



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109655619 A

(43)申请公布日 2019.04.19

(21)申请号 201910062661.X

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2019.01.23

G01N 33/535(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCC No.15893 2018.06.15

CGMCC No.15894 2018.06.15

(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 刘海坤 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12页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种检测鸡白细胞介素12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鸡白细胞介素12含量的方法及其专用试剂盒。本发明利用chIL-12单克隆抗体建立了针对chIL-12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-12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-12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-12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，而且有助于了解鸡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-12的单克隆抗体,其结合chIL-12氨基酸序列的第1-98位或第99-197位;所述chIL-12氨基酸序列如序列表中序列2所示。

2. 抗chIL-12的单克隆抗体,是由保藏号为CGMCC No.15893的杂交瘤细胞株LHK-1分泌的或由保藏号为CGMCC No.15894的杂交瘤细胞株LHK-2分泌的。

3. 一株分泌抗chIL-12的单克隆抗体的杂交瘤细胞株LHK-1,其保藏号为CGMCC No.15893。

4. 一株分泌抗chIL-12的单克隆抗体的杂交瘤细胞株LHK-2,其保藏号为CGMCC No.15894。

5. 一种检测或辅助检测待测样品中chIL-12含量的酶联免疫试剂盒,其包括权利要求1或2所述的单克隆抗体和/或权利要求3或4所述的杂交瘤细胞株。

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-12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-12含量的产品中的应用。

7. 一种检测或辅助检测待测样品中chIL-12含量的方法,是以权利要求1所述的单克隆抗体为检测抗体、权利要求2所述的单克隆抗体为包被抗体的双抗体夹心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2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-12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1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-12标准品的各孔的吸光度值,以chIL-12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,将所述吸光度值代入所述标准曲线,即得待测样品中chIL-12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2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-12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1所述的单克隆抗体稀释后加入酶标板中。

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至5 μ 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;

或,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37 $^{\circ}$ C封闭2h;

或,所述步骤(3)和步骤(4)中,所述BSA溶液的质量分数为1%;

或,所述步骤(3)中,所述孵育时间为1h;

或,所述步骤(4)中,所述抗体的浓度稀释至1 μ g/mL;所述孵育时间为1h;

或,所述步骤(5)中,所述孵育时间为30min;

或,所述用酶标仪检测吸光度值时的波长为450nm;

或,所述洗涤的次数为6次。

一种检测鸡白细胞介素12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,具体涉及一种检测鸡白细胞介素12(chIL-12)含量的方法及其专用试剂盒。

背景技术

[0002] 白细胞介素12(Interleukin-12,IL-12)是B细胞、巨噬细胞以及中性粒细胞等在受到各种刺激时释放的一种细胞因子。IL-12是目前所发现的细胞因子中对体内免疫活性细胞诱导和调节作用最强、范围最广的一种细胞因子。IL-12有多种生物学功能,在肿瘤、病毒性疾病及寄生虫病的免疫治疗中发挥重要的作用。

[0003] 单克隆抗体技术是利用在体外培养能大量无限增殖但不能分泌特异性抗体的骨髓瘤细胞和能产生特异性抗体但在体外不能无限增殖的B淋巴细胞进行细胞融合,获得既能够无限增值又能够分泌抗体的杂交瘤细胞。只有融合的杂交瘤细胞能够在选择培养基中存活和增殖,又经过三次亚克隆及间接ELISA方法的筛选,最终获得能分泌特异性识别单一抗原表位抗体的杂交瘤细胞,经小鼠腹腔内培养,即可无限制地大量获得单克隆抗体。

[0004] 夹心ELISA是利用纯化的抗体包被酶标板,洗涤后加入待检测的抗原,洗涤后加入酶标抗体进行反应,最后加入底物显色的一种酶联免疫吸附试验,该方法可用于抗原的检测。

[0005] 目前已有人和小鼠IL-12细胞因子的检测试剂盒,能够从蛋白水平反映出机体的感染或免疫状态。但由于鸡IL-12基因序列与哺乳动物的同源性较低,因此不能将其检测试剂盒直接用于鸡血清中IL-12的检测。而目前在国内外尚未出现鸡IL-12细胞因子商品化检测试剂盒。科学研究领域仅能够通过使用荧光定量PCR的方法检测鸡细胞因子的mRNA水平。但由于在mRNA翻译蛋白质的过程中,细胞内仍有许多的调控,并不能够直接真实地反映出鸡体内chIL-12的蛋白水平。

发明内容

[0006] 本发明的第一个目的是提供抗chIL-12的单克隆抗体。

[0007] 本发明提供的抗chIL-12的单克隆抗体结合chIL-12氨基酸序列的第1-98位或第99-197位。所述chIL-12氨基酸序列如序列表中序列2所示。

[0008] 进一步的,所述单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No.15893的杂交瘤细胞株LHK-1分泌的或由保藏号为CGMCC No.15894的杂交瘤细胞株LHK-2分泌的。

[0009] 所述保藏号为CGMCC No.15893的杂交瘤细胞株LHK-1分泌的抗chIL-12的单克隆抗体结合chIL-12氨基酸序列的第1-98位;所述保藏号为CGMCC No.15894的杂交瘤细胞株LHK-2分泌的抗chIL-12的单克隆抗体结合chIL-12氨基酸序列的第99-197位。

