声破碎, 直至菌液不再粘稠, 10000r/min, 离心 30min。分别取少量裂解后的上清和沉淀, 加入 2 \times 蛋白电泳上样缓冲液 (100mmol/L Tris-HCl(pH6.8), 200mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT, 购自 Amresco 公司), 4% SDS(电泳级), 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油) 125 μL , 振荡混匀, 100℃煮沸 10min, 12000r/min 离心 5min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳分析。

[0083] 2.2 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的配制及电泳

[0084] 15%分离胶配制: 纯化水 1.6mL, 30%丙烯酰胺溶液 2.0mL, 1.5mol/L Tris-Base 溶液 (pH8.8) 1.3mL, 10% SDS 0.05mL, 10%过硫酸铵 0.05mL, TEMED 0.003mL; 各成分加入后迅速混合, 加入制胶板中, 上面加异丁醇。

[0085] 5%浓缩胶配制: 纯化水 2.1mL, 30%丙烯酰胺溶液 0.5mL, 1.0mol/L Tris-Base 溶液 (pH6.8) 0.38mL, 10% SDS 0.03mL, 10%过硫酸铵 0.03mL, TEMED 0.003mL; 各成分加入后迅速混合, 加入制胶板的分离胶的上面, 灌满后插入加样梳。待积层胶凝固后, 取下梳子; 将凝胶固定于电泳装置上, 加入足够量的 Tris-甘氨酸电泳缓冲液, 在加样孔中分别加入各样品; 电泳电压 80V, 待溴酚蓝至分离胶界面时, 电压改为 120V, 至溴酚蓝泳出胶底面, 终止电泳。

[0086] 2.3 聚丙烯酰胺凝胶染色与脱色

[0087] 卸下凝胶, 用考马斯亮蓝 R250 染色液 (45% 甲醇, 45% 纯化水, 10% 冰乙酸, 0.25% 的考马斯亮蓝 R250) 染色 4h 以上, 再用脱色液 (45% 甲醇, 45% 纯化水, 10% 冰乙

酸)进行脱色至背景色完全脱去,观察结果。确定目的蛋白是可溶性表达还是以包涵体的形式表达。

[0088] 2.4 重组蛋白的纯化

[0089] 将收集的重组蛋白表达菌 BL/pET-32a-IFN- γ 用购自 Novagen 公司的试剂盒自带的缓冲液重悬,超声波破碎,4℃ 12000g 离心 15min 取上清上样。使用 Ni-NTA His • Band 层析柱(购自 Novagen 公司)纯化目的蛋白。分别使用结合 Binding buffer 和洗涤缓冲液 Washing buffer(20mM Tris-HCl pH7.9,15mM Imidazole,0.5M NaCl)洗柱直至 OD 值达到基线附近,换用洗脱缓冲液 Elute buffer(20mM Tris-HCl pH7.9,40mM Imidazole,0.5M NaCl)洗脱结合的重组蛋白,收集波峰部分蛋白作为纯化的重组蛋白用于进一步分析。

[0090] 3、目的蛋白表达最佳条件的确定

[0091] 根据上述步骤 2(即表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析)的方法,检测表明本发明制备的重组融合蛋白 IFN- γ 为可溶性表达。重新复苏保存的转化有 pET-32a-IFN- γ 的大肠杆菌 BL21(DE3)菌液,37℃ 摇床培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6-0.8 时,按照 IPTG 浓度分别为 0.4mM、0.8mM 和 1.0mM,和分别于诱导前和诱导后 3h、4h、5h 取样,SDS-PAGE 分析。

[0092] 确定 IFN- γ 蛋白的最佳表达条件为 IPTG 0.8mmol/L,37℃ 诱导 3h 表达量最高。

[0093] 4、重组蛋白纯化最佳条件的确定

[0094] 为摸索 Wash Buffer 中最佳的咪唑浓度,将 Wash Buffer 中咪唑浓度按终浓度 30mM、40mM、50mM 三个梯度稀释,将细菌破碎后离心得到的上清上柱后、加 Binding Buffer 后、依次加三个浓度 Wash Buffer 后分别接收样品,SDS-PAGE 分析。

[0095] 确定 IFN- γ 蛋白纯化的最佳 Wash Buffer 咪唑浓度为 30mM。

[0096] 实施例 4:重组蛋白 IFN- γ 单 / 多克隆抗体的制备

[0097] 1、用重组蛋白 IFN- γ 免疫小鼠和大白兔

[0098] 本实施例所用的 Balb/C 小鼠和日本长耳大白兔均购自湖北省预防疾病控制中心,4-6 周龄的雌性 Balb/C 小鼠 6 只,按 200 μ g/ 只皮下多点接种纯化的重组 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 天,选择抗体滴度高的 Balb/C 小鼠,按 500 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 CerIFN- γ 抗体的效价。

[0099] 同时,将纯化的 CerIFN- γ 按以上程序免疫三只 2.0kg 以上体重的雌性日本长耳大白兔,抗原免疫剂量为 700 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,利用饱和硫酸铵法纯化高免血清。

[0100] 2、梅花鹿 IFN- γ 细胞融合

[0101] 2.1 SP2/0 骨髓瘤细胞的活化

[0102] 本实施例所用的骨髓瘤(SP2/0)细胞购自中国兽药监察所,将复苏的 SP2/0 细胞,收集起来用 0.5mLRPMI-1640 基础液悬浮(0.5 ~ 1 \times 10⁶)注射 Balb/C 小鼠背部皮下。待 9 ~ 10d 实体瘤生长后,视大小选择取瘤细胞的时间。

[0103] 2.2 细胞融合

[0104] 分别取免疫小鼠脾脏细胞和活化的 SP2/0 骨髓瘤细胞,在融合剂的作用下将二者融合,同时制备饲养细胞,以辅助杂交瘤细胞的生长,方法简述如下(史良如,1984):

