



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107300619 A

(43)申请公布日 2017.10.27

(21)申请号 201710480501.8

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2017.06.22

(83)生物保藏信息

CGMCC No.13838 2017.04.24

CGMCC No.13839 2017.04.24

(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 关晓宇 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.

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页  
序列表3页 附图4页

(54)发明名称

一种检测禽白细胞介素4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白细胞介素4含量的方法及其专用试剂盒。本发明利用chIL-4单克隆抗体建立了针对chIL-4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chIL-4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chIL-4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chIL-4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。

1. 抗chIL-4的单克隆抗体,是由保藏号为CGMCC No.13838的杂交瘤细胞株1G11-7F-9E-6B分泌的。

2. 抗chIL-4的单克隆抗体,是由保藏号为CGMCC No.13839的杂交瘤细胞株2E5-G7-10C-7E分泌的。

3. 一株分泌抗chIL-4的单克隆抗体的杂交瘤细胞株1G11-7F-9E-6B,其保藏号为CGMCC No.13838。

4. 一株分泌抗chIL-4的单克隆抗体的杂交瘤细胞株2E5-G7-10C-7E,其保藏号为CGMCC No.13839。

5. 一种检测或辅助检测待测样品中chIL-4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chIL-4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chIL-4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chIL-4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chIL-4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chIL-4标准品的各孔的吸光度值,以chIL-4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chIL-4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,用磷酸盐缓冲液将权利要求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chIL-4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 $1.0\mu\text{g/mL}$ 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 $5\mu\text{g/mL}$ ;所述包被的条件为 $4^{\circ}\text{C}$ 包被12h;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 $0.05\text{M}$ ,pH为6.0;

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 $4^{\circ}\text{C}$ 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。

## 一种检测禽白细胞介素4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白细胞介素4含量的方法及其专用试剂盒。

### 背景技术

[0002] 白细胞介素4(Interleukin 4,IL-4)是20世纪80年代初发现的,具有多种免疫学调节功能的细胞因子,对B细胞、T细胞等免疫细胞以及造血细胞等非免疫细胞均有免疫调节作用,可通过与多种类型细胞相互作用来调节宿主的免疫应答。2004年,单拷贝的功能性鸡白细胞介素4(chicken Interleukin 4,chIL-4)基因被发现,其mRNA基因序列全长为411bp,前体是137肽,其中包括25个氨基酸残基组成的信号肽,分泌的成熟的chIL-4有112个氨基酸残基,含3个分子内二硫键和2个可能的N端糖基化位点。

[0003] 目前,已有在蛋白水平上检测人和小鼠IL-4的商品化试剂盒,但是由于chIL-4与人和小鼠IL-4的同源性仅分别为22.48%和21.23%,所以目前国内,无论是在学术研究还是临床疾病分析中主要还是以荧光定量PCR检测chIL-4的相对含量。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chIL-4的实际水平,故其并不能作为一个检测chIL-4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。因此,建立针对chIL-4在蛋白水平上的检测方法,将有助于评价chIL-4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。

### 发明内容

[0004] 本发明的第一个目的是提供抗chIL-4的单克隆抗体。

[0005] 本发明提供的抗chIL-4的单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No.13838的杂交瘤细胞株1G11-7F-9E-6B和保藏号为CGMCC No.13839的杂交瘤细胞株2E5-G7-10C-7E分泌的。将保藏号为CGMCC No.13838的杂交瘤细胞株1G11-7F-9E-6B分泌的抗chIL-4的单克隆抗体命名为1G11-7F-9E-6B抗体,将保藏号为CGMCC No.13839的杂交瘤细胞株2E5-G7-10C-7E分泌的抗chIL-4的单克隆抗体命名为2E5-G7-10C-7E抗体。

[0006] 本发明的第二个目的是提供分泌抗chIL-4的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0007] 本发明提供的分泌抗chIL-4的单克隆抗体的杂交瘤细胞株为1G11-7F-9E-6B和2E5-G7-10C-7E。杂交瘤细胞株1G11-7F-9E-6B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.13838。

[0008] 杂交瘤细胞株2E5-G7-10C-7E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.13839。

[0009] 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chIL-4含量的酶联免疫试剂盒。

[0010] 本发明提供的检测或辅助检测待测样品中chIL-4含量的酶联免疫试剂盒包括上述1G11-7F-9E-6B抗体和/或2E5-G7-10C-7E抗体。

[0011] 上述酶联免疫试剂盒还包括chIL-4标准品；所述chIL-4标准品是通过将核苷酸序列如序列表中序列1所示的chIL-4基因在原核细胞中进行表达获得的。

[0012] 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。

[0013] 本发明的第四个目的是提供上述抗chIL-4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。

[0014] 本发明提供了上述抗chIL-4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chIL-4含量中的应用。

[0015] 上述抗chIL-4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chIL-4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。

[0016] 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chIL-4含量的方法。

[0017] 本发明提供的检测或辅助检测待测样品中chIL-4含量的方法是以1G11-7F-9E-6B抗体为包被抗体、生物素化的2E5-G7-10C-7E抗体为检测抗体的双抗体夹心ELISA检测方法。

[0018] 上述方法检测或辅助检测待测样品中chIL-4含量的方法具体包括如下步骤：

[0019] (1) 将1G11-7F-9E-6B抗体包被到酶标板上，洗涤；

[0020] (2) 封闭(1)得到的酶标板，洗涤；

[0021] (3) 向(2)得到的酶标板中加入chIL-4标准品或待测样品，孵育，洗涤；

[0022] (4) 向(3)得到的酶标板中加入生物素化的2E5-G7-10C-7E抗体，孵育，洗涤；

[0023] (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；

[0024] (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；

[0025] (7) 用酶标仪检测加入chIL-4标准品的各孔的吸光度值，以chIL-4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；

[0026] (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chIL-4的浓度。

[0027] 上述方法中，

[0028] 所述步骤(1)中，用磷酸盐缓冲液将1G11-7F-9E-6B抗体稀释后包被到酶标板上；

[0029] 所述步骤(2)中，用脱脂奶溶液封闭(1)得到的酶标板；

[0030] 所述步骤(3)中，用BSA溶液将chIL-4标准品稀释后加入酶标板中；

[0031] 所述步骤(4)中，用BSA溶液将生物素化的2E5-G7-10C-7E抗体稀释至1 $\mu$ g/mL后加入酶标板中。所述生物素化的2E5-G7-10C-7E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。

[0032] 上述方法中，

[0033] 所述步骤(1)中,所述抗体的浓度稀释为5 $\mu$ g/mL;所述包被的条件为4 $^{\circ}$ C包被12h;所述磷酸盐缓冲液的浓度为0.05M,pH为6.0;

[0034] 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;

