

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510095208.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2006年4月26日

[11] 公开号 CN 1763534A

[22] 申请日 2005.10.28

[21] 申请号 200510095208.7

[71] 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路 88 号

[72] 发明人 秦爱建 许金俊 李瑞芳 金文杰
邵红霞

[74] 专利代理机构 扬州市锦江专利事务所

代理人 江平

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称

奶牛结核病的快速检测方法及其特异性单克隆抗体 BovIFN- γ -4A3、BovIFN- γ -4G5 的构建方法

[57] 摘要

奶牛结核病的快速检测方法及其特异性单克隆抗体 BovIFN- γ -4A3、BovIFN- γ -4G5 的构建方法，涉及奶牛结核病的检测技术领域。用重组菌诱导表达的融合蛋白 GST-BovIFN- γ 免疫 Balb/c 小鼠，通过杂交瘤技术研制出抗 BovIFN- γ 的单克隆抗体，即获得特异性单克隆抗体 BovIFN- γ -4A3 和 BovIFN- γ -4G5。单抗 BovIFN- γ -4A3 属于 IgG2b 亚类，单抗 BovIFN- γ -4G5 属于 IgM 亚类，能特异性识别 BovIFN- γ 。本发明在制备了 rBovIFN- γ 的基础上，研制出抗 BovIFN- γ 的单克隆抗体，以单克隆抗体为基础建立快速检测病牛血细胞分泌的 IFN- γ 量，从而判断奶牛的结核病感染情况。该方法检测步骤简单、敏感性高、快速，整个检测过程只需 4 小时。

1、奶牛结核病的快速检测方法，其特征在于采用 22mM 的碳酸钠稀释特异性单克隆抗体或多克隆抗体，并包被酶标板，4 °C 保存；取 1.5ml 新鲜牛全血加肝素抗凝剂，在 4 小时内分装于 2 孔 24 孔细胞培养板中，分别加入加 100ul PBS 和 100ul 牛结核杆菌素，所述牛结核杆菌素的 PPD 300ug/ml，37°C，5%CO₂ 培养箱培养 16 小时，取其上清作为待检样本；将待检样本加入酶标板，37 °C 作用 1 小时，然后以 PBS-T 洗涤 3-5 次，再加入工作浓度酶标记的抗 BovIFN- γ 的单克隆抗体，经 37 °C 温浴 1 小时，以 PBS-T 洗涤 3-5 次，再以酶的底物溶液 OPD 显色，测定 OD₄₉₀ 的值；如果用 PPD 刺激的细胞上清测得的 OD₄₉₀ 比 PBS 刺激的细胞上清的 OD₄₉₀ 大 0.1，则判该样本为牛结核阳性，否则判为阴性。

2、用于奶牛结核病的快速检测的特异性单克隆抗体 BovIFN- γ -4A3、BovIFN- γ -4G5 的构建方法，其特征在于用重组菌诱导表达的融合蛋白 GST-BovIFN- γ 免疫 Balb/c 小鼠，通过杂交瘤技术研制出抗 BovIFN- γ 的单克隆抗体，即获得特异性单克隆抗体 BovIFN- γ -4A3 和 BovIFN- γ -4G5。

3、根据权利要求 2 所述用于奶牛结核病的快速检测的特异性单克隆抗体 BovIFN- γ -4A3、BovIFN- γ -4G5 的构建方法，其特征在于构建的具体步骤是：

1) 免疫原的制备与动物免疫：重组菌在 28 °C 温度条件下摇瓶培养 5 小时，以 IPTG 诱导表达 5 小时，离心取沉淀，经 SDS-PAGE 后，切取目的条带，制成冻干粉；取冻干粉用 PBS 稀释，腹腔注射 0.3ml 免疫 Balb/c 小鼠，间隔 7 天免疫一次，二免，三免同上；

