



四川農業大學
SICHUAN AGRICULTURAL UNIVERSITY

专业硕士学位论文

鸭干扰素 γ 双抗体夹心 ELISA 方法的建立
及鸭干扰素 γ 抗坦布苏病毒的功能研究

姓 名 卢雨馨

学 号 2021303102

指 导 教 师 黄娟 副教授

校 外 导 师 陈斌 研究员

四川省动物疫病预防控制中心

专业学位类别 兽医硕士

研 究 方 向 _____

培养单位名称 动物医学院

2024 年 6 月

分类号 S858.32
UDC 636.5

密 级 公开
学校代码 10626

四川农业大学
专业硕士学位论文

鸭干扰素 γ 双抗体夹心 ELISA 方法的建立
及鸭干扰素 γ 抗坦布苏病毒的功能研究

姓 名 卢雨馨

学 号 2021303102

指 导 教 师 黄娟 副教授

校 外 导 师 陈斌 研究员

四川省动物疫病预防控制中心

专业学位类别 兽医硕士

研 究 方 向 _____

培 养 单 位 动物医学院

2024 年 6 月

A Thesis Submitted to Sichuan Agricultural University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Professional Degree of
Master of Veterinary Medicine

**Development of DAS-ELISA for duck IFN γ
diagnosis and study on the effect of duck
IFN γ against duck Tembusu virus**

by

Yuxin Lu

Supervised by

Juan Huang, Associate professor

Majored in

Veterinary Medicine

June, 2024

College of Veterinary Medicine

Chengdu, Sichuan

本论文研究内容获得四川省产教融合示范项目

“饲料工业全产业链转型升级产教融合创新示范”资助

摘要

干扰素 γ (Interferon- γ , IFN γ) 主要由活化的 T 淋巴细胞和 NK 细胞产生, 是一种具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等多种生物学功能的糖蛋白。本研究通过制备抗鸭 IFN γ (duck interferon- γ , du_IFN γ) 多克隆抗体, 建立双抗体夹心 ELISA 法, 旨在为 du_IFN γ 的检测提供一种补充手段, 为水禽抗病毒研究提供技术支持。此外, 本研究通过真核表达 du_IFN γ 重组蛋白, 探究其在体外抗鸭坦布苏病毒 (duck Tembusu virus, DTMUV) 的效应, 为进一步解析 du_IFN γ 的抗病毒作用提供理论依据。研究主要内容及成果如下:

1. du_IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法的建立

成功构建了 du_IFN γ 原核表达菌 BL21 (pET32a-du_IFN γ), 以 IPTG 终浓度 1 mmol/L, 37°C 诱导 4 h, 在表达菌破碎上清中成功表达了重组 du_IFN γ 。后通过 Ni-NTA 纯化蛋白, 与水佐剂混合分别免疫小鼠和兔以获得血清, 经 WB 验证该血清可以特异性结合 du_IFN γ 真核表达蛋白, 即成功制备了鼠抗及兔抗 du_IFN γ 多克隆抗体。后以兔抗 du_IFN γ 为捕获抗体, 鼠抗 du_IFN γ 为检测抗体, 建立 du_IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法, 并对各个阶段进行优化以确定最佳反应条件。对该方法进行评价, 试验结果显示, 该方法特异性良好, 可检测原核及真核表达 du_IFN γ , 不与其他蛋白发生反应; 敏感度高, 可以检测 2 ng/100 μ L 的 du_IFN γ 蛋白; 重复性良好, 批间及批内变异系数均小于 10%; 并可用于监测疫苗免疫或病毒感染后鸭血清中 du_IFN γ 的表达量。成功建立了可用于 du_IFN γ 的检测方法。

2. du_IFN γ 在体外抑制 DTMUV 感染的作用

将获得的真核蛋白 du_IFN γ 经本试验建立的双抗体夹心 ELISA 方法进行浓度测定。采用 20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL 的 du_IFN γ 分别孵育 DEF 和 PBMC, CCK-8 试验显示 du_IFN γ 对 DEF 和 PBMC 均无细胞毒性。用 20 ng/mL du_IFN γ 分别预孵育 DEF 和 PBMC, 12 h 后接种 DTMUV (MOI=1), 结果显示, 在 DEF 中, du_IFN γ 孵育组的 DTMUV NS3 拷贝数和病毒蛋白表达量均显著低于无 du_IFN γ 处理组; DTMUV 病毒滴度较仅接毒组下降 10 倍以上。在 PBMC 中, du_IFN γ 孵

育组的 DTMUV NS3 和 E 的 mRNA 水平均显著低于无 du-IFN γ 处理组；病毒滴度在 24 h 后较仅接毒组下降 20 倍以上。以上结果表明，du-IFN γ 具有抑制 DTMUV 感染 DEF 和 PBMC 的作用，且这一作用与 du-IFN γ 呈剂量依赖性。进一步检测发现，du-IFN γ 不影响 DTMUV 吸附和进入 DEF，但抑制了 DTMUV 在 DEF 中的复制。

3. du-IFN γ 在体外加速清除 DTMUV 感染的作用

将 MOI=1 的 DTMUV 感染 DEF，6 h 后加入 20 ng/mL du-IFN γ ，12 h 后 RT-qPCR 结果显示，du-IFN γ 处理组的 E 和 NS3 的 mRNA 水平均显著低于无 du-IFN γ 处理组 ($p < 0.001$)。噬斑法检测结果显示，du-IFN γ 处理组的病毒滴度为 4.79 log₁₀ PFU/mL，而无 du-IFN γ 处理组的病毒滴度为 5.70 log₁₀ PFU/mL。将 MOI=1 的 DTMUV 感染 PBMC，6 h 后加入 20 ng/mL du-IFN γ ，24 h 后检测结果显示，du-IFN γ 处理组 E 和 NS3 的 mRNA 水平、病毒滴度均显著低于无 du-IFN γ 处理组 ($p < 0.001$)。表明 du-IFN γ 具有体外清除 DTMUV 感染的作用。

关键词：鸭干扰素 γ ；双抗体夹心 ELISA；抗病毒作用；清除感染

Abstract

Interferon- γ (IFN γ) is a glycoprotein mainly produced by activated T lymphocytes and NK cells, which has a variety of biological functions such as antiviral, anti-tumor, and immunoregulation. In this study, the anti-duck interferon- γ (du_IFN γ) polyclonal antibody was prepared and the du_IFN γ DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA) method was established, aiming to provide a supplementary method for the detection of du_IFN γ and provide technical support for the related research of poultry diseases. In addition, the recombinant protein of du_IFN γ was expressed in eukaryotic cells to explore its effect against duck Tembusu virus (DTMUV) in vitro, and the antiviral effect of du_IFN γ was further analyzed to provide a theoretical basis for the study of du_IFN γ . The main contents and results of the study are as follows:

1. Establishment of the DAS-ELISA method for du_IFN γ

The prokaryotic expression strain BL21 (pET32a-du_IFN γ) was successfully constructed, and the recombinant du_IFN γ was successfully expressed in the expression strain supernatant after induction with 1 mmol/L IPTG at 37°C for 4 h. After purification of the protein by Ni-NTA, the protein was mixed with water adjuvant to immunize mice and rabbits to obtain serum. WB verified that the serum could specifically bind to the eukaryotic expression protein of du_IFN γ , that is, the mouse anti- and rabbit anti-du_IFN γ polyclonal antibodies were successfully prepared. The DAS-ELISA method for du_IFN γ was established by using rabbit anti-du_IFN γ as the capture antibody and mouse anti-du_IFN γ as the detection antibody, and the various steps were optimized to determine the best reaction conditions. The method was evaluated, and the results showed that the method had good specificity, which could detect prokaryotic du_IFN γ and eukaryotic du_IFN γ , without reacting with other proteins; high sensitivity, the limit detection of du_IFN γ is 2 ng/100 μ L; good repeatability, the coefficient of variation between batches and within batches was less than 10%; and could be used to monitor the expression of du_IFN γ in duck serum after vaccination or virus infection. The method for detection of du_IFN γ was successfully established.

2. du_IFN γ has the effect of inhibiting DTMUV infection

The concentration of eukaryotic du_IFN γ was determined by DAS-ELISA method established in this experiment. DEF and PBMC were incubated with 20 ng/mL, 40 ng/mL and 80 ng/mL of du_IFN γ respectively. CCK-8 test showed that du_IFN γ had no cytotoxicity on both DEF and PBMC. DEF and PBMC were pre-incubated with 20 ng/mL of du_IFN γ for 12h respectively, and inoculated with DTMUV(MOI=1). The results showed that in DEF, the copy number of DTMUV NS3 and the expression of viral protein in the du_IFN γ incubation group were significantly lower than those in the non-du_IFN γ treatment group; the virus titer decreased more than 10 times compared with the non-du_IFN γ treatment group. In PBMC, the mRNA levels of DTMUV NS3 and E in the du_IFN γ incubation group were significantly lower than those in the non-du_IFN γ treatment group; the virus titer decreased more than 20 times compared with the non-du_IFN γ treatment group after 24h. The above results showed that du_IFN γ had the effect of preventing DTMUV infection in both DEF and PBMC, and this effect was dose-dependent. Further detection found that du_IFN γ did not affect the adsorption and entry of DTMUV into DEF, but inhibited the replication of DTMUV in DEF.

3. du_IFN γ has the effect of accelerating the clearance of DTMUV infection

DEF was infected with DTMUV(MOI=1), and 20 ng/mL of du_IFN γ was added 6 h later, RT-qPCR result at 12 h showed that the mRNA levels of E and NS3 in the du_IFN γ treatment group were significantly lower than those in the non-du_IFN γ treatment group($p < 0.001$); the plaque assay results showed that the virus titer in the du_IFN γ treatment group was 4.79 log₁₀ PFU/mL, while the virus titer in the non-du_IFN γ treatment group was 5.70 log₁₀ PFU/mL. PBMC was infected with DTMUV, and 20 ng/mL of du_IFN γ was added 6 h later, the results at 24 h showed that the mRNA levels of E and NS3 and the virus titer in the du_IFN γ treatment group were significantly lower than those in the non-du_IFN γ treatment group($p < 0.001$). It is suggested that du_IFN γ has the effect of accelerating the clearance of DTMUV infection in both DEF and PBMC.

Keywords: duck IFN γ ; DAS-ELISA; antiviral effect; accelerated clearance of infection

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
APC	antigen presenting cell	抗原提呈细胞
DAS-ELISA	double antibody sandwich ELISA	双抗体夹心 ELISA
DEF	duck embryo fibroblasts	鸭胚成纤维细胞
DTMUV	duck Tembusu virus	鸭坦布苏病毒
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
IFN	Interferon	干扰素
IFN γ	Interferon- γ	干扰素 γ
IPTG	isopropyl β -D-Thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
LB	lysogeny broth	肉膏蛋白胨培养基
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	外周血单个核细胞
PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PFU	plaque forming unit	空斑形成单位
RT-qPCR	real-time quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
WB	Western Blot	蛋白质印迹法

目 录

1 绪论.....	1
1.1 文献综述.....	1
1.1.1 干扰素的来源及分类.....	1
1.1.2 IFN γ 的产生机制	2
1.1.3 IFN γ 的分子结构和理化性质	2
1.1.4 IFN γ 的受体及作用机制	2
1.1.5 IFN γ 的抗病毒作用	3
1.1.6 IFN γ 的免疫调节作用	4
1.1.7 IFN γ 的抗肿瘤作用	4
1.1.8 IFN γ 的应用.....	4
1.1.9 IFN γ 的检测.....	5
1.2 立题依据.....	6
1.3 主要研究内容.....	6
1.4 技术路线.....	6
2 材料与方法.....	7
2.1 试验材料.....	7
2.1.1 毒株、菌株、质粒、细胞、血清.....	7
2.1.2 试验动物.....	7
2.1.3 主要抗体	7
2.1.4 主要试剂.....	7
2.1.5 主要仪器设备.....	8
2.1.6 本论文中所用引物信息.....	8
2.2 试验方法.....	9
2.2.1 du__IFN γ 原核表达质粒的构建	9
2.2.2 du__IFN γ 的原核表达	10
2.2.3 du__IFN γ 多克隆抗体的制备	11
2.2.4 du__IFN γ 多克隆抗体的鉴定	11
2.2.5 双抗体夹心 ELISA 方法的建立	11
2.2.6 双抗体夹心 ELISA 方法的评价	13
2.2.7 du__IFN γ 真核表达蛋白的获得	13
2.2.8 du__IFN γ 在 DEF 中的抗 DTMUV 作用.....	15
2.2.9 du__IFN γ 在 PBMC 中的抗 DTMUV 作用.....	18
3 结果与分析.....	20
3.1 pET32a-du__IFN γ 原核表达质粒的构建	20

3.2 du__IFN γ 原核表达菌的鉴定	20
3.3 SDS-PAGE 验证 du__IFN γ 的原核表达	21
3.4 du__IFN γ 原核表达蛋白的纯化	22
3.5 兔抗 du__IFN γ 多克隆抗体及鼠抗 du__IFN γ 多克隆抗体的鉴定	22
3.6 双抗体夹心 ELISA 方法的建立	23
3.6.1 酶标抗体工作浓度的确定	23
3.6.2 捕获抗体和检测抗体间最佳工作浓度的确定	24
3.6.3 最佳封闭时间的确定	24
3.6.4 最佳抗原孵育时间的确定	25
3.6.5 最佳检测抗体作用时间的确定	26
3.6.6 最佳酶标抗体作用时间的确定	27
3.7 双抗体夹心 ELISA 方法的评价	27
3.7.1 阴阳性临界值(cut-off 值)的确定	27
3.7.2 敏感性试验	28
3.7.3 特异性试验	29
3.7.4 重复性试验	29
3.7.5 du__IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法的应用	30
3.8 du__IFN γ 真核蛋白的获得	31
3.8.1 WB 验证 du__IFN γ 的真核表达	31
3.8.2 真核 du__IFN γ 的浓缩及浓度测定	31
3.9 du__IFN γ 在 DEF 中的抗 DTMUV 作用	32
3.9.1 DTMUV 感染后 DEF 中 du__IFN γ 的表达情况	32
3.9.2 du__IFN γ 对 DEF 活性的影响	33
3.9.3 du__IFN γ 在 DEF 中抗 DTMUV 感染的作用	34
3.9.4 du__IFN γ 在 DEF 中抗 DTMUV 感染呈剂量依赖性	36
3.9.5 du__IFN γ 对 DTMU 病毒粒子吸附 DEF 的影响	36
3.9.6 du__IFN γ 对 DTMU 病毒粒子进入 DEF 的影响	37
3.9.7 du__IFN γ 对 DTMUV 基因翻译、蛋白复制的影响	37
3.9.8 du__IFN γ 在 DEF 中对 DTMUV 感染的清除作用	38
3.9.9 不同浓度 du__IFN γ 在 DEF 中对 DTMUV 感染的清除作用	40
3.10 du__IFN γ 在 PBMC 中的抗 DTMUV 作用	40
3.10.1 DTMUV 感染后 PBMC 中 du__IFN γ 的表达情况	40
3.10.2 CCK-8 法检测 du__IFN γ 孵育对 PBMC 活性的影响	41
3.10.3 du__IFN γ 在 PBMC 中抗 DTMUV 感染的作用	42
3.10.4 du__IFN γ 在 PBMC 中对 DTMUV 感染的清除作用	43
4 讨论	45

