



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107286241 A

(43)申请公布日 2017.10.24

(21)申请号 201710559393.3

C12N 5/20(2006.01)

(22)申请日 2017.07.10

G01N 33/68(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 33/577(2006.01)

CGMCC No.13834 2017.04.24

G01N 33/532(2006.01)

CGMCC No.13835 2017.04.24

C12R 1/91(2006.01)

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业大学西校区

(72)发明人 郑世军 柳亚楠 王永强 李晓齐
曹红

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51)Int.Cl.

C07K 16/24(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种检测禽 γ -干扰素含量的方法及其专用试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测禽 γ -干扰素含量的方法及其专用试剂盒。本发明利用chIFN- γ 单克隆抗体建立了针对chIFN- γ 在蛋白水平上的双夹心ELISA检测方法。通过实验证明：本发明的抗chIFN- γ 单克隆抗体具有良好的特异性和亲和力，能够准确地反映出血清或细胞上清中chIFN- γ 的含量，且本发明的检测方法快捷、高效又准确，解决了现有技术中采用荧光定量PCR检测方法带来的操作繁琐，耗时耗力，易受操作及其他外部条件影响等问题，不仅有助于评价chIFN- γ 在机体内的动态变化水平，为疾病的预防和治疗提供很好的参考，而且有助于了解禽类传染性疾病的发生、发展、转归情况及机体保护性免疫反应的动态。

1. 抗chIFN- γ 的单克隆抗体,是由保藏号为CGMCC No.13834的杂交瘤细胞株LYN1分泌的。

2. 抗chIFN- γ 的单克隆抗体,是由保藏号为CGMCC No.13835的杂交瘤细胞株LYN2分泌的。

3. 一株分泌抗chIFN- γ 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株LYN1,其保藏号为CGMCC No.13834。

4. 一株分泌抗chIFN- γ 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株LYN2,其保藏号为CGMCC No.13835。

5. 一种检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量的酶联免疫试剂盒,其包括权利要求1所述的单克隆抗体和/或权利要求2所述的单克隆抗体。

6. 权利要求1或2所述的单克隆抗体或权利要求3或4所述的杂交瘤细胞株或权利要求5所述的酶联免疫试剂盒在检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量中的应用;

或,权利要求1或2所述的单克隆抗体或权利要求3或4所述的杂交瘤细胞株在制备检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量的试剂或胶体金试纸条或试剂盒中的应用。

7. 一种检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量的方法,是以权利要求1所述的单克隆抗体为包被抗体、权利要求2所述的单克隆抗体为检测抗体的双抗体夹心ELISA检测方法。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:

(1) 将权利要求1所述的单克隆抗体包被到酶标板上,洗涤;

(2) 封闭(1)得到的酶标板,洗涤;

(3) 向(2)得到的酶标板中加入chIFN- γ 标准品或待测样品,孵育,洗涤;

(4) 向(3)得到的酶标板中加入生物素化的权利要求2所述的单克隆抗体,孵育,洗涤;

(5) 向(4)得到的酶标板中加入HRP标记的链霉亲和素,孵育,洗涤;

(6) 向(5)得到的酶标板中加入底物显色,显色后加入终止液终止反应;

(7) 用酶标仪检测加入chIFN- γ 标准品的各孔的吸光度值,以chIFN- γ 标准品浓度为横坐标、以酶标仪的读数为纵坐标绘制标准曲线;

(8) 用酶标仪检测加入待测样品的孔的吸光度值,将吸光度值代入所述标准曲线,即得待测样品中chIFN- γ 的浓度。

9. 根据权利要求7或8所述的方法,其特征在于:

或,所述步骤(1)中,用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液将权利要求1所述的单克隆抗体稀释后包被到酶标板上;

或,所述步骤(2)中,用脱脂奶溶液封闭(1)得到的酶标板;

或,所述步骤(3)中,用BSA溶液将chIFN- γ 标准品稀释后加入酶标板中;

或,所述步骤(4)中,用BSA溶液将生物素化的权利要求2所述的单克隆抗体稀释至1.0 μ g/mL后加入酶标板中。

10. 根据权利要求7-9中任一所述的方法,其特征在于:

所述步骤(1)中,所述抗体的浓度稀释为4 μ g/mL;所述包被的条件为4 $^{\circ}$ C包被12h;所述柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液的浓度为0.05M,pH为5.0;

所述步骤(2)中,所述脱脂奶溶液的质量分数为5%;所述封闭的条件为4 $^{\circ}$ C封闭12h;

所述BSA溶液的质量分数为1%；
所述步骤(3)中,所述孵育时间为1h；
所述步骤(4)中,所述孵育时间为2h；
所述步骤(5)中,所述孵育时间为15min；
所述用酶标仪检测吸光度值时的波长为450nm；
所述洗涤的次数为6次。

一种检测禽 γ -干扰素含量的方法及其专用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种检测禽 γ -干扰素(IFN- γ)含量的方法及其专用试剂盒。

背景技术

[0002] γ -干扰素(IFN- γ)是由活化的T淋巴细胞和NK细胞产生,属于II型干扰素,在抗病毒,抗肿瘤及免疫调节中起重要作用。IFN- γ 属于TH1型细胞因子,可促进细胞免疫应答。IFN- γ 具有抗感染和增强疫苗免疫效果的作用,有作为免疫佐剂的潜在价值。

[0003] 目前不论国内还是国外市场上都还没有能够检测鸡IFN- γ 蛋白的试剂盒,但类似的能够检测人或小鼠血清或细胞上清中IFN- γ 蛋白的试剂盒已经被广泛应用,对于鸡IFN- γ 的研究还处于起步阶段,因此,建立针对鸡IFN- γ 在蛋白水平上的检测方法,将有助于评价鸡IFN- γ 在机体内的动态变化水平,对于了解禽类传染性疾病的发生、发展、转归情况及机体保护性免疫反应的动态规律具有重要意义。

[0004] 目前对于IFN- γ 的研究主要集中于哺乳动物尤其是人IFN- γ ,而对鸡IFN- γ 的研究还十分有限,鸡IFN- γ 与哺乳动物IFN- γ 有相似的生物学活性。但因为IFN- γ 具有种属特异性,鸡IFN- γ 与哺乳动物IFN- γ 同源性相差较大(鸡和小鼠IFN- γ 氨基酸同源性为23.97%,鸡和人IFN- γ 氨基酸同源性为29.45%),无交叉反应性。故目前很多可用于哺乳动物的实验技术及从市面上商品化的检测试剂盒不能用于鸡IFN- γ 的研究,极大的限制了对于鸡IFN- γ 的深入研究。现在在生产中还没有办法实现对鸡IFN- γ 的大批量检测。

[0005] 现有技术中检测鸡IFN- γ 的变化主要应用的实验技术是荧光定量PCR,荧光定量检测的是mRNA水平的变化,但由于mRNA水平与蛋白水平并不呈绝对的线性关系,所以应用荧光定量PCR并不能反应出鸡IFN- γ 蛋白的实际水平,故其并不能作为一个检测鸡IFN- γ 蛋白量的实验技术而应用,同时荧光定量PCR技术操作繁琐,对专业技能要求较高且价格昂贵,不宜用于生产实际。