2) 细胞融合：最后一次免疫三天后进行细胞融合；

3) 间接 ELISA：采用超声波分别破碎重组菌 pGEX-BovIFN- γ 和 pGEX，制备抗原，用 22mM 的碳酸钠缓冲液稀释包被 ELISA 板，5%脱脂乳封闭非特

异性位点，检测杂交瘤细胞上清；经辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 和 IgM 作用，邻苯二胺底物显色，判定结果；选取只与融合蛋白反应而不与 GST 反应的培养孔细胞作进一步培养，并连续亚克隆，直到克隆细胞达到 100%阳性，并按常规方法制备腹水单抗；

4)间接免疫荧光试验:重组杆状病毒 Bacmid-BovIFN- γ 感染昆虫细胞 Sf9, 然后加预冷的丙酮:乙醇固定,再分别与抗 BovIFN- γ 单抗和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 37°C 反应 40min, 洗后荧光显微镜观察; 试验中设空载体 Bacmid-Bacmid 转染 Sf9 细胞、正常未转染 Sf9 细胞、正常 ICR 血清代替鼠抗 rBovIFN- γ 高免血清三个阴性对照;

5) 单克隆抗体对 BovIFN- γ 的中和抑制作用: 取对数生长期的 MDBK 接种于 96 孔细胞培养板, 100 μ l/孔, 培养细胞生长成单层; 将单抗 BovIFN- γ -4A3 与 BovIFN- γ -4G5 分别用细胞培养液从 1: 100 稀释到 1: 10000, 100 μ l/孔, 然后与 100U 的 rBovIFN- γ 等量混合, 4°C 中和作用过夜, 最后用传统的细胞病变抑制法检测 rBovIFN- γ 的抗 VSV 病毒活性。

奶牛结核病的快速检测方法及其特异性单克隆抗体

BovIFN- γ -4A3、BovIFN- γ -4G5 的构建方法

技术领域

本发明涉及奶牛结核病的检测技术领域。

背景技术

牛结核病（Bovine Tuberculosis）是由牛结核分枝杆菌（*Mycobacterium bovis*）引起的一种人兽共患的慢性传染病。世界动物卫生组织（WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH，简称 OIE）将其列为 B 类动物疫病，我国将其列为二类动物疫病。近年来随着某些疾病引起的免疫功能低下及艾滋病的流行，使全球性的结核病引起的感染性疾病发病率有所上升，严重威胁着人类的生命安全，使人们重新对结核病加以重视。事实上，牛结核病所造成的损失大于牛的其他各种疾病所造成损失的总和。许多学者在寻求发现结核分支杆菌的特异抗原成份，用于分析结核病的免疫反应及试图发展更好的疫苗和特异性诊断方法。

目前结核的诊断和检疫的方法主要是病原分离鉴定和结核菌素试验。如果开放性牛结核病诊断，采取病牛的病灶、痰、尿、粪便、乳及其它分泌物样品，作抹片或集菌处理后抹片，用抗酸染色法染色镜检，以及分离培养和动物接种等。但是对兽医来说，使用这些样品是不太适用的。单克隆抗体已经被用于牛分支杆菌培养物的阳性鉴定。以每毫升 10^5 cfu 的菌体浓度与 ELISA 相结合直接检测牛分支杆菌。惟一从牛分离出的用于体外检测牛结核的可实用的诊断样品就是痰液，此阶段的细菌水平最可能在该病发展到一定阶段时才能检测到。

结核菌素试验是广泛使用的最古老的免疫学试验方法之一。自从罗伯特·库克首次在 1891 年提出了结核菌素反应，这种试验一直应用于动物和人结核病的免疫诊断。尽管传统的结核菌素试验得到了广泛的应用，但已证实