[0105] 2.2.1 SP2/0 瘤细胞的制备

[0106] 若是细胞瓶中培养,直接用 RPMI-1640 基础液洗下,离心收集即可。从小鼠瘤子中制备的方法如下:小鼠断颈处死,75%酒精浸泡 5min,超净台无菌状态取瘤,先将肿瘤块剪下,放一无菌;平皿中,先将共剪成几小块,再移至匀浆器中,加 5mL RPMI-1640 基础液充分研磨后,补加 10mL RPMI-1640 液,静置 2min,待较大的组织团块沉于管底后,吸取上层的细胞悬液于另一离心管备用,再补加 10mL RPMI-1640 液,重复一次,将取出的细胞悬液体积控制在 30mL。于另一 50mL 离心管中加入 15mL 淋巴细胞分离液,将细胞悬液轻轻地加在分离液之上(比例为 1:2 到 1:1),1800~2000r/m 20min,用吸管吸取位于界面致密的白色细胞层,用 RPMI-1640 液洗 2 遍,计数后备用。

[0107] 2.2.2 免疫脾细胞的制备:

[0108] (1) 取经最后强化免疫的 Balb/C 鼠一只,眼眶放血处死(收集血清,即为阳性血清),在 75%酒精中浸泡 5min 消毒。

[0109] (2) 将消毒好的老鼠固定于解剖板上,前肢固定,后肢交叉(左后肢在上)固定,用镊子夹住下腹部皮肤,剪一小口,撕开皮露出腹膜,换一套镊子和剪刀,剪开腹膜,暴露出脾脏,再换一套器械,用镊子夹住脾脏,用剪刀去掉粘连细胞的脂肪组织,剪破脾脏外膜,放入灭菌的匀浆器中。

[0110] (3) 加 3mL RPMI-RPMI-1640 基础液于匀浆器中,研磨(不要太剧烈,以免损伤脾细胞,可选用比较松的匀浆器),挤压出脾细胞,取出匀浆棒,补加 7mL RPMI-1640 基础液,静置 2min,吸取上层细胞悬液于另一无菌的 50mL 离心管,再补加 10mL RPMI-1640 液于匀浆器中,同上重复 2 次。

[0111] (4) 1000r/m 离心 10min 去上清,细胞重悬后计数。

[0112] 2.2.3 饲养细胞的制备

[0113] (1) 取一只未免疫的 Balb/C 鼠,眼眶放血,收集血清为阴性血清。

[0114] (2) 四肢固定后,先撕开皮,露出腹膜,在腹膜上剪一小口(在腹部中央),然后用吸管 3mL RPMI-1640 液注入小鼠腹腔,吸打几次,再将液体吸出放于一 50mL 离心管,再重复一次,此为腹腔巨噬细胞。

[0115] (3) 同上操作制备脾细胞悬液,并放入腹腔巨噬细胞管中。

[0116] (4) 1000r/m 离心 10min 去上清,细胞重悬后计数。

[0117] 2.2.4 细胞融合

[0118] (1) 先将饲养细胞离心 1000rpm,5min 去掉上清,于 37℃放置备用。

[0119] (2) 将 $1-2 \times 10^7$ 个 SP2/0 与 108 个免疫细胞(1:10-1:15)于 50mL 离心管中混匀,1500r/m,离心 10min。

[0120] (3) 倒空上清(可用灭菌的滤纸吸干),轻轻敲击管底,使细胞沉淀略加松动。

[0121] (4) 将装有细胞混合物的离心管放于 37℃水浴中。然后在 1min 内慢慢滴入预温至 37℃的 50% PEG

[0122] 0.8mL,边加边轻轻用吸管尖搅拌 1min。

[0123] (5) 然后慢慢加入 37℃预温的 RPMI-1640 基础液 10mL。具体方法为:第一分钟逐滴滴入 1mL。第二分钟加 1mL,第 3-4 分钟加 3mL,第 5 分钟加其余的 5mL,每次加时需缓慢加入,并不断轻轻地搅拌。最后加入 30mL RPMI-1640 液,也需慢慢加入。

[0124] (6) 8000r/m 离心 5min, 去上清于 37℃ 放置 5-8min。

[0125] (7) 用 HAT 培养基悬浮, 同时也用 HAT 培养基悬浮饲养脾细胞与融合后的细胞混合, 根据需要补加适量 HAT 培养基, 分种于 96 孔培养板, 约 250 μ L/ 孔。一次融合可接种 4-8 块 96 孔板。根据需要也可少种, 一般按 SP2/0 的细胞数计算, 每孔接种量约含 10^4 左右个 SP2/0 细胞。

[0126] (8) 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。

[0127] (9) 融合后第二天开始观察, 有无污染, 于第 4 天补加 1 滴 HAT 培养基, 第 8-10 天吸去 100 μ L 培养基换 HT 培养基 100 μ L。待融合细胞集落长至培养孔 1/4, 培养基略变黄时, 进行抗体检测。

[0128] 2.2.5 间接 ELISA 方法检测杂交瘤细胞上清, 筛选阳性杂交瘤细胞

[0129] 于测定前一天 4℃ 包被过夜 (gG : 50ng/ 孔), 洗涤液洗三次拍干, 37℃ 封闭 1h, 洗涤液洗三次拍干, 加入杂交瘤细胞培养上清, 于 37℃ 温育 1h, 洗涤液洗三次拍干, 加入 1 : 10000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 37℃ 温育 45mins, 洗涤 5 次, 加入 TMB 底物 100 μ L, 避光显色 10min, 最后加入 50 μ L 终止液终止反应, 用酶标仪在 630nm 波长下测定 OD 值, 同时设 SP2/0 细胞的培养上清作为阴性对照, OD₆₃₀ 大于阴性对照 2 倍的样品为阳性。