[0010] 将由保藏号为CGMCC No.15893的杂交瘤细胞株LHK-1分泌的抗chIL-12的单克隆抗体命名为LHK-1抗体;将由保藏号为CGMCC No.15894的杂交瘤细胞株LHK-2分泌的抗chIL-12的单克隆抗体命名为LHK-2抗体。

[0011] 本发明的第二个目的是提供一株分泌抗chIL-12的单克隆抗体的杂交瘤细胞株LHK-1。

[0012] 本发明提供的分泌抗chIL-12的单克隆抗体的杂交瘤细胞株LHK-1的保藏号为CGMCC No.15893。所述杂交瘤细胞株LHK-1的分类命名为杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株已于2018年6月15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)。

[0013] 本发明的第三个目的是提供一株分泌抗chIL-12的单克隆抗体的杂交瘤细胞株LHK-2。

[0014] 本发明提供的分泌抗chIL-12的单克隆抗体的杂交瘤细胞株LHK-2的保藏号为CGMCC No.15894。所述杂交瘤细胞株LHK-2的分类命名为杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株已于2018年6月15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)。

[0015] 本发明的第四个目的是提供一种检测或辅助检测待测样品中chIL-12含量的酶联免疫试剂盒。

[0016] 本发明提供的检测或辅助检测待测样品中chIL-12含量的酶联免疫试剂盒包括LHK-1抗体和/或LHK-2抗体。

[0017] 上述酶联免疫试剂盒还包括chIL-12标准品;所述chIL-12标准品是通过将核苷酸序列如序列表中序列1所示的chIL-12基因在原核细胞中进行表达获得的。

[0018] 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。

[0019] 本发明的第五个目的是提供上述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。

[0020] 本发明提供了上述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-12含量中的应用。

[0021] 本发明还提供了上述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制备检测或辅助检测待测样品中chIL-12含量的产品中的应用。

[0022] 所述产品可为试剂或胶体金试纸条或试剂盒。

[0023] 本发明的第六个目的是提供一种检测或辅助检测待测样品中chIL-12含量的方法。

[0024] 本发明提供的检测或辅助检测待测样品中chIL-12含量的方法是以LHK-2抗体为检测抗体、LHK-1抗体为包被抗体的双抗体夹心ELISA检测方法。

[0025] 上述检测或辅助检测待测样品中chIL-12含量的方法可包括如下步骤:

[0026] (1) 将LHK-1抗体包被到酶标板上,洗涤;

[0027] (2) 封闭(1)得到的酶标板,洗涤;

[0028] (3) 向(2)得到的酶标板中加入chIL-12标准品或待测样品,孵育,洗涤;

[0029] (4) 向(3)得到的酶标板中加入生物素化的LHK-2抗体,孵育,洗涤;

[0030] (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;

[0031] (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;

[0032] (7) 用酶标仪检测加入chIL-12标准品的各孔的吸光度值,以chIL-12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;

[0033] (8) 用酶标仪检测加入待测样品的孔的吸光度值,将所述吸光度值代入所述标准曲线,即得待测样品中chIL-12的浓度。

[0034] 进一步的,

[0035] 所述步骤(1)中,用磷酸盐缓冲液将LHK-1抗体稀释后包被到酶标板上。

[0036] 所述步骤(2)中,用脱脂奶溶液封闭(1)得到的酶标板。

[0037] 所述步骤(3)中,用BSA溶液将chIL-12标准品稀释后加入酶标板中。

[0038] 所述步骤(4)中,用BSA溶液将生物素化的LHK-2抗体稀释后加入酶标板中。

[0039] 更进一步的,

[0040] 所述步骤(1)中,所述抗体的浓度稀释至 $5\mu\text{g/mL}$;所述包被的条件为 4°C 包被12h;所述磷酸盐缓冲液的浓度为0.05M,pH为6.0;

[0041] 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 37°C 封闭2h;

[0042] 所述步骤(3)和步骤(4)中,所述BSA溶液的质量分数为1%;

[0043] 所述步骤(3)中,所述孵育时间为1h;

[0044] 所述步骤(4)中,所述抗体的浓度稀释至 $1\mu\text{g/mL}$;所述孵育时间为1h;

[0045] 所述步骤(5)中,所述孵育时间为30min;

[0046] 所述用酶标仪检测吸光度值时的波长为450nm;

[0047] 所述洗涤的次数为6次。

[0048] 所述底物为TMB;所述终止液为2M H_2SO_4 。

[0049] 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和高特异性结合,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。

[0050] 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chIL-12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。

[0051] 本发明利用鸡chIL-12单克隆抗体建立了针对chIL-12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chIL-12含量。通过实验证明:本发明的chIL-12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-12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chIL-12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

[0052] 图1为单克隆抗体识别抗原表位示意图。

[0053] 图2为标准曲线的建立。

具体实施方式

[0054] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0055] 下述实施例中所使用的溶液的配方如下:

[0056] 1、包被缓冲液(0.05M碳酸盐缓冲液,pH9.6)的配方如下:

[0057] 称取1.59g碳酸钠,2.93g碳酸氢钠,溶于1000mL蒸馏水中。

[0058] 2、洗涤缓冲液(PBST,pH7.4)的配方如下:

[0059]	试剂	用量
	KH_2PO_4	0.2 g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
[0060]	NaCl	8.0 g
	KCl	0.2 g
	Tween-20	0.5 mL
	蒸馏水	1000 mL

[0061] 3、封闭液(5%的脱脂奶)的配方如下:

[0062]

试剂	用量
脱脂奶	5g
洗涤缓冲液	100mL

[0063] 4、样品及抗体稀释液(1%的BSA)的配方如下:

[0064]

试剂	用量
牛血清白蛋白(BSA)	1g
洗涤缓冲液	100mL

[0065] 5、终止液(2M H_2SO_4)的配置方法

[0066]

试剂	用量
浓硫酸	22mL
水	178mL

[0067] 6、PBS(pH 7.4)

[0068] 称取8.0g NaCl,0.2g KCl,1.44g Na_2HPO_4 ,0.24g KH_2PO_4 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。

[0069] 下述实施例中的缓冲液的制备方法如下:

[0070] 1、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)。

[0072] 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)。

[0073] 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)。

[0074] 2、0.05M磷酸盐缓冲液 (pH 6.0-8.0)

[0075] 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)。

[0076] 将39mL A液和61mL B液混匀,得到0.05M磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)。

[0077] 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)。

[0078] 3、0.05M碳酸盐缓冲液 (pH 9.6)

[0079] 称取1.59g碳酸钠,2.93g碳酸氢钠,溶于1000mL蒸馏水中。

[0080] 4、0.05M碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液 (pH 10)

[0081] 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。

[0082] 实施例1、用于检测鸡白细胞介素12 (chIL-12) 的酶联免疫检测试剂盒及其使用方法

[0083] 一、用于检测鸡白细胞介素12 (chIL-12) 的酶联免疫检测试剂盒的制备

[0084] 本发明的用于检测鸡白细胞介素12 (chIL-12) 的酶联免疫检测试剂盒包括chIL-12标准品 (重组蛋白GST-chIL-12, 夹心蛋白)、单克隆抗体LHK-1 (包被抗体)、单克隆抗体LHK-2 (检测抗体)、聚苯乙烯酶标反应板、0.05M碳酸盐缓冲液 (pH 6.0, 包被液)、PBST (pH 7.4, 洗涤缓冲液)、5%的脱脂奶 (封闭液)、1%的BSA (样品及抗体稀释液)、HRP标记的链霉亲和素、底物TMB、2M H_2SO_4 溶液 (终止液)。

[0085] 1、免疫原的制备

[0086] (1) 鸡IL-12原核表达载体的构建

[0087] (1-1) 在NCBI上获取已发表的鸡白细胞介素12的核苷酸序列 (NM_213571.1), 并根据所报道的序列设计特异性引物, 引物序列如下:

[0088] 上游引物:5'-AGCAAATGGGTCGCGGATCCCAGTGGAACCTTAGAGAGAA-3';

[0089] 下游引物:5'-TGGTGGTGGTGGTCTCGAGTCTGCAAAGCGTGGACCACT-3'。

[0090] (1-2) 以雏鸡脾脏提取的cDNA为模板, 采用 (1-1) 中的引物进行PCR扩增, 获得鸡白细胞介素12的基因片段 (序列1)。

[0091] (1-3) 将序列表中序列1所示的鸡白细胞介素12的基因片段插入载体pET-28a (购自EMD Biosciences (Novagen), 产品目录号为69864-3) 的BamH I和Xho I酶切位点间, 且保持载体pET-28a的其他序列不变, 得到pET-28a-IL-12重组载体。

[0092] 将序列表中序列1所示的鸡白细胞介素12的基因片段插入载体pGEX-6p-1 (购自优

宝生物公司,产品目录号为VT1258)的BamH I和Xho I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-IL-12重组载体。

[0093] (2) 重组菌的构建及重组蛋白的诱导表达与纯化

[0094] (2-1) 分别将pET-28a-IL-12和pGEX-6p-1-IL-12重组载体转化至工程菌Rosetta (购自北京康为世纪生物,货号为CW0811A)中,分别得到重组菌。

[0095] (2-2) 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(超声功率比35%,超声2秒,暂停2s,超声时长(包含超声和暂停时间)共600秒)后,12000r/min离心20min,收集上清液。用带有Ni离子的亲和层析柱和与GST标签结合的亲和层析柱分别对上清液进行亲和层析纯化,分别得到纯化后的重组蛋白His-chIL-12 (38Kda) 和GST-chIL-12 (58Kda)。SDS-PAGE和Western blotting结果分别如图1所示。重组蛋白His-chIL-12用于免疫小鼠,重组蛋白GST-chIL-12用于杂交瘤细胞筛选。

[0096] 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Soluble Binding Buffer冲洗柱子,收集流穿峰。3、使用5倍柱体积的Soluble Elution Buffer洗脱,收集洗脱峰。4、洗脱后,依次使用3倍柱体积的Soluble 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℃保存。