[0006] 生物素(biotin)是动、植物体内广泛分布的一种小分子生长因子,生物素经化学修饰后,成为带有多种活性基团的衍生物-活化生物素(BNHS),可以与各种蛋白质(如抗体、酶)结合。链霉亲和素(streptavidin)是由链霉菌分泌的一种蛋白质,由4条相同的肽链组成,每条肽链都能结合一个生物素,二者亲和常数极高。生物素-链霉亲和素与标记试剂高亲和力的牢固结合及多级放大效应,使免疫标记和有关示踪分析更加灵敏,已成为目前广泛用于微量抗原、抗体定性、定量检测及定位观察研究的新技术。

发明内容

[0007] 本发明的第一个目的是提供抗chIFN- γ 的单克隆抗体。

[0008] 本发明提供的抗chIFN- γ 的单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No.13834的杂交瘤细胞株LYN1和保藏号为CGMCC No.13835的杂交瘤细胞株LYN2分泌的。将保藏号为CGMCC No.13834的杂交瘤细胞株LYN1分泌的抗chIFN- γ 的单克隆抗体命名为LYN1抗体,将保藏号

为CGMCC No.13835的杂交瘤细胞株LYN2分泌的抗chIFN- γ 的单克隆抗体命名为LYN2抗体。

[0009] 本发明的第二个目的是提供分泌抗chIFN- γ 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0010] 本发明提供的分泌抗chIFN- γ 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株为LYN1和LYN2。杂交瘤细胞株LYN1的分类命名为杂交瘤细胞系(小鼠来源),该杂交瘤细胞株已于2017年4月24日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏号为CGMCC No.13834。

[0011] 杂交瘤细胞株LYN2的分类命名为杂交瘤细胞系(小鼠来源),该杂交瘤细胞株已于2017年4月24日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏号为CGMCC No.13835。

[0012] 本发明的第三个目的是提供一种检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量的酶联免疫试剂盒。

[0013] 本发明提供的检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量的酶联免疫试剂盒包括上述LYN1抗体和/或LYN2抗体。

[0014] 上述酶联免疫试剂盒还包括chIFN- γ 标准品;所述chIFN- γ 标准品是通过将核苷酸序列如序列表中序列1所示的chIFN- γ 基因在原核细胞中进行表达获得的。

[0015] 所述酶联免疫试剂盒中还包括如下中的至少一种:酶标板、包被缓冲液、洗涤缓冲液、抗体稀释液、封闭液、辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(HRP标记的链霉亲和素)、显色液和终止液。

[0016] 本发明的第四个目的是提供上述抗chIFN- γ 的单克隆抗体或上述杂交瘤细胞株或上述酶联免疫试剂盒的新用途。

[0017] 本发明提供了上述抗chIFN- γ 的单克隆抗体或上述杂交瘤细胞株或上述酶联免疫试剂盒在检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量中的应用。

[0018] 上述抗chIFN- γ 的单克隆抗体或上述杂交瘤细胞株在制备检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量的试剂或胶体金试纸条或试剂盒中的应用也属于本发明的保护范围。

[0019] 本发明的第五个目的是提供一种检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量的方法。

[0020] 本发明提供的检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量的方法是以LYN1抗体为包被抗体、生物素化的LYN2抗体为检测抗体的双抗体夹心ELISA检测方法。

[0021] 上述方法检测或辅助检测待测样品中chIFN- γ 含量的方法具体包括如下步骤:

[0022] (1) 将LYN1抗体包被到酶标板上,洗涤;

[0023] (2) 封闭(1)得到的酶标板,洗涤;

[0024] (3) 向(2)得到的酶标板中加入chIFN- γ 标准品或待测样品,孵育,洗涤;

[0025] (4) 向(3)得到的酶标板中加入生物素化的LYN2抗体,孵育,洗涤;

[0026] (5) 向(4)得到的酶标板中加入HRP标记的链霉亲和素,孵育,洗涤;

[0027] (6) 向(5)得到的酶标板中加入底物显色,显色后加入终止液终止反应;

[0028] (7) 用酶标仪检测加入chIFN- γ 标准品的各孔的吸光度值,以chIFN- γ 标准品浓度为横坐标、以酶标仪的读数为纵坐标绘制标准曲线;

[0029] (8) 用酶标仪检测加入待测样品的孔的吸光度值,将吸光度值代入所述标准曲线,

即得待测样品中chIFN- γ 的浓度。

[0030] 上述方法中，

[0031] 所述步骤(1)中，用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液将LYN1抗体稀释后包被到酶标板上；

[0032] 所述步骤(2)中，用脱脂奶溶液封闭(1)得到的酶标板；

[0033] 所述步骤(3)中，用BSA溶液将chIFN- γ 标准品稀释后加入酶标板中；

[0034] 所述步骤(4)中，用BSA溶液将生物素化的LYN2抗体稀释至1 μ g/mL后加入酶标板中。所述生物素化的LYN2抗体的制备方法参照抗体生物素标记试剂盒(购自Thermo Scientific, Prod#21440)中说明书中的方法。

[0035] 上述方法中，

[0036] 所述步骤(1)中，所述抗体的浓度稀释为4 μ g/mL；所述包被的条件为4 $^{\circ}$ C包被12h；所述柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液的浓度为0.05M，pH为5.0；

[0037] 所述步骤(2)中，所述脱脂奶溶液(溶剂为洗涤缓冲液)的质量分数为5%；所述封闭的条件为4 $^{\circ}$ C封闭12h；

[0038] 所述BSA溶液(溶剂为洗涤缓冲液)的质量分数为1%；

[0039] 所述步骤(3)中，所述孵育时间为1h；

[0040] 所述步骤(4)中，所述孵育时间为2h；

[0041] 所述步骤(5)中，所述孵育时间为15min；

[0042] 所述用酶标仪检测吸光度值时的波长为450nm；

[0043] 所述洗涤的次数为6次；

[0044] 所述底物为TMB；所述终止液为2M H₂SO₄。

[0045] 本发明在酶联免疫的基础上结合生物素-链霉亲和素系统建立了双抗体夹心ELISA检测方法，该方法利用标记了抗体的生物素和HRP标记的链霉亲和素之间的高亲和力及高特异性结合，使大量的酶分子聚集在抗原抗体复合物周围，产生多级放大作用，使每个抗体携带的酶分子显著增加，从而极大地提高了灵敏度。

[0046] 与荧光定量PCR相比，本发明所建立的双抗体夹心ELISA检测方法有以下优点：(1)样品处理简单，不需要取动物的组织进行RNA的提取及反转录，仅采取少量动物的血液，分离血清进行适当稀释后，即可进行检测；(2)简单、快速，操作方法简单，且整个检测过程仅需3-4个小时；(3)准确性高，直接在蛋白水平上针对chIFN- γ 进行检测，不易受操作或是其他外部条件影响；(4)成本低、对仪器要求不高。