4.1 du__IFN γ 的原核表达	45
4.2 du__IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法的建立	45
4.3 du__IFN γ 体外抗病毒试验	46
5 结论及主要创新点	48
5.1 结论	48
5.2 主要创新点	48
参考文献	49

1 绪论

1.1 文献综述

du-IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法的建立对于在禽类某些疾病的诊断和免疫监控中都有着重要的意义。IFN γ 是很多疾病的指示性细胞因子,如新生儿化脓性脑膜炎^[1]、鲟海分枝杆菌病^[2]等。以 IFN γ 体外释放试验为原理,已有大量研究建立了针对人及各种动物的 IFN γ 检测方法,该方法可以对结核病^[3]、布鲁氏菌^[4]等胞内寄生菌导致的疾病做出诊断。此外,作为重要的 Th1 型细胞因子,IFN γ 水平的高低可以反应机体的细胞免疫状态。目前现有的商业化试剂盒主要针对的是人、鼠等哺乳动物,禽类的 IFN γ 的检测试剂盒较少,且质量参差不齐,高昂的价格也不适用于大量样品的检测。

探究 du-IFN γ 的抗 DTMUV 活性可以对 du-IFN γ 的功能研究提供理论依据。目前已制备出了大量具有抗病毒活性的动物 IFN γ ,如有抑制水疱性口炎病毒复制作用的犬 IFN γ ^[5];可以有效抑制口蹄疫病毒、猪伪狂犬病毒增殖的猪 IFN γ ^[6];在体内外均有抗草鱼呼肠孤病毒的草鱼 IFN γ ^[7]等。在禽类 IFN γ 抗病毒的研究中,鸡 IFN γ 预处理的鸡胚成纤维细胞可以抑制人源性 H1N1 和禽源性 H9N2 流感病毒的复制^[8],鹅 IFN γ 可以有效抑制鸭瘟病毒在 DEF 中的增殖^[9];重组鸭 IFN γ 对鸭乙型肝炎病毒、鸭病毒性肠炎、禽流感病毒、马立克病毒都有着一定程度的抵抗作用^[10-13]。目前尚无关于鸭 IFN γ 对坦布苏病毒的抗病毒活性相关研究。

1.1.1 干扰素的来源及分类

1957 年,Isaacs 等人在进行流感病毒试验时意外发现,当鸡胚细胞受到灭活流感病毒感染后,这些细胞会生成一种特殊的可溶性蛋白,其具有抑制和干扰流感病毒感染的作用,故命名为干扰素 (Interferon, IFN)^[14]。根据其分子结构和特异性受体的差异,可以将干扰素分为三类。其中, I 型干扰素涵盖了多种亚型,主要包括 IFN α (主要由白细胞产生)、IFN β (主要由成纤维细胞和上皮细胞产生)、IFN ϵ 、IFN κ 、IFN ω 。IFN γ 是唯一的 II 型干扰素,又被称作免疫干扰素^[15]。III 型干扰素是一种新型干扰素,目前分类仅包括 IFN λ 。

1.1.2 IFN γ 的产生机制

IFN γ 是一种诱生蛋白，在正常情况下，IFN γ 的编码基因处于一种静止状态，其转录和翻译受到抑制。在诱导剂的作用下，可以产生一种特殊因子，通过灭活其基因抑制物从而激活 IFN γ 的转录和翻译，生成的 IFN γ 前体在内质网经过一系列的剪切和修饰后形成成熟的 IFN γ 被分泌到细胞外^[16]。有丝分裂原，如刀豆素 A^[17]、脂多糖；病原微生物及其代谢产物；及一些相关的细胞因子^[18]，如 IL-12、表皮细胞生长因子、血小板衍生因子等都可以作为诱导剂诱导细胞产生 IFN γ 。

IFN γ 主要来源于活化的 T 细胞和自然杀伤（Natural killer, NK）细胞。在适应性免疫反应中，IFN γ 来自接受抗原刺激的 CD4⁺Th1 细胞和 CD8⁺T 细胞^[19]，所产生的 IFN γ 可以反过来促进机体的免疫反应向 Th1 型转化，而对 Th2 型免疫反应起到抑制作用^[20]。此外，自然杀伤 T（natural killer T cell, NKT）细胞^[21]、部分抗原呈递细胞（Antigen-presenting cells, APC）如树突状细胞^[22]、单核-巨噬细胞^[23] 也可以产生 IFN γ ，其过程受到多种细胞因子的调控，其中，IL-12 和 IL-18 能够促进 IFN γ 的产生，而 IL-4 和 IL-10 起到抑制作用^[24]。

1.1.3 IFN γ 的分子结构和理化性质

天然的 IFN γ 蛋白以二聚体或四聚体的形式存在，du_IFN γ 的 CDs 区全长 495 bp，其中前 20 个氨基酸为信号肽，成熟蛋白 144 个氨基酸。其与鸡的 IFN γ 氨基酸序列同源性的为 80.6%，而与哺乳动物的氨基酸同源性在 50.5%左右^[25]。虽然同源性有所差异，但基本的空间结构是相似的，IFN γ 的 C 端螺旋上存在一个 60 度的转角，是与 I 型干扰素结构上的主要区别之一；且相比于 I 型干扰素，IFN γ 缺少一个二硫键^[26]。IFN γ 的分子量较小，对酸有敏感性，56°C 作用 30min 即可失活，易被乙醚、氯仿等有机溶剂破坏。

1.1.4 IFN γ 的受体及作用机制

IFN γ 发挥生物学活性依赖于与细胞表面的特异性受体结合，触发下游的信号通路，最终将信号传递至细胞核内，以调控相关基因的表达，而非直接对效应分子的基因进行调控^[27]。功能性的 IFN γ 受体（IFNGR）由两条配体结合的 IFNGR1

链和与相关信号机制偶联的两条信号传导的 IFNGR2 组成^[28]，包括胞外区、跨膜区和胞内区三个部分。IFN γ 受体广泛分布于各类细胞，其中 IFNGR2 链是 IFN γ 反应的限制因素^[29]，因为 IFNGR1 的表达通常是过量的，而 IFNGR2 的表达受控于细胞的状态，如高水平表达 IFNGR2 的 CD4⁺Th2 细胞在 IFN γ 的作用下会受到抑制而引发凋亡程序，而低水平表达 IFNGR1 的 Th1 细胞的增殖不会受到影响^[28]。

IFN γ 与 IFNGR 识别结合后，导致蛋白酪氨酸激酶（Janus kinase, JAK）的激活与磷酸化，从而触发位于质膜区域内酪氨酸的磷酸化，激活的酪氨酸又可以进一步活化胞浆内部的信号传导和转录激活因子（Signal transducer and activator of transcription, STAT）^[30]。磷酸化的 STATs 形成复合体进入细胞核内，与干扰素刺激反应元件（IFN-stimulated response element, ISRE）结合，引起一系列干扰素刺激基因（IFN-stimulated genes, ISGs）和效应分子的表达，以此发挥其功能。除 JAK-STAT1 这一经典途径外，被证实 IFN γ 还可以通过其它的传导途径发挥作用，如 Ras-MAPK^[31]。

1.1.5 IFN γ 的抗病毒作用

无论是在感染早期还是在感染后期，IFN γ 在机体抵御病毒感染过程中都发挥着不可或缺的作用，其抗病毒作用的发挥并非直接杀伤病毒，而是通过与靶细胞膜上的受体结合，触发靶细胞内相关基因的转录，进而产生数种具有酶活性的抗病毒蛋白（Antiviral protein, AVP），这些蛋白质可以从不同阶段抑制病毒的增殖，并且使细胞本身处于一种抗病毒的状态^[32]。因此，IFN γ 的抗病毒作用是间接的、非特异性的。

IFN γ 诱导的抗病毒蛋白主要有 PKR、MX、OAS、Viperin 等，可以通过靶向病毒复制的不同阶段以抑制病毒的复制。其中，PKR 在识别病毒后发生磷酸化激活翻译起始因子 eIF2 α ，其可以抑制病毒 mRNA 翻译，阻碍病毒元件的合成^[33]，并且能够调控细胞自身及病毒诱导的自噬来抵抗病毒感染^[34]；MX 可以阻止病毒核酸进入胞内，且抑制病毒 RNA 的转录；活性 OAS 可以激活 RNaseL 以抑制病毒蛋白的合成，干扰病毒的复制^[35]；Viperin 可以通过影响细胞膜从而抑制病毒的释放。

IFN γ 不仅直接激发靶细胞的抗病毒效应，还可以诱导其周边细胞中相关效应

分子的合成，以建立一个整体的、长期的抗病毒状态^[36, 37]。此外，IFN γ 还可以通过增强机体的免疫状态和诱导单核巨噬细胞产生 NO 等途径对病毒感染产生拮抗作用。

1.1.6 IFN γ 的免疫调节作用

IFN γ 具有很强的免疫调节活性。IFN γ 可以上调细胞表面 MHC I 类和 MHC II 类分子的表达^[38]，提高了细胞毒性 T 细胞识别外源肽链的能力和识别表位的多样性^[39]，从而提高细胞介导的免疫反应，提高免疫监视。其还可以通过增加抗原递呈相关酶的表达从而提高递呈的整体效率，如蛋白酶体 PA28^[40]。作为一种巨噬细胞激活因子，IFN γ 可以通过促进相关酶的合成，从而增强巨噬细胞对细菌和癌细胞的杀伤和吞噬作用^[41]。同时，IFN γ 还能通过增加巨噬细胞表面的细胞间黏附分子-1 (Intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表达使其在抗原提呈过程中与 T 细胞间的相互作用加强^[42]；通过诱导一氧化氮合成酶的产生，使巨噬细胞生成 NO，以清除细胞内的病原微生物^[43, 44]。IFN γ 可以调节 CD4⁺T 细胞的特异性亚型的分化，调整 Th1、Th2 细胞的平衡，并决定机体免疫应答的方向。

1.1.7 IFN γ 的抗肿瘤作用

IFN γ 抗肿瘤主要从以下几个方面发挥作用：通过干扰肿瘤细胞的分裂周期，使其的增殖受到抑制^[45]，从而减缓疾病的发展；通过抑制金属蛋白酶的活性来抑制肿瘤细胞的转移^[46]，减少癌细胞的产生；通过激活巨噬细胞以增强其对肿瘤细胞的杀伤作用；通过对免疫逃逸相关基因的调控^[47]，同时促进癌细胞表面表达特异性抗原，使其易被杀伤性 T 淋巴细胞识别^[48]。

1.1.8 IFN γ 的应用

在 IFN γ 免疫调控功能的研究中，Vandenbroeck^[49]等发现使用重组猪 IFN γ 可以提高猪对伪狂犬病毒灭活疫苗的免疫反应，并使其临床症状得到改善。用重组 du-IFN γ 作为 DHBV 弱毒疫苗的免疫佐剂，IFN γ 水平明显上调，肝脏中的总 DNA 和 cccDNA 水平均低于对照组^[50]。由于 IFN γ 具有抗病毒及抗肿瘤活性，早在 1994 年，美国食品药品监督管理局 (FDA) 就已批准重组 IFN γ 作为药物用于临床治疗^[51]，

如今它在人类医学的临床领域已被广泛使用，如风湿性关节炎、过敏性皮炎、肿瘤病等^[52-54]。在动物上，许金俊^[55]发现重组 IFN γ 针对实验性大肠埃希菌引起的乳房炎具有良好的治疗效果；IFN γ 可用于对猪流行性腹泻和猪繁殖障碍综合征^[56]；通过将 IFN γ 的表达载体鼻内接种于小鼠可以使其抵抗呼吸道合胞体病毒的感染^[57]；在禽类上也有基因工程 IFN 用于治疗鸭病毒性肝炎和鸭流感的早期防治^[58-60]。此外，IFN γ 还可用于治疗寄生虫病，如重组鸡 IFN γ 在鸡体内有明显抵抗球虫的作用^[61]。

1.1.9 IFN γ 的检测

IFN γ 被认为是一种关键的指示性因子，它参与了许多疾病的发生过程，包括病毒感染、癌症、炎症等。且机体内 IFN γ 水平的高低在很大程度上可以反应其细胞免疫状态，特异性 IFN γ 反应也可以作为机体针对某种特定外来抗原的免疫状态指标^[62]，因此，IFN γ 的检测对于某些疾病的诊断和免疫监控都有着重要的意义^[63-65]。目前对于 IFN γ 的检测主要有以下几个方法：通过实时荧光定量 RT-PCR 检测 IFN γ 的基因表达水平；通过 ELISA 检测试剂盒检测 IFN γ 的蛋白分泌水平；通过 ELISPOT 方法量化单个 IFN γ 分泌细胞；通过流式细胞术检测细胞内的 IFN γ 情况。姜勇^[66]通过建立间接双夹心 ELISA 方法用于检测猕猴的 IFN γ 水平，以用于猕猴结核病的检测；范蕾通过表达牛 IFN γ 受体，替代传统双夹心 ELISA 的包被抗体，建立了双抗体夹心 ELISA 方法检测牛 IFN γ ^[62]；白宇^[20]通过建立 ELISPOT 方法，可以检测马机体不同免疫状态下 IFN γ 的分泌水平。在禽类上，Zhou^[67]等人开发了一种实时荧光定量 PCR 的检测试剂盒，可以检测鹅 IFN γ 的 mRNA 水平；Krzysica^[68]等人利用市售的抗体建立了鸡 IFN γ 的捕获 ELISA 方法，用于鸡 IFN γ 的蛋白水平检测；Ruiz-Hernandez^[69]等人通过建立鸡 IFN γ 的 ELISPOT 方法，用于检测禽类产生 IFN γ 的细胞。

日常的实验室检测是通过 RT-qPCR 从转录水平上检测目的基因，而转录到翻译是一个复杂的过程，所以基因的表达量与蛋白的表达量不一定是正相关的。ELISA 方法可以对目的蛋白的分泌进行定量的检测，可以用于血液、细胞上清、组织样品中抗原的检测，能够更直接地反映机体或细胞产生该蛋白的情况。且 ELISA 检测的灵敏度高，适用于大量样品的检测，对实验设备及试剂的要求不高。