[0035] 所述BSA溶液(溶剂为洗涤缓冲液)的质量分数为1%;

[0036] 所述步骤(3)中,所述孵育时间为1h;

[0037] 所述步骤(4)中,所述孵育时间为2h;

[0038] 所述步骤(5)中,所述孵育时间为15min;

[0039] 所述用酶标仪检测吸光度值时的波长为450nm;

[0040] 所述洗涤的次数为6次;

[0041] 所述底物为TMB;所述终止液为2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

[0042] 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,该方法利用生物素化抗体和HRP标记的链霉亲和素之间的高亲和力及高特异性结合的特点,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。与荧光定量PC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h;(3)准确性高,直接在蛋白水平上针对chIL-4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。

[0043] 本发明利用chIL-4单克隆抗体建立了针对chIL-4在蛋白水平上的双抗体夹心ELISA检测方法,可以用于检测血清及细胞上清中chIL-4含量。通过实验证明:本发明的chIL-4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chIL-4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chIL-4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

[0044] 图1为SDS-PAGE分析重组蛋白的表达。(A)重组蛋白His-chIL-4的诱导表达。M:蛋白Marker;1:pET-28a空载诱导后;2,3:pET-28a-chIL-4未诱导;4,5:pET-28a-chIL-4诱导后。(B)重组蛋白GST-chIL-4的诱导表达。M:蛋白Marker;1:pGEX-6p-1空载诱导后;2,3,4,5:pGEX-6p-1-chIL-4未诱导;6,7,8,9:pGEX-6p-1-chIL-4诱导后。

[0045] 图2为Western blot验证重组蛋白的表达。(A)重组蛋白His-chIL-4的Western blot鉴定。1:pET-28a-chIL-4未诱导;2:重组蛋白His-chIL-4诱导后;3:pET-28a空载诱导后。(B)重组蛋白GST-chIL-4的Western blot鉴定。1:pGEX-6p-1-chIL-4未诱导;2:重组蛋白GST-chIL-4诱导后;3:pGEX-6p-1空载诱导后。

[0046] 图3为单克隆抗体抗原识别区的分析。(A)chIL-4基因全长和截短示意图;(B)单克隆抗体抗原识别区的Western blot鉴定;(C)单克隆抗体抗原识别区示意图。

[0047] 图4为单克隆抗体特异性鉴定。

[0048] 图5为标准曲线的建立。

### 具体实施方式

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 下述实施例中所使用的溶液的配方如下:

[0052] 1、包被缓冲液为0.05M磷酸盐缓冲液(pH 6.0),是将A液438.5mL和B液61.5mL混匀得到的溶液,其中A液和B液的配方如下:

[0053]

	试剂	用量
A 液	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.9 g
	蒸馏水	500 mL
B 液	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.975 g
	蒸馏水	500 mL

[0054] 2、洗涤缓冲液(PBST, pH 7.4)的配方如下:

	试剂	用量
[0055]	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
	NaCl	8.0 g

[0056]	KCl	0.2 g
	Tween-20	0.5 mL
	蒸馏水	1000 mL

[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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)的配置方法

[0062]

试剂	用量
浓硫酸	22mL
水	178mL

[0063] 下述实施例中的原核表达的chIL-2在文献“付梦姣等, chIL-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。

[0064] 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。

[0065] 下述实施例中的缓冲液的制备方法如下:

[0066] 1、0.05M甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 2.8)

[0067] 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。

[0068] 2、0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0-5.0)

[0069] 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)。

[0070] 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)。

[0071] 3、0.05M磷酸盐缓冲液(pH 6.0-8.0)

[0072] 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)。

[0073] 4、0.05M碳酸盐缓冲液(pH 9.6)

[0074] 称取1.59g碳酸钠,2.93g碳酸氢钠,溶于1000mL蒸馏水中。

[0075] 5、0.05M碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液(pH 10.0)

[0076] 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。

[0077] 6、PBS(pH 7.4)

[0078] 称取8.0g NaCl,0.2g KCl,1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>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。

[0079] 下述实施例中的封闭液的配方如下:

[0080] 1、5%的脱脂奶:称取5g脱脂奶,溶于80mL PBST中,最后定容至100mL。

[0081] 2、2%的BSA:称取2g BSA,溶于80mL PBST中,最后定容至100mL。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 实施例1、用于检测禽白细胞介素4(chIL-4)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

[0085] 一、用于检测禽白细胞介素4(chIL-4)的酶联免疫检测试剂盒的制备

[0086] 本发明用于检测禽白细胞介素4(chIL-4)的酶联免疫检测试剂盒包括聚苯乙烯酶标反应板、chIL-4标准品(重组蛋白GST-chIL-4,夹心蛋白)、抗chIL-4单克隆抗体1G11-7F-

9E-6B(包被抗体)、生物素化抗chIL-4单克隆抗体2E5-G7-10C-7E(检测抗体)、0.05M磷酸盐缓冲液(pH 6.0,包被液)、PBST(pH 7.4,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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液(终止液)。

### [0087] 1、免疫原的制备

#### [0088] (1) chIL-4原核表达载体的构建

[0089] 将序列1所示的chIL-4基因序列插入到载体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pET-28a-chIL-4质粒。

[0090] 将序列1所示的chIL-4基因序列插入到载体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pGEX-6p-1-chIL-4质粒。

#### [0091] (2) 重组菌的构建及重组蛋白的诱导表达与纯化

[0092] 1) 分别将质粒pET-28a-chIL-4和pGEX-6p-1-chIL-4转化到Rosseta表达菌(购自北京康为世纪生物,货号为CW0811A)中,分别得到重组菌。

[0093] 2) 分别向重组菌中加入IPTG至终浓度为1mmol/L,37℃诱导6h,离心收集菌体。菌体经超声裂解(其功率比为35%,槽温度为46℃,超声3s,停3s,超声总时间为30min)后12000r/min离心20min,分离上清和沉淀,通过SDS-PAGE分析蛋白的表达情况并用Western blot进行验证后,提取包涵体,并进行稀释复性,分别得到纯化后的重组蛋白His-chIL-4(约15kDa)和GST-chIL-4(约38kDa)。SDS-PAGE和Western blot结果分别如图1和图2所示。重组蛋白His-chIL-4用于免疫小鼠,GST-chIL-4用于杂交瘤细胞筛选。

### [0094] 2、小鼠免疫及杂交瘤细胞株的获得

[0095] 以重组蛋白His-chIL-4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,颈背部皮内多点注射,50μg/只。3周后进行二免,抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合乳化,颈背部皮下多点注射,50μg/只。3周后进行三免,免疫剂量与途径同二免。三免1周后,小鼠断尾采血分离血清,以重组蛋白GST-chIL-4所包被的酶标反应板用间接ELISA的方法测定血清抗体效价,当效价大于1:10 000时,小鼠达到融合以制备单克隆抗体的要求。在细胞融合前3d,进行加强免疫,小鼠腹腔注射抗原,50μg/只。