[0047] 本发明利用禽IFN- γ 单克隆抗体建立了针对IFN- γ 在蛋白水平上的双夹心ELISA检测方法，可以用于检测血清及细胞上清中IFN- γ 含量。通过实验证明：本发明的禽IFN- γ 单克隆抗体具有良好的特异性和亲和力，能够准确地反映出血清或细胞上清中禽IFN- γ 的含量，且本发明的检测方法快捷、高效又准确，解决了现有技术中采用PCR检测方法带来的操作繁琐，耗时耗力，易受操作及其他外部条件影响等问题，不仅有助于评价IFN- γ 在机体内的动态变化水平，为疾病的预防和治理提供很好的参考，而且有助于了解禽类传染性疾病的发生、发展、转归情况及机体保护性免疫反应的动态。

附图说明

[0048] 图1为chIFN- γ 蛋白的表达纯化。

[0049] 图2为chIFN- γ 单抗特异性和识别表位确定。

[0050] 图3为标准曲线的建立。

具体实施方式

[0051] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0052] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0053] 下述实施例中所使用的溶液的配方如下:

[0054] 1、包被缓冲液(0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,pH5.0)的配方如下:A液:称取柠檬酸10.5g溶于500mL蒸馏水中,制成0.05M柠檬酸作为母液备用。B液:称取柠檬酸钠14.7g溶于500mL蒸馏水中,制成0.05M柠檬酸钠作为母液备用。将41mL A液和59mL B液混匀,得到0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)。

[0055] 2、洗涤缓冲液(PBST,pH7.4)的配方如下:

[0056]

| 试剂 | 用量 |
|---|--------|
| KH ₂ PO ₄ | 0.2g |
| Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O | 2.9g |
| NaCl | 8.0g |
| KCl | 0.2g |
| Tween-20 | 0.5mL |
| 蒸馏水 | 1000mL |

[0057] 3、封闭液(5%的脱脂奶)的配方如下:

[0058]

| 试剂 | 用量 |
|-------|-------|
| 脱脂奶 | 5g |
| 洗涤缓冲液 | 100mL |

[0059] 4、样品及抗体稀释液(1%的BSA)的配方如下:

[0060]

| 试剂 | 用量 |
|-------------|-------|
| 牛血清白蛋白(BSA) | 1g |
| 洗涤缓冲液 | 100mL |

[0061] 5、终止液(2M H₂SO₄)的配方如下:

[0062]

| 试剂 | 用量 |
|-----|-------|
| 浓硫酸 | 22mL |
| 水 | 178mL |

[0063] 6、PBS(pH 7.4)的配方如下:称取8.0g NaCl,0.2g KCl,1.44g Na₂HPO₄,0.24g KH₂PO₄溶解于800mL蒸馏水,浓盐酸调节pH值至7.4,定容至1L,121℃高压20min,4℃保存。

[0064] 下述实施例中的原核表达的chIL-2在文献“付梦姣等,IL-2单克隆抗体的制备与鉴定,中国兽医杂志”中公开过,公众可从中国农业大学获得。

[0065] 下述实施例中的原核表达的chIL-4在文献“关晓宇等,抗鸡白介素4单克隆抗体的制备与鉴定,生物工程学报”中公开过,公众可从中国农业大学获得。

[0066] 下述实施例中的原核表达的chIL-10在文献“高俊峰等,鸡白介素10(chIL-10)单克隆抗体的制备及鉴定,中国兽医杂志”中公开过,公众可从中国农业大学获得。

[0067] 下述实施例中的缓冲液的制备方法如下:

[0068] 1、0.05M甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 2.8)

[0069] A液:称取1.5g甘氨酸溶于100mL蒸馏水中,制成0.2M甘氨酸作为母液备用。B液:量取1.65mL浓盐酸,用蒸馏水定容至100mL,制成0.2M盐酸作为母液备用。取A液25mL,B液8.4mL,加蒸馏水定容至100mL。

[0070] 2、0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0-5.0)

[0071] A液:称取柠檬酸10.5g溶于500mL蒸馏水中,制成0.05M柠檬酸作为母液备用。B液:称取柠檬酸钠14.7g溶于500mL蒸馏水中,制成0.05M柠檬酸钠作为母液备用。将93mL A液和7mL B液混匀,得到0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0)。将65.5mL A液和34.5mL B液混匀,得到0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.0)。将41mL A液和59mL B液混匀,得到0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)。

[0072] 3、0.05M磷酸盐缓冲液(pH 6.0-8.0)

[0073] A液:称取二水磷酸二氢钠3.9g溶于500mL蒸馏水中,制成0.05M磷酸二氢钠作为母液备用。B液:称取十二水磷酸氢二钠8.975g溶于500mL蒸馏水中,制成0.05M磷酸氢二钠作为母液备用。将87.7mL A液和12.3mL B液混匀,得到0.05M磷酸盐缓冲液(pH 6.0)。将39mL A液和61mL B液混匀,得到0.05M磷酸盐缓冲液(pH 7.0)。将5.3mL A液和94.7mL B液混匀,得到0.05M磷酸盐缓冲液(pH 8.0)。

[0074] 4、0.05M碳酸盐缓冲液(pH 9.6)

[0075] 称取1.59g碳酸钠,2.93g碳酸氢钠,溶于1000mL蒸馏水中。

[0076] 5、0.05M碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液(pH 10)

[0077] A液:称取0.21g碳酸氢钠溶于50mL蒸馏水中制成0.05M碳酸氢钠作为母液备用。B液:称取0.4g氢氧化钠溶于100mL蒸馏水中制成0.1M氢氧化钠作为母液备用。取A液50mL,B液10.7mL,加蒸馏水定容至100mL后混匀。

[0078] 下述实施例中的封闭液的配方如下:

[0079] 1、5%的脱脂奶:称取5g脱脂奶,溶于80mL PBST中,最后定容至100mL。

[0080] 2、2%的BSA:称取2g BSA,溶于80mL PBST中,最后定容至100mL。

[0081] 3、1%的明胶:称取1g明胶,溶于80mL PBST中,搅拌溶解,最后定容至100mL。

[0082] 4、5%的脱脂奶+1%的酪蛋白:称取0.5g酪蛋白,用PBST定容至50mL,搅拌溶解过夜,然后与等量的5%的脱脂奶混合。

[0083] 实施例1、用于检测禽 γ -干扰素(IFN- γ)的酶联免疫检测试剂盒及双抗体夹心ELISA检测方法的建立及条件的优化

[0084] 一、用于检测禽 γ -干扰素(IFN- γ)的酶联免疫检测试剂盒的制备

[0085] 本发明的用于检测禽 γ -干扰素(IFN- γ)的酶联免疫检测试剂盒包括聚苯乙烯酶标反应板、chIFN- γ 标准品(重组蛋白His-chIFN- γ ,夹心蛋白)、抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN1(包被抗体,本发明选择LYN1杂交瘤细胞株分泌的抗体作为包被抗体)、抗chIFN- γ 单