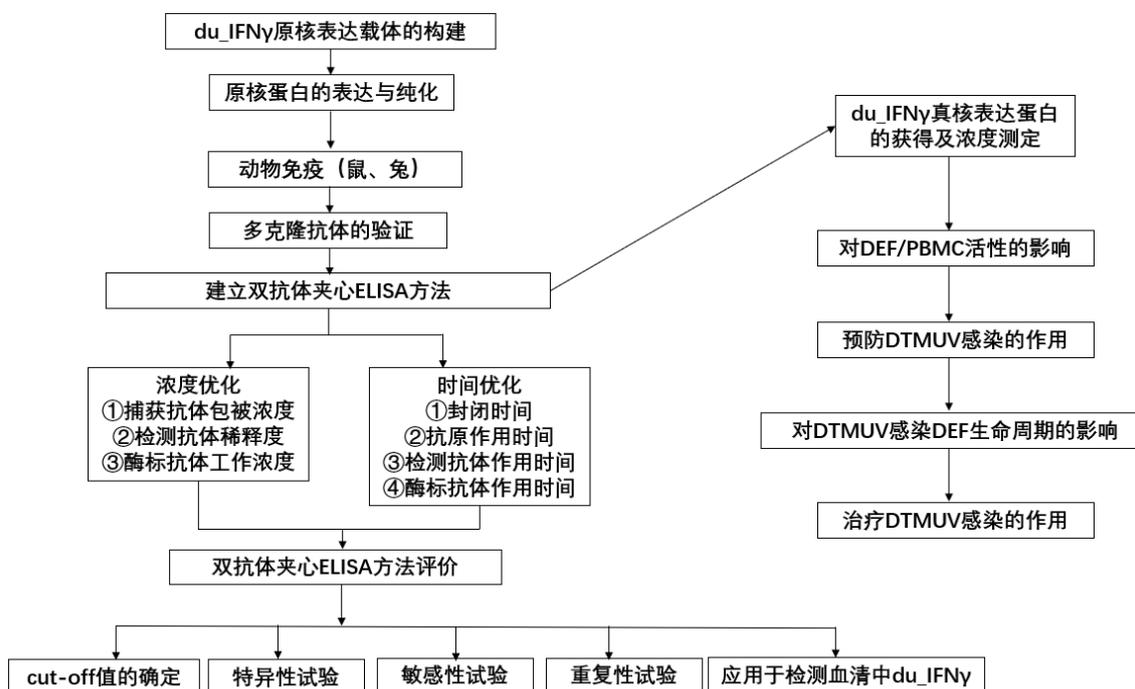
1.2 立题依据

IFN γ 是一种具有多种生物学功能的糖蛋白。作为宿主自身免疫机制的产物，具有调节细胞免疫功能，抵御外来病原的作用，所以干扰素介导的抗病毒反应的研究对疾病的防控具有重要意义；且 IFN γ 的检测对于禽类某些疾病的诊断和免疫监控也是不可或缺的一部分。

1.3 主要研究内容

本研究通过制备抗 du_IFN γ 多克隆抗体，建立双抗体夹心 ELISA 方法，旨在为检测 du_IFN γ 提供一种补充方法，为禽类疾病的诊治与防控提供技术支持。此外，本研究通过构建真核表达载体，表达 du_IFN γ 重组蛋白，利用所构建的双抗体夹心 ELISA 方法对其浓度进行测定，后探究其在体外的抗 DTMUV 的效应，进一步解析 du_IFN γ 的抗病毒作用。

1.4 技术路线



2 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 毒株、菌株、质粒、细胞、血清

DTMUV CQW 1 株；质粒 pET32a、pcDNA3.1 由四川农业大学禽病防治研究中心提供；大肠杆菌 TOP10、大肠杆菌 BL21、由四川农业大学禽病防治研究中心提供；BHK-21 细胞，293T 细胞由四川农业大学禽病防治研究中心提供；鸭瘟感染后 2d、6d、10d 的鸭血清、商用鸭肝炎疫苗免疫后 4d 的鸭血清，由四川农业大学禽病防治研究中心采集并保存。

2.1.2 试验动物

昆明小鼠、新西兰兔购于成都达硕实验动物有限公司。9 日龄鸭胚来自于四川农业大学雅安某鸭场。

2.1.3 主要抗体

- (1) 兔抗DTMUV E多克隆抗体、兔抗DTMUV NS1、兔抗DTMUV NS3多克隆抗体由本实验室制备并保存；
- (2) 鼠抗Flag IgG1单克隆抗体购自北京全式金生物技术有限公司；
- (3) HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L)、鼠抗 β -actin单克隆抗体购自Proteintech；
- (4) HRP 标记山羊抗鼠 IgG (H+L) 购自 Immunoway；

2.1.4 主要试剂

- (1) CCK-8试剂，BCA蛋白浓度检测试剂盒，鸭外周血单个核细胞分离液试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司；
- (2) TransIntroTM EL Transfection Reagent 购自北京全式金生物技术有限公司。
- (3) Clon Express II One Step Cloning Kit 、2×Rapid Taq Master Mix购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。
- (4) PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase, RNAiso Plus 、QuickCutTM *EcoR* I、QuickCutTM *Xho* I、反转录试剂PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit购

2.2 试验方法

2.2.1 du_IFN γ 原核表达质粒的构建

根据du_IFN γ 序列（Genbank: AF087134.1）CDs区（去信号肽，495 bp）及载体pET32a的序列设计扩增du_IFN γ 的引物。模板为课题组提供的连接了du_IFN γ 去信号肽CDs区的另一原核表达载体，其序列进行了针对大肠杆菌表达系统的密码子优化。用设计的pET32a-du_IFN γ 上游及下游引物（见表2-1）扩增带同源臂的du_IFN γ 片段，体系见表2-2，经验证后对目的片段进行液回收。用EcoRI和XhoI限制性内切酶对pET32a载体进行酶切线性化。根据Clon Express II One Step Cloning Kit（Vazyme）的说明书操作，将du_IFN γ 扩增片段与pET32a线性化载体进行同源重组。将重组产物转化至DH5 α ，用T7 F和pET32a-du_IFN γ R引物（见表2-1）进行菌落PCR鉴定，鉴定体系见表2-3，对鉴定阳性菌进行测序，测序正确单菌落命名为DH5 α （pET32a-du_IFN γ ）并保种。

表2-2 du_IFN γ 扩增体系和扩增程序

Table 2-2 PCR reaction system and amplification procedure of du_IFN γ

组分	用量 (μ L)	温度	时间	循环数
PrimeSTAR Max Premix	5	98°C	2min	1
上游引物	0.2	98°C	10s	} 35
下游引物	0.2	55°C	15s	
模板	0.2	72°C	15s	
ddH ₂ O	4.4	72°C	7min	1
		12°C	Forever	

表2-3 菌落PCR鉴定的反应体系和反应程序

Table 2-3 Reaction system and reaction procedure

组分	用量 (μ L)	温度	时间	循环数
2×Rapid Taq Master Mix	5	95°C	3min	1
上游引物	0.2	95°C	15s	} 35
下游引物	0.2	57°C	15s	
模板	0.2	72°C	15s	
ddH ₂ O	4.4	72°C	2min	1
		12°C	Forever	

2.2.2 du_IFN γ 的原核表达

2.2.2.1 BL21 (pET32a-du_IFN γ) 的构建

抽提上述阳性质粒，用钙离子转化法将 pET32a-du_IFN γ 质粒转化至大肠杆菌 BL21 中。次日挑取单菌落，用 T7 F 和 pET32a-du_IFN γ R 进行菌落 PCR 鉴定，将鉴定阳性菌命名为 BL21 (pET32a-du_IFN γ) 并进行保种。

2.2.2.2 du_IFN γ 的诱导表达

挑取 BL21 (pET32a-du_IFN γ) 于含 Amp (100 μ g/mL) 的液体 LB 种过夜培养得到种子液，将 1 mL 种子液加入至 9 mL 的液体 LB 中，在 37 $^{\circ}$ C，140 rpm 的摇床中培养至 OD_{600nm}=0.5-0.6，加入 IPTG 溶液至终浓度为 1 mmol/L，于 37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4 h。分别取诱导前和诱导后的菌液 1 mL 离心，后用 100 μ L 20 mM Tris-HCl (PH=8.0) 重悬，加入 25 μ L 5 \times Loading Buffer，分别标记为未诱导样和诱导后样；将剩余诱导后菌液离心，用 Tris-HCl 重悬菌体沉淀，低温条件下进行超声破碎（超声程序：55W，20s，间隔 20s，重复 10 次），后于 4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 10 min，取上清 100 μ L 加入 25 μ L 5 \times Loading Buffer，标记为超声上清样；用 1 mL 8mol/L 尿素重悬沉淀，冰上裂解 30 min 后于 4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 10 min，取上清 100 μ L 加入 25 μ L 5 \times Loading Buffer，标记为包涵体样。

2.2.2.3 SDS-PAGE 验证 du_IFN γ 的原核表达

配制 12% 分离胶与浓缩胶，将上述收集样本依次加入对应的泳道，SDS-PAGE 验证 du_IFN γ 原核蛋白的表达情况，程序为 80 V，30 min；120 V，60 min。电泳结束后剥离凝胶，放于考马斯亮蓝染液中浸泡过夜，次日进行脱色处理后使用凝胶成像仪进行图像采集并进行相关分析。

2.2.2.4 du_IFN γ 的纯化及验证

诱导方案见 2.2.2.2，将诱导表达后的菌液 150 mL，于 4 $^{\circ}$ C，6000 rpm 离心 10 min，收集沉淀，用少量 PBS 重悬后加入 20 mL 平衡缓冲液，加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL。低温下超声破碎（超声程序：55 W，20 s，间隔 20 s，重复至菌液澄清），后于 4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 10 min，收集上清并经八层纱布过滤。取 2 mL Ni 于纯化柱中，室温静置 10 min 以分离酒精和 Ni，打开出液孔，排出酒精，将过滤后的上清液反复上柱三次，后向纯化柱中加入 30 mL Binding buffer 洗涤纯化

柱，用 2 mL Elution buffer 反复洗脱三次后收集洗脱液，取 20 μ L 洗脱样加入 Loading Buffer。后通过 SDS-PAGE 验证 du-IFN γ 的纯化情况。

2.2.3 du-IFN γ 多克隆抗体的制备

按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Solarbio) 说明书步骤操作，测定纯化后的 du-IFN γ 蛋白浓度。抗原制备参照 QuickAntibody-Mouse5W 及 QuickAntibody-Mouse8W (Biodragon) 说明书。用生理盐水将抗原稀释到 2 倍最终浓度 (按鼠每针次 100 μ L 用量配制，抗原量为 50 μ g; 兔每针次 200 μ L 用量配制，抗原量为 100 μ g)，充分混匀佐剂，无菌条件下取出所需用量与抗原按体积比 1:1 迅速混匀，通过后腿小腿肌肉注射免疫小鼠或兔。小鼠在 21 d 按同样方式加强免疫 1 针，免疫后 7 d 进行眼球采血; 兔在 21 d、42 d 按同样方式加强免疫，免疫后 7d 进行颈静脉采血。将采集血液放置于 4 $^{\circ}$ C 静置过夜，后以 4500 rpm 离心 10 min，分离血清并分装，存于 -80 $^{\circ}$ C。

2.2.4 du-IFN γ 多克隆抗体的鉴定

配制 15%浓度的蛋白胶，将 pcDNA3.1-vector 转染上清样、pcDNA3.1-du-IFN γ -linker-flag 转染上清样加入孔中。SDS-PAGE 程序为 80 V, 30 min, 120 V, 60 min; 转膜程序为 220 mA, 60 min。后用 5%脱脂奶粉于常温封闭 PVDF 膜 2 h; 用 5%脱脂奶粉将所制备的鼠抗 du-IFN γ 多克隆抗体及兔抗 du-IFN γ 多克隆抗体以 1: 500 倍稀释，于 4 $^{\circ}$ C 静置孵育过夜; TBST 洗涤 3 次，10 min/次; 后使用 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 及 HRP 标记山羊抗兔 IgG，于室温孵育 2 h; TBST 洗涤 3 次，10 min/次; 进行显色处理。

2.2.5 双抗体夹心 ELISA 方法的建立

2.2.5.1 酶标抗体工作浓度的确定

将鼠抗 du-IFN γ 多克隆抗体用 PH=9.6 的碳酸缓冲液作 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 稀释并包被酶标板，100 μ L/孔，4 $^{\circ}$ C 过夜。使用 PBST 洗涤 5 次，每次 5 分钟。加入 5%脱脂牛奶封闭液，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。洗涤后，使用 PBS 将 HRP-羊抗鼠 IgG 作 1: 2000, 1: 4000, 1: 8000, 1: 16000 倍稀释，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBST 洗涤 5 次，5 min/次，加入 TMB 显色液，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C

避光显色20 min后，加入100 μL /孔 2M H_2SO_4 终止反应，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值，以确定检测抗体与酶标抗体二者最佳结合浓度。

2.2.5.2 捕获抗体和检测抗体间最佳配合工作浓度的确定

将兔抗du_IFN γ 多克隆抗体使用PH=9.6的碳酸缓冲液作1: 20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280倍比稀释包被酶标板，100 μL /孔，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。洗涤后，加入5%脱脂牛奶封闭液，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h。经洗涤，加入du_IFN γ 原核表达蛋白，100 μL /孔，每孔500 ng，37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h。洗涤后，加入使用PBS作1: 20, 1: 40, 1: 80, 1: 160, 1: 320, 1: 640及1: 1280倍比稀释好的鼠抗du_IFN γ 多克隆抗体，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h。洗涤后，加入1: 8000稀释的酶标抗体，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。洗涤后加入TMB显色液作用20 min后，加入2 mol/L H_2SO_4 终止反应后测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值，确定出捕获抗体和检测抗体的最佳配合工作浓度。

2.2.5.3 封闭时间的确定

用最佳稀释浓度的兔抗du_IFN γ 多克隆抗体包被酶标板，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，洗涤后分别用PBS稀释的5%兔阴性血清，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别作用0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h; 经洗涤后加入抗原，洗涤，加入最佳稀释浓度的鼠抗du_IFN γ 多克隆抗体，并洗涤，再加入1:8000稀释的羊抗鼠酶标抗体，洗涤后底物显色20 min再加入终止液终止该反应。以P/N值最大为最适封闭液和封闭时间。

2.2.5.4 抗原孵育时间的确定

用已确定的条件做双抗体夹心ELISA，原核表达蛋白du_IFN γ 作为抗原，孵育浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，分别选择孵育时间为0.5 h、1 h、1.5 h、2 h，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值，以P/N值最大为最佳抗原孵育时间。

2.2.5.5 检测抗体作用时间的确定

用已确定的条件做双抗体夹心ELISA，分别选择检测抗体作用时间为0.5 h、1 h、1.5 h、2 h，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值，以P/N值最大为最佳检测抗体作用时间。

2.2.5.6 酶标抗体作用时间的确定

用已确定的条件做双抗体夹心ELISA，分别选择酶标抗体作用时间为0.5 h、1 h、1.5 h、2 h，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值，以P/N值最大为最佳酶标抗体作用时间。