### [0096] 3、细胞融合

[0097] 小鼠三次免疫后取小鼠血清采用间接ELISA进行抗体效价检测,效价合格者进行加强免疫用于细胞融合。细胞融合的具体步骤如下:将准备好的sp2/0杂交瘤细胞和免疫脾细胞按照1:2-1:5的比例混合,加到一个无菌的50mL离心管中,4℃,1 000rpm离心10min,弃上清,将盛有细胞的离心管插入37℃的温水中,一边轻轻晃动离心管,一边吸取1mL溶解好的PEG 4000融合剂,一滴一滴加入到细胞泥中,在60s内完成此操作,然后静止60s,之后按照如下方法加入15mL10%DMEM培养液:第1-2min缓缓加入1mL10%DMEM培养液,第三分钟加入1mL,第四分钟加入2mL,然后在3min内加入余下的10%DMEM培养液,1 000rpm离心10min,弃上清,加入40mL10%DMEM培养液悬浮沉淀细胞,将悬浮细胞加入96孔板中,100μL/孔,置于37℃CO<sub>2</sub>培养箱培养。

[0098] 上述间接ELISA进行抗体效价检测的具体步骤如下:用pH 9.6的碳酸盐缓冲液(包被液)将GST-chIL-4蛋白稀释至1μg/mL,100μL/孔包被酶标板,4℃过夜;甩干孔内残留液

体,每孔加入300 $\mu$ L PBST,洗涤3次;每孔加入300 $\mu$ L 5%脱脂奶,4 $^{\circ}$ C封闭过夜;洗涤同上;断尾采血,将阴阳性血清分别做2倍倍比稀释,将稀释好的血清加入酶标板,100 $\mu$ L/孔,每个稀释度做三个以上的平行孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗涤同上;加入按1:5 000稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗涤同上;加TMB显色剂,100 $\mu$ L/孔,室温显色10-15min后,每孔加50 $\mu$ L终止液,最后酶标仪检测OD<sub>450</sub>值。结果的判定以检测OD<sub>450</sub>>标准阴性样品的均值+2x标准阴性样品的标准差为标准进行阳性判定,在统计学上该判定结果可以达到95%的置信区间。

#### [0099] 4、阳性杂交瘤细胞筛选

[0100] 待融合的细胞克隆生长到覆盖孔底部的1/4-1/3时,利用间接ELISA方法对培养上清进行检测,方法同血清抗体效价的测定,加入阴阳性血清和sp2/0细胞上清作为对照,判定标准同血清抗体效价的测定,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。

#### [0101] 5、阳性杂交瘤细胞的亚克隆

[0102] 将阳性细胞轻轻吹起,取少量细胞进行稀释后,加入台盼蓝染色液进行细胞计数,经计算后,吸取80-100个杂交瘤细胞加入到20mL15%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孔加入约10个细胞,1个孔内加入约100个细胞,以避免阳性细胞的丢失。将细胞放于37 $^{\circ}$ C培养箱培养,待细胞长到覆盖孔底部的1/4-1/3时,再按上述步骤进行阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆,亚克隆一共做3-4次。当获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株后,进行扩大培养。最终获得2株可稳定分泌chIL-4抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为1G11-7F-9E-6B和2E5-G7-10C-7E。

[0103] 杂交瘤细胞株1G11-7F-9E-6B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.13838。

[0104] 杂交瘤细胞株2E5-G7-10C-7E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.13839。

#### [0105] 6、单克隆抗体的制备及鉴定

[0106] 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5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 $2.0 \times 10^6$ 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1G11-7F-9E-6B分泌的chIL-4单克隆抗体命名为1G11-7F-9E-6B抗体;杂交瘤细胞株2E5-G7-10C-7E分泌的chIL-4单克隆抗体命名为2E5-G7-10C-7E抗体,并分别对其特性进行鉴定,包括亚型鉴定、腹水效价测定、亲和力测定、抗体特异性鉴定及抗原表位分析。

##### [0107] (1) 单克隆抗体的抗原表位分析

[0108] 以chIL-4N端第80位和第40位氨基酸为截点,构建chIL-4的截短蛋白的表达载体pET-28a-chIL-4- $\Delta$ 1(His-chIL-4 1-80aa)和pET-28a-chIL-4- $\Delta$ 2(His-chIL-440-

112aa),然后在E.coIi BL21菌中分别诱导各个截短蛋白的表达,并以此为抗原,以chIL-4单克隆抗体为一抗,以HRP标记的山羊抗小鼠IgG为二抗,通过Western blot分析2株单克隆抗体的抗原识别区。

[0109] 上述chIL-4的截短蛋白的表达载体pET-28a-chIL-4- $\Delta$ 1 (His-chIL-4 1-80aa)为将序列2所示的DNA片段插入到载体pET-28a的BamH和XhoI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。

[0110] 上述chIL-4的截短蛋白的表达载体pET-28a-chIL-4- $\Delta$ 2 (His-chIL-4 40-112aa)为将序列3所示的DNA片段插入到载体pET-28a的BamHI和XhoI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。

[0111] 结果如图3所示。结果表明:2株单克隆抗体识别chIL-4不同的抗原表位:1G11-7F-9E-6B识别抗原氨基酸序列如序列5所示;2E5-G7-10C-7E识别抗原氨基酸序列如序列6所示。

[0112] (2) 单克隆抗体得特异性鉴定

[0113] 以原核表达的重组蛋白His-chIL-4、His-chIL-2、His-chIL-10和His-chIFN- $\gamma$ 为抗原,分别以His-tag单克隆抗体和2株抗chIL-4单克隆抗体为一抗,以HRP标记山羊抗小鼠IgG为二抗进行Western blot,鉴定单克隆抗体的特异性。

[0114] 上述原核表达的His-chIFN- $\gamma$ 表达载体为将序列4所示的鸡IFN- $\gamma$ 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的其他序列不变后得到的载体。

[0115] 结果如图4所示。结果表明:2株抗chIL-4单克隆抗体均只识别原核表达的His-chIL-4蛋白,而不识别原核表达的His-chIL-2、His-chIL-10和His-chIFN- $\gamma$ ,表明2株单抗特异性良好。

[0116] (3) 单克隆抗体亚型的鉴定

[0117] 按照Sigma公司的Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents鉴定试剂盒说明书进行单克隆抗体亚型的鉴定。