克隆抗体LYN2(检测抗体,本发明选择LYN2杂交瘤细胞株分泌的抗体作为检测抗体)、0.05M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH5.0,包被液)、PBST(pH7.4,洗涤缓冲液)、5%脱脂奶(封闭液)、1%BSA(样品及抗体稀释液)、HRP标记的链霉亲和素、底物TMB、2M H₂SO₄溶液(终止液)。

[0086] 1、免疫原的制备

[0087] (1) 鸡IFN- γ 原核表达载体的构建

[0088] 将序列1所示的鸡IFN- γ 基因序列插入载体pET-28a(购自EMD Biosciences(Novagen),产品目录号为69864-3)的EcoRI和Hind III酶切位点间,且保持载体pET-28a的其他序列不变,得到重组载体chIFN- γ -pET-28a。

[0089] 将序列1所示的鸡IFN- γ 基因序列插入载体pGEX-6p-1(购自优宝生物公司,产品目录号为VT1258)的EcoRI和Hind III酶切位点间,且保持载体pGEX-6p-1的其他序列不变,得到重组载体chIFN- γ -pGEX-6P。

[0090] (2) 重组菌的构建及重组蛋白的诱导表达与纯化

[0091] 分别将重组载体chIFN- γ -pET-28a和chIFN- γ -pGEX-6P转入到Rosseta表达菌(购自北京康为世纪生物,货号为CW0811A)中进行诱导表达,加入IPTG至终浓度为1mmol/L,37°C诱导6h,离心收集菌体。菌体经超声裂解(超声仪功率比30%,槽温度40°C,超声3s,停2s,超声总时间30min)后12 000r/min离心20min,收取上清。上清进行亲和层析纯化,分别得到纯化后的重组蛋白chIFN- γ -His(18kDa)和chIFN- γ -GST(38kDa)(如图1所示)。chIFN- γ -His蛋白用于免疫小鼠,chIFN- γ -GST蛋白用于杂交瘤细胞筛选。

[0092] 上述纯化的具体步骤如下:1、将上清液过柱,流速为10倍柱体积/小时。2、使用15倍柱体积的SoIuble Binding Buffer冲洗柱子,收集流穿峰。3、使用5倍柱体积的SoIuble Elution Buffer洗脱,收集洗脱峰。4、洗脱后,依次使用3倍柱体积的SoIuble Binding Buffer和5倍柱体积的去离子水洗涤柱子,再用3倍柱体积的20%乙醇平衡(乙醇要将填料浸没),封柱后2-8°C保存。

[0093] 2、小鼠免疫

[0094] 将纯化后的chIFN- γ -His蛋白作为抗原,免疫8周龄雌性BALB/c小鼠。首次免疫,抗原与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化,颈背部皮下多点注射,50 μ g/只。首免4周后进行2免,抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合乳化,免疫剂量与途径同首次免疫。之后,再隔4周按照2免方法免疫,免疫1次。在3免完成后1周,断尾采血,以chIFN- γ -GST包被酶标板用间接ELISA方法对免疫小鼠血清进行效价测定。效价达到要求后,在融合前3d进行加强免疫,抗原直接注射小鼠腹腔,50 μ g/只。

[0095] 上述间接ELISA进行抗体效价检测的具体步骤如下:用pH9.6的碳酸盐缓冲液(包被液)将GST-chIFN- γ 蛋白稀释至1 μ g/ml,100 μ L/孔包被CORNING酶标板,4°C过夜;甩干孔内残留液体,每孔加入300 μ L PBST,洗涤3次,3min/次;甩干孔内残留液体后每孔加入300 μ L 5%脱脂乳,4°C封闭过夜;洗涤;断尾采血,将阴阳性血清从1:1000开始分别做2倍比稀释,将稀释好的血清加入酶标板,100 μ L/孔,每个稀释度做三个以上的平行孔,37°C孵育1小时,清洗5遍;加1:10000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG酶标二抗100 μ I/孔,37°C孵育1小时;PBST洗涤三遍;甩干孔内残留液体,加入稀释好的酶标二抗溶液,37°C孵育1小时;PBST洗涤;加TMB显色剂100 μ I/孔,室温显色10-15分钟,每孔加50 μ I终止液后酶标仪检测OD₄₅₀值。结果的判定由检测OD₄₅₀>标准阴性样品的均值+2x标准阴性样品的标准差进行阳

性判定,在统计学上该判定结果可以达到95%的置信区间。

[0096] 3、细胞融合

[0097] 按照Current Protocol in Immunology上的方法进行细胞融合,将SP2/0细胞与无菌免疫脾细胞按照1:10进行混合,在盛有37℃水的烧杯中,以预热的1 000g/L PEG 4000为融合剂逐滴加入细胞泥中,再缓慢加入DMEM后离心,用含20%胎牛血清的DMEM进行重悬至每毫升 1.2×10^6 个细胞,以200 μ L/孔加入到96孔板中,置于37℃、5%CO₂温箱中培养。融合后第2、3、4、5、7、9、11d用含HAT的20%DMEM进行半换液,第14d用含HT的20%DMEM进行半换液,第15d后换成20%DMEM。

[0098] 4、阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

[0099] 当杂交瘤细胞长至孔底的10%-25%时,在换液2d后取100 μ L上清液,以chIFN- γ -GST包被酶标板用间接ELISA方法进行筛选,方法同测定血清抗体效价,加入阳性血清对照和sp2/0细胞上清对照,用sp2/0细胞上清值作为临界值筛选阳性杂交瘤细胞,阴性孔三天后再检一次,如仍为阴性则弃之。经两次间接ELISA检测为阳性的细胞孔,选择阳性值较高的进行扩大培养和亚克隆。

[0100] 上述亚克隆方法为:将阳性细胞轻轻吹起,取少量细胞稀释后用台盼蓝染色液进行细胞计数,用细胞培养液将阳性杂交瘤细胞10倍稀释后,吸取80-100个杂交瘤细胞加入到20mL 15%DMEM培养液中,混匀,将稀释好的细胞悬液加入96孔细胞培养板中,使每孔内大约含有1个杂交瘤细胞,每个阳性克隆铺一块板,另外每块板内有1孔加入10个细胞,1个孔内加入100个细胞以避免阳性细胞的丢失,将细胞放于37℃培养箱培养,待细胞长至覆盖孔底部1/4-1/3时,吸取细胞上清利用间接ELISA进行检测,选择只有一个细胞克隆的阳性孔再次进行克隆,亚克隆3次直至所有单克隆细胞孔阳性率为100%。当获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株后,进行扩大培养。

[0101] 最终获得两株能稳定分泌特异性抗chIFN- γ 抗体的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为LYN1和LYN2。