2.2.6 双抗体夹心 ELISA 方法的评价

2.2.6.1 阴阳性临界值 (cut-off值) 的确定

取30份阴性鸭血清样品, 用建立的双抗体夹心ELISA方法进行检测, 计算该方法的临界值= $\bar{X} \pm 3SD$ 。

2.2.6.2 敏感性试验

应用所建立的方法, 将原核表达du_IFN γ 做梯度稀释, 调整检测量为250 ng、125 ng、62.5 ng、31.3 ng、15.6 ng、7.8 ng、3.9 ng、2 ng、1 ng, 进行夹心ELISA测定, 测定OD_{450nm}值, 以确定该方法最低蛋白检测量。

2.2.6.3 特异性试验

应用建立的双抗体夹心ELISA方法, 检测原核表达du_IFN γ 、du_IL-1 β 、真核表达du_IFN γ 、真核表达du_IFN α 、du_IFN β 、du_IL6、du_IL4、DTMUV NS1、DTMUV NS3蛋白, 以评估该方法的特异性。

2.2.6.4 重复性试验

批内重复性试验: 用相同批次包被的3块酶标板检测3份阳性样品, 每份样本重复3孔, 按照已确定的反应条件进行夹心 ELISA 测定, 计算变异系数CV。批间重复性试验: 用不同批次的3块包被抗体分别在不同时间检测同3份阳性样品。按照已确定的反应条件进行夹心 ELISA 测定, 计算变异系数CV。其中, $CV = SD / \bar{X} \times 100\%$, SD为样本的标准差, \bar{X} 为样本平均值。评判标准: 批间变异系数应小于15%, 批内变异系数应小于10%^[44]。

2.2.6.5 du_IFN γ 双抗体夹心ELISA的应用

利用所建立的双抗体夹心ELISA方法, 分别对感染鸭瘟后2 d、6 d、10 d的鸭血清, 及商用鸭肝炎疫苗免疫后4 d的鸭血清中du_IFN γ 的水平进行检测。

2.2.7 du_IFN γ 真核表达蛋白的获得

2.2.7.1 du_IFN γ 真核表达载体的构建

根据 du_IFN γ 序列 (Genbank: AF087134.1) 及载体 pcDNA3.1-vector 的序列对目标表达载体进行了模拟克隆, 获得 pcDNA3.1-du_IFN γ -Linker-FLAG 的序列。为了让 du_IFN γ 在 DEF 中更好地表达, 我们对其序列进行了鸭源密码子优化 (武汉金开瑞生物工程有限公司), 获得菌种 Top10(pcDNA3.1-du_IFN γ -Linker-Flag)。

2.2.7.2 质粒转染

分别抽提 pcDNA3.1-du_{IFN} γ -Linker-FLAG 和 pcDNA3.1-vector 去内毒素质粒。将 DEF 细胞铺于单孔板中，置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中培养，待细胞密度约 90% 时，按 TransIntroTM EL Transfection Reagent（全式金）说明书将 pcDNA3.1-du_{IFN} γ -linker-flag 质粒和 pcDNA3.1-vector 质粒分别转染至 DEF 细胞。转染 48 h 后收取细胞培养上清和细胞沉淀样，WB 检测 du_{IFN} γ 的表达。

2.2.7.3 WB法检测du_{IFN} γ 的表达

配制 12%浓度的蛋白胶，依次将上述收集样本加入孔中，20 μ L/孔。采用 2.2.4 所述程序进行 WB 试验；5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜，常温下摇床孵育 3 h；后用 5%脱脂奶粉将鼠抗 FLAG 单克隆抗体作为一抗，于 4°C 静置孵育过夜；TBST 洗涤 3 次，10 min/次；用 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 作为二抗，室温下摇床孵育 1 h；TBST 洗涤 3 次，10 min/次；后进行显色分析。

2.2.7.4 真核表达du_{IFN} γ 的浓缩

质粒转染见 2.2.7.2。收集 DEF 转染 pcDNA3.1-du_{IFN} γ -Linker-FLAG 后 48 h 上清样。在 3 kDa 蛋白浓缩管中加入 2 mL DMED，3500 xg，离心 5 min，弃去上层管和下层管的液体。后加入转染后收上清样 4-5 mL，3500 xg，离心 30 min，得 1 mL 浓缩液体，后用 0.22 μ m 滤器将浓缩液进行过滤。收集各阶段样本，用 WB 法验证浓缩后液体中 du_{IFN} γ 的表达情况。

2.2.7.5 双抗体夹心ELISA法测定du_{IFN} γ 浓度

利用所建立的 du_{IFN} γ 双抗体夹心 ELISA 方法对浓缩后的 du_{IFN} γ 浓度进行测定。将原核表达 du_{IFN} γ 做梯度稀释，调整蛋白含量为 500 ng、250 ng、125 ng、62.5 ng、31.2 ng、15.6 ng、7.8 ng、3.9 ng、2 ng，利用已知浓度的测定结果建立对应的标准曲线，将试验组的 OD_{450nm} 值带入函数公式，求得浓缩后 du_{IFN} γ 的浓度。

2.2.8 du_{IFN} γ 在 DEF 中的抗 DTMUV 作用

2.2.8.1 DEF 的制备

取 9 日龄鸭胚，75%酒精将外壳消毒，取出胚体，去除头、翅、爪和内脏，PBS 冲洗 3 次。用剪刀将胚体剪碎后转移至离心管内，加入 1 mL PBS 与 1 mL 0.25% 胰蛋白酶常温消化 8 min。4500 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 20 mL DMEM 重悬细胞沉淀，后用 8 层灭菌纱布进行过滤。取适量细胞悬液与台盼蓝染液混合，加至血细胞计数板上，进行细胞计数。

2.2.8.2 RT-qPCR 法检测 DEF 感染 DTMUV 后的病毒拷贝数

制备 DEF，调整细胞密度为 2.5×10^6 个/mL，后以每孔 2 mL 铺于六孔板中，置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中培养 14 h，后在各试验孔中接种 DTMUV (MOI=1)，分别在感染后 12 h、24 h、36 h 收集细胞及上清，用于后续试验研究。

以 Trizol 试剂常规抽提各时间点所收细胞样。用 qDTMUV NS3 F 和 R 引物（见表 2-1），通过 RT-qPCR 法检测 DTMUV NS3 mRNA 表达水平，反应体系与反应程序见表 2-4。通过实验室建立的 DTMUV NS3 绝对定量方法检测样本中病毒拷贝数。

表2-4 RT-qPCR检测DTMUV-NS3的反应体系和反应程序

Table 2-4 RT-qPCR reaction system and reaction procedure of DTMUV-NS3

组分	用量	温度	时间	
qPCR SYBR Green Master Mix	5 μ L	95°C	30s	
qDTMUV-NS3 F	0.2 μ L	95°C	5s	} 40 次
qDTMUV-NS3 R	0.2 μ L	55.9°C	30s	
细胞样 cDNA	1.0 μ L			
ddH ₂ O	3.6 μ L			

2.2.8.3 WB 验证 DEF 感染 DTMUV 后病毒蛋白的表达

细胞处理方法见 2.2.8.2。配制 12%浓度的蛋白胶，将 12 h、24 h、36 h 收集的细胞样加入孔中，20 μ L/孔。电泳程序为 80 V，30 min；120 V，60 min；转膜程序为 220 mA，80 min；用 5%脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 2 h；后分别用鼠抗 β -Actin、兔抗 DTMUV NS1、兔抗 DTMUV NS3 作为一抗，于 4°C 静置孵育过夜；TBST 洗涤 PVDF 膜 5 次，5 min/次；后分别用 HRP 标记山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠

IgG, 于室温孵育 2 h; TBST 洗涤 PVDF 膜 5 次, 5 min/次; 进行显色分析。

2.2.8.4 噬斑试验检测DEF感染DTMUV后的病毒滴度

细胞处理方法见 2.2.8.2。将 BHK-21 细胞调整密度为 3×10^5 个/mL, 后铺至 12 孔板中, 1 mL/孔。于 37°C, 5% CO₂ 培养箱过夜培养。待细胞密度达 90%, 将各时间点上清样做梯度稀释后加入细胞中, 于 37°C, 5% CO₂ 培养箱孵育 2 h, 后弃去上清液, 用 PBS 润洗细胞培养板 3 遍后加入 DMEM 稀释的 1.5% 甲基纤维素, 含 2% NBS。将细胞板置于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 待细胞板出现明显斑块时对其进行染色处理: 弃培养液, PBS 润洗 2 次, 加入 4% 多聚甲醛固定 20 min。后再加入 1% 结晶紫染色 5 min, PBS 洗涤 3 次。观察并记录产生噬斑数。

2.2.8.5 RT-qPCR法检测du_IFN γ 相对表达量

细胞处理方法见 2.2.8.2。以 Trizol 试剂常规抽提各时间点所收细胞样。用 q du_IFN γ F 和 q du_IFN γ R 引物 (见表 2-1), 通过 RT-qPCR 法检测 du_IFN γ mRNA 的相对表达水平, 反应体系于反应程序见表 2-5。

表2-5 RT-qPCR检测du_IFN γ 的反应体系和反应程序

Table 2-5 RT-qPCR reaction system and reaction procedure of du_IFN γ

组分	用量	温度	时间	
qPCR SYBR Green Master Mix	5 μ L	95°C	30s	
q du_IFN γ F	0.2 μ L	95°C	5s	} 40 次
q du_IFN γ R	0.2 μ L	60°C	30s	
细胞样 cDNA	1.0 μ L			
ddH ₂ O	3.6 μ L			

2.2.8.6 CCK-8法检测du_IFN γ 孵育对DEF活性的影响

制备 DEF 细胞, 将细胞悬液加至 96 孔板中, 100 μ L/孔, 置于 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养过夜。后分别在各试验孔中加入 pcDNA3.1-vector 真核表达上清、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL 的真核 du_IFN γ , 同时设置对照组。待孵育 12 h 后, 向每孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液, 将培养板放置培养箱孵育 4 h, 后用酶标仪测定各孔的 OD_{450nm} 值。

2.2.8.7 RT-qPCR检测du_IFN γ 对DTMUV病毒拷贝数的影响

按 2.2.8.2 所述方法制备 DEF 及铺板。后在 du_IFN γ 孵育试验孔中加 20 ng/mL 的真核表达 du_IFN γ 上清；在空载组对照加入 200 μ L， pcDNA3.1-vector 的真核表达上清。待孵育 12 h 后弃培养上清，用 PBS 润洗培养板 3 次，在各试验孔中接种 DTMUV (MOI=1)，分别在感染后 12 h、24 h、36 h 收集细胞及上清，用于后续试验研究。病毒拷贝数的检测见 2.2.8.2。

2.2.8.8 WB验证du_IFN γ 对DTMUV病毒蛋白表达的影响

具体细胞处理见 2.2.8.7。收集各组 DTMUV 感染后 12 h、24 h、36 h 的细胞样，以鼠抗 β -Actin、兔抗 DTMUV NS1、兔抗 DTMUV NS3 分别作为一抗，按 2.2.8.3 所述方法进行 WB 检测。

2.2.8.9 噬斑试验检测du_IFN γ 对DTMUV病毒滴度的影响

具体细胞处理见 2.2.8.7。收集各组 DTMUV 感染后 12 h、24 h、36 h 的细胞培养上清，按 2.2.8.4 所述方法检测病毒滴度。

2.2.8.10 噬斑试验检测不同浓度du_IFN γ 对DTMUV病毒滴度的影响

按 2.2.8.2 所述方法制备 DEF 及铺板。后在各组中分别加入 20 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、2.5 ng/mL 的真核 du_IFN γ ，各 200 μ L。待孵育 12 h 后弃培养上清，用 PBS 润洗培养板 3 次，在各试验孔中接种 DTMUV (MOI=1)，在感染后 24 h 收集培养上清，按 2.2.8.4 所述方法检测病毒滴度。

2.2.8.11 RT-qPCR检测du_IFN γ 对DTMU病毒粒子吸附DEF的影响

按 2.2.8.7 所述方法处理细胞，在接种 DTMUV (MOI=1) 后放置到 4 $^{\circ}$ C 摇床中，1 h，后弃去上清，用 PBS 清洗 4 次除去未吸附的病毒粒子，立即收取细胞样品，用于抽 RNA。后利用相对定量 qPCR 计算 DTMUV E 基因表达情况，即为吸附的病毒粒子水平。

2.2.8.12 RT-qPCR检测du_IFN γ 对DTMU病毒粒子进入DEF的影响

按 2.2.8.7 所述方法处理细胞，在接种 DTMUV (MOI=1) 后，放置到 37 $^{\circ}$ C 摇床中，1 h，后弃去上清，用 0.025% trypsin-PBS 清洗 4 次除去吸附但未进入的病毒粒子，37 $^{\circ}$ C 继续培养 1 h，然后收取细胞样品，用于抽 RNA。后利用相对定量 qPCR 计算 DTMUV E 基因表达情况，即为进入的病毒粒子水平。

2.2.8.13 RT-qPCR 检测 du-IFN γ 对 DTMUV E、NS3 蛋白在 DEF 内复制翻译的影响

按 2.2.8.7 所述方法处理细胞，在各试验孔中接种 DTMUV (MOI=1)，后于 37°C 孵育 2 h，期间摇晃，后弃上清，用 PBS 清洗 3 次，加入维持液，在对应试验孔中加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 放线菌酮 (Cycloheximide, CHX)。在感染后 12 h、24 h 收集细胞样。按 2.2.8.2 所述方法对 DTMUV NS3、E 基因的表达情况进行检测；2.2.8.3 所述方法对感染后 24 h 病毒蛋白进行 WB 检测。

2.2.8.14 du-IFN γ 在 DEF 中对 DTMUV 感染的清除作用

按 2.2.8.2 所述方法制备 DEF 及铺板。在各试验孔中接种 DTMUV (MOI=1)，放置到 37°C 摇床中，1 h，弃去上清，用 0.025% trypsin-PBS 清洗 4 次除去吸附但未进入的病毒粒子，37°C 继续培养 4 h，后在 du-IFN γ 孵育试验孔中加入 20 ng/mL 的真核 du-IFN γ ，37°C 培养箱培养 12 h，后收集细胞及上清。分别按照 2.2.8.2 和 2.2.8.4 的方法对 DTMUV NS3、E 基因的表达情况进行检测及对上清中病毒滴度进行检测。

2.2.8.15 不同浓度的 du-IFN γ 在 DEF 中对 DTMUV 感染的清除作用

按 2.2.8.14 所述方法处理细胞。在 du-IFN γ 孵育试验孔中加入 10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL 的真核 du-IFN γ ，各 200 μL 。37°C 培养箱培养 12 h，后收集各组培养上清。按 2.2.8.4 的方法对上清中病毒滴度进行检测。