[0097] 2、小鼠免疫

[0098] 以重组蛋白His-chIL-12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-12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1:10000时,小鼠达到融合以制备单克隆抗体的标准。在细胞融合前3d,进行加强免疫,小鼠腹腔注射抗原,50μg/只。

[0099] 3、细胞融合

[0100] 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℃,1000rpm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PEG4000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15mL的10%DMEM培养液:第1-2min缓缓加入1mL的10%DMEM培养液,第3min加入1mL,第4min加入2mL,然后在3min内加入余下的10%DMEM培养液,1000rpm离心10min,弃上清,加入40mL的HAT选择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℃,CO₂培养箱培养。

[0101] 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)将重组蛋白GST-chIL-12稀释至1μg/mL,100μL/孔包被CORNING酶标板,4℃过夜;甩干孔内残留液体,每孔加入300μL PBST,洗涤3次;甩干孔内残留液体后每孔加入300μL的5%脱脂乳,4℃封闭过夜;洗涤;断尾采血,将阴阳性血清分别做2倍比稀释,将稀释好的血清加入酶标板,100μL/孔,每个稀释度做三个以上的平行孔,37℃孵育1小时,清洗3遍;加1:10000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG酶标二抗,100μL/孔,37℃孵育

30min;PBST洗涤三遍;甩干孔内残留液体;加TMB显色剂,100 μ L/孔,室温显色10-15分钟,每孔加50 μ L的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。

[0102] 4、阳性杂交瘤细胞筛选

[0103] 待融合的细胞克隆生长到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测定,加入阴阳性血清对照和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。

[0104] 5、阳性杂交瘤细胞的亚克隆

[0105] 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10mL的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-12抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为LHK-1和LHK-2。

[0106] 杂交瘤细胞株LHK-1的分类命名为杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株已于2018年6月15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.15893。

[0107] 杂交瘤细胞株LHK-2的分类命名为杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株已于2018年6月15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.15894。

[0108] 6、单克隆抗体的制备及鉴定

[0109] 挑选经产BALB/c小鼠,腹腔注射灭菌液体石蜡500 μ L/只,7d后分别将步骤5筛选的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 2.5×10^6 个(细胞悬液约200 μ L)/只,7-10天后小鼠腹围明显增大,采集腹水,并利用正辛酸-饱和硫酸铵法纯化单克隆抗体。纯化的具体步骤如下:向腹水中加入醋酸盐缓冲液混匀后并调节pH至4.8,再向其中加入正辛酸,4℃搅拌30分钟,12000rpm,4℃离心30分钟,取上清并调节pH至7.2,缓慢加入饱和硫酸铵使其最终饱和度达到45%,4℃搅拌30分钟,12000rpm,4℃离心30分钟,弃去上清,沉淀用2mL的PBS重悬,并加入预先处理好的透析袋中,将透析袋放入PBS中并在4℃透析24小时。在此期间更换透析液(PBS)3-4次,最终分别收集透析袋中的抗体,获得了纯化后的抗体。其中,杂交瘤细胞株LHK-2分泌的chIL-12单克隆抗体命名为抗chIL-12单克隆抗体LHK-2(LHK-2抗体);杂交瘤细胞株LHK-1分泌的chIL-12单克隆抗体命名为抗chIL-12单克隆抗体LHK-1(LHK-1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。

[0110] (1) 单克隆抗体的抗原表位分析

[0111] 构建鸡IL-12的截短表达载体pGEX-6P-1-IL12- Δ 1、pGEX-6P-1-IL12- Δ 2、pGEX-6P-1-IL12- Δ 3和pGEX-6P-1-IL12- Δ 4,然后在Rosetta表达工程菌中分别诱导截短蛋白的表达,并以此为抗原,以单克隆抗体为一抗,HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体为二抗通过Western blotting分析2株单克隆抗体(LHK-2抗体和LHK-1抗体)的抗原识别区。

[0112] 上述鸡IL-12的截短表达载体pGEX-6P-1-IL12- Δ 1载体为将序列1第1-591位所示的DNA片段插入载体pGEX-6p-1的BamH I和Xho I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-IL12- Δ 1重组载体。pGEX-6P-1-IL12- Δ 1重组载体表达IL-12截短体1-197(chIL-12氨基酸序列第1-197位)。

[0113] 上述鸡IL-12的截短表达载体pGEX-6P-1-IL12- Δ 2为将序列1第295-885位所示的DNA片段插入载体pGEX-6p-1的BamH I和Xho I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-IL12- Δ 2重组载体。pGEX-6P-1-IL12- Δ 2重组载体表达IL-12截短体99-295(chIL-12氨基酸序列第99-295位)。

[0114] 上述鸡IL-12的截短表达载体pGEX-6P-1-IL12- Δ 3载体为将序列1第1-294位所示的DNA片段插入载体pGEX-6p-1的BamH I和Xho I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-IL12- Δ 3重组载体。pGEX-6P-1-IL12- Δ 3重组载体表达IL-12截短体1-98(chIL-12氨基酸序列第1-98位)。