[0118] 结果表明2株抗chIL-4单克隆抗体的亚型均为IgG1。

[0119] (4) 单克隆抗体的亲和力检测

[0120] 利用间接ELISA方法测定单克隆抗体的亲和力,具体步骤如下:以1 $\mu$ g/mL重组蛋白GST-chIL-4包被酶标反应板,封闭后加入倍比稀释的单克隆抗体,以HRP标记的山羊抗小鼠IgG为二抗,酶标仪读取OD<sub>450</sub>吸光值。当连续几个稀释度的OD<sub>450</sub>读数不再增大时视为抗原抗体100%结合,以抗体浓度(mol/L)为横坐标,OD<sub>450</sub>吸光值为纵坐标做散点图,生成对数趋势线和公式。将OD<sub>450</sub>最大值的一半带入公式,求出此时的抗体浓度即为单克隆抗体的亲和力解离常数(Kd)。结果表明2株单克隆抗体1G11-7F-9E-6B和2E5-G7-10C-7E的亲和力分别为 $1.79 \times 10^{-9}$ 和 $2.36 \times 10^{-9}$ 。

[0121] 二、双抗体夹心ELISA检测方法的建立及条件的优化

[0122] 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1G11-7F-9E-6B为包被抗体、以重组蛋白GST-chIL-4为夹心蛋白,以生物素标记抗体2E5-G7-10C-7E为检测抗体,利用生物素化抗体和HRP标记的链霉亲和素之间的高亲和力及高特异性结合的特点,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。

[0123] 按照常规双抗体夹心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后,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=阳性对照OD<sub>450</sub>均值/阴性对照OD<sub>450</sub>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。

[0124] 1、包被条件的优化

[0125] 分别以0.05M甘氨酸-盐酸(pH 2.8)、0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0)、0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.0)、0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)、0.05M磷酸盐缓冲液(pH 6.0)、0.05M磷酸盐缓冲液(pH 7.0)、0.05M磷酸盐缓冲液(pH 8.0)、0.05M碳酸盐缓冲液(pH 9.6)和0.05M碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液(pH 10.0)为包被液,将1G11-7F-9E-6B抗体稀释至浓度为10 $\mu$ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被12h,1%的PBST洗涤3遍后,用5%的脱脂奶4 $^{\circ}$ C封闭12h后洗涤,加入以PBS进行倍比稀释的重组蛋白GST-IL-4,并以PBS为阴性对照,37 $^{\circ}$ C孵育1h后洗涤。用PBS将生物素化抗体稀释至10 $\mu$ g/mL(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)中说明书所述方法),37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C孵育30min后洗涤,加入显色液TMB并室温显色适当时间后,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止。在酶标仪上读取OD<sub>450</sub>吸光值,根据判定条件确定最佳包被液。

[0126] 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 $^{\circ}$ C包被12h和37 $^{\circ}$ C包被2h,其他反应条件同上,在酶标仪上读取OD<sub>450</sub>吸光值,根据判定条件确定最佳包被温度及时间。

[0127] 在优化包被浓度时,用最佳包被液将抗体分别稀释到5 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、15 $\mu$ g/mL和20 $\mu$ g/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OD<sub>450</sub>吸光值,根据判定条件确定最佳包被浓度。

[0128] 根据上述优化结果,最佳包被条件如下:0.05M磷酸盐缓冲液(pH 6.0)稀释包被抗体至5 $\mu$ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被12h。

[0129] 2、封闭条件的优化

[0130] 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 $^{\circ}$ C,12h和37 $^{\circ}$ 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OD<sub>450</sub>吸光值,根据判定条件确定最佳封闭条件。

[0131] 根据上述优化结果,最佳的封闭条件如下:5%的脱脂奶,4 $^{\circ}$ C封闭12h。

[0132] 3、生物素化抗体作用浓度的优化

[0133] 采用已优化的最佳反应条件,将生物素化抗体分别稀释至0.25 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL、1.0 $\mu$ g/mL、2.0 $\mu$ g/mL,其他反应条件同上,在酶标仪上读取OD<sub>450</sub>吸光值,根据判定条件确定最佳生物素化抗体作用浓度。

[0134] 根据上述优化结果,最佳生物素化抗体作用浓度为1.0 $\mu$ g/mL。

[0135] 4、夹心蛋白及生物素化抗体稀释液的优化

[0136] 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OD<sub>450</sub>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)。

[0137] 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。

[0138] 5、夹心蛋白孵育时间的优化

[0139] 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OD<sub>450</sub>吸光值,根据判定条件确定最佳夹心蛋白孵育时间。

[0140] 根据上述优化结果,最佳夹心蛋白孵育时间为1h。

[0141] 6、生物素化抗体孵育时间的优化

[0142] 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OD<sub>450</sub>吸光值,根据判定条件确定最佳生物素化抗体孵育时间。

[0143] 根据上述优化结果,最佳生物素化抗体孵育时间为2h。

[0144] 7、洗板次数的优化

[0145] 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OD<sub>450</sub>吸光值,根据判定条件确定最佳洗板次数。

[0146] 根据上述优化结果,最佳洗板次数为6次。

[0147] 8、HRP标记的链霉亲和素孵育时间的优化

[0148] 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OD<sub>450</sub>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。

[0149] 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。

[0150] 9、最佳反应条件的确定

[0151] 通过上述反应条件的优化,最终确定双抗体夹心ELISA检测方法的反应条件如下: pH 6.0的磷酸盐缓冲液稀释包被抗体1G11-7F-9E-6B至5 $\mu$ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被12h;5%脱脂奶,4 $^{\circ}$ C封闭12h;用1%的BSA稀释夹心蛋白(重组蛋白GST-chIL-4),37 $^{\circ}$ C孵育1h;用1%的BSA将生物素化抗体2E5-G7-10C-7E稀释至1.0 $\mu$ g/mL,37 $^{\circ}$ C孵育2h;用1%的BSA按照1:10 000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。

[0152] 实施例2、用于检测禽IL-4的酶联免疫检测试剂盒的灵敏度检测

[0153] 一、本发明的用于检测禽IL-4的酶联免疫检测试剂盒的灵敏度检测

[0154] 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1G11-7F-9E-6B为包被抗体、生物素化抗体2E5-G7-10C-7E为检测抗体,将夹心蛋白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OD<sub>450</sub>为纵坐标建立标准曲线。具体步骤如下:

[0155] 1、用pH 6.0的磷酸盐缓冲液将包被抗体1G11-7F-9E-6B稀释成5 $\mu$ g/mL,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被12h后,洗涤缓冲液洗涤6次,300 $\mu$ L/孔,甩干孔内残留液体;

[0156] 2、5%的脱脂奶,300 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C封闭12h后,洗涤同上;

[0157] 3、用1%的BSA将夹心蛋白(重组蛋白GST-chIL-4)稀释至不同浓度(浓度如表1所示),100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h后,洗涤同上;