[0102] 杂交瘤细胞株LYN1的分类命名为杂交瘤细胞系(小鼠来源),该杂交瘤细胞株已于2017年4月24日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏号为CGMCC No.13834。

[0103] 杂交瘤细胞株LYN2的分类命名为杂交瘤细胞系(小鼠来源),该杂交瘤细胞株已于2017年4月24日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏号为CGMCC No.13835。

[0104] 5、单克隆抗体的制备及鉴定

[0105] 挑选经产BALB/c小鼠,腹腔注射灭菌液体石蜡1mL/只,7d后分别将步骤4筛选得到的2株杂交瘤细胞注射入小鼠腹腔进行腹水制备,杂交瘤细胞注射量为 2.0×10^6 个/只。收集的腹水经离心后收集上清,利用正辛酸饱和硫酸铵沉淀法进行纯化。其中,杂交瘤细胞株LYN1分泌的chIFN- γ 单克隆抗体命名为LYN1抗体;杂交瘤细胞株LYN2分泌的chIFN- γ 单克隆抗体命名为LYN2抗体,并分别对其特性进行鉴定,包括亚型鉴定、亲和力测定、抗体特异性鉴定及抗原表位分析。

[0106] (1) chIFN- γ 单克隆抗体Ig亚类的鉴定

[0107] 按照小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒(Sigma)鉴定制备的2株单抗的亚类,结果表明LYN1株单抗的重链类型为IgG1,LYN2株单抗的重链类型为IgG2b。

[0108] (2) chIFN- γ 单克隆抗体的亲和力鉴定

[0109] 应用间接ELISA方法测定单抗亲和力。具体步骤如下:用 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ chIFN- γ -GST包被酶标板,50g/L脱脂乳封闭过夜后,向其中加入倍比稀释的单抗,初始浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$,以HRP标记的山羊抗小鼠IgG为二抗进行测定。ELISA结果中以连续读数不再增加时定为抗原抗体100%结合,以OD₄₅₀吸光度值为纵坐标,抗体浓度为横坐标做散点图,生成对数趋势线及公式。以吸光度最大值一半(视为抗原与抗体结合率50%)代入公式,求出抗体浓度,即为抗体亲和力解离常数(K_d)。

[0110] 根据计算得出2株单抗的亲和力解离常数(K_d)分别为:LYN1株: 7.35×10^{-10} ;LYN2株: 1.10×10^{-10} ,均为高亲和力抗体。

[0111] (3) chIFN- γ 单克隆抗体的特异性鉴定

[0112] 利用Western Blot方法检测chIFN- γ 单克隆抗体对原核表达的chIL-2、chIL-4、chIL-10和chIFN- γ 蛋白(重组蛋白His-chIFN- γ)的特异性。具体步骤如下:

[0113] 将上述不同蛋白稀释一定倍数后进行Western Blot,分别用稀释的chIFN- γ 单抗(1:5000)或His单抗(1:10000)作为一抗,辣根过氧化物酶HRP标记的山羊抗小鼠IgG作为二抗,检测所得禽chIFN- γ 单克隆抗体对其他常见的不同禽细胞因子有无交叉反应。

[0114] 结果如图2A所示,2株单抗均只识别原核表达的chIFN- γ 蛋白,而不识别原核表达的chIL-2、chIL-4和chIL-10蛋白,表明2株单抗特异性良好。

[0115] (4) chIFN- γ 单克隆抗体的抗原表位分析

[0116] 构建如下鸡IFN- γ 截短蛋白的表达载体:1-100aa chIFN- γ -pET-28a和46-145aa chIFN- γ -pET-28a(图2B),然后在Rosseta菌中分别诱导各个截短蛋白的表达载体(如图2C),并分别以诱导得到的截短蛋白为抗原,以chIFN- γ 单克隆抗体为一抗,辣根过氧化物酶HRP标记的山羊抗小鼠IgG为二抗通过Western blotting分析2株单克隆抗体的抗原识别区。

[0117] 上述1-100aa chIFN- γ -pET-28a载体为将序列2所示的DNA片段插入载体pET-28a的EcoR I和Hind III酶切位点间,且保持载体pET-28a的其他序列不变后得到的载体。

[0118] 上述47-145aa chIFN- γ -pET-28a载体为将序列3所示的DNA片段插入载体pET-28a的EcoR I和Hind III酶切位点间,且保持载体pET-28a的其他序列不变后得到的载体。

[0119] 结果如图2C所示:LYN1识别全长和第47-145位氨基酸截短,而不识别第1-100位氨基酸截短,表明LYN1识别区域位于第101-145位氨基酸;LYN2株识别全长和第1-100位氨基酸截短,而不识别第47-145氨基酸截短,表明LYN2株识别区域位于第1-46位氨基酸。图2D为2株单抗抗原表位识别区域示意图。

[0120] 二、双抗体夹心ELISA检测方法的建立及条件的优化

[0121] 本发明在酶联免疫的基础上结合生物素-链霉亲和素系统建立了双抗体夹心ELISA检测方法,该方法以抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN1为包被抗体、以重组蛋白His-chIFN- γ 为夹心蛋白,以抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN2为检测抗体,并利用标记了抗体的生物素和HRP标记的链霉亲和素之间的高亲和力及高特异性结合,使大量的酶分子聚集在抗原抗体

复合物周围,产生多级放大作用,使每个抗体携带的酶分子显著增加,从而极大地提高灵敏度。

[0122] 按照常规双抗体ELISA方法进行操作,每优化一个条件则固定其他条件。当优化好一个条件A,那么下一次优化另一条件B时,则采用A的条件,其他条件仍固定,以此类推,直到所有的条件优化完毕。每完成一次条件优化,需对得到的数据进行处理,综合考虑P/N值($P/N值 = \text{阳性对照OD}_{450} \text{均值} / \text{阴性对照OD}_{450} \text{均值}$,通常以P/N值最大,且P值接近1,N值较小作为最佳反应条件的判定依据)以及线性关系良好的夹心蛋白浓度范围两方面,确定最佳反应条件。

[0123] 1、包被条件的优化

[0124] 分别以0.05M甘氨酸-盐酸(pH2.8)、0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH2.5)、0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH4.0)、0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH5.0)、0.05M磷酸盐缓冲液(pH6.0)、0.05M磷酸盐缓冲液(pH7.0)、0.05M磷酸盐缓冲液(pH8.0)、0.05M碳酸盐缓冲液(pH9.6)和0.05M碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液(pH10)为包被液。将抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN1稀释至浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被12h,1%的PBST洗涤3遍后,用5%的脱脂奶4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭12h后洗涤,加入以PBS进行倍比稀释的重组蛋白chIFN- γ -GST,并以PBS为阴性对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h后洗涤。用PBS按1:1000对生物素化抗体(生物素化抗体的制备方法参照抗体生物素标记试剂盒(购自Thermo Scientific,Prod#21440)中Thermo Scientific,Prod#21440说明书)进行稀释,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h后洗涤,用1%的BSA按1:1000对HRP标记的链霉亲和素(购自Thermo Scientific,Prod#21130)进行稀释,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min后洗涤,加入显色液TMB后2M H_2SO_4 终止。在酶标仪上读取OD450吸光值,根据判定条件确定最佳包被液。