[0115] 上述鸡IL-12的截短表达载体pGEX-6P-1-IL12- Δ 4为将序列1第592-885位所示的DNA片段插入载体pGEX-6p-1的BamH I和Xho I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-IL12- Δ 4重组载体。pGEX-6P-1-IL12- Δ 4重组载体表达IL-12截短体198-295(chIL-12氨基酸序列第198-295位)。

[0116] 结果表明:LHK-1单克隆抗体识别chIL-12氨基酸序列的第1-98位;LHK-2单克隆抗体识别chIL-12氨基酸序列的第99-197位。chIL-12氨基酸序列如序列表中序列2所示。

[0117] (2) 单克隆抗体的Ig亚类的鉴定

[0118] 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。

[0119] 结果表明:LHK-2单克隆抗体和LHK-1单克隆抗体的亚型均为IgG2a。

[0120] (3) 单克隆抗体的亲和力检测

[0121] 将纯化后的单克隆抗体以2倍倍比稀释加入用纯化后的GST-chIL-12包被的酶标反应板进行间接ELISA,测定每孔的OD₄₅₀,并以其为纵坐标,抗体浓度为横坐标作图,得出计算公式。将所测得的OD₄₅₀最大值作为抗原抗体100%结合,并根据抗原抗体结合率为50%的抗体浓度计算出亲和力解离常数(K_d)。经鉴定LHK-2单克隆抗体的亲和力解离常数为 1.063×10^{-10} ,LHK-1单克隆抗体的亲和力解离常数为 5.330×10^{-11} 。

[0122] (4) 单克隆抗体的特异性检测

[0123] 分别以原核表达的重组蛋白His-chIL-12、chIL-6、chIL-17和TGF- β 为抗原,经SDS-PAGE后转印至PVDF膜;分别以His-tag单抗、纯化的LHK-2单克隆抗体、LHK-1单克隆抗体为一抗;以HRP-山羊抗小鼠IgG为二抗进行Western blotting,检测单克隆抗体的特异性。

[0124] 结果表明:LHK-2单克隆抗体和LHK-1单克隆抗体均只识别原核表达的His-chIL-12蛋白,而不识别chIL-6、chIL-17和TGF- β 等细胞因子。说明2株单抗特异性良好。

[0125] 二、双抗体夹心ELISA检测方法的建立及条件的优化

[0126] 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LHK-1抗体为包被抗体、以重组蛋白GST-chIL-12为夹心蛋白,以LHK-2抗体为检测抗体,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。

[0127] (一)最佳检测抗体和包被抗体的确定

[0128] 按照Thermo公司的EZ-Link® NHS-PEG Solid Phase Biotinylation Kit-Pre-packed Column的说明书对2株单克隆抗体进行生物素标记。然后分别将1株单克隆抗体作为包被抗体包被酶标板,另外1株生物素化抗体作为检测的酶标抗体,以PBS倍比稀释的重组蛋白GST-chIL-12为夹心蛋白,以PBS为阴性对照,按照常规夹心ELISA的反应条件,酶标仪读取OD₄₅₀吸光值,检测不同抗体配对条件下,该检测方法的灵敏度,以最高灵敏度条件下的包被抗体和检测抗体为最佳包被抗体与检测抗体。最终确定LHK-2单克隆抗体为检测抗体,LHK-1单克隆抗体为包被抗体。

[0129] (二)双抗体夹心ELISA反应条件的优化

[0130] 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=阳性对照OD₄₅₀均值/阴性对照OD₄₅₀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。

[0131] 1、包被条件的优化

[0132] 分别以0.05M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH3.0)、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)作为包被液。将LHK-1单克隆抗体稀释至浓度为10μg/mL,4℃包被12h,1%的PBST洗涤3遍后,用5%的脱脂奶37℃封闭2h后洗涤,加入以PBS进行倍比稀释的重组蛋白GST-chIL-12,并以PBS为阴性对照,37℃孵育1h后洗涤。用PBS按1:1000对生物素化的LHK-2单克隆抗体(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℃孵育30min后洗涤,加入显色液TMB后2M H₂SO₄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。

[0133] 在优化包被温度及时间时,用最佳包被液对抗体进行稀释,包被温度和时间分别如下:37℃包被2h、4℃包被12h、4℃包被12h再37℃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。

[0134] 在优化包被浓度时,用最佳包被液将抗体分别稀释到5μg/mL、10μg/mL、20μg/mL和40μg/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。

[0135] 根据上述优化结果,最佳的包被条件如下:0.05M磷酸盐缓冲液(pH6.0)稀释包被

抗体至5 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被12h。

[0136] 2、封闭条件的优化

[0137] 采用已优化的最佳反应条件,分别以5%的脱脂奶、2%的BSA、1%的胎牛血清作为封闭液,分别在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OD₄₅₀吸光值,根据判定条件确定最佳封闭条件。

[0138] 根据上述优化结果,最佳的封闭条件如下:5%的脱脂奶,37 $^{\circ}$ C封闭2h。

[0139] 3、夹心蛋白及生物素化抗体稀释液的优化

[0140] 采用已优化的最佳反应条件,分别以5%的脱脂奶、2.5%的脱脂奶、1%的BSA和PBST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)。