2.2.9 du-IFN γ 在 PBMC 中的抗 DTMUV 作用

2.2.9.1 RT-qPCR 检测 PBMC 感染 DTMUV 后的病毒拷贝数

取健康鸭外周血，按鸭外周血单个核细胞分离液试剂盒（北京索莱宝科技有限公司）说明书分离鸭 PBMC，后调整细胞密度为 1×10^7 个/mL，后以每孔 2 mL 铺于六孔板中，在各试验孔中接种 DTMUV (MOI=1)，分别在感染后 12 h、24 h、36 h 收集细胞样，按 2.2.8.2 所述方法对病毒拷贝数进行测定。

2.2.9.2 噬斑试验检测 PBMC 感染 DTMUV 后的病毒滴度

按 2.2.9.1 所述方法处理细胞。收集感染后 12 h、24 h、36 h 的细胞培养上清，按 2.2.8.4 所述方法对上清中病毒滴度进行测定。

2.2.9.3 RT-qPCR 检测 PBMC 感染 DTMUV 后 du_IFN γ 的表达情况

按 2.2.9.1 所述方法处理细胞。以 Trizol 试剂常规抽提各时间点所收细胞样，按 2.2.8.5 所述反应体系与程序检测 du_IFN γ 的表达情况。

2.2.9.4 双抗体夹心 ELISA 方法检测培养上清中 du_IFN γ 的分泌量

按 2.2.9.1 所述方法处理细胞，利用本试验所建立的双抗体夹心 ELISA 方法检测各时间点的细胞培养上清中 du_IFN γ 的分泌水平。

2.2.9.5 CCK-8 法检测 du_IFN γ 孵育对 PBMC 细胞活性的影响

分离 PBMC，将细胞悬液加至 96 孔板中，100 μ L/孔，分别在各试验孔中加入 pcDNA3.1-vector 真核表达上清、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL 的真核 du_IFN γ ，同时设置对照组。待孵育 12 h 后，向每孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液，将培养板放置培养箱孵育 4 h，酶标仪测定各孔的 OD_{450nm} 值。

2.2.9.6 RT-qPCR 检测 du_IFN γ 对 DTMUV NS3、E 基因表达水平的影响

按 2.2.9.1 所述方法制备细胞及铺板。在 du_IFN γ 孵育试验孔中加入 20 ng/mL 的真核 du_IFN γ ，同时设置接毒对照组。待孵育 12h 后弃培养上清，用 PBS 润洗培养板 3 次，在各试验孔中接种 DTMUV (MOI=1)，分别在感染后 12 h、24 h、36 h 收集细胞样，病毒拷贝数的检测见 2.2.8.2。

2.2.9.7 噬斑试验检测 du_IFN γ 对 DTMUV 病毒滴度的影响

具体细胞处理见 2.2.9.5。分别在感染后 12 h、24 h、36 h 收集培养上清，按 2.2.8.4 的方法检测病毒滴度。

2.2.9.8 du_IFN γ 在 PBMC 中对 DTMUV 感染的清除作用

按 2.2.9.1 所述方法制备细胞及铺板。在各试验孔中接种 DTMUV (MOI=1)，37 $^{\circ}$ C 培养 6 h，然后在 du_IFN γ 孵育试验孔中加入 20 ng/mL 的真核 du_IFN γ ，37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h，后收集细胞及上清。分别按照 2.2.8.2 和 2.2.8.4 的方法对 DTMUV NS3、E 基因的表达情况进行检测及对上清中病毒滴度进行检测。

3 结果与分析

3.1 pET32a-du_IFN γ 原核表达质粒的构建

采用 pET32a-du_IFN γ F 和 R 引物（见表 2-1）经过 PCR 扩增后，通过凝胶电泳，在 500 bp 处出现特异性条带（见图 3-1a），该条带大小符合预期值 480 bp。回收片段后将其连接至 pET32a，并转化至 DH5 α 菌种中，挑取单个菌落用 T7 F 和 pET32a-du_IFN γ R 引物（见表 2-1）进行菌落 PCR 鉴定。凝胶电泳结果见图 3-1b，1000-2000 bp 之间出现单一条带，符合理论值 1117 bp。将 PCR 鉴定为阳性的菌送至擎科生物科技有限公司进行 DNA 测序，测序结果与理论序列一致，即 pET32a-du_IFN γ 重组质粒构建成功。

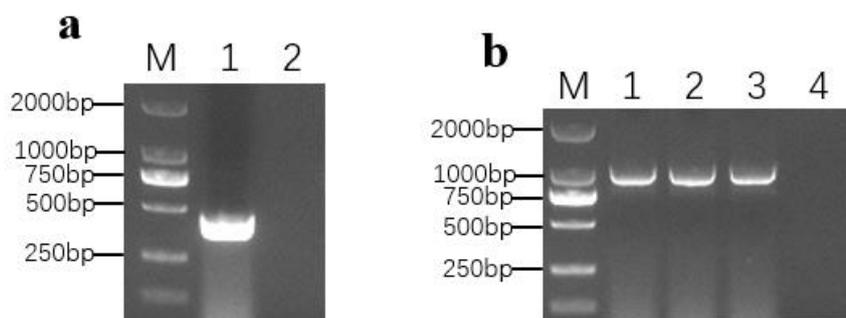


图 3-1 pET32a-du_IFN γ 重组质粒核酸凝胶电泳图

Fig 3-1 Construction result of pET32a-du_IFN γ recombinant plasmid

注：（a）du_IFN γ 基因扩增凝胶电泳，M: DL2000；1: du_IFN γ ；2: 阴性对照；（b）DH5 α （pET32a-du_IFN γ ）菌落 PCR 鉴定结果，M: DL2000；1-3: DH5 α （pET32a-du_IFN γ ）单菌落；4: 阴性对照

3.2 du_IFN γ 原核表达菌的鉴定

抽提 pET32a-du_IFN γ 质粒，将其转化至 BL21 大肠杆菌感受态，过夜培养后挑取生长单菌落，用 T7 F 和 pET32a-du_IFN γ R 引物（见表 2-1）进行菌落 PCR 鉴定。由图 3-2 可知，1000-2000 bp 之间存在单一条带，符合理论值（1117 bp），表明 BL21（pET32a-du_IFN γ ）构建成功。

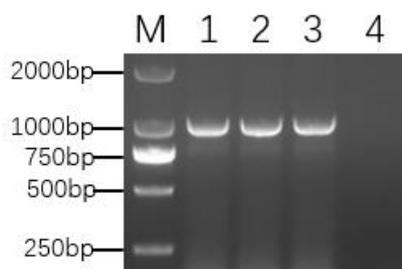


图 3-2 菌落PCR鉴定BL21 (pET32a-du_IFN γ) 核酸凝胶电泳图

Fig 3-2 Identification result of BL21(pET32a-du_IFN γ)

注：M：DL2000；1~3：BL21 (pET32a-du_IFN γ)；2：阴性对照

3.3 SDS-PAGE 验证 du_IFN γ 的原核表达

挑取 BL21 (pET32a-du_IFN γ) 单菌落于 100 mL 含有 Amp 的 LB 培养液培养至 OD_{600nm} 达 0.5-0.6，加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG，于 37°C 振荡培养 4h。后通过 SDS-PAGE 检验 du_IFN γ 原核蛋白的表达，结果显示，与未诱导样相比，BL21 (pET32a-du_IFN γ) 经诱导后在 35 kDa 处出现明显条带（见图 3-3），大小与 du_IFN γ 原核蛋白理论值（35.6 kDa）相符，且 du_IFN γ 蛋白大量表达于上清，表明 du_IFN γ 原核蛋白表达成功。

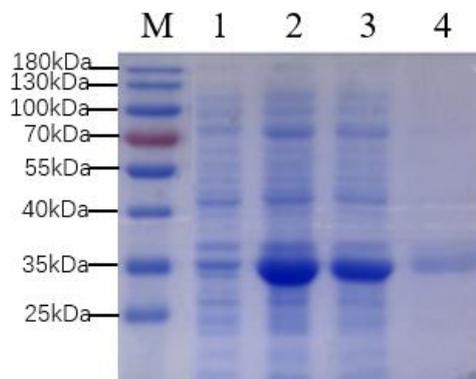


图 3-3 SDS-PAGE检测du_IFN γ 原核蛋白表达

Fig 3-3 SDS-PAGE analysis of du_IFN γ prokaryotic protein

注：M：蛋白 marker；1：BL21 (pET32a-du_IFN γ) 未诱导；2：BL21 (pET32a-du_IFN γ) 诱导后；3：BL21 (pET32a-du_IFN γ) 超声后上清；4：BL21 (pET32a-du_IFN γ) 诱导包涵体。

3.4 du_IFN γ 原核表达蛋白的纯化

按照 2.2.2.4 步骤大量诱导 du_IFN γ 蛋白，表达后使用 Ni-NTA 进行纯化，收集洗脱后蛋白样，后通过 SDS-PAGE 分析蛋白纯化情况。由结果可见，经 IPTG 诱导后，35 kDa 处出现明显条带，且经 Ni-NTA 纯化处理后 du_IFN γ 蛋白条带较为单一（图 3-4）。

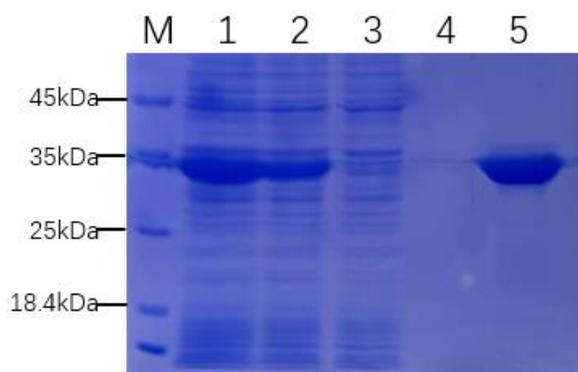


图 3-4 SDS-PAGE 检测 du_IFN γ 原核蛋白的纯化

Fig 3-4 SDS-PAGE analysis of purified du_IFN γ prokaryotic protein

注：M：蛋白 marker；1：BL21（pET32a-du_IFN γ ）诱导表达全菌；2：BL21（pET32a-du_IFN γ ）超声上清；3：流穿样；4：洗涤样；5：洗脱样

3.5 兔抗 du_IFN γ 多克隆抗体及鼠抗 du_IFN γ 多克隆抗体的鉴定

用 du_IFN γ 原核蛋白分别免疫兔和小鼠三次后，采血收集血清，即为抗 du_IFN γ 多克隆抗体。WB 检测发现，不管是使用鼠抗 du_IFN γ 多克隆抗体，还是使用兔抗 du_IFN γ 多克隆抗体，均可以在 15-25 kDa 处检测到与真核蛋白理论值（20.3kDa）相符的特异性条带（见图 3-5）。结果提示，所制备的鼠抗及兔抗 du_IFN γ 多克隆抗体可特异性识别 du_IFN γ 真核蛋白，表明成功制备鼠抗及兔抗 du_IFN γ 多克隆抗体。

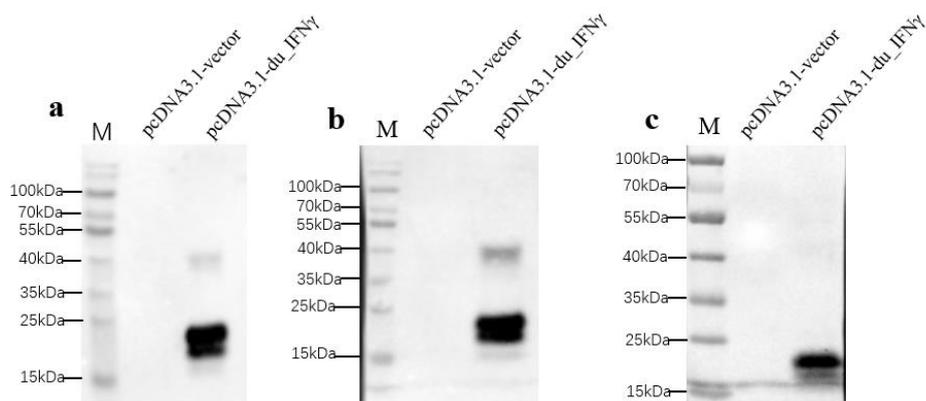


图 3-5 WB验证鼠抗du_IFN γ 和兔抗du_IFN γ 多克隆抗体

Fig 3-5 Western blot analysis of mouse anti-du_IFN γ polyclonal antibody and rabbit anti-du_IFN γ polyclonal antibody

注：(a) 使用鼠抗 FLAG 单克隆抗体作为一抗 (b) 使用鼠抗 du_IFN γ 多克隆抗体作为一抗；(c) 使用兔抗 du_IFN γ 多克隆抗体作为一抗

3.6 双抗体夹心 ELISA 方法的建立

3.6.1 酶标抗体工作浓度的确定

利用方阵滴定法确定检测抗体（鼠抗 du_IFN γ 多克隆抗体）和酶标抗体（HRP-山羊抗鼠 IgG）间的最佳工作浓度，结果见表 3-1。从结果可以看出，随着酶标抗体稀释度的加大，OD_{450nm} 值逐渐减小，当稀释度为 1: 8000 时，OD_{450nm} 值仍大于 1 且阴性对照值小于 0.1。结果表明，当 HRP-山羊抗鼠稀释度为 1: 8000 可作为适宜的工作浓度用于后续的试验。

表 3-1 酶标抗体工作浓度的确定

Table 3-1 Determination of the concentration of enzyme-labeled antibody

鼠抗 du_IFN γ 多克隆抗体 包被稀释度	HRP-山羊抗鼠 IgG 工作浓度			
	1: 2000	1: 4000	1: 8000	1: 16000
1: 20	1.842	1.471	1.172	0.733
1: 40	1.686	1.325	1.087	0.681
1: 80	1.946	1.405	1.141	0.721
1: 160	2.049	1.409	1.172	0.753
1: 320	1.893	1.421	1.178	0.756
1: 640	1.762	1.376	1.156	0.736
1: 1280	2.032	1.467	1.218	0.764
阴性对照	0.122	0.105	0.091	0.086

3.6.2 捕获抗体和检测抗体间最佳工作浓度的确定

将兔抗du_IFN γ 多克隆抗体作为捕获抗体，鼠抗du_IFN γ 多克隆抗体作为检测抗体，分别做不同的稀释度，用常规双抗体夹心ELISA步骤操作。结果表明，当捕获抗体稀释比为1: 80、检测抗体稀释比为1: 160时，阳性与阴性间的P/N值最大（P/N=6.956）（表3-2）。因此兔抗du_IFN γ 多克隆抗体和鼠抗du_IFN γ 多克隆抗体的稀释比分别为1: 80和1: 160时为最佳配合工作浓度。

表3-2 捕获抗体和检测抗体间最佳工作浓度的确定

Table 3-2 Optimum working concentration of capturing antibody and detecting antibody