[0130] 2.2.6 杂交瘤细胞的克隆化 (有限稀释法)

[0131] (1) 克隆前或者前一天制备小鼠饲养细胞层。

[0132] (2) 将要克隆的杂交瘤细胞从培养孔内轻轻吹下, 血细胞计数板计数活细胞数。

[0133] (3) 将细胞用完全培养基稀释到 5、10、50 个细胞 / 毫升。

[0134] (4) 将上述三个浓度的细胞悬液分别加入已制备好的饲养细胞的 96 孔培养板, 100 μ L/ 孔, 使相应的每孔分别含 0.5、1 和 5 个细胞。

[0135] (5) 培养第 4 天换液一次, 第 5-6 天仔细观察各孔内细胞的生长情况, 并记录。

[0136] (6) 特异性抗体的检测 : 在克隆后第 7-9 天, 细胞克隆长满 1/3-1/2 个视野时, 即可检测, 如检出细胞生长孔有特异性抗体, 可选择抗体效价高, 呈单个克隆生长, 形态良好的细胞孔, 继续同法再克隆或扩大培养。

[0137] (7) 阳性孔的细胞可移至 24 孔培养板, 并在原孔中补加另一批培养基, 以防二者同时污染或细胞死亡。待 24 孔板中的细胞生长良好时, 可转种至小方瓶中, 并冻存 2 支以上的细胞。

[0138] 实施例 5 : 梅花鹿 IFN- γ 单克隆抗体的鉴定

[0139] 1、杂交瘤细胞染色体数的检测

[0140] 在细胞传代培养 48h 后加入秋水仙胺, 使其最终浓度达到 0.04 μ g/mL, 继续培养 2-2.5h。终止培养后, 将贴壁的细胞全部用吸管吹下, 移入 10mL 的离心管, 以 1000r/m 离心 10min, 弃去上清液。加入 37℃ 预温的 0.075mol/L 的氯化钾低渗溶液 5mL, 用吸管吹打均匀, 置 37℃ 水浴 15-20min。每管加入新鲜配制的固定液 (甲醇 : 冰乙酸 = 3 : 1) 1mL 混匀, 以 1000r/m 离心 10min, 去上清。再每管加固定液 5mL, 轻轻混匀, 静止 30min 后, 以 1000r/m 离心 10min, 弃上清。再次固定, 加固定液 5mL, 轻轻混匀静止 30min, 以 1000r/m 离心 10min, 弃上清, 用同样方法加固定液 5mL 打匀, 封上管口于 4℃ 静止过夜。轻轻吸去上清液, 留下 0.5mL 左右的上清液, 混匀使细胞悬浮, 用滴管吸取细胞悬液 2-3 滴, 滴在已用冰水浸泡的洁净的载玻片上, 立即吹散, 并在火焰上通过几次, 促使细胞平铺于载玻片上, 自然干燥。以

10% Giemsa 染液染色 10min, 洗去洗液自然干燥。最后于显微镜下观察计数 (章谷生, 容秉培, 1987)。

[0141] 2、单克隆抗体的生产和效价测定

[0142] 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。也可在小鼠体内诱生小鼠腹水生产单克隆抗体, 取 8-10 周龄的小鼠, 腹腔注射灭菌的液体石蜡 0.5mL/只, 7-10 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 /只, 7-10 天后抽取小鼠腹水, 离心取上清, 测定效价, 并冻存。

[0143] 3、Western-blot 分析单克隆抗体的特异性

[0144] 将上述纯化的重组融合蛋白 IFN- γ 进行 SDS-PAGE 电泳。

[0145] 转移: 切出 6 张 Whatman 3M 滤纸和 1 张硝酸纤维膜 (NC 膜), 滤纸和膜的大小要和凝胶的大小完全相等或略小于凝胶, 用铅笔在滤膜一角作标记, 确保转印后膜与凝胶的相对方向; 将硝酸纤维膜在纯化水中浸泡 5min; 在另一浅托盘中加入少量转移缓冲液 (39mmol/L 甘氨酸, 48mmol/L Tris 碱, 0.037% SDS (电泳级), 20% 甲醇), 将 6 张 Whatman 3M 滤纸浸泡于其中。然后按照如下方法安装转移电泳槽: 平放石墨电极的底座 (负极), 依次放 3 层 3M 滤纸、聚丙烯酰胺凝胶、硝酸纤维膜和 3 层 3M 滤纸。彻底排除各层间的气泡; 将转移电泳槽的上盖扣到石墨电极-转移膜胶复合体上; 连接电源, 根据凝胶板面积按照 $0.65-1.0\text{mA}/\text{cm}^2$ 的参数接通电流, 电泳转移 0.5-2h。

[0146] 将 NC 膜置于含 1% BSA 和 5% 的脱脂奶粉的 $1 \times$ TBST (10mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20, pH8.0) 中, 室温封闭过夜或至少 30min;

[0147] 洗膜: 弃封闭液, 用 $1 \times$ TBST 洗涤 NC 膜 3 遍, 每次 5min;

[0148] 一抗孵育: 将 NC 膜放入用 $1 \times$ TBST 稀释的梅花鹿 IFN- γ 单克隆抗体 (体积比为 1 : 3000), 37°C 孵育 1h;

[0149] 洗膜: 取出 NC 膜, 用 $1 \times$ TBST 洗膜 3 次, 每次 10min;

[0150] 二抗孵育: 将膜转入 $1 \times$ TBST 稀释的 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的羊抗牛 IgG (购自 Sigma 公司) 抗体 (体积比为 1 : 5000), 37°C 孵育 1h;

[0151] 洗膜: 取出 NC 膜, 用 $1 \times$ TBST 洗膜 3 次, 每次 10min;

[0152] 显色: 将 NC 膜置于新配置的 DAB 显色液中, 置暗处显色, 待蛋白带的颜色深度达到要求后, 用 $1 \times$ TBST 冲洗以终止反应。