[0158] 4、用1%的BSA对生物素化抗体2E5-G7-10C-7E进行稀释,使其最终浓度为1 $\mu$ g/mL,

100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h后,洗涤同上;

[0159] 5、用1%的BSA按1:10 000的比例对HRP标记的链霉亲和素进行稀释,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育15min后,洗涤同上;

[0160] 6、加入显色液TMB,100 $\mu$ L/孔,待阴性对照轻微变蓝时,加入2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,50 $\mu$ L/孔,终止反应;

[0161] 7、酶标仪读取OD<sub>450</sub>吸光值。

[0162] 标准曲线如图5所示。夹心蛋白浓度与OD<sub>450</sub>线性关系如表1所示。结果表明:夹心蛋白浓度在64pg/mL-40ng/mL的浓度范围内,其浓度与OD<sub>450</sub>线性关系良好,所能检测到的最小夹心蛋白浓度为64pg/mL。

[0163] 表1、夹心蛋白浓度与OD<sub>450</sub>线性关系

[0164]

夹心蛋白度 (ng/mL)	1 000	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0
OD <sub>450</sub>	3.0380	3.0265	1.4510	0.5460	0.2905	0.2500	0.2480	0.2243

[0165] 二、对比文献中抗体灵敏度的检测

[0166] 按照步骤一中的方法,分别以文献“抗鸡白细胞介素4单克隆抗体的制备及鉴定”中的杂交瘤细胞株分泌的抗chIL-4抗体为包被抗体和检测抗体,将夹心蛋白倍比稀释至不同浓度后进行ELISA试验。包被抗体、检测抗体及夹心蛋白的浓度具体如表2和表3所示。

[0167] 结果如表2和表3所示。不同抗体组合夹心蛋白浓度与OD<sub>450</sub>线性关系如表2所示。从表中可以看出:文献中以1G11-3B为包被抗体,生物素化抗体1G11-5H为检测抗体的组合检测效果最好,这对抗体组合经条件优化后能检测到的最小夹心蛋白浓度为156pg/mL,如表3所示。因此,本发明的以1G11-7F-9E-6B为包被抗体、生物素化抗体2E5-G7-10C-7E为检测抗体的抗体组合的灵敏度明显更好。

[0168] 表2、对比文献中杂交瘤细胞株所分泌抗体用于夹心ELISA的检测情况

[0169]

包被抗体	检测抗体	夹心蛋白浓度 (ng/mL)								
		1 000	250	63	16	4	1	0.25	0.063	0
1G11-3B	2E5-3D	0.6685	0.2835	0.1725	0.1650	0.1545	0.1540	0.1635	0.1610	0.1560
	1G11-5H	2.7980	2.4445	1.0310	0.4370	0.2345	0.1890	0.1770	0.1675	0.1726
2E5-3D	1G11-3B	1.8865	1.3050	1.100	1.0780	1.0565	1.0175	0.9710	0.9930	1.0280
	1G11-5H	2.5120	1.845	0.8375	0.3360	0.1955	0.1635	0.1525	0.1500	0.1608
1G11-5H	1G11-3B	2.1140	1.4385	1.1945	1.1180	1.1005	1.0955	1.0895	1.0590	1.0823
	2E5-3D	0.6465	0.3230	0.2160	0.1915	0.1840	0.1855	0.1795	0.1660	0.1976

[0170] 表3、文献中最佳抗体组合夹心蛋白浓度与OD<sub>450</sub>线性关系

[0171]

夹心蛋白度 (ng/mL)	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0
OD <sub>450</sub>	0.6980	0.4650	0.3270	0.2750	0.2400	0.2275	0.2090	0.1960	0.1900

[0172] 实施例3、用于检测禽IL-4的酶联免疫检测试剂盒的应用

[0173] 采用本发明的用于检测禽IL-4的酶联免疫检测试剂盒对70份1日龄雏鸡血清和56份沙门菌抗体阳性血清样品进行检测,初步判断该检测方法临床实用性。具体步骤如下:

[0174] 1、用pH 6.0的磷酸盐缓冲液将包被抗体1G11-7F-9E-6B稀释成5μg/mL,100μL/孔,4℃包被12h后,洗涤缓冲液洗涤6次,300μL/孔,甩干孔内残留液体;

[0175] 2、5%的脱脂奶,300μL/孔,4℃封闭12h后,洗涤同上;

[0176] 3、用1%的BSA按1:10的比例对待测血清样品进行稀释,100μL/孔,37℃孵育1h后,洗涤同上;

[0177] 4、用1%的BSA对生物素化抗体2E5-G7-10C-7E进行稀释,使其最终浓度为1μg/mL,100μL/孔,37℃孵育2h后,洗涤同上;

[0178] 5、用1%的BSA按1:10 000对HRP标记的链霉亲和素进行稀释,100μL/孔,37℃孵育15min后,洗涤同上;

[0179] 6、加入显色液TMB,100μL/孔,待阴性对照轻微变蓝时,加入2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,50μL/孔,终止反应;

[0180] 7、酶标仪读取OD<sub>450</sub>吸光值。将OD<sub>450</sub>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chIL-4浓度。

[0181] 结果如表4和表5所示。结果表明:70份1日龄雏鸡血清中,有7份被检测出chIL-4浓度较高,其余血清中chIL-4的浓度较低,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。56份沙门菌抗体阳性血清中,除2份浓度为0外,其余血清中被检测出的chIL-4浓度均较高,且绝大部分检出的chIL-4浓度远高于1日龄雏鸡血清的chIL-4浓度。

[0182] 表4、1日龄雏鸡血清检测

		血清编号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0183]	浓度 (pg/mL)	0	0	0	3425	4452	14384	15411	0	0	0
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	浓度 (pg/mL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	浓度 (pg/mL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	浓度 (pg/mL)	0	1417	0	0	0	0	0	0	0	0
[0184]		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	浓度 (pg/mL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	浓度 (pg/mL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
	浓度 (pg/mL)	0	0	0	0	0	0	2530	0	1325	0

[0185] 表5、沙门菌抗体阳性血清检测

[0186]

	血清编号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
浓度 (pg/mL)	54382	87528	83876	59719	55787	7472	104944	672360	32472	379382
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
浓度 (pg/mL)	46478	83585	79497	52453	48050	0	103082	25409	21950	410314
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
浓度 (pg/mL)	0	41500	387500	645000	599500	45500	12500	117500	160500	275000
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
浓度 (pg/mL)	28207	128478	146141	91522	38981	13804	56739	374130	35714	51786
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
浓度 (pg/mL)	72024	38393	365179	57143	57143	24107	78361	92295	54262	243279
	51	52	53	54	55	56				
浓度 (pg/mL)	26230	38033	66557	24426	41148	8361				