该方法存在的问题。一些详细研究牛单一结核菌素试验（SIDT）的敏感性和特异性的文献指出，在某种情况下，这种试验方法的敏感性会大大下降。

Francis J 等(1978)重复了该项工作，结果发现 SIDT 的敏感性只是中等水平(平均 72%)。Wood P R 等发现 SIDT 的敏感性为 65.6%。因此,亟待探索诊断结核病的替代试验。Thoen C A 等首次报道了用结核纯化蛋白提取物作抗原来进行牛结核病的酶联免疫吸附试验（ELISA），在 ELISA 的早期研究中,Ritacco V 等 报道了其对牛结核病的敏感性为 90%，特异性为 89.8%，但是后来该研究组成员对 ELISA 进行了更深入的研究,发现 ELISA 的敏感性下降至 73.6%。Plackett 等报道，MPT70-ELISA 的特异性为 98.2%； 敏感性为 49.5%。迄今也没有诊断结核病的血清学试验被医学和兽医学实验室用于常规方法。

澳大利亚发展了一种迅速的全血培养系统，检查细胞因子—— γ 干扰素的释放，作为牛结核分支杆菌抗原（PPD）的阳性反应的指示剂。结核分支杆菌的 ESAT-6 是免疫记忆效应 T 细胞的主要靶抗原之一，可在再次感染的早期诱导其迅速增殖并释放高水平的 γ 干扰素，有效激活巨噬细胞，从而控制结核病。因此，研制重组牛 γ 干扰素的单克隆抗体，并用这些单克隆抗体开发了一种对牛 γ 干扰素敏感的酶免疫试验（EIA）。牛 γ 干扰素 EIA 一旦与全血培养系统相结合，就可产生一种特异、快速（24 h）和敏感的体外检测牛分支杆菌感染牛的特异性细胞免疫反应。 γ 干扰素试验表现出 93.6% 的敏感性，而结核菌素试验敏感性仅为 65.6%。 γ 干扰素试验将成为 21 世纪诊断牛结核病的最新诊断试验方法。

BovIFN- γ 单抗在奶牛疫病检疫牛已为人们所关注，如应用于牛结核病的检测。Rothel JS 等建立了一种双抗体夹心 ELISA 方法，通过检测 BovIFN- γ 水平从而诊断牛的结核病，该方法现已成为澳大利亚等国家结核病检测的标准方法。该方法灵敏性达到 93.6%，比传统的皮试实验 65.6% 的灵敏度高得多。

发明内容

本发明目的在于发明一种能快速检测由牛结核分枝杆菌引起的牛结核病的奶牛结核病的快速检测方法。

本发明采用 22mM 的碳酸钠稀释特异性单克隆抗体或多克隆抗体，并包被酶标板，4 °C 保存；取 1.5ml 新鲜牛全血加肝素抗凝剂，在 4 小时内分装于 2 孔 24 孔细胞培养板中，分别加入加 100ul PBS 和 100ul 牛结核杆菌素(PPD 300ug/ml)，37°C,5%CO₂ 培养箱培养 16 小时，取其上清作为待检样本；将待检样本加入酶标板，37 °C 作用 1 小时，然后以 PBS-T 洗涤 3-5 次，再加入工作浓度酶标记的抗 BovIFN- γ 的单克隆抗体，经 37 °C 温浴 1 小时，以 PBS-T 洗涤 3-5 次，再以酶的底物溶液 OPD 显色，测定 OD₄₉₀ 的值；如果用 PPD 刺激的细胞上清测得的 OD₄₉₀ 比 PBS 刺激的细胞上清的 OD₄₉₀ 大 0.1，则判该样本为牛结核阳性，否则判为阴性。

本发明的另一个目的在于发明用于奶牛结核病的快速检测的特异性单克隆抗体 BovIFN- γ -4A3、BovIFN- γ -4G5 的构建方法。

本发明用重组菌诱导表达的融合蛋白 GST-BovIFN- γ 免疫 Balb/c 小鼠，通过杂交瘤技术研制出抗 BovIFN- γ 的单克隆抗体，即获得特异性单克隆抗体 BovIFN- γ -4A3 和 BovIFN- γ -4G5。