[0153] 结果表明, 梅花鹿 IFN- γ 单克隆抗体表现出很高的特异性, 而阴性对照组 (pET32a(+)) 载体表达菌) 没有出现反应。

[0154] 实施例 6: 梅花鹿 IFN- γ 双抗体夹心 ELISA 方法的建成立

[0155] 1. 梅花鹿 IFN- γ 单克隆抗体敏感度的测定

[0156] 利用双抗体夹心 ELISA 测定梅花鹿 IFN- γ 单克隆抗体敏感度。用包被液 (25mmol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6) 保守值 3000 倍稀释单克隆抗体, 按每孔 $100 \mu\text{l}$ 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 5% 脱脂奶粉 37°C 封闭 45min。PBST 充分洗涤后, 用洗涤液递增稀释抗原 (CerIFN- γ 标准品), 稀释后为 50ng、25.5ng、12.75ng、6.375ng、3.1875ng、1.593ng、0.79ng、0.398ng、0.199ng、0.099ng、0.498ng、0.025ng、0.012ng、0.006ng、0.003ng 和 0.002ng 12 个梯度, 37°C 孵育 1h, 重复洗涤。用洗涤液保守值 5000 倍稀释的兔抗 CerIFN- γ 多克隆抗体, 每孔 $100 \mu\text{l}$, 37°C 孵育

45min 后充分洗涤。加 1 : 5000 稀释的 HRP- 羊抗兔 IgG, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 30min, 充分洗涤后每孔 100 μ l TMB/H₂O₂ 底物液, 室温避光反应 10min 后, 每孔加入 50 μ l 终止液 (0.25% 氢氟酸) 终止反应, 读取波长 630nm 的光密度值 (OD)。

[0157] 2. 梅花鹿 IFN- γ 单 / 多克隆抗体最佳工作浓度的确定

[0158] 利用方阵间接滴定确定最佳工作浓度确定。用梅花鹿 IFN- γ 作为抗原, 分别以 50ng、25.5ng、12.75ng、6.375ng、3.1875ng、1.593ng、0.79ng、0.398ng、0.199ng、0.099ng、0.498ng、0.025ng、0.012ng、0.006ng、0.003ng 和 0.002ng 12 个梯度按每孔 100 μ l 包被 96 孔 ELISA 板, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。次日用 PBST 充分洗涤后加入 5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 30min。用洗涤液 200、400、800、1600、3200、6400、12800 和 25600 倍 8 个梯度稀释的 CerIFN- γ 单克隆抗体 (或用洗涤液 400、800、1600、3200、6400、12800、25600 和 51200 倍 8 个梯度稀释的 CerIFN- γ 多克隆抗体), 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后充分洗涤。加 1 : 5000 稀释的 HRP- 羊抗鼠 IgG (或 HRP- 羊抗兔 IgG), 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 30min, 充分洗涤后每孔 100 μ l TMB/H₂O₂ 底物液, 室温避光反应 10min 后, 每孔加入 50 μ l 终止液 (0.25% 氢氟酸) 终止反应, 读取波长 630nm 的光密度值 (OD)

[0159] 3. 梅花鹿 IFN- γ 体外特异性释放

[0160] 抽取梅花鹿颈静脉血, 肝素抗凝。将全血按 1.5ml/ 孔分别加入 24 孔细胞培养板的三个孔中, 其中阳性对照含有 60 μ g 刀豆球蛋白 A (Con A), 检测孔 80 μ g 结核菌特异性蛋白 Rv3872-CFP10-ESAT6 融合蛋白, 空白对照孔含 50 μ 基础 1640 培养液。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 $^{\circ}$ C 培养 16-24h。次日收集培养上清液, 夹心 ELISA 检测 IFN- γ 浓度。

[0161] 4. 梅花鹿 IFN- γ 检测夹心 ELISA 的建立

[0162] 用包被液适当稀释单克隆抗体, 按每孔 100 μ l 加入 ELISA 板孔中, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。次日用 PBST 充分洗涤后加入 5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 45min。PBST 充分洗涤后, 每孔 100 μ l 上述三种上清液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 重复洗涤。用洗涤液适当稀释的兔抗 CerIFN- γ 多克隆抗体, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 45min 后充分洗涤。加 1 : 5000 稀释的 HRP- 羊抗兔 IgG, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 30min, 充分洗涤后每孔 100 μ l TMB/H₂O₂ 底物液, 室温避光反应 10min 后, 每孔加入 50 μ l 终止液 (0.25% 氢氟酸) 终止反应, 读取波长 630nm 的光密度值 (OD)。

[0163] 实施例 7 : 梅花鹿 IFN- γ 检测结核病检测法的应用

[0164] 1. 样品的处理

[0165] 取 120 份抗凝梅花鹿鹿血样品, 按 1.5ml/ 孔分别加入 24 孔细胞培养板的三个孔中, 其中阳性对照含有 60 μ g 刀豆球蛋白 A (购自 Sigma 公司), 检测孔 80 μ g 保藏号为 CCTCC NO : M208244 (专利申请号为 2009100609131, 专利公开号为 CN101538578A) 牛结核特异性三基因融合抗原蛋白 RCE, 空白对照孔含有 50 μ 基础 1640 培养液 (配方见附录 1)。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 $^{\circ}$ C 培养 16-24h, 次日收集培养上清液。

[0166] 2. 用商品化 ELISA 试剂盒检测上述样品 (对照试验 1)

[0167] 本实施例所用的商品化 ELISA 试剂盒购自武汉科前动物生物制品有限责任公司。方法如下 : 使用保藏号为 CCTCC NO : M208244 (专利申请号为 2009100609131, 专利公开号为 CN101538578A) 牛结核特异性三基因融合抗原蛋白 RCE, 于 4 $^{\circ}$ C 过夜包被酶标板, 洗涤液