兔抗 du_IFN γ 多克隆抗体 稀释倍数		鼠抗 du_IFN γ 多克隆抗体稀释倍数		
		1: 80	1: 160	1: 320
1: 20	阳性 OD 值	0.797	0.798	0.797
	阴性 OD 值	0.137	0.138	0.143
	P/N	5.818	5.783	5.573
1: 40	阳性 OD 值	0.989	0.940	0.916
	阴性 OD 值	0.175	0.156	0.179
	P/N	5.651	6.026	5.117
1: 80	阳性 OD 值	1.014	1.028	0.899
	阴性 OD 值	0.169	0.148	0.170
	P/N	6.000	6.956	5.288
1: 160	阳性 OD 值	1.071	0.979	0.942
	阴性 OD 值	0.175	0.155	0.157
	P/N	6.120	6.316	6.000

3.6.3 最佳封闭时间的确定

用上述已经确定的各抗体稀释比作为条件，选择封闭时间为 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h，按照双抗体夹心 ELISA 方法进行试验，结果表明，当封闭时间为 0.5 h 时，其 P/N 值最大，因此确定最佳封闭时间为 0.5h（表 3-3、图 3-6）。

表3-3 最佳封闭时间的确定

Table 3-3 Determination of optimal reaction time of blocking buffer

封闭时间	阳性 OD 值	阴性 OD 值	P/N
0.5 h	1.357	0.150	9.047
1 h	1.255	0.171	7.339
1.5 h	1.256	0.170	7.388
2 h	1.202	0.149	8.067

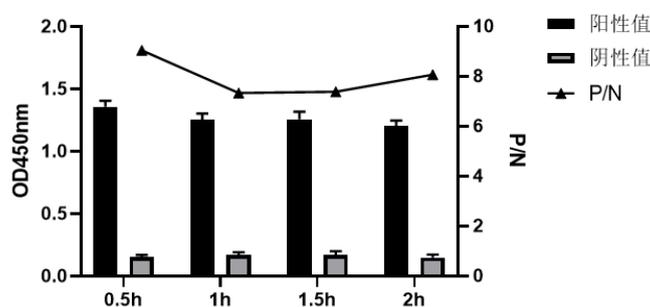


图 3-6 最佳封闭时间的确定

Fig 3-6 Determination of optimal reaction time of blocking buffer

3.6.4 最佳抗原孵育时间的确定

用已确定的条件做双抗体夹心 ELISA，du_IFN γ 原核表达蛋白作为抗原，孵育浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。分别选择孵育时间为 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h，以确定最佳抗原孵育时间。结果表明，当抗原孵育时间为 1.5 h 时，其 P/N 值最高，因此确定最佳抗原孵育时间为 1.5h（表 3-4、图 3-7）。

表3-4 最佳抗原孵育时间的确定

Table 3-4 Determination of optimum incubation time of antigen

抗原孵育时间	阳性 OD 值	阴性 OD 值	P/N
0.5 h	1.042	0.205	5.083
1 h	1.049	0.174	6.029
1.5 h	1.105	0.166	6.657
2 h	0.958	0.178	5.382

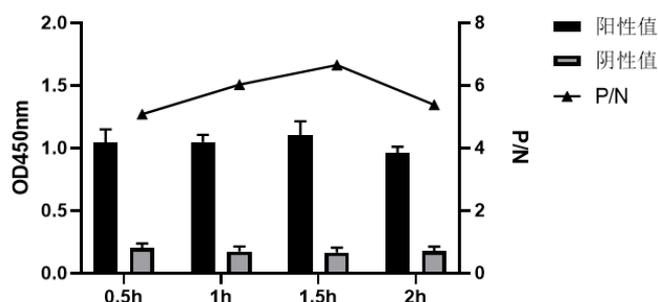


图 3-7 最佳抗原孵育时间的确定

Fig 3-7 Determination of optimum incubation time of antigen

3.6.5 最佳检测抗体作用时间的确定

用已确定的条件做双抗体夹心 ELISA，分别选择检测抗体（鼠抗 du_IFN γ 多克隆抗体）作用时间为 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h，以确定最佳检测抗体作用时间。结果表明，当鼠抗 du_IFN γ 多克隆抗体作用时间为 2 h 时，其 P/N 值最高（表 3-5、图 3-8），因此确定最佳检测抗体作用时间为 2 h。

表3-5 最佳检测抗体作用时间的确定

Table 3-5 Determination of treatment time for detection antibody

检测抗体作用时间	阳性 OD 值	阴性 OD 值	P/N
0.5 h	1.382	0.184	7.511
1 h	1.369	0.194	7.057
1.5 h	1.415	0.205	6.902
2 h	1.406	0.154	9.130

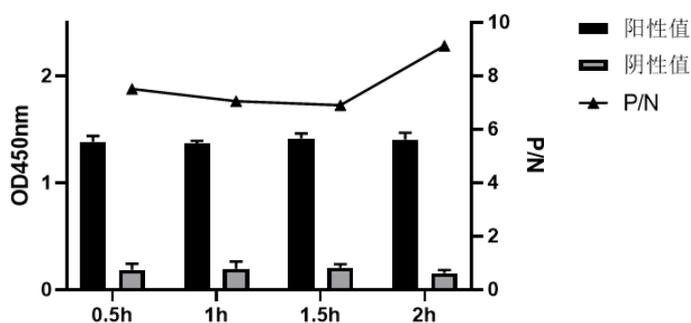


图 3-8 最佳检测抗体作用时间的确定

Fig 3-8 Determination of treatment time for detection antibody

3.6.6 最佳酶标抗体作用时间的确定

用已确定的条件做双抗体夹心 ELISA，分别选择酶标抗体（HRP-山羊抗鼠 IgG）作用时间为 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h，以确定最佳酶标抗体作用时间。结果表明，当 HRP-山羊抗鼠 IgG 作用时间为 1 h 时，其 P/N 值最高（表 3-6、图 3-9），因此确定最佳酶标抗体作用时间为 1 h。

表3-6 最佳酶标抗体作用时间的确定

Table 3-6 Determination of the optimum incubation time of enzyme-labeled antibody

酶标抗体作用时间	阳性 OD 值	阴性 OD 值	P/N
0.5 h	1.443	0.207	6.923
1 h	1.569	0.214	7.332
1.5 h	1.522	0.227	6.705
2 h	1.561	0.291	5.364

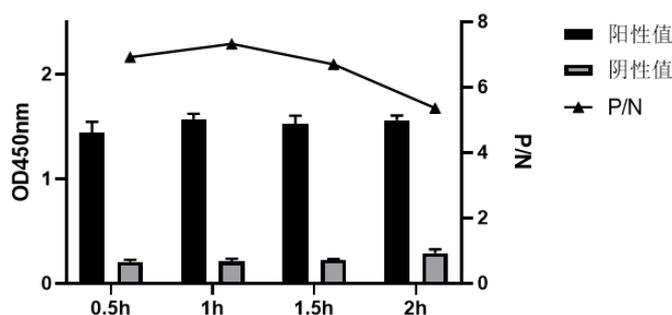


图 3-9 最佳酶标抗体作用时间的确定

Fig 3-9 Determination of the optimum incubation time of enzyme-labeled antibody

3.7 双抗体夹心 ELISA 方法的评价

3.7.1 阴阳性临界值（cut-off 值）的确定

按照已经确立的 ELISA 程序操作，测定 30 份鸭阴性血清 OD_{450nm} 值(见表 3-7)。根据统计学原则，样本的 OD_{450nm} 值 \geq 阴性样本 OD 平均值(\bar{X})+3 \times SD 时，可以在 99.9%的水平上判定为阳性^[70]。经计算 30 份血清的 OD_{450nm} 值的平均值 = 0.255，标准方差 SD=0.039379。因此，ELISA 阴阳性临界值(cut-off 值)=0.255+3 \times 0.039379 =0.373，当 OD_{450nm}>0.373 时判定为阳性，且当 OD_{450nm} \leq \bar{X} +2SD 时，即 OD_{450nm} \leq 0.337，可判定为阴性；当 \bar{X} +2SD<OD_{450nm} \leq \bar{X} +3SD 时，即 0.337<

$OD_{450nm} \leq 0.373$ 时为可疑。

表3-7 双抗体夹心ELISA阴阳性临界值的确定

Table 3-7 Determination of the threshold for DAS-ELISA

样本代号	OD _{450nm} 值	样本代号	OD _{450nm} 值	样本代号	OD _{450nm} 值
1	0.198	11	0.265	21	0.227
2	0.237	12	0.334	22	0.266
3	0.257	13	0.190	23	0.272
4	0.275	14	0.241	24	0.312
5	0.232	15	0.200	25	0.284
6	0.218	16	0.320	26	0.290
7	0.221	17	0.233	27	0.243
8	0.281	18	0.287	28	0.222
9	0.246	19	0.232	29	0.207
10	0.251	20	0.344	30	0.281

3.7.2 敏感性试验

应用所建立的方法，将原核表达 du_IFN γ 做梯度稀释进行夹心 ELISA 测定，同时设置阴性对照。结果表明（表 3-8），当检测抗原量为 2 ng 时，其 OD_{450nm} 值仍为阳性，且 P/N 值 > 2；当检测抗原量为 1 ng 时，其 OD_{450nm} 值为 0.295，且 P/N 值为 1.6，因此确定该方法对 du_IFN γ 蛋白最低检测量为 2 ng/100 μ L。

表3-8 双抗体夹心ELISA最低检出量

Table 3-8 Limit of detection for DAS-ELISA

检测抗原量 (ng)	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	2	1	0
OD _{450nm} 值	1.578	1.412	1.216	0.987	0.832	0.772	0.590	0.446	0.295	0.184

3.7.3 特异性试验

应用建立的双抗体夹心 ELISA 方法，检测原核表达 du_IFN γ 、du_IL-1 β 、真核表达 du_IFN γ 、真核表达 du_IFN α 、du_IFN β 、du_IL6、du_IL4、DTMUV NS1、DTMUV NS3 蛋白，另做阴性对照。结果如图 3-10 所示，用建立的双抗体夹心 ELISA 方法检测 du_IFN γ 原核表达蛋白（OD_{450nm}=2.136）和 du_IFN γ 真核表达蛋白（OD_{450nm}=0.909）均为阳性，而其余蛋白的均为阴性。以上结果表明建立的 du_IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法特异性良好。

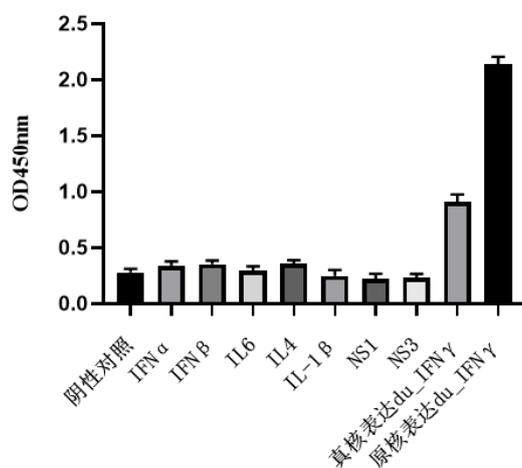


图 3-10 双抗体夹心ELISA方法的特异性试验

Fig 3-10 Specificity detection for DAS-ELISA

3.7.4 重复性试验

3.7.4.1 批内重复性试验

利用相同批次包被的 3 块酶标板对 3 份阳性样品进行检测，按照最适反应条件进行夹心 ELISA 测定，结果见表 3-9，经计算，批内变异系数系数为 1.09%~6.54%，表明该方法的批内重复性良好。

表3-9 批内重复性试验

Table 3-9 Intra-repeatability assay

样品	1	2	3
OD _{450nm} 值	1.280	1.573	0.664
	1.287	1.593	0.640
	1.307	1.411	0.643
批内变异系数	1.09%	6.54%	2.02%

3.7.4.2 批间重复性试验

取不同批次的 3 块包被抗体的酶标板，分别对同样的 3 份阳性样品进行 3 次检测。按照最适反应条件进行夹心 ELISA 测定，结果见表 3-10，经计算，批间变异系数系数为 2.45%~6.71%，表明该方法的批间重复性良好。

表3-10 批间重复性试验

Table 3-10 Inter-repeatability assay

样品	1	2	3
OD _{450nm} 值	1.291	1.526	0.649
	1.355	1.487	0.720
	1.322	1.370	0.637
批间变异系数	2.45%	5.56%	6.71%

3.7.5 du_IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法的应用

为了确定该方法是否能应用于对体内天然 du_IFN γ 的检测，分别对鸭瘟病毒攻毒后和鸭肝炎疫苗免疫后的鸭血清进行检测。由图 3-11 可知，鸭肝炎疫苗免疫后血清中的 du_IFN γ 水平显著提高；鸭瘟病毒的感染也可以诱导机体 du_IFN γ 的分泌。表明该方法可以检测血清中 du_IFN γ 的表达量，用于监测机体的免疫反应。

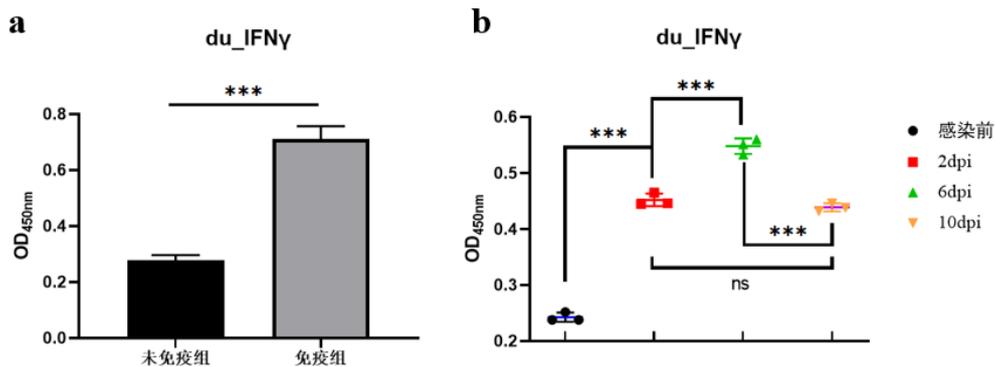


图 3-11 双抗体夹心ELISA用于检测血清中du_IFN γ 水平

Fig 3-11 DAS-ELISA is used to detect du_IFN γ level in serum

注：(a) 鸭肝炎商用疫苗免疫后鸭血清中 du_IFN γ 水平。(b) 鸭瘟病毒感染后不同时间点鸭血清中 du_IFN γ 水平。T 检验分析各组数据间差异，ns 表示 $p > 0.05$ ，***表示 $p < 0.001$ 。

3.8 du_IFN γ 真核蛋白的获得

3.8.1 WB 验证 du_IFN γ 的真核表达

将 pcDNA3.1-du_IFN γ 质粒转染至 DEF 细胞，以转染 pcDNA3.1-vector 质粒为阴性对照。转染 48 h 后收取上清样和细胞样，通过 WB 法验证 du_IFN γ 真核蛋白的表达情况。结果显示，在上清样中，在 15-25 kDa 间出现特异性条带（图 3-12），与 du_IFN γ 蛋白理论大小（20.3 kDa）相符，表明 du_IFN γ 蛋白可在 DEF 细胞中表达，且可表达至细胞上清。