试验证明，两株杂交瘤细胞分泌抗体的性能稳定，单抗 BovIFN- γ -4A3 属于 IgG2b 亚类，单抗 BovIFN- γ -4G5 属于 IgM 亚类，能特异性识别 BovIFN- γ 。本发明在制备了 rBovIFN- γ 的基础上，研制出抗 BovIFN- γ 的单克隆抗体，以单克隆抗体为基础建立快速检测病牛血细胞分泌的 IFN- γ 量，从而判断奶牛的结核病感染情况。该方法检测步骤简单、敏感性高、快速，整个检测过程只需 4 小时。

用于奶牛结核病的快速检测的特异性单克隆抗体 BovIFN- γ -4A3、BovIFN- γ -4G5 的具体构建步骤是：

1) 免疫原的制备与动物免疫：重组菌在 28 °C 温度条件下摇瓶培养 5 小时，以 IPTG 诱导表达 5 小时，离心取沉淀，经 SDS-PAGE 后，切取目的条带，制成冻干粉；取冻干粉用 PBS 稀释，腹腔注射 0.3ml 免疫 Balb/c 小鼠，间隔 7 天免疫一次，二免，三免同上；

2) 细胞融合：最后一次免疫三天后进行细胞融合；

3) 间接 ELISA: 采用超声波分别破碎重组菌 pGEX-BovIFN- γ 和 pGEX, 制备抗原, 用 22mM 的碳酸钠缓冲液稀释包被 ELISA 板, 5%脱脂乳封闭非特异性位点, 检测杂交瘤细胞上清; 经辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 和 IgM 作用, 邻苯二胺底物显色, 判定结果; 选取只与融合蛋白反应而不与 GST 反应的培养孔细胞作进一步培养, 并连续亚克隆, 直到克隆细胞达到 100%阳性, 并按常规方法制备腹水单抗;

4) 间接免疫荧光试验: 重组杆状病毒 Bacmid-BovIFN- γ 感染昆虫细胞 Sf9, 然后加预冷的丙酮: 乙醇固定, 再分别与抗 BovIFN- γ 单抗和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 37°C 反应 40min, 洗后荧光显微镜观察; 试验中设空载体 Bacmid-Bacmid 转染 Sf9 细胞、正常未转染 Sf9 细胞、正常 ICR 血清代替鼠抗 rBovIFN- γ 高免血清三个阴性对照;

5) 单克隆抗体对 BovIFN- γ 的中和抑制作用: 取对数生长期的 MDBK 接种于 96 孔细胞培养板, 100 μ l/孔, 培养细胞生长成单层; 将单抗 BovIFN- γ -4A3 与 BovIFN- γ -4G5 分别用细胞培养液从 1: 100 稀释到 1: 10000, 100 μ l/孔, 然后与 100U 的 rBovIFN- γ 等量混合, 4°C 中和作用过夜, 最后用传统的细胞病变抑制法检测 rBovIFN- γ 的抗 VSV 病毒活性。

附图说明

图 1 为感染重组病毒的 Sf9 细胞后的阳性荧光照片。

图 2 为空载体 Bacmid 转染 Sf9 细胞后的阴性荧光照片。

具体实施例

1 构建单克隆抗体 BovIFN- γ -4A3、BovIFN- γ -4G5

1.1 材料

1.1.1 质粒、细菌与病毒 表达 GST-BovIFN- γ 融合蛋白的重组质粒 pGEX-BovIFN- γ 、重组杆状病毒 rBacmid-BovIFN- γ 为江苏省动物预防医学重点实验室构建并保存, 宿主菌 BL21 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 实验动物、细胞 6-10 周龄雄性 Balb/c 小鼠, 8 周龄以上雄性 ICR 小鼠, 均由本校比较医学中心提供。小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0、昆虫细胞 (Sf9) 由江苏省动物预防医学重点实验室保存。