洗涤 3 次,用洗涤液稀释的 5%脱脂奶粉 37℃封闭 1h,洗涤液洗板 3 次后加入 1 : 100(体积比)倍稀释血清,100 μ L/孔,每孔重复 3 次,37℃反应 30min。洗板 3 次后加入体积比为 1 : 10000(体积比)稀释的羊抗牛 IgG,37℃反应 30min。洗板 5 次后加入 100 μ L 底物液(含 1mg/mL TMB 和 0.03% H₂O₂),避光显色 10min 后加入 0.25% HF 终止反应,于 OD₆₃₀ 读数。(结果表 1)

[0168] 3. 用商品化试纸条检测上述样品(对照试验 2):

[0169] 本实施例所用的商品化试纸条购自韩国动物遗传公司(公司的英文名称:Animal Genetics, Inc,商品名称为:Anigen Rapid Bovine TB Ab Test Kit)。按照试纸条的说明书操作:将上述待检梅花鹿的血样取 100 μ L 加入试纸条检测孔中,10min 后观察结果(结果表 2)。

[0170] 4. 用本发明的梅花鹿 γ-干扰素双抗体夹心 ELISA 方法检测:

[0171] 具体方法如下:用包被液(见附录 2)按照 50ng/孔稀释单克隆抗体,按每孔 100 μ l 加入 ELISA 酶标板孔中,4℃包被过夜。次日用冲洗液(见附录 2)充分洗涤后加入 5%脱脂奶粉 37℃封闭 45min。用冲洗液充分洗涤后,每孔 100 μ l 上述三种上清液(待检血样),37℃孵育 1h,重复洗涤。用冲洗液(50ng/孔)稀释的兔抗梅花鹿 γ-干扰素多克隆抗体,每孔 100 μ l,37℃孵育 45min 后充分洗涤。加 1 : 5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,每孔 100 μ l,37℃ 30min,充分洗涤后每孔 100 μ l 显色液,室温避光反应 10min 后,每孔加入 50 μ l 终止液(见附录 3)终止反应,在酶联免疫检测仪上于 630nm 波长处测定吸光度值。

[0172] 表 1120 份待测样品检测结果

[0173]

梅花鹿 γ-干扰素检测				
		阳性数	阴性数	合计
商品化 ELISA 试剂盒	阳性数	3	0	3
	阴性数	3	114	117
	合计	6	114	120

[0174] 表 2120 份待测样品检测结果

[0175]

梅花鹿 γ-干扰素检测				
		阳性数	阴性数	合计
商品化试纸条	阳性数	2	0	2
	阴性数	4	114	118
	合计	6	114	120

[0176] 5. 结果的判定

[0177] 当阳性与阴性对照孔的 OD 值差 ≥ 0.25 ,特异性抗原(RCE)与阴性对照孔的 OD 值差 ≥ 0.1 时,判断为结核病阳性;

[0178] 当阳性与阴性对照孔的 OD 值差 ≥ 0.25 ,特异性抗原(RCE)与阴性对照孔的 OD 值差 < 0.1 时,判断为结核病阴性;

[0179] 当阳性与阴性对照孔的 OD 值差 < 0.25, 特异性抗原 (RCE) 与阴性对照孔的 OD 值差 < 0.1 时, 结果无法确定。

[0180] 附录 1

[0181] 1、RPMI1640 基础培养液的配制

[0182] (1) 量取去离子水 950ml, 置于一定的容器中;

[0183] (2) 将 RPMI1640 粉剂 (购自上海碧云天生物技术有限公司) 10g 加于 15°C -30°C 的去离子水中, 边加边搅拌, 得到培养液;

[0184] (3) 向步骤 (2) 的培养液中按 1000ml 培养液加 2g 碳酸氢钠;

[0185] (4) 加水至 1000ml, 用 CO₂ 将培养液 pH 值调至 pH6.5-6.8, 在过滤之前应盖紧容器瓶塞;

[0186] (5) 立即用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌, 4°C 冰箱保存备用。

[0187] 附录 2

[0188] (1) 冲洗液: 氯化钠 8.0g, 氯化钾 0.2g, 磷酸氢二钠 0.2g, 磷酸二氢钾 2.9g, 吐温 -200.5ml, 用蒸馏水定容至 1000ml, pH7.4。

[0189] (2) 包被液: 碳酸钠 1.59g, 碳酸氢钠 2.93g, 用蒸馏水定容至 1000ml。

[0190] (3) 封闭液: 冲洗液 100ml, 脱脂牛奶 10g。

[0191] 附录 3

[0192] 显色液的配制:

[0193] 显色 A 液的配制: 磷酸氢二钠 71.6g, 柠檬酸 19.2g, 用蒸馏水定容至 1000ml。

[0194] 显色 B 液的配制: 0.1mol/L pH5.0 的磷酸盐 - 柠檬酸盐缓冲液 100ml (磷酸氢二钠 7.16g, 柠檬酸 1.92g, 用蒸馏水定容至 100ml), 邻苯二胺 40mg, 30% 浓度的过氧化氢 0.15ml。

[0195] 终止液: 2mol/L 硫酸 22.2ml, 蒸馏水 177.8ml。

[0196] 说明: 本发明所述的“梅花鹿 γ -干扰素”与生物材料样品保藏证明中命名的“梅花鹿干扰素 - γ ”为同一种生物材料样品, 本说明书将生物材料样品命名的“梅花鹿干扰素 - γ ”修改为“梅花鹿 γ -干扰素”更适合中文的表述习惯。

[0197] 序列表

[0198] <110> 华中农业大学

[0199] <120> 梅花鹿 γ -干扰素双抗体夹心 ELISA 检测方法及其试剂盒与应用

[0200] <130>

[0201] <141> 2010-01-28

[0202] <160> 4

[0203] <170> PatentIn version 3.1

[0204] <210> 1

[0205] <211> 438

[0206] <212> DNA

[0207] <213> 梅花鹿 (*Cervus nippon*)