## 序列表

&lt;110&gt;中国农业大学

&lt;120&gt;一种检测禽白细胞介素4含量的方法及其专用试剂盒

&lt;160&gt;6

&lt;210&gt;1

&lt;211&gt;336bp

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt;1

```

ttacagctct cagtgccgct gatggagagc atccggatag tgaatgacat ccagggagag 60
gtttcctgcg tcaagatgaa cgtgacagat atctttgcag acaataagac aaataacaaa 120
actgagctct tatgcaaage ctccacaatt gtttgggaga gccagcactg ccacaagaac 180
ctgcagggtc tcttctcaa catgcgctcag ctctgaaatg ccagcagcac ctccctcaag 240
gcaccatgtc ccacggcage aggcaacact acttcaatgg agaagttct agcagaccta 300
cgtaccttct tccaccaact agctaaaaat aagtga                               336

```

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;240bp

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt;2

```

ttacagctct cagtgccgct gatggagagc atccggatag tgaatgacat ccagggagag 60
gtttcctgcg tcaagatgaa cgtgacagat atctttgcag acaataagac aaataacaaa 120
actgagctct tatgcaaage ctccacaatt gtttgggaga gccagcactg ccacaagaac 180
ctgcagggtc tcttctcaa catgcgctcag ctctgaaatg ccagcagcac ctccctcaag 240

```

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;216bp

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt;3

```

actgagctct tatgcaaage ctccacaatt gtttgggaga gccagcactg ccacaagaac 60
ctgcagggtc tcttctcaa catgcgctcag ctctgaaatg ccagcagcac ctccctcaag 120
gcaccatgtc ccacggcage aggcaacact acttcaatgg agaagttct agcagaccta 180

```

cgtaccttct tccaccaact agctaaaaat aagtga 216  
 <210>4  
 <211>435bp  
 <212>DNA  
 <213>人工序列  
 <220>  
 <223>  
 <400>4  
 cataactgcaa gtagtctaaa tcttgttcaa ctcaagatg atatagacaa actgaaagct 60  
 gactttaact caagtcattc agatgtagct gacggtggac ctattattgt agagaaactg 120  
 aagaactgga cagagagaaa tgagaaaagg atcatactga gccagattgt ttcgatgtac 180  
 ttggaaatgc ttgaaaacac tgacaagtca aagecgcaca tcaaacacat atctgaggag 240  
 ctctatactc tgaaaaacaa cttcctgat ggcgtgaaga aggtgaaaga tatcatggac 300  
 ctggccaage tcccgatgaa cgacttgaga atccagcgc aagecgcgaa tgaactcttc 360  
 agcatcttac agaagctggt ggatcctccg agtttcaaaa ggaaaaggag ccagtctcag 420  
 aggagatgca attgc 435  
 <210>5  
 <211>40  
 <212>PRT  
 <213>人工序列  
 <220>  
 <223>  
 <400>5  
 Leu Gln Leu Ser Val Pro Leu Met Glu Ser Ile Arg Ile Val Asn Asp  
 1 5 10 15  
 Ile Gln Gly Glu Val Ser Cys Val Lys Met Asn Val Thr Asp Ile Phe  
 20 25 30  
 Ala Asp Asn Lys Thr Asn Asn Lys  
 35 40  
 <210>6  
 <211>40  
 <212>PRT  
 <213>人工序列  
 <220>  
 <223>  
 <400>6  
 Thr Glu Leu Leu Cys Lys Ala Ser Thr Ile Val Trp Glu Ser Gln His  
 1 5 10 15  
 Cys His Lys Asn Leu Gln Gly Leu Phe Leu Asn Met Arg Gln Leu Leu