[0141] 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。

[0142] 4、夹心蛋白孵育时间的优化

[0143] 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。

[0144] 根据上述优化结果,最佳夹心蛋白孵育时间为1.0h。

[0145] 5、生物素化抗体孵育时间的优化

[0146] 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。

[0147] 根据上述优化结果,最佳生物素化抗体孵育时间为1.0h。

[0148] 6、洗板次数的优化

[0149] 采用已优化的最佳反应条件,分别洗板3、4、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。

[0150] 根据上述优化结果,最佳洗板次数为6次。

[0151] 7、HRP标记的链霉亲和素孵育时间的优化

[0152] 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。

[0153] 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30min。

[0154] 8、最佳反应条件的确定

[0155] 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磷酸盐缓冲液(pH6.0)稀释捕获抗体至5 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被12h;5%脱脂奶,37 $^{\circ}$ C封闭2h;待检抗原使用1%BSA稀释,37 $^{\circ}$ C孵育1h;1%BSA稀释生物素化抗体至1 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C孵育1h;用1%BSA以1:10000的比例稀释HRP标记的链霉亲和素,37 $^{\circ}$ C孵育30min;PBST洗板6次。

[0156] 实施例2、用于检测鸡IL-12的酶联免疫检测试剂盒的灵敏度检测

[0157] 按照实施例1中确定的双抗体夹心ELISA检测方法的最优条件,以LHK-1抗体为包被抗体、生物素化抗体LHK-2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OD₄₅₀为纵坐标建立标准曲线。具体步骤如下:

[0158] 1、用0.05M磷酸盐缓冲液(pH6.0)将LHK-1抗体稀释至5 μ g/mL,100 μ L/孔,4℃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;

[0159] 2、5%脱脂奶,300 μ L/孔,37℃封闭2h后,洗涤同上;

[0160] 3、用1%BSA按1:10的比例对待测血清样品进行稀释,100 μ L/孔,37℃孵育1h后,洗涤同上;

[0161] 4、用1%BSA对生物素化抗体LHK-2进行稀释,使其终浓度为1 μ g/mL,100 μ L/孔,37℃孵育1h后,洗涤同上;

[0162] 5、用1%BSA按1:10 000的比例对HRP标记的链霉亲和素进行稀释,100 μ L/孔,37℃孵育30min后,洗涤同上;

[0163] 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;

[0164] 7、酶标仪读取OD₄₅₀吸光值。

[0165] 标准曲线如图2所示。结果表明:夹心蛋白浓度在244-31250pg/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244pg/mL。

[0166] 实施例3、酶联免疫检测试剂盒的应用

[0167] 采用本发明的用于检测鸡IL-12的酶联免疫检测试剂盒对60份1日龄雏鸡血清和79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:

[0168] 1、用0.05M磷酸盐缓冲液(pH6.0)将LHK-1抗体稀释成5 μ g/mL,100 μ L/孔,4℃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;

[0169] 2、5%脱脂奶,300 μ L/孔,37℃封闭2h后,洗涤同上;

[0170] 3、用1%BSA按1:10的比例对待测血清样品进行稀释,100 μ L/孔,37℃孵育1h后,洗涤同上;

[0171] 4、用1%BSA对生物素化抗体LHK-2进行稀释,使其终浓度为1 μ g/mL,100 μ L/孔,37℃孵育1h后,洗涤同上;

[0172] 5、用1%BSA按1:10 000的比例对HRP标记的链霉亲和素进行稀释,100 μ L/孔,37℃孵育30min后,洗涤同上;

[0173] 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;

[0174] 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chIL-12浓度。

[0175] 结果如表1和表2所示。结果表明:60份1日龄雏鸡血清中,有13份被检测出chIL-12浓度较高,其余血清中chIL-12的浓度较低,不在该方法的检测线性浓度范围内的浓度以0表示;78份阳性血清检出的chIL-12浓度均较高,且远高于阴性血清的检出浓度。

[0176] 表1、1日龄雏鸡血清检测

[0177]

	血清编号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
浓度 (pg/mL)	0	0	2879	0	0	0	0	1102	0	0
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
浓度 (pg/mL)	3145	0	0	2720	0	950	0	0	0	1459
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
浓度 (pg/mL)	0	0	5843	0	0	0	0	0	1770	0
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
浓度 (pg/mL)	0	0	0	2278	0	0	0	0	0	0
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
浓度 (pg/mL)	0	7993	0	6840	0	0	0	0	0	0
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
浓度 (pg/mL)	0	0	0	0	1389	0	0	0	2964	0

[0178] 表2、沙门菌抗体阳性血清检测

[0179]