1.1.3 主要试剂 DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司；细胞融合用次黄嘌呤（H）、胸腺嘧啶核苷（T）、氨基蝶呤（A）、聚乙二醇（PEG4000）、辣根过氧化物酶（HRP）标记羊抗鼠 IgG、IgM 均购自 Sigma 公司；优级新生牛血清和胎牛血清购自中美合资民海生物工程有限公司；邻苯二胺（OPD）、DAB 均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫原的制备与动物免疫 重组菌培养按文献[10]进行，以 IPTG 诱导表达，离心取沉淀，经 SDS-PAGE 后，切取目的条带，制成冻干粉。取冻干粉用 PBS 稀释，腹腔注射 0.3ml 免疫 Balb/c 小鼠，间隔 7 天免疫一次，二免，三免同上，最后一次免疫三天后进行细胞融合。

1.2.2 细胞融合 采用常规方法进行。

1.2.3 间接 ELISA 采用超声波破碎法制备抗原，用碳酸盐缓冲液（pH9.6）稀释包被 ELISA 板，5% 脱脂乳封闭非特异性位点，检测杂交瘤细胞上清。经辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠 IgG 与等量 IgM 作用，邻苯二胺（OPD）底物显色，判定结果。选取只与融合蛋白反应而不与 GST 反应的培养孔细胞作进一步培养，并连续亚克隆，直到克隆细胞达到 100% 阳性，并按常规方法制备腹水单抗。

1.2.4 间接免疫荧光试验（IFA） 按常规方法进行，主要步骤如下：重组杆状病毒 Bacmid-BovIFN- γ 感染昆虫细胞（Sf9），然后加预冷的丙酮：乙醇固定，再分别与抗 BovIFN- γ 单抗和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG，37℃ 反应 40min，洗后荧光显微镜观察。试验中设空载体 Bacmid-Bacmid 转染 Sf9 细胞、正常未转染 Sf9 细胞、正常 ICR 血清代替鼠抗 rBovIFN- γ 高免血清三个阴性对照。

1.2.5 单克隆抗体对 BovIFN- γ 的中和抑制作用，取对数生长期的 MDBK 接种于 96 孔细胞培养板，100 μ l/孔，培养细胞生长成单层；将单抗 BovIFN- γ -4A3 与 BovIFN- γ -4G5 分别用细胞培养液从 1: 100 稀释到 1: 10000，100 μ l/孔，然后与 100U 的 rBovIFN- γ 等量混合，4℃ 中和作用过夜，最后用传统的细胞病变抑制法检测 rBovIFN- γ 的抗病毒活性。

2、结果

2.1 单克隆抗体细胞株的建立及其稳定性测定

采用上述方法，经过 6 次细胞融合，用间接 ELISA 试验筛选，获得 2 株阳性杂交瘤细胞，连续几次亚克隆之后，获得的杂交瘤培养上清为 100%阳性。经体外连续培养数代，并经 Balb/c 小鼠体内传 3 代，其分泌单克隆抗体的能力不变。间接 ELISA 检测结果如表 1：

表 1. 间接 ELISA 检测抗 rBovIFN- γ 的结果

table1. results of monoclonal antibodies to rBovIFN- γ detected by indirect ELISA

| 包被抗原 | 一抗 | | | |
|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| | 抗 rBovIFN- γ 多抗血清 | BovIFN- γ -4A3 | BovIFN- γ -4G5 | 抗 GST 单抗 |
| 含 GST-BovIFN- γ 融合蛋白的 菌体裂解液 | 1.155 ^a | 1.830 | 1.276 | 0.685 |
| 含 GST 蛋白的菌体裂解液 | 1.001 | 0.031 | 0.085 | 0.894 |

注：a, OD₄₉₀ 值

从表 1 中可以看出，GST 单抗与融合蛋白和 GST 蛋白均有反应说明包被抗原正确；杂交瘤细胞培养上清与腹水均只对融合蛋白反应，而不与 GST 反应，说明筛选到的单抗是特异性的针对 BovIFN- γ 的抗体。