[0208] <220>

[0209] <221> gene

[0210] <222>(1).. (438)
 [0211] <223>
 [0212] <220>
 [0213] <221>CDS
 [0214] <222>(1).. (438)
 [0215] <223>
 [0216] <400>1
 [0217] tct tat ggc cag ggc cca ttt ttt aaa gaa ata gaa aac tta aag gag 48
 [0218] Ser Tyr Gly Gln Gly Pro Phe Phe Lys Glu Ile Glu Asn Leu Lys Glu
 [0219] 1 5 10 15
 [0220] tat ttt aat gca agt aac cca gat gta gct gag ggt ggg cct ctt ttc 96
 [0221] Tyr Phe Asn Ala Ser Asn Pro Asp Val Ala Glu Gly Gly Pro Leu Phe
 [0222] 20 25 30
 [0223] ata gaa att ttg aag aat tgg aaa gag gag agt gac aga aaa att att 144
 [0224] Ile Glu Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Ile
 [0225] 35 40 45
 [0226] cag agc caa att gtc tcc ttc tac ttc aaa ctc ttt gaa aac ttc aaa 192
 [0227] Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Glu Asn Phe Lys
 [0228] 50 55 60
 [0229] gat aac cag gtc att cag agg agc gtg gat atc atc aag caa gac atg 240
 [0230] Asp Asn Gln Val Ile Gln Arg Ser Val Asp Ile Ile Lys Gln Asp Met
 [0231] 65 70 75 80
 [0232] ttt cag aag ttc ttg aat ggc agc tct gag aaa ctg gag gac ttc aaa 288
 [0233] Phe Gln Lys Phe Leu Asn Gly Ser Ser Glu Lys Leu Glu Asp Phe Lys
 [0234] 85 90 95
 [0235] aag ctg att caa att tcg gtg gat gat atg cag atc cag cgc aaa gcc 336
 [0236] Lys Leu Ile Gln Ile Ser Val Asp Asp Met Gln Ile Gln Arg Lys Ala
 [0237] 100 105 110
 [0238] ata aat gaa ctc atc aaa gtg atg aat gac ctg tcg cca aaa tct aac 384
 [0239] Ile Asn Glu Leu Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser Pro Lys Ser Asn
 [0240] 115 120 125
 [0241] ctc ata aag cgg aag aga agt cag aat ctc ttt cga ggc cgg aga gca 432
 [0242] Leu Ile Lys Arg Lys Arg Ser Gln Asn Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala
 [0243] 130 135 140
 [0244] tca atg 438
 [0245] Ser Met
 [0246] 145
 [0247] <210>2
 [0248] <211>146

[0249] <212>PRT
 [0250] <213> 梅花鹿 (Cervus nippon)
 [0251] <400>2
 [0252] Ser Tyr Gly Gln Gly Pro Phe Phe Lys Glu Ile Glu Asn Leu Lys Glu
 [0253] 1 5 10 15
 [0254] Tyr Phe Asn Ala Ser Asn Pro Asp Val Ala Glu Gly Gly Pro Leu Phe
 [0255] 20 25 30
 [0256] Ile Glu Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Ile
 [0257] 35 40 45
 [0258] Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Glu Asn Phe Lys
 [0259] 50 55 60
 [0260] Asp Asn Gln Val Ile Gln Arg Ser Val Asp Ile Ile Lys Gln Asp Met
 [0261] 65 70 75 80
 [0262] Phe Gln Lys Phe Leu Asn Gly Ser Ser Glu Lys Leu Glu Asp Phe Lys
 [0263] 85 90 95
 [0264] Lys Leu Ile Gln Ile Ser Val Asp Asp Met Gln Ile Gln Arg Lys Ala
 [0265] 100 105 110
 [0266] Ile Asn Glu Leu Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser Pro Lys Ser Asn
 [0267] 115 120 125
 [0268] Leu Ile Lys Arg Lys Arg Ser Gln Asn Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala
 [0269] 130 135 140
 [0270] Ser Met
 [0271] 145
 [0272] <210>3
 [0273] <211>30
 [0274] <212>DNA
 [0275] <213> 梅花鹿 (Cervus nippon)
 [0276] <220>
 [0277] <221>primer_bind
 [0278] <222>(1)..(30)
 [0279] <223>
 [0280] <400>3
 [0281] atatggatcc gatcttatgg ccagggccca 30
 [0282] <210>4
 [0283] <211>34
 [0284] <212>DNA
 [0285] <213> 梅花鹿 (Cervus nippon)
 [0286] <220>
 [0287] <221>primer_bind

[0288] <222>(1)..(34)