[0125] 在优化包被温度及时间时,用最佳包被液对抗体进行稀释,分别室温包被12h、4 $^{\circ}\text{C}$ 包被12h和37 $^{\circ}\text{C}$ 包被2h,其他反应条件同上,在酶标仪上读取OD450吸光值,根据判定条件确定最佳包被温度及时间。

[0126] 在优化包被浓度时,用最佳包被液将抗体分别稀释到5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,采用最佳包被温度及时间,其他反应条件同上,在酶标仪上读取OD450吸光值,根据判定条件确定最佳包被浓度。

[0127] 根据上述优化结果,最佳的包被条件如下:0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH5.0)稀释包被抗体至4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被12h。

[0128] 2、封闭条件的优化

[0129] 采用已优化的最佳反应条件,分别以5%的脱脂奶、2%的BSA、1%的明胶和5%的脱脂奶+1%的酪蛋白)作为封闭液,在4 $^{\circ}\text{C}$,12h和37 $^{\circ}\text{C}$,2h的条件下进行封闭,其他反应条件同上,在酶标仪上读取OD450吸光值,根据判定条件确定最佳封闭条件。

[0130] 根据上述优化结果,最佳的封闭条件如下:5%的脱脂奶,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭12h。

[0131] 3、生物素化抗体稀释比例的优化

[0132] 采用已优化的最佳反应条件,分别将生物素化抗体按1:400、1:800、1:1600和1:3200进行稀释,其他反应条件同上,在酶标仪上读取OD450吸光值,根据判定条件确定最佳生物素化抗体稀释比例。

[0133] 根据上述优化结果,最佳生物素化抗体稀释比例为1:800。

[0134] 4、夹心蛋白及生物素化抗体稀释液的优化

[0135] 采用已优化的最佳反应条件,分别以PBS、5%的脱脂奶、2.5%的脱脂奶、1.25%的脱脂奶和1%的BSA对生物素化抗体和夹心蛋白进行稀释,其他反应条件不变,在酶标仪上读取OD450吸光值,根据判定条件确定最佳夹心蛋白及生物素化抗体稀释液(确定以后,将最佳稀释液作为阴性对照)。

[0136] 根据上述优化结果,最佳夹心蛋白及生物素化抗体稀释液为1%的BSA。

[0137] 5、夹心蛋白孵育时间的优化

[0138] 采用已优化的最佳条件,夹心蛋白分别孵育0.5h、1.0h、1.5h和2.0h,其他反应条件不变,在酶标仪上读取OD450吸光值,根据判定条件确定最佳夹心蛋白孵育时间。

[0139] 根据上述优化结果,最佳夹心蛋白孵育时间1.0h。

[0140] 6、生物素化抗体孵育时间的优化

[0141] 采用已优化的最佳反应条件,生物素化抗体分别孵育0.5h、1.0h、1.5h和2.0h,其他反应条件不变,在酶标仪上读取OD450吸光值,根据判定条件确定最佳生物素化抗体孵育时间。

[0142] 根据上述优化结果,最佳生物素化抗体孵育时间为2.0h。

[0143] 7、洗板次数的优化

[0144] 采用已优化的最佳反应条件,分别洗板3、4和6次,其他反应条件不变,在酶标仪上读取OD450吸光值,根据判定条件确定最佳洗板次数。

[0145] 根据上述优化结果,最佳洗板次数为6次。

[0146] 8、HRP标记的链霉亲和素孵育时间的优化

[0147] 采用已优化的最佳反应条件,HRP标记的链霉亲和素分别孵育15min、30min、45min和60min,其他反应条件不变,在酶标仪上读取OD450吸光值,根据判定条件确定最佳HRP标记的链霉亲和素的孵育时间。

[0148] 根据上述优化结果,最佳HRP标记的链霉亲和素的孵育时间为15min。

[0149] 9、最佳反应条件的确定

[0150] 通过上述对反应条件的优化,最终确定双抗体夹心ELISA检测方法的具体步骤如下:0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH5.0)稀释包被抗体(抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN1)至4 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被12h;5%的脱脂奶,4 $^{\circ}$ C封闭12h;用1%的BSA稀释夹心蛋白(重组蛋白His-chIFN- γ),37 $^{\circ}$ C孵育1h;用1%的BSA按照1:800的比例将生物素化抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN2稀释至1 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C孵育2h;用1%的BSA按照1:12 000的比例对HRP标记的链霉亲和素进行稀释,37 $^{\circ}$ C孵育15min;PBST洗板6次。

[0151] 实施例2、用于检测禽 γ -干扰素的酶联免疫检测试剂盒的灵敏度检测

[0152] 按照实施1中确定的双抗体夹心ELISA检测方法的最优条件,以抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN1为包被抗体、生物素化抗体抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN2为检测抗体,将夹心蛋白(重组蛋白His-chIFN- γ)倍比稀释至不同浓度后进行ELISA试验,并以夹心蛋白浓度为横坐标,以OD₄₅₀为纵坐标建立标准曲线。具体步骤如下:

[0153] 1、用0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH5.0)将包被抗体抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN1稀释至4 μ g/mL,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被12h后,洗涤缓冲液洗涤6次,300 μ L/孔,甩干孔内残留液体;

[0154] 2、5%的脱脂奶,300 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C封闭12h后,洗涤同上;

[0155] 3、用1%的BSA将夹心蛋白(重组蛋白His-chIFN- γ)稀释至不同浓度(浓度如表1所示),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h后,洗涤同上;

[0156] 4、用1%的BSA对生物素化抗体抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN2进行稀释,使其最终浓度为1 μ g/mL,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h后,洗涤同上;

[0157] 5、用1%的BSA按1:12 000的比例对HRP标记的链霉亲和素进行稀释,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育15min后,洗涤同上;

[0158] 6、加入显色液TMB,100 μ L/孔,待阴性对照轻微变蓝时,加入2M H₂SO₄,50 μ L/孔,终止反应;

[0159] 7、酶标仪读取OD₄₅₀吸光值。

[0160] 标准曲线如图3所示,夹心蛋白浓度与OD₄₅₀线性关系如表1所示。结果表明:夹心蛋白浓度在15-244pg/mL的浓度范围内,其浓度与OD₄₅₀线性关系良好,所能检测到的最小夹心蛋白浓度为15pg/mL。

[0161] 表1、夹心蛋白浓度与OD₄₅₀线性关系

[0162]

| | | | | | | | | | |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 夹心蛋白度 (pg/mL) | 980 | 490 | 244 | 122 | 61 | 31 | 15 | 8 | 0 |
| OD ₄₅₀ | 0.1497 | 0.1357 | 0.1397 | 0.1280 | 0.1210 | 0.1143 | 0.1140 | 0.1063 | 0.1067 |