2.2 单克隆抗体识别真核细胞 (Sf9) 表达的 rBovIFN- γ

为进一步证明单克隆抗体是针对 BovIFN- γ ，而不是细菌的其他成分，作者用上述方法进行间接免疫荧光试验 (IFA)，如图 1、2 所示，结果表明，感染重组病毒的 Sf9 细胞在荧光倒置显微镜下可见特异性亮绿色荧光 (如图 1)，而空载体 Bacmid 转染 Sf9 细胞、正常未转染 Sf9 细胞、正常 ICR 血清代替鼠抗 rBovIFN- γ 高免血清为一抗三个对照均为阴性 (如图 2)。说明单克隆抗体能特异性识别真核细胞 (Sf9 细胞) 表达的重组 BovIFN- γ 。

2.3 抗 BovIFN- γ 单抗的部分生物学特性

应用间接 ELISA 方法检测证明，腹水单抗的效价可以达到 1: 1.3×10^7 ，细胞上清效价达到 1: 25600；与其它动物 γ -IFN 如重组鸡 γ -IFN 无交叉反应 (鸡 γ -IFN 制备的阳性血清 OD₄₉₀ 值为 1.407，阴性对照为 0.053)。

应用捕获 ELISA 方法检测单抗的亚型，结果单抗 BovIFN- γ -4A3 的抗体为 IgG2b 亚型，单抗 BovIFN- γ -4G5 的抗体亚型为 IgM。

表 2. 单抗的部分生物学特性结果

table2. the results of biological features of the mAbs

| 杂交瘤细胞株 | 细胞上清 | 腹水 | 抗体类型 | 与 rCHIFN- γ 反应 |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------|-----------------------|
| BovIFN- γ -4A3 | 1: 100 \times 2 ⁸ | 1: 100 \times 2 ¹⁷ | IgG2b | 0. 048 ^a |
| BovIFN- γ -4G5 | 1: 100 \times 2 ⁵ | 1: 100 \times 2 ⁸ | IgM | 0. 095 |

注：a, OD₄₉₀ 值

2.4 抗 BovIFN- γ 单抗具有中和活性

将单抗 BovIFN- γ -4A3 经系列稀释后与 100U 的昆虫细胞表达的 rBovIFN- γ 4℃作用过夜，然后在通过测定其抗病毒活性，结果发现单抗 BovIFN- γ -4A3 具有一定的中和作用，各稀释度单抗与干扰素中和后，其抗病毒活性效价明显下降，结果见表 3。

表 3. 单抗 BovIFN- γ -4A3 对 rBovIFN- γ 抗病毒活性的中和作用

Table3. Neutralization of BovIFN- γ -4A3 to rBovIFN- γ for the antiviral activity

| rBovIFN- γ | BovIFN- γ -4A3 单抗稀释度 | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | 1:100 | 1:200 | 1:500 | 1:1000 | 1:2000 | 1:4000 | 1:6000 | 1:10000 |
| Activity | 0 ^a | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 32 | 64 |

注：a, 残余的干扰素抗病毒效价，单位为 U

2.5 单克隆抗体应用于牛结核病的检测

2.5.1 取 1.5ml 新鲜牛全血加肝素抗凝剂，在 4 小时内分装于 2 孔 24 孔细胞培养板中，分别加入加 100ul PBS 和 100ul 牛结核杆菌素（PPD 300ug/ml），37℃,5%CO₂ 培养箱培养 16 小时，取其上清作为待检样本。

2.5.2 采用 22mM 的碳酸钠稀释特异性单克隆抗体或多克隆抗体，并包被酶标板，4℃保存。

2.5.3 取 1.5ml 新鲜牛全血加肝素抗凝剂，在 4 小时内分装于 2 孔 24 孔

细胞培养板中，分别加入加 100ul PBS 和 100ul 牛结核杆菌素（PPD 300ug/ml），37℃，5%CO₂ 培养箱培养 16 小时，取其上清作为待检样本。