	血清编号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
浓度 (pg/mL)	19279	39769	41809	21057	20556	23091	18893	31204	32114	34260
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
浓度 (pg/mL)	26492	29840	19753	17830	24827	14704	25621	26185	29740	14792
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
浓度 (pg/mL)	24791	28741	16915	32955	24038	26950	37051	26836	21693	36813
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
浓度 (pg/mL)	33751	37981	27510	16340	19715	27840	29640	29438	30573	27831
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
浓度 (pg/mL)	13968	21856	26689	18602	19562	19730	15042	13403	24027	37504
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
浓度 (pg/mL)	36790	26103	11655	26902	19268	24570	20689	14295	19048	26730
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
浓度 (pg/mL)	16306	26585	35703	22041	27094	27902	15839	26925	29630	37021
	71	72	73	74	75	76	77	78		
浓度 (pg/mL)	13564	28950	14339	23781	27895	16239	13493	28564		

序列表

<110>中国农业大学

<120>一种检测鸡白细胞介素12含量的方法及其专用试剂盒

<160>2

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>885

<212>DNA

<213>人工序列 (Artificial Sequence)

<400>1

```

cagtggaaac ttagagagaa tgtgtatgtc atagaatctg agtggaacga tgagacacca 60
gctaaaaaag tgaagctcac ctgtgacaca tctgatgaag cactgccagt ttactggaaa 120
aagggaacag aactgaaagg aactggaaag actctgacca ccgaagtga ggagttccca 180
gatgctggca actacacctg cctgtctgct aagaccacg agattatcag ctacagtttc 240
tttctcataa ctaaagtaga ctccaatggg caaatgatac ggtcaattct gaaaagctat 300
aaagagccaa gcaagacgtt cttaaaatgt gaggcaaaga actactctgg aattttcaca 360
tgttcatgga tgacagaaaa tgagagtcca agtgtgaagt tcacaattag gaggcctaaa 420
ggctctcaag gagatgtaac ctgcagcagc cctgtggctc gcactgataa atctgtgact 480
gaatacactg ccagtgcca gaaggaaaac tactgtccat ttgccgaaga gcaccagccg 540
actgagatgt tcctggaggt cattgatgag gtggaatatg agaactacac tagtagcttc 600
ttcatcagag atatcataaa gccagacca cctcaatgtc agtatgcaag cacaaatgga 660
actgtgacct ggacatatcc caagacctgg agcacaccga agtcctactt ccctttgact 720
ttcagggcca aagttgaaag cacaagaaa tacaaaagca aggtttatga tgctgatgag 780
cagtctattc agattccaaa gactgggcca aaagacaaga tctctgtgca ggccagggat 840
cgctattaca actcatcctg gagtgagtgg tccacgcttt gcaga 885

```

<210>2

<211>295

<212>PRT

<213>人工序列 (Artificial Sequence)

<400>2

```

Gln Trp Lys Leu Arg Glu Asn Val Tyr Val Ile Glu Ser Glu Trp Asn
1           5           10           15
Asp Glu Thr Pro Ala Lys Lys Val Lys Leu Thr Cys Asp Thr Ser Asp
          20           25           30
Glu Ala Leu Pro Val Tyr Trp Lys Lys Gly Thr Glu Leu Lys Gly Thr
          35           40           45
Gly Lys Thr Leu Thr Thr Glu Val Lys Glu Phe Pro Asp Ala Gly Asn
          50           55           60

```


Tyr	Thr	Cys	Leu	Ser	Ala	Lys	Thr	His	Glu	Ile	Ile	Ser	Tyr	Ser	Phe	
65					70				75						80	
Phe	Leu	Ile	Thr	Lys	Val	Asp	Ser	Asn	Gly	Gln	Met	Ile	Arg	Ser	Ile	
				85					90						95	
Leu	Lys	Ser	Tyr	Lys	Glu	Pro	Ser	Lys	Thr	Phe	Leu	Lys	Cys	Glu	Ala	
				100					105					110		
Lys	Asn	Tyr	Ser	Gly	Ile	Phe	Thr	Cys	Ser	Trp	Met	Thr	Glu	Asn	Glu	
				115					120					125		
Ser	Pro	Ser	Val	Lys	Phe	Thr	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys	Gly	Ser	Gln	Gly	
				130					135					140		
Asp	Val	Thr	Cys	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Arg	Thr	Asp	Lys	Ser	Val	Thr	
145					150					155					160	
Glu	Tyr	Thr	Ala	Gln	Cys	Gln	Lys	Glu	Asn	Tyr	Cys	Pro	Phe	Ala	Glu	
				165					170						175	
Glu	His	Gln	Pro	Thr	Glu	Met	Phe	Leu	Glu	Val	Ile	Asp	Glu	Val	Glu	
				180					185					190		
Tyr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Ser	Ser	Phe	Phe	Ile	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Pro	
				195					200					205		
Asp	Pro	Pro	Gln	Cys	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Asn	Gly	Thr	Val	Thr	Trp	
				210					215					220		
Thr	Tyr	Pro	Lys	Thr	Trp	Ser	Thr	Pro	Lys	Ser	Tyr	Phe	Pro	Leu	Thr	
225					230					235					240	
Phe	Arg	Val	Lys	Val	Glu	Ser	Thr	Lys	Lys	Tyr	Lys	Ser	Lys	Val	Tyr	
				245					250						255	
Asp	Ala	Asp	Glu	Gln	Ser	Ile	Gln	Ile	Pro	Lys	Thr	Gly	Pro	Lys	Asp	
				260					265					270		
Lys	Ile	Ser	Val	Gln	Ala	Arg	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ser	Trp	Ser	
				275					280					285		
Glu	Trp	Ser	Thr	Leu	Cys	Arg										
290						295										