[0163] 实施例3、酶联免疫检测试剂盒的应用

[0164] 采用本发明的用于检测禽 γ -干扰素的酶联免疫检测试剂盒对20份沙门菌抗体阳性血清进行检测,初步判断该检测方法临床实用性。具体步骤如下:

[0165] 1、用0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH5.0)将包被抗体抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN1稀释至4 μ g/mL,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被12h后,洗涤缓冲液洗涤6次,300 μ L/孔,甩干孔内残留液体;

[0166] 2、5%的脱脂奶,300 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C封闭12h后,洗涤同上;

[0167] 3、用1%的BSA按1:10的比例对待测血清样品进行稀释,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h后,洗涤同上;

[0168] 4、用1%的BSA对生物素化抗体抗chIFN- γ 单克隆抗体LYN2进行稀释,使其最终浓度为1 μ g/mL,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h后,洗涤同上;

[0169] 5、用1%的BSA按1:12 000的比例对HRP标记的链霉亲和素进行稀释,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育15min后,洗涤同上;

[0170] 6、加入显色液TMB,100 μ L/孔,待阴性对照轻微变蓝时,加入2M H₂SO₄,50 μ L/孔,终止反应;

[0171] 7、酶标仪读取OD₄₅₀吸光值。将OD₄₅₀吸光值代入实施例2中的标准曲线中,得到待测血清样品中 γ -干扰素浓度。

[0172] 结果如表2所示。结果表明,20份沙门菌抗体阳性血清中,除3份浓度为0(不在本发明的酶联免疫试剂盒的检测线性浓度范围内的浓度以0表示)外,其余血清中被检测出chIFN- γ 浓度。

[0173] 表2、待测血清样品中 γ -干扰素浓度检测结果

[0174]

| | 血清编号 | | | | | | | | | |
|------------|------|-------|-------|----|-------|------|-------|--------|-------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 浓度 (pg/mL) | 8373 | 2271 | 33176 | 0 | 7787 | 3391 | 83611 | 272653 | 32222 | 83627 |
| | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 浓度 (pg/mL) | 1821 | 72761 | 87271 | 0 | 47271 | 0 | 11312 | 226169 | 26261 | 483626 |

序列表

<110>中国农业大学

<120>一种检测禽 γ -干扰素含量的方法及其专用试剂盒

<160>3

<210>1

<211>435bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

cataactgcaa gtagtctaaa tcttgttcaa cttcaagatg atatagacaa actgaaagct 60
gactttaact caagtcattc agatgtagct gacggtggac ctattattgt agagaaactg 120
aagaactgga cagagagaaa tgagaaaagg atcataactga gccagattgt ttcgatgtac 180
ttggaatgc ttgaaaacac tgacaagtca aagccgcaca tcaaacacat atctgaggag 240
ctctatactc tgaaaaacaa ccttcctgat ggcgtgaaga aggtgaaaga tatcatggac 300
ctggccaagc tcccgatgaa cgacttgaga atccagcgcga aagccgcgaa tgaactcttc 360
agcatcttac agaagctggt ggatcctccg agtttcaaaa ggaaaaggag ccagtctcag 420
aggagatgca attgc 435

<210>2

<211>300bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

cataactgcaa gtagtctaaa tcttgttcaa cttcaagatg atatagacaa actgaaagct 60
gactttaact caagtcattc agatgtagct gacggtggac ctattattgt agagaaactg 120
aagaactgga cagagagaaa tgagaaaagg atcataactga gccagattgt ttcgatgtac 180
ttggaatgc ttgaaaacac tgacaagtca aagccgcaca tcaaacacat atctgaggag 240
ctctatactc tgaaaaacaa ccttcctgat ggcgtgaaga aggtgaaaga tatcatggac 300

<210>3

<211>300bp

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>3

agaaatgaga aaaggatcat actgagccag attgtttega tgtacttgga aatgcttgaa 60
aacactgaca agtcaaagcc gcacatcaaa cacatatctg aggagctcta tactctgaaa 120
aacaaccttc ctgatggcgt gaagaagggt aaagatatca tggacctggc caagctcccg 180
atgaacgact tgagaatcca gcgcaaagcc gcgaaatgaac tcttcagcat cttacagaag 240
ctggtggatc ctccgagttt caaaaggaaa aggagccagt ctcagaggag atgcaattgc 300