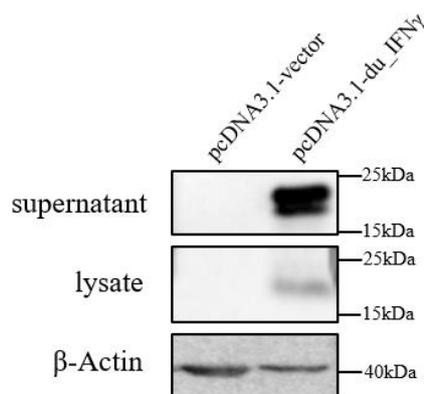


图 3-12 WB 检测 du_IFN γ 真核蛋白的表达

Fig 3-12 Western blot analysis of du_IFN γ eukaryotic expression

3.8.2 真核 du_IFN γ 的浓缩及浓度测定

收集真核表达 du_IFN γ ，利用 3 kDa 蛋白浓缩管进行浓缩，后将浓缩液进行过滤，通过 WB 验证。结果显示（图 3-13a）在目标位置有特异性条带，表示成功获得浓缩后的 du_IFN γ 。利用所建立的 du_IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法对浓缩后的 du_IFN γ 浓度进行测定，并同时测定梯度稀释的原核蛋白，得到对应的标准曲线（图 3-13b），根据 ELISA 结果，du_IFN γ 测定的 OD_{450nm} 值为 1.131，带入所得到的函数，求得检测量为 41.644 ng，因此浓缩后 du_IFN γ 的浓度约为 416 ng/mL。

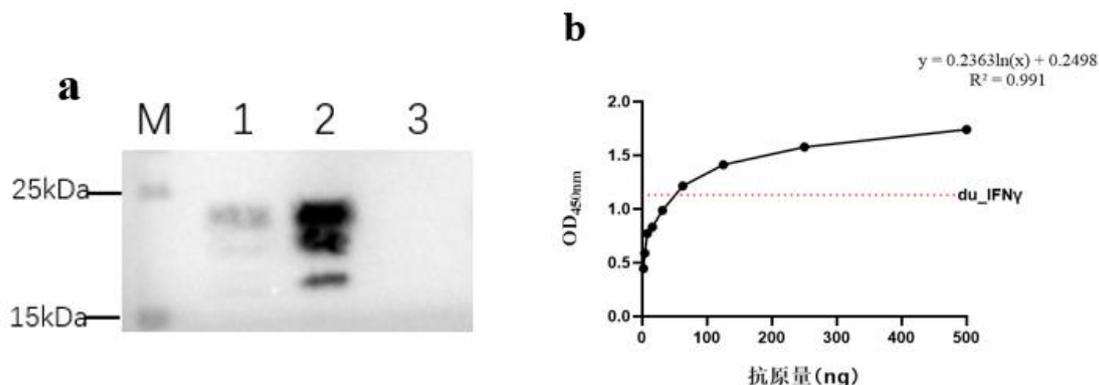


图 3-13 真核表达du_IFN γ 的浓缩及浓度测定

Fig 3-13 Concentration of the eukaryotic expression of du_IFN γ and concentration determination

注：(a) 1：转染上清；2：浓缩样；3：阴性对照；(b) 双抗体夹心 ELISA 方法的标准曲线

3.9 du_IFN γ 在 DEF 中的抗 DTMUV 作用

3.9.1 DTMUV 感染后 DEF 中 du_IFN γ 的表达情况

检测 DTMUV 感染 DEF 后 12 h、24 h、36 h 细胞中的病毒拷贝数（图 3-14a），病毒特异性蛋白表达情况（图 3-14b），及噬斑试验检测各时间点的病毒滴度（图 3-14c），可以看出 DTMUV 的增殖在 36h 内是逐步上升的，且在病毒基因 mRNA 水平、病毒蛋白翻译水平、病毒粒子释放水平上的趋势是一致的。RT-qPCR 分别检测 DTMUV 感染 DEF 后 12 h、24 h、36 h 细胞中 du_IFN γ 的相对表达量，发现在 DTMUV 的刺激下，du_IFN γ 的转录水平在各个时间点均显著上调，且在 24 h 时其转录水平达到最高，36 h 时有所下降（图 3-14d），表明 DTMUV 的刺激可以引起 DEF 内 du_IFN γ 转录水平的上调，猜测 du_IFN γ 参与了 DEF 对 DTMUV 感染的抵抗。

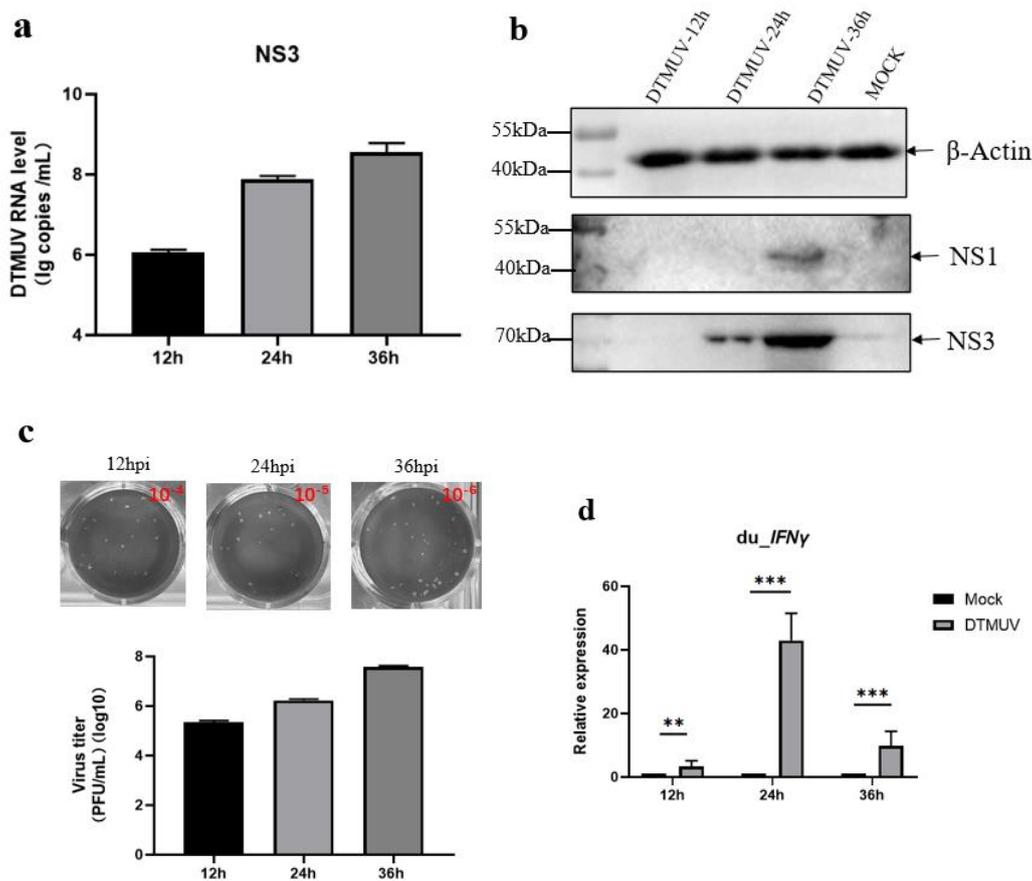


图 3-14 DTMUV 感染 DEF 后的增殖及 du_IFN γ 的相对表达情况

Fig 3-14 Proliferation of DTMUV after infecting DEF and relative expression of du_IFN γ

注：(a) DTMUV NS3 拷贝数；(b) DTMUV NS1、NS3 蛋白表达情况；(c) DTMUV 病毒滴度及噬斑形态图；(d) du_IFN γ 相对表达情况。T 检验分析各组数据间差异，**表示 $p < 0.01$ ；***表示 p 小于 0.01。

3.9.2 du_IFN γ 对 DEF 活性的影响

为确定 du_IFN γ 的孵育是否会对 DEF 的细胞活性产生影响，分别用 pcDNA3.1 真核表达上清、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL 的真核 du_IFN γ 孵育 DEF 12 h，后通过 CCK-8 法检测细胞活性。由图 3-15 可知，对照组与各试验组的细胞活性并无差异 ($p > 0.05$)，提示在 80 ng/mL 浓度内的 du_IFN γ 的预孵育对 DEF 无细胞毒性。

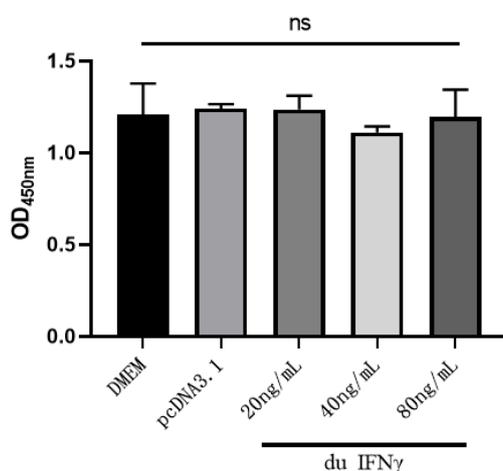


图 3-15 CCK-8法检测du_IFN γ 孵育对DEF活性的影响

Fig 3-15 Effect of du_IFN γ incubation on cytoactive of DEF

注：T 检验分析各组数据间差异，ns 表示 $P > 0.05$

3.9.3 du_IFN γ 在 DEF 中抗 DTMUV 感染的作用

为确定 du_IFN γ 是否可以预防 DTMUV 对 DEF 的感染，用 20 ng/mL 的真核 du_IFN γ 孵育 DEF 12h，后以 MOI=1 接毒 DTMUV，对感染后 12 h、24 h、36 h 的样本进行检测。RT-qPCR 检测 DTMUV 的 NS3 拷贝数，结果显示，du_IFN γ 孵育组在各个时间点的 DTMUV NS3 拷贝数（12 h 为 5.91 lg copies/mL；24 h 为 6.86 lg copies/mL；36 h 为 7.82 lg copies/mL）均显著低于对照组（12 h 为 6.79 lg copies/mL；24 h 为 7.55 lg copies/mL；36 h 为 8.66 lg copies/mL）及孵育空载上清组（ $p < 0.001$ ），而空载表达上清孵育组与接毒对照组相比并无显著差异（ $p > 0.5$ ）（图 3-16a）。噬斑试验检测各组病毒滴度，由图 3-1b 可以看出，du_IFN γ 孵育组在各个时间点的病毒滴度（12 h 为 3.96 log₁₀ PFU/mL；24 h 为 4.66 log₁₀ PFU/mL；36 h 为 5.85 log₁₀ PFU/mL）均显著低于接毒对照组（12 h 为 5.04 log₁₀ PFU/mL；24 h 为 5.85 log₁₀ PFU/mL；36 h 为 7.74 log₁₀ PFU/mL）（ $p < 0.001$ ），且三个时间点的差异均在 10 倍以上，36 h 时各组间的病毒滴度达到了 70 倍的差异。WB 检测病毒蛋白的表达情况，由图 3-16c 可以发现 du_IFN γ 处理的细胞样中，在 24 h 均未检测到 DTMUV NS3、NS1 的蛋白条带，36 h 时蛋白灰度值明显低于接毒对照组和空载表达上清孵育组，而后两者的蛋白表达水平是一致的。以上结果表明，du_IFN γ 的

预处理可以有效地抑制 DTMUV 在 DEF 中的增殖，即可以降低 DTMUV 对 DEF 的感染。

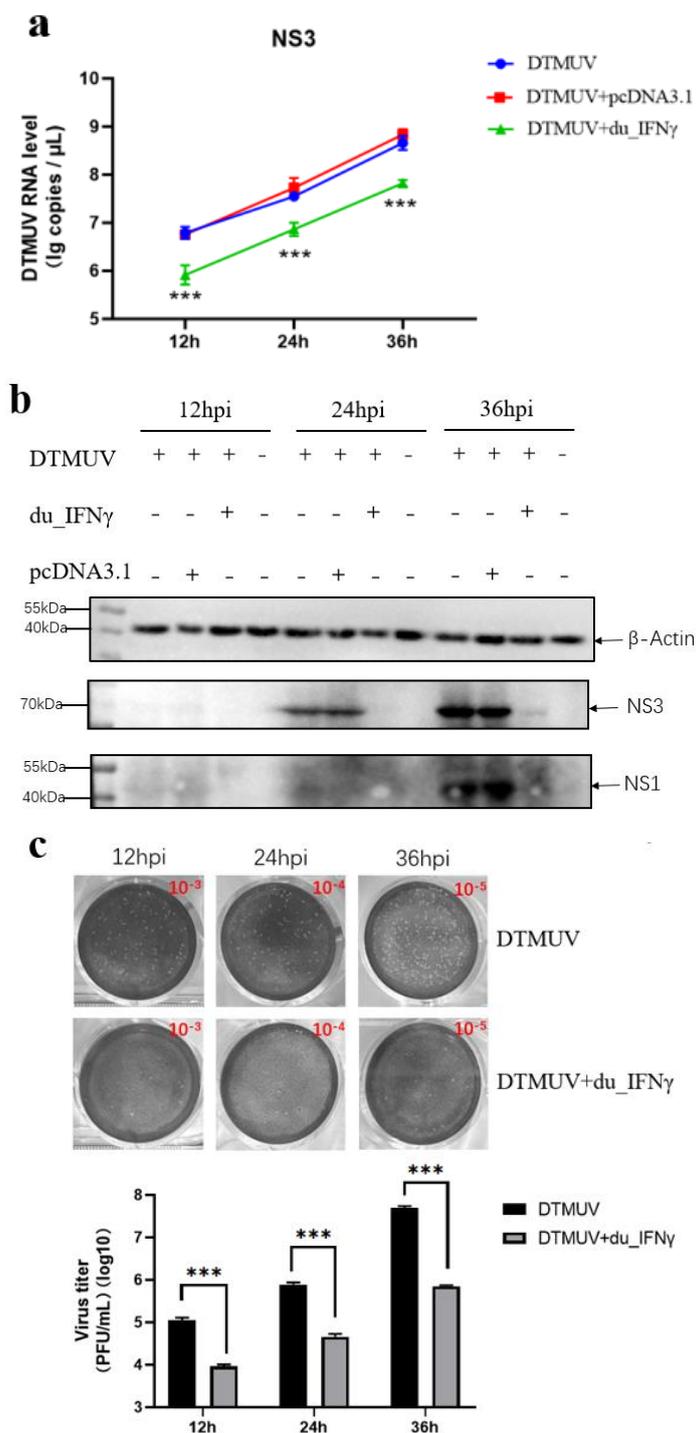


图 3-16 du_IFN γ 在DEF中抑制DTMUV感染的作用

Fig 3-16 The effect of du_IFN γ in inhibiting DTMUV infection in DEF

注：(a) DTMUV NS3 拷贝数；(b) DTMUV NS1、NS3 蛋白表达情况；(c) DTMUV 病毒滴度及噬斑形态图。T 检验分析各组数据间差异，***表示 $p < 0.001$ 。