---

	20		25		30		
Asn	Ala	Ser	Ser	Thr	Ser	Leu	Lys
	35		40				

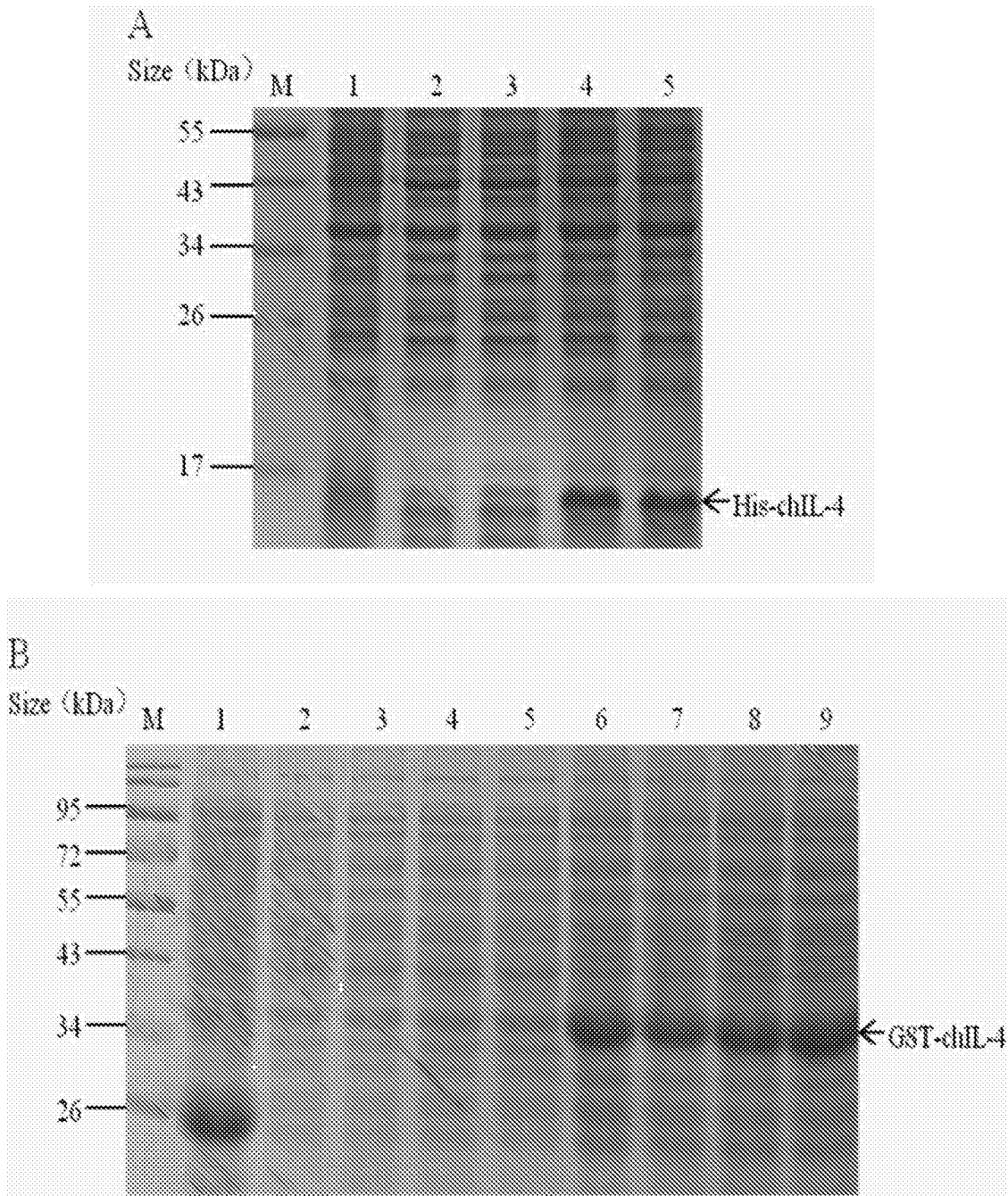


图1

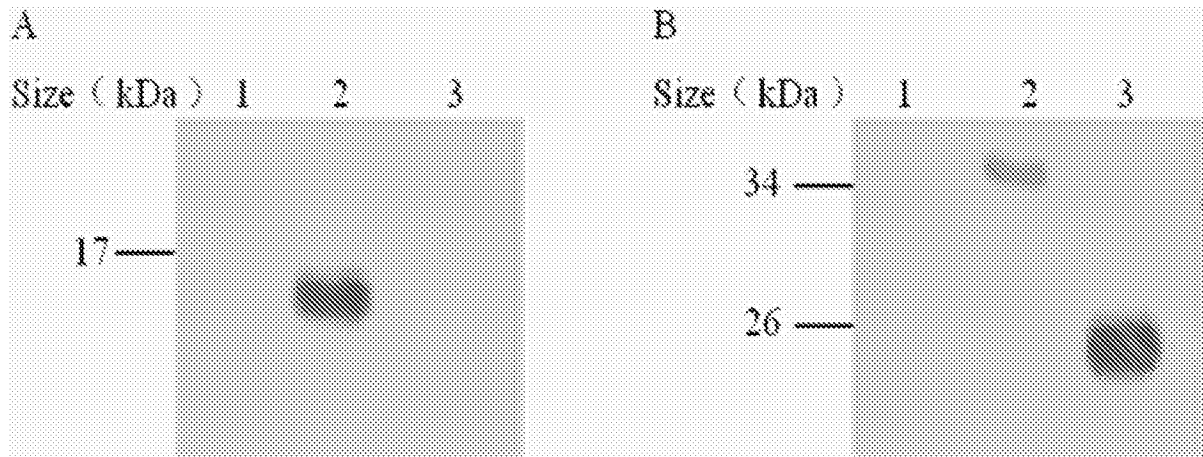


图2

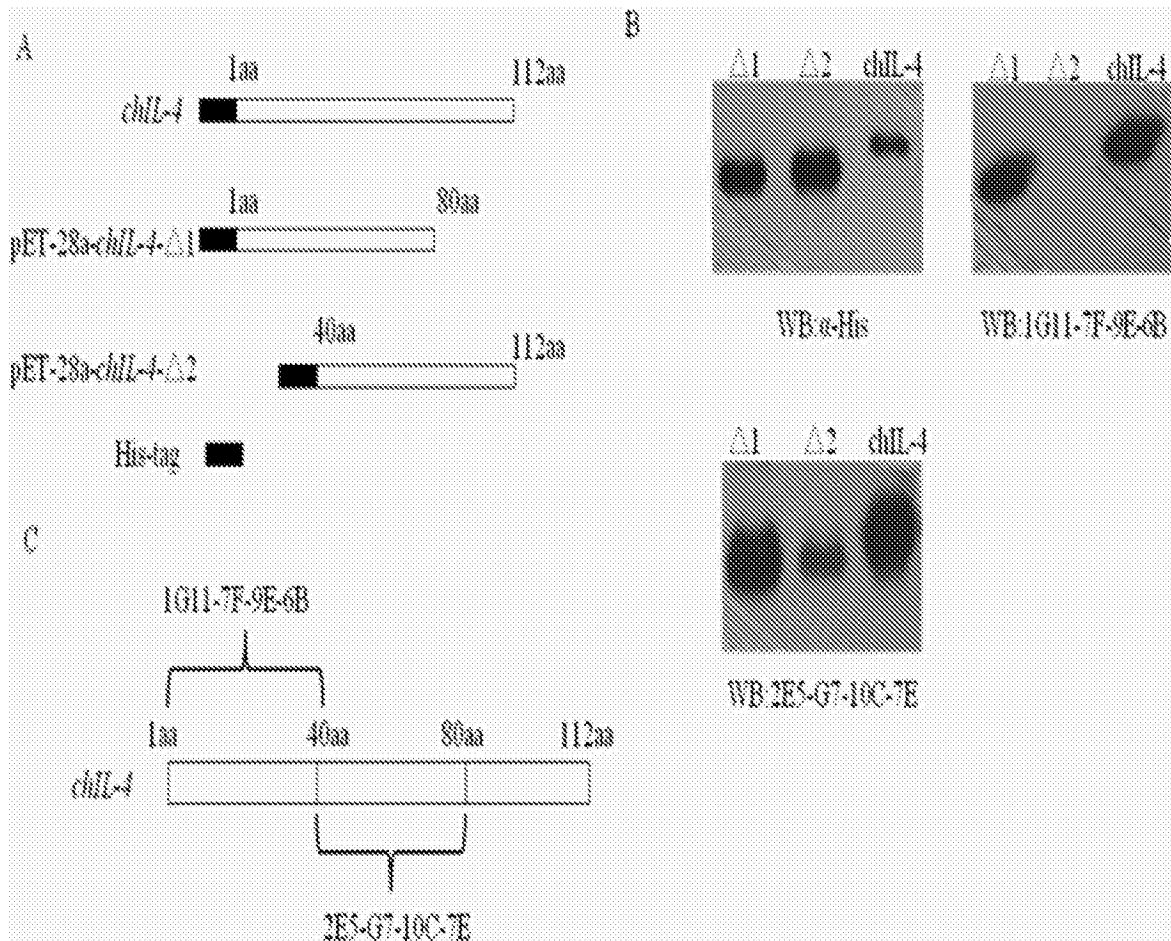


图3

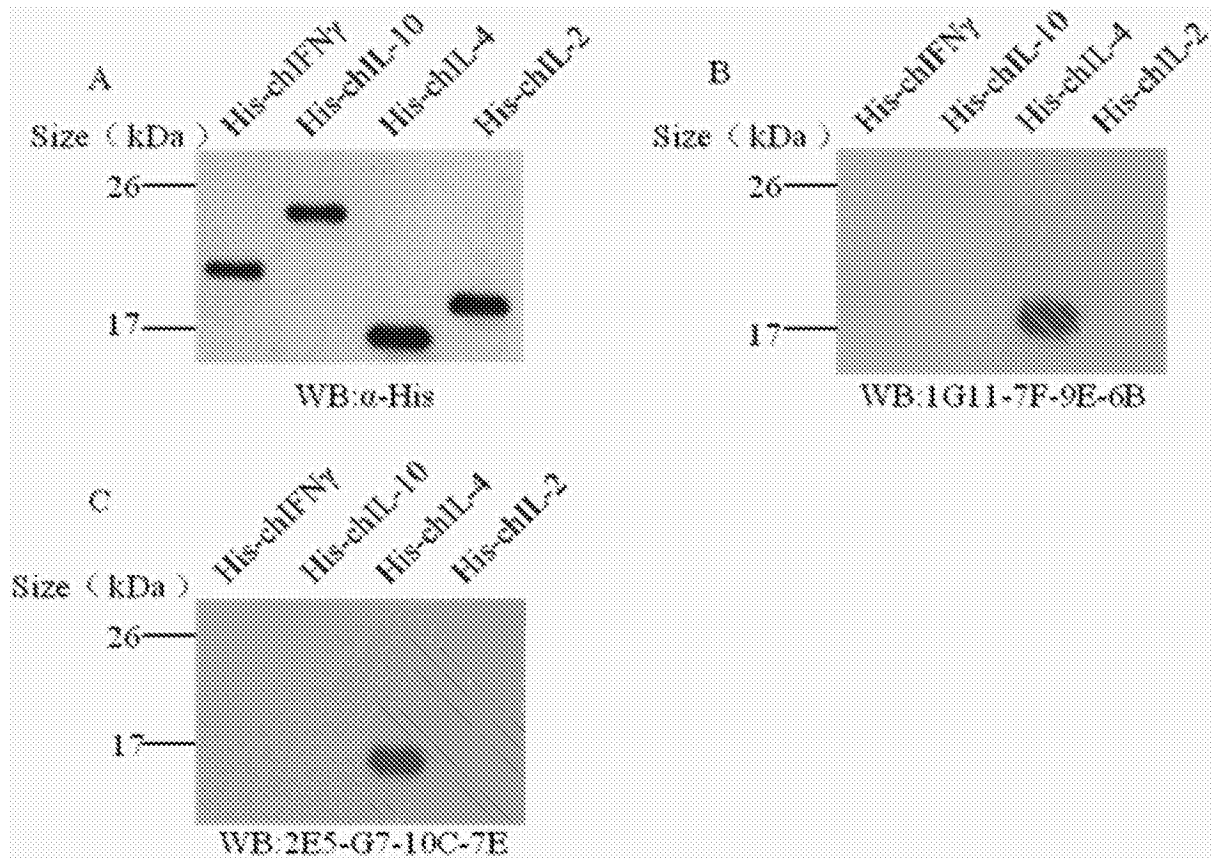


图4

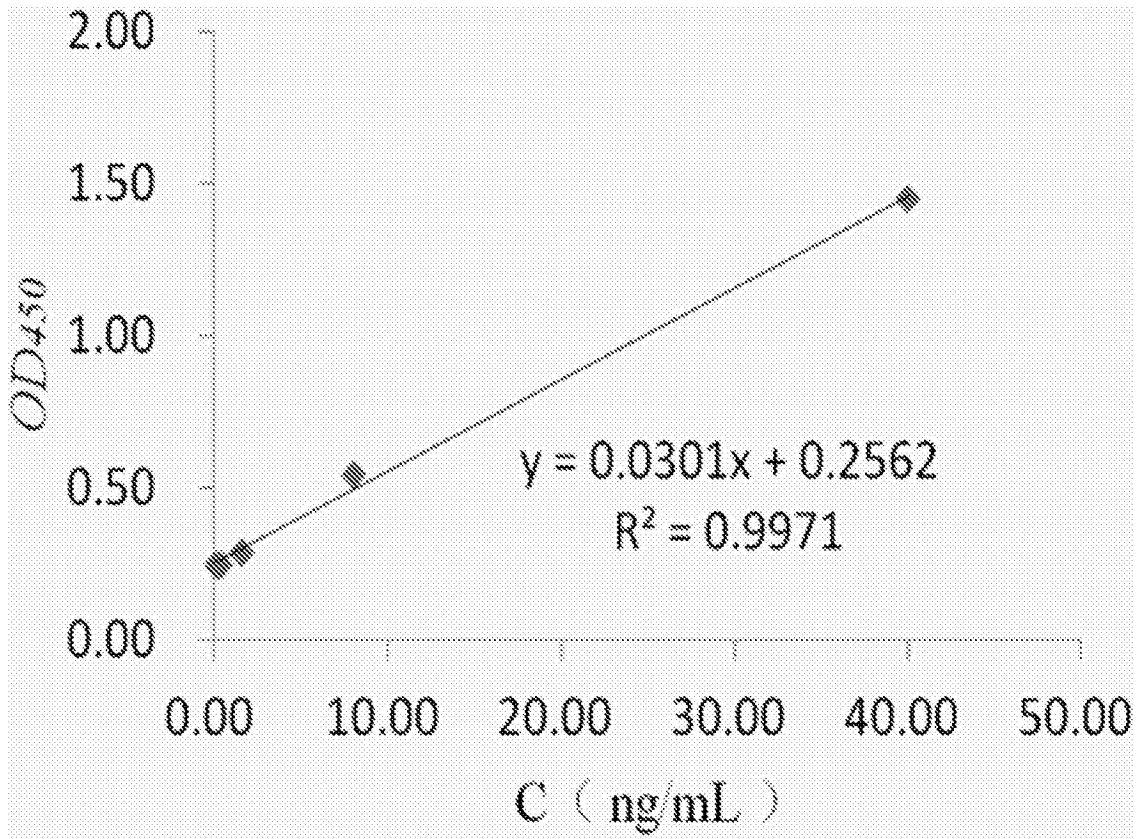


图5

专利名称(译)	一种检测禽白细胞介素4含量的方法及其专用试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN107300619A</a>	公开(公告)日	2017-10-27
申请号	CN2017110480501.8	申请日	2017-06-22
[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 关晓宇 王永强 李晓齐 曹红		
发明人	郑世军 关晓宇 王永强 李晓齐 曹红		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N2333/5406		
代理人(译)	关畅		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测禽白细胞介素4含量的方法及其专用试剂盒。本发明利用chIL-4单克隆抗体建立了针对chIL-4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chIL-4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chIL-4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chIL-4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。

	试剂	用量
A液	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	3.9 g
	蒸馏水	500 mL
B液	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8.975 g
	蒸馏水	500 mL