[0289] <223>

[0290] <400>4

[0291] taataagctt ttacgttgat gctctccggc ctcg

34

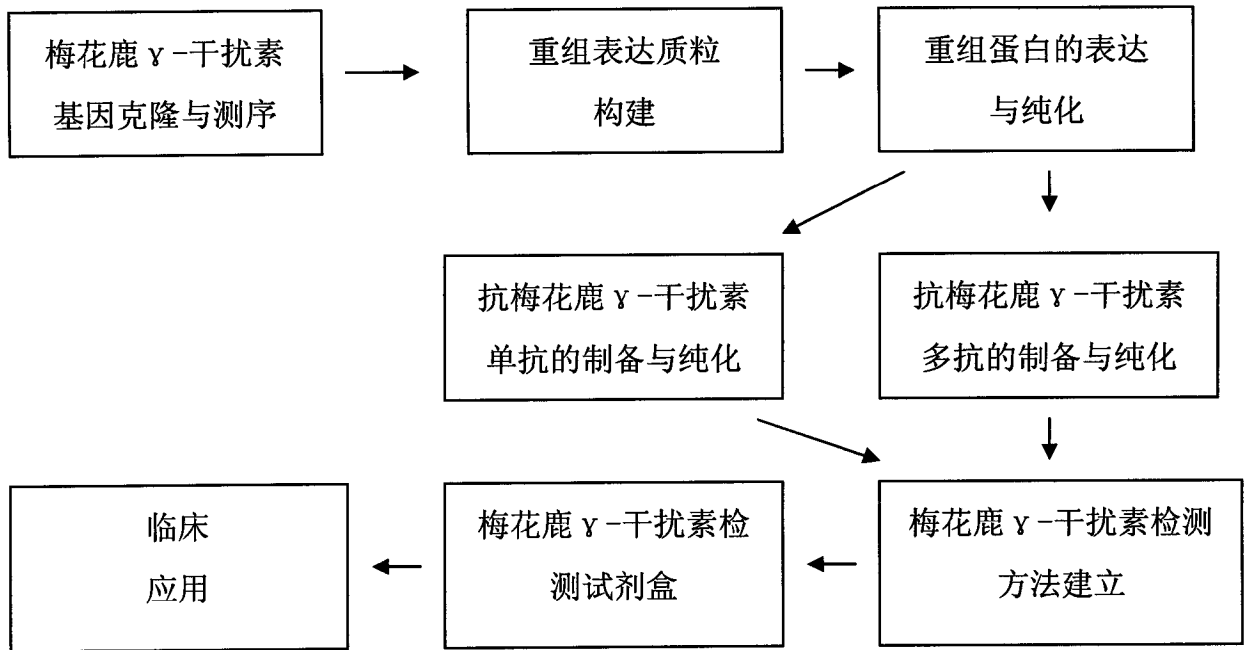


图 1

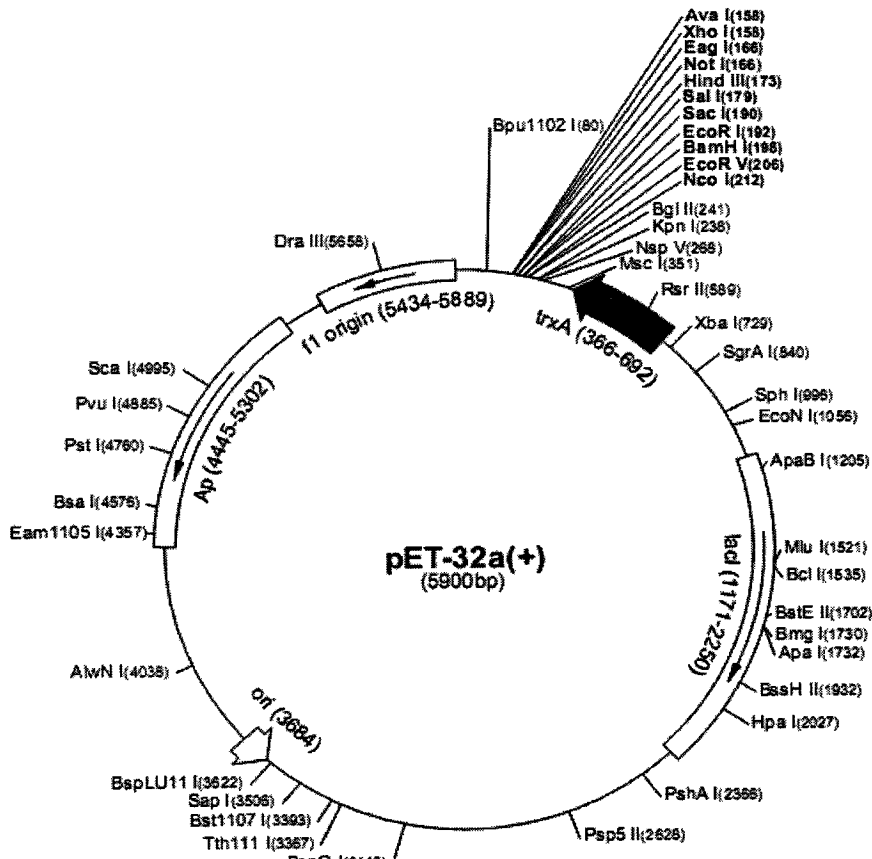


图 2

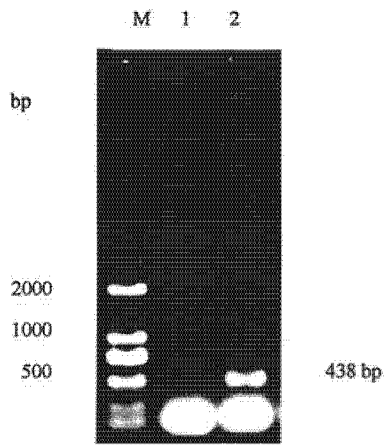


图 3

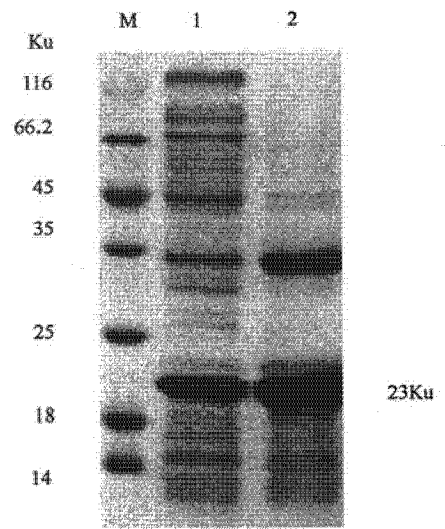


图 4

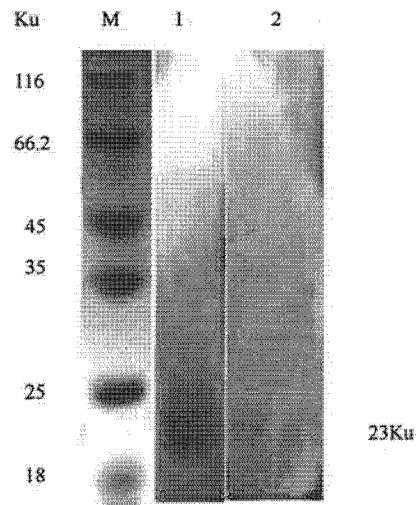


图 5

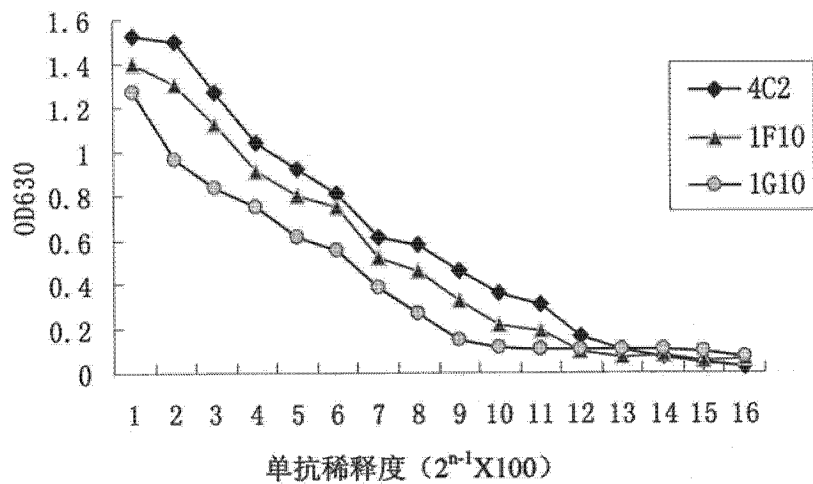


图 6

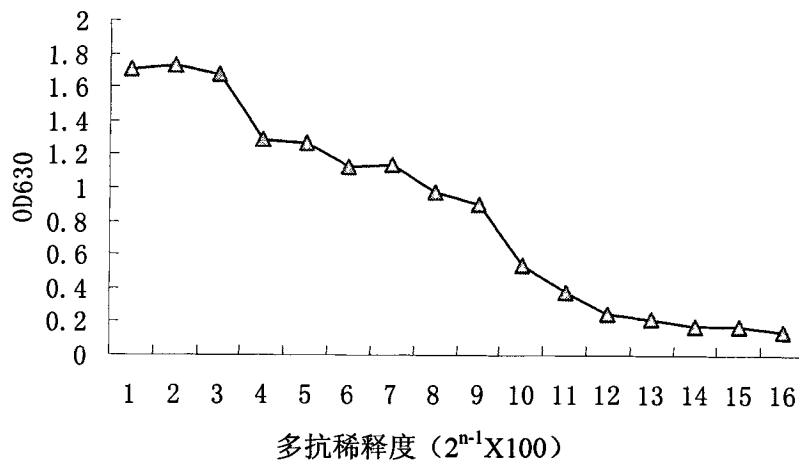


图 7

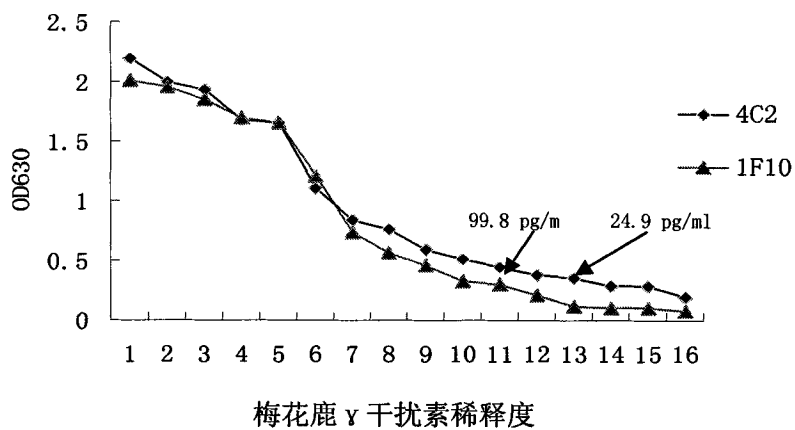


图 8

专利名称(译)	梅花鹿 γ -干扰素双抗体夹心ELISA检测方法及其试剂盒与应用		
公开(公告)号	CN101788563A	公开(公告)日	2010-07-28