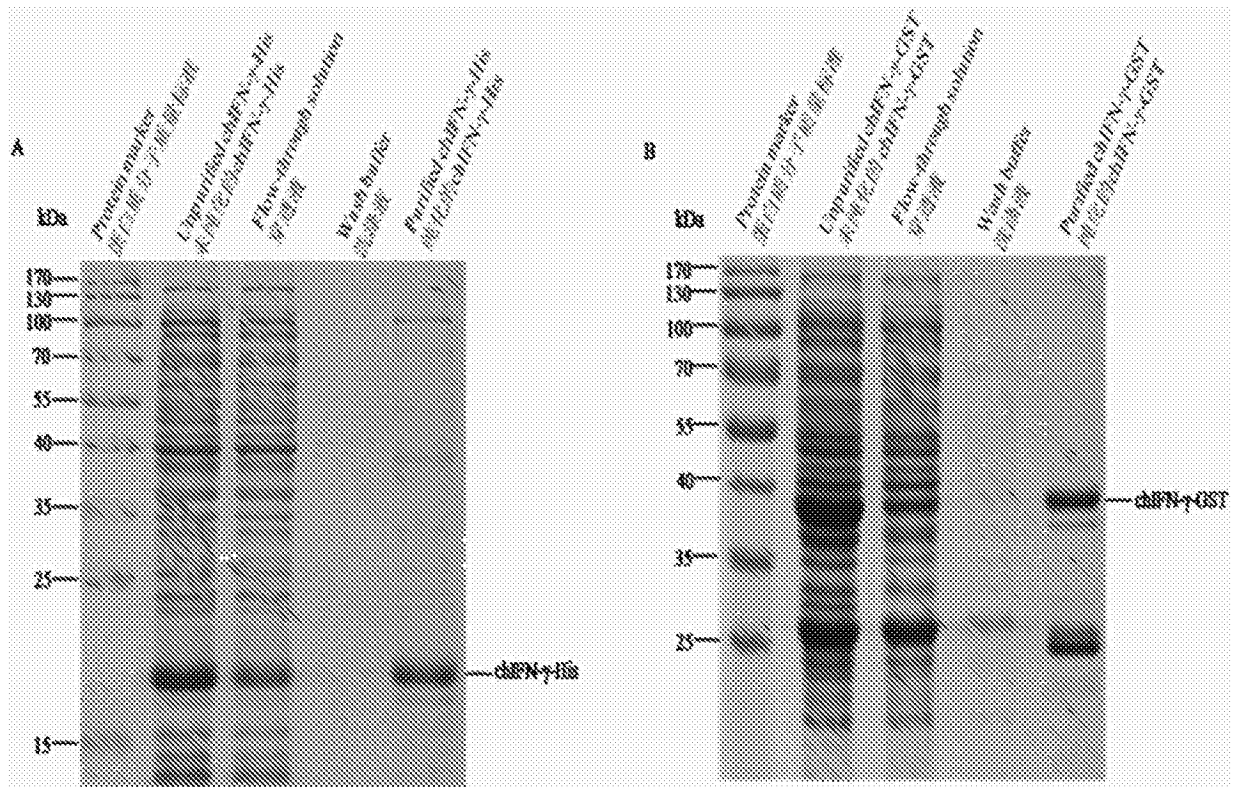


图1

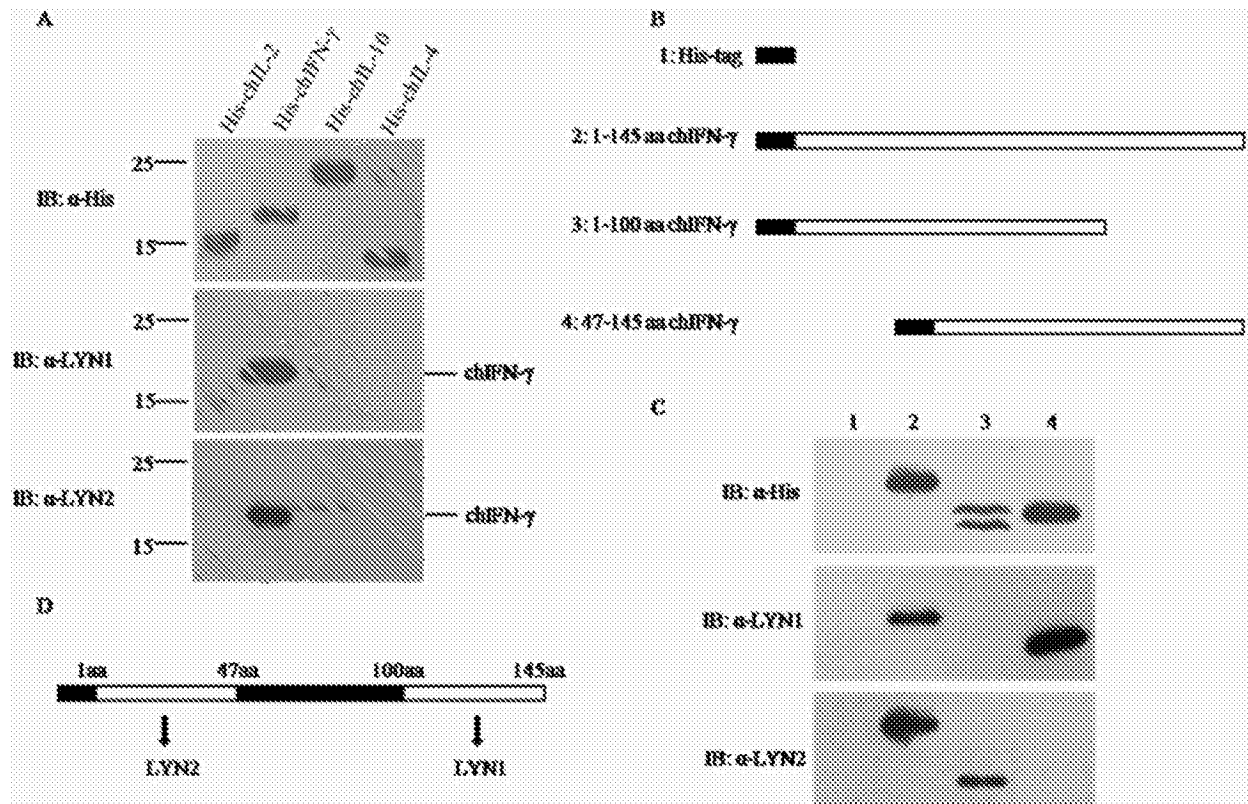


图2

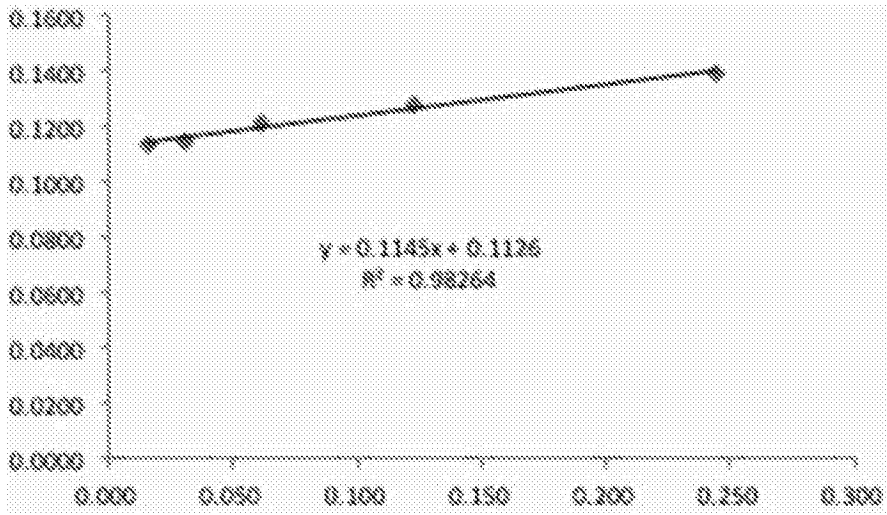


图3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种检测禽 γ -干扰素含量的方法及其专用试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN107286241A | 公开(公告)日 | 2017-10-24 |
| 申请号 | CN2017110559393.3 | 申请日 | 2017-07-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国农业大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中国农业大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中国农业大学 | | |
| [标]发明人 | 郑世军 柳亚楠 王永强 李晓齐 曹红 | | |
| 发明人 | 郑世军 柳亚楠 王永强 李晓齐 曹红 | | |
| IPC分类号 | C07K16/24 C12N5/20 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/532 C12R1/91 | | |
| CPC分类号 | C07K16/249 C07K2317/33 G01N33/532 G01N33/577 G01N33/6866 G01N2333/57 | | |
| 代理人(译) | 关畅 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种检测禽 γ -干扰素含量的方法及其专用试剂盒。本发明利用chIFN- γ 单克隆抗体建立了针对chIFN- γ 在蛋白水平上的双夹心ELISA检测方法。通过实验证明：本发明的抗chIFN- γ 单克隆抗体具有良好的特异性和亲和力，能够准确地反映出血清或细胞上清中chIFN- γ 的含量，且本发明的检测方法快捷、高效又准确，解决了现有技术中采用荧光定量PCR检测方法带来的操作繁琐，耗时耗力，易受操作及其他外部条件影响等问题，不仅有助于评价chIFN- γ 在机体内的动态变化水平，为疾病的预防和治理提供很好的参考，而且有助于了解禽类传染性疾病的发生、发展、转归情况及机体保护性免疫反应的动态。