2.5.4 将待检样本加入酶标板，37℃作用 1 小时，然后以 PBS-T 洗涤 3-5 次，再加入工作浓度酶标记的抗 BovIFN- γ 的单克隆抗体，经 37℃温浴 1 小时，以 PBS-T 洗涤 3-5 次，再以酶的底物溶液 OPD 显色，测定 OD₄₉₀ 的值。细胞培养物上清中 γ 干扰素含量与 OD₄₉₀ 值为正相关。如果用 PPD 刺激的细胞上清测得的 OD₄₉₀ 比 PBS 刺激的细胞上清的 OD₄₉₀ 大 0.1，则判该样本为牛结核阳性，否则判为阴性。

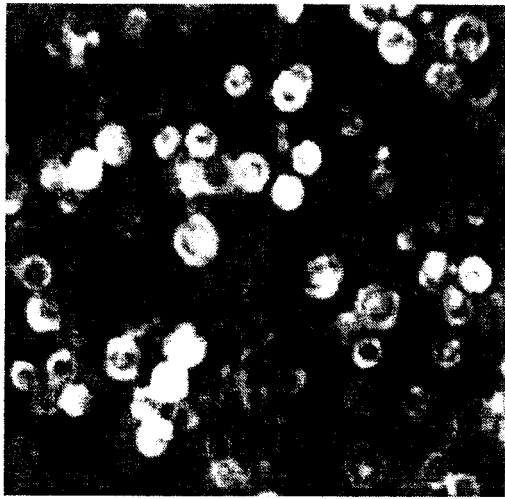


图 1

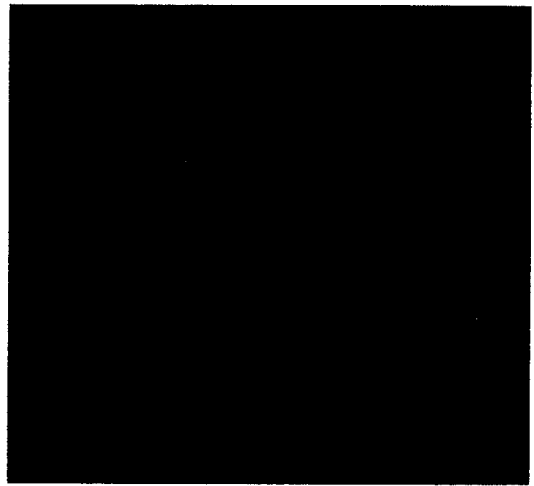


图 2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 奶牛结核病的快速检测方法及其特异性单克隆抗体BovIFN - γ - 4A3、BovIFN - γ - 4G5的构建方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1763534A | 公开(公告)日 | 2006-04-26 |
| 申请号 | CN200510095208.7 | 申请日 | 2005-10-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 扬州大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 扬州大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 扬州大学学报 | | |
| [标]发明人 | 秦爱建 许金俊 李瑞芳 金文杰 邵红霞 | | |
| 发明人 | 秦爱建 许金俊 李瑞芳 金文杰 邵红霞 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/531 G01N33/569 | | |
| 代理人(译) | 江平 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

奶牛结核病的快速检测方法及其特异性单克隆抗体BovIFN - γ - 4A3、BovIFN - γ - 4G5的构建方法，涉及奶牛结核病的检测技术领域。用重组菌诱导表达的融合蛋白GST - BovIFN - γ 免疫Balb/c小鼠，通过杂交瘤技术研制出抗BovIFN - γ 的单克隆抗体，即获得特异性单克隆抗体BovIFN - γ - 4A3和BovIFN - γ - 4G5。单抗BovIFN - γ - 4A3属于IgG2b亚类，单抗BovIFN - γ - 4G5属于IgM亚类，能特异性识别BovIFN - γ 。本发明在制备了rBovIFN - γ 的基础上，研制出抗BovIFN - γ 的单克隆抗体，以单克隆抗体为基础建立快速检测病牛血细胞分泌的IFN - γ 量，从而判断奶牛的结核病感染情况。该方法检测步骤简单、敏感性高、快速，整个检测过程只需4小时。