申请号	CN201010104575.X	申请日	2010-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	郭爱珍 刘颖 张广智 廖娟红 刘冬光 于清龙 王冰 邹新峰 熊家军 杨利国 陈焕春		
发明人	郭爱珍 刘颖 张广智 廖娟红 刘冬光 于清龙 王冰 邹新峰 熊家军 杨利国 陈焕春		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535 G01N21/78 G01N1/28		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN101788563B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于农业微生物基因工程和动物传染病领域。涉及一种梅花鹿 γ -干扰素双夹心ELISA检测方法及其试剂盒与应用。获得一株能稳定分泌梅花鹿 γ -干扰素单克隆抗体的细胞株CerIFN- γ 4C，其保藏号为CCTCC NO：C200966。本发明还建立了梅花鹿 γ -干扰素双夹心ELISA检测方法，核心是，构建梅花鹿 γ -干扰素的单克隆抗体，制备梅花鹿 γ -干扰素多克隆抗体等。本发明的试剂盒包含梅花鹿 γ -干扰素的单克隆抗体，梅花鹿 γ -干扰素的多克隆抗体，牛结核特异性三基因融合抗原蛋白RCE及其他试剂。本发明还公开了所述检测方法和试剂盒的应用。本发明特异性强、灵敏度高、操作简便和诊断快速。