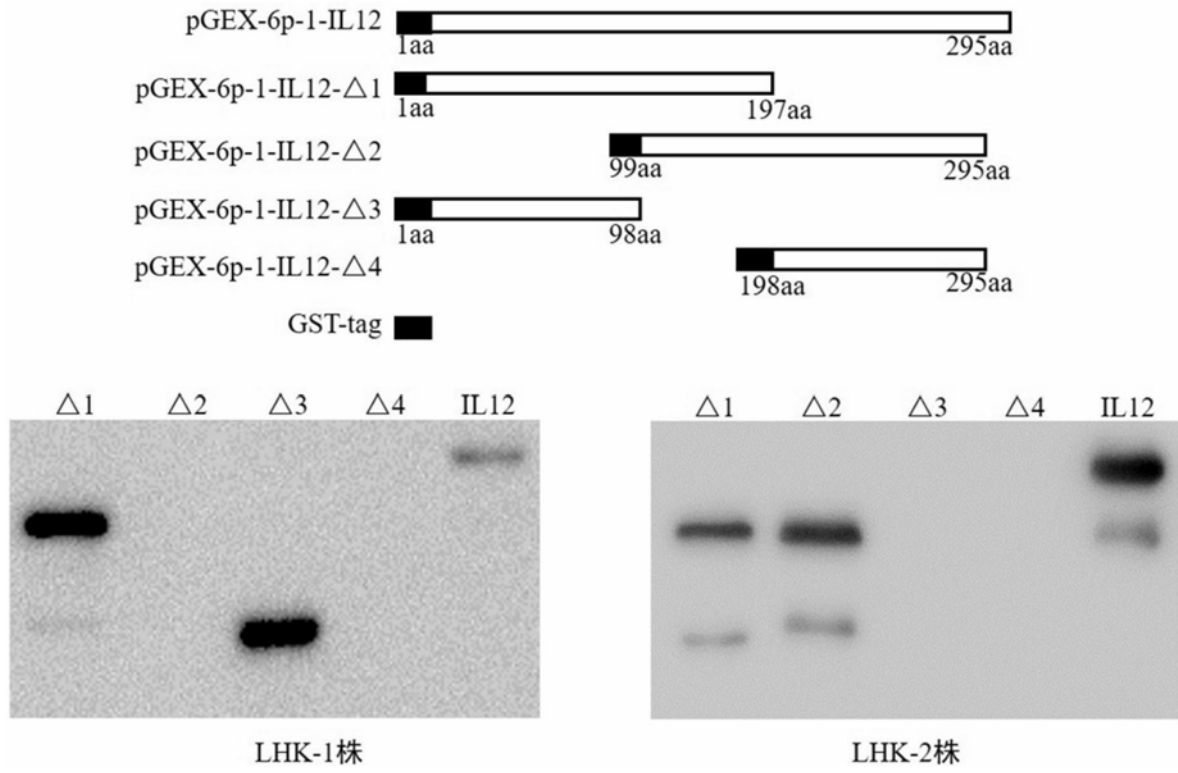


图1

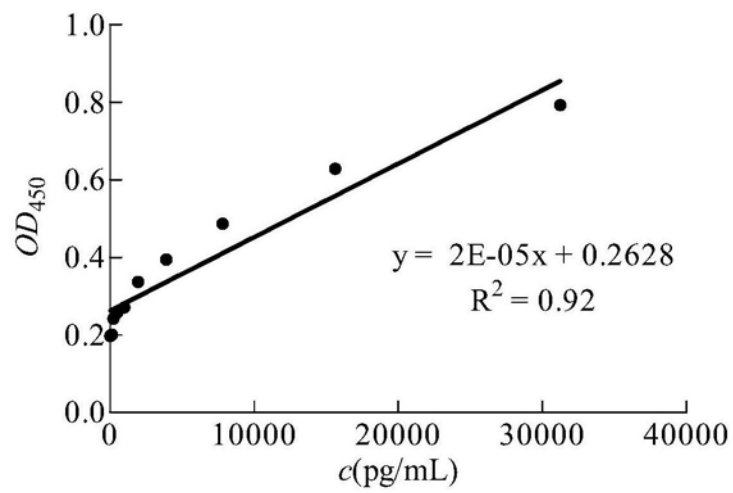


图2

专利名称(译)	一种检测鸡白细胞介素12含量的方法及其专用试剂盒		
公开(公告)号	CN109655619A	公开(公告)日	2019-04-19
申请号	CN201910062661.X	申请日	2019-01-23
[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 刘海坤 王永强 李晓齐 曹红		
发明人	郑世军 刘海坤 王永强 李晓齐 曹红		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/535		
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鸡白细胞介素12含量的方法及其专用试剂盒。本发明利用chIL-12单克隆抗体建立了针对chIL-12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-12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-12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-12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，而且有助于了解鸡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
KH_2PO_4	0.2g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9g