3.9.4 du-IFN γ 在 DEF 中抗 DTMUV 感染呈剂量依赖性

为探究 du-IFN γ 抑制 DTMUV 感染 DEF 是否存在剂量依赖性, 分别用不同浓度的 du-IFN γ 对 DEF 孵育 12 h, 后以 MOI=1 接毒 DTMUV, 收集感染后 24 h 的各组培养上清进行噬斑试验。由图 3-17 可以看出, 不同浓度 du-IFN γ 对 DEF 的预处理均能使 DTMUV 的病毒滴度显著下降 ($p < 0.01$); 而 du-IFN γ 的工作量在 20 ng/mL 时, 其抗 DTMUV 增殖的作用最明显, 与其它各孵育组间也存在差异 ($p \leq 0.05$)。随着稀释倍数的增加, du-IFN γ 对 DTMUV 的抑制作用在一定程度上有所下降, 但并无显著差异。结果表明, du-IFN γ 在一定浓度范围内对 DTMUV 都有良好的抑制作用, 且其抑制作用呈剂量依赖性。

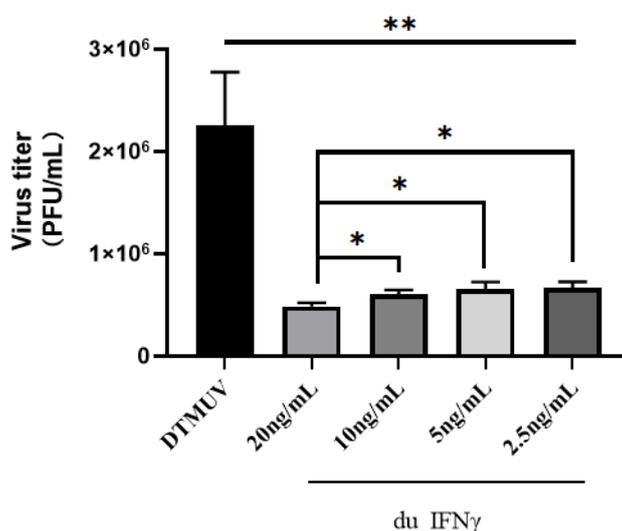


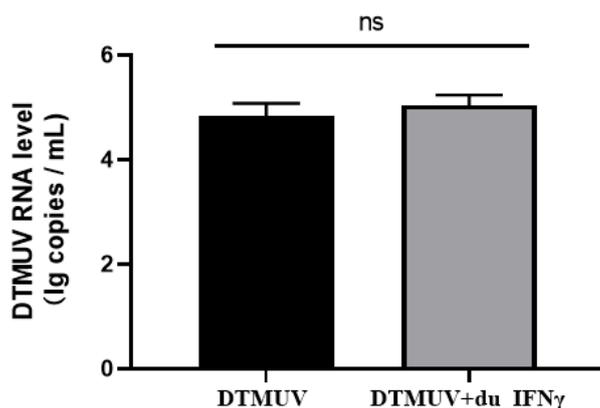
图 3-17 不同浓度 du-IFN γ 对 DTMUV 病毒滴度的影响

Fig 3-17 Effects of different concentrations of du-IFN γ on DTMUV virus titer

注: T 检验分析各组数据间差异, **表示 $p < 0.01$; *表示 $p \leq 0.05$ 。

3.9.5 du-IFN γ 对 DTMU 病毒粒子吸附 DEF 的影响

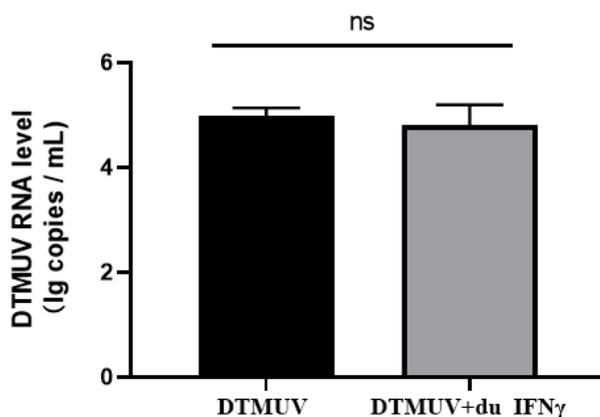
采用实验室建立的对 DTMUV 吸附 DEF 过程的研究方法进一步确认 du-IFN γ 对 DTMUV 感染 DEF 生命周期的影响, 利用 RT-qPCR 检测各组 DTMUV E 基因的表达情况, 由图 3-18 可见, du-IFN γ 的预处理不会影响 DTMUV 对 DEF 的吸附 ($p > 0.05$)。

图 3-18 du_IFN γ 对DTMUV病毒粒子吸附DEF过程的影响Fig 3-18 The effect of du_IFN γ on viral binding

注：T 检验分析各组数据间差异，ns 表示 $P>0.05$

3.9.6 du_IFN γ 对 DTMU 病毒粒子进入 DEF 的影响

采用实验室建立的对 DTMUV 进入 DEF 过程的研究方法进一步确认 du_IFN γ 对 DTMUV 生命周期的影响，利用 RT-qPCR 检测各组 DTMUV E 基因的表达情况，由图 3-19 可见，du_IFN γ 的预处理不会影响 DTMUV 对 DEF 的进入 ($p>0.05$)。

图 3-19 du_IFN γ 对DTMUV病毒粒子进入DEF过程的影响Fig 3-19 The effect of du_IFN γ on viral entry

注：T 检验分析各组数据间差异，ns 表示 $P>0.05$

3.9.7 du_IFN γ 对 DTMUV 基因翻译、蛋白复制的影响

为探究 du_IFN γ 对 DTMUV 基因组翻译、病毒蛋白复制的影响，用 du_IFN γ 孵育 DEF 12 h，后以 MOI=1 接毒 DTMUV，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后弃上清，在对应试

验孔中加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX。在感染后 12 h、24 h 收集细胞样，对 DTMUV NS3、E 基因的表达情况进行检测。WB 验证感染后 24 h 时 DTMUV NS1、NS3 蛋白的表达情况。结果显示，CHX 或 $\text{du_IFN}\gamma$ 都抑制了 DTMUV NS3 和 E 基因的表达 ($p < 0.001$) (图 3-20a、3-20b)，但两者同时作用没有进一步减少其表达水平 ($p > 0.05$)，并且在病毒蛋白表达水平上也呈现相同的情况 (图 3-20c)。以上结果说明 $\text{du_IFN}\gamma$ 的预孵育干扰了参与病毒蛋白合成的 RNA 的复制，从而影响了病毒蛋白的表达。

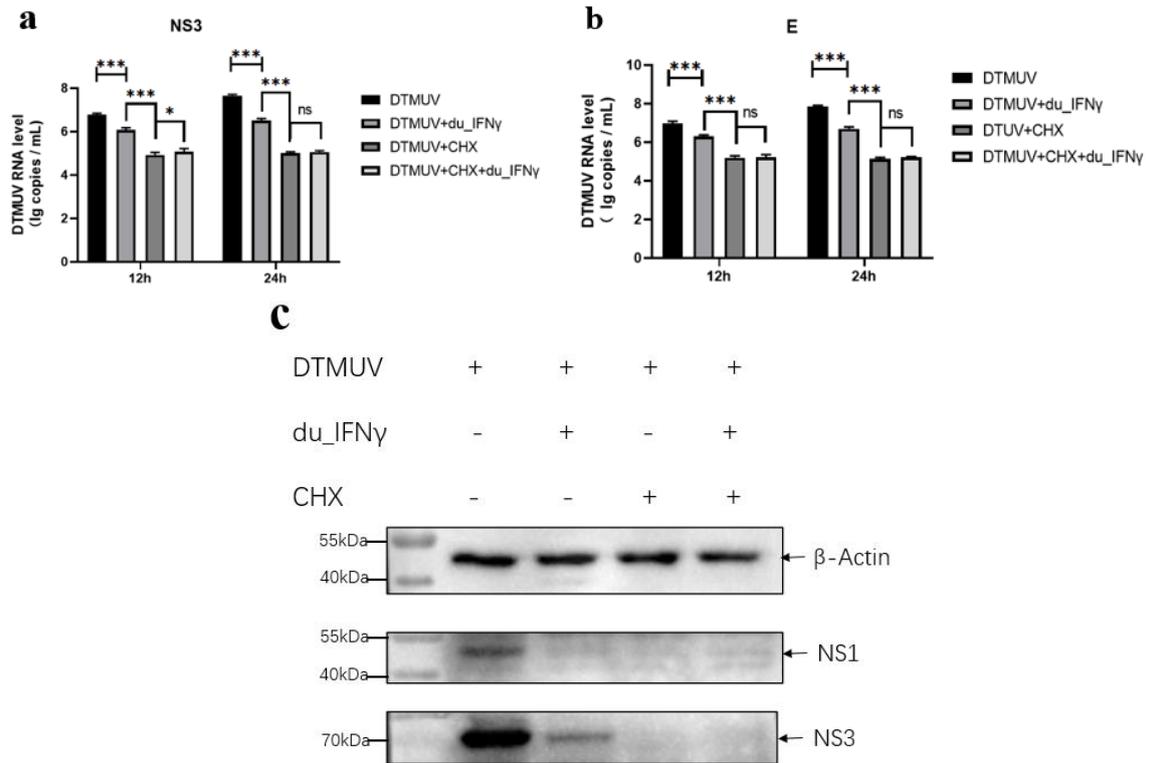


图 3-20 $\text{du_IFN}\gamma$ 对DTMUV翻译、复制过程的影响

Fig 3-20 The effect of $\text{du_IFN}\gamma$ on viral RNA translation and replication

注：(a) DTMUV NS3 转录水平；(b) DTMUV E 转录水平；(c) DTMUV NS1、NS3 蛋白表达情况。T 检验分析各组数据间差异，ns 表示 $p > 0.05$ ，*表示 $p \leq 0.05$ ，***表示 $p < 0.001$ 。

3.9.8 $\text{du_IFN}\gamma$ 在 DEF 中对 DTMUV 感染的清除作用

为探究 $\text{du_IFN}\gamma$ 是否可以加速已感染 DEF 对 DTMUV 的清除作用，将 DTMUV 以 $\text{MOI}=1$ 感染 DEF，待病毒吸附 DEF 后再培养 4 h，加入 20 ng/mL 的 $\text{du_IFN}\gamma$ 孵育 12 h，收集样品。RT-qPCR 检测 DTMUV 的 NS3 及 E 基因的表达量，

结果显示, du_IFN γ 组 E 和 NS3 的转录水平 (分别为 6.55 lg copies/mL 和 6.33 lg copies/mL) 均显著低于对照组 (分别为 8.12 lg copies/mL 和 7.63 lg copies/mL) ($p < 0.001$), 且差异分别达到了 37 倍和 20 倍 (图 3-21a、3-21b)。噬斑试验检测病毒滴度, 结果显示 du_IFN γ 组的病毒滴度 (4.79 log₁₀ PFU/mL) 与病毒 mRNA 转录水平一样 (图 3-21c), 也显著低于对照组 (5.70 log₁₀ PFU/mL) ($p < 0.001$)。以上结果表明, 在 DEF 感染 DTMUV 后加入 du_IFN γ 孵育可以明显抑制病毒的增殖, du_IFN γ 对 DTMUV 感染 DEF 有一定的清除作用。

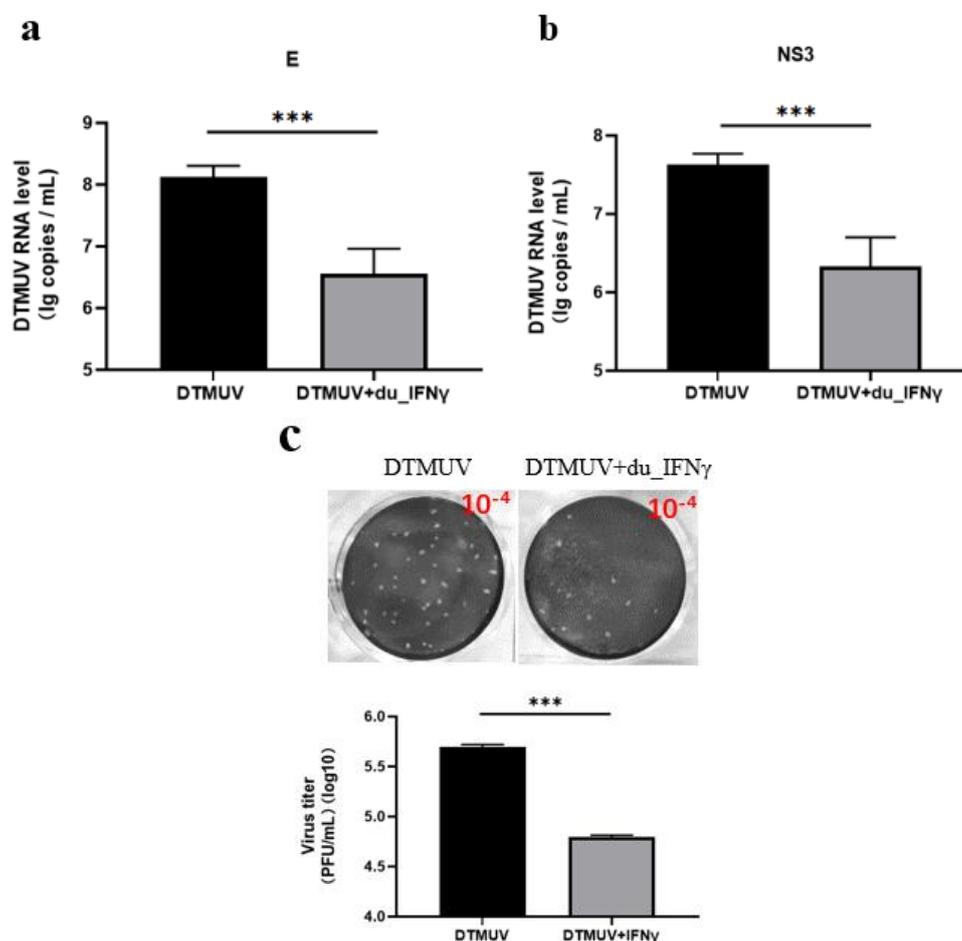


图 3-21 du_IFN γ 在DEF中对DTMUV感染的清除作用

Fig 3-21 Effect of du_IFN γ in accelerating the clearance of DTMUV infection in DEF

注: (a) DTMUV E 转录水平; (b) DTMUV NS3 转录水平; (c) DTMUV 病毒滴度及噬斑形态图。T 检验分析各组数据间差异, ***表示 $p < 0.001$

3.9.9 不同浓度 du_{IFN} γ 在 DEF 中对 DTMUV 感染的清除作用

DTMUV 以 MOI=1 感染 DEF, 待病毒吸附 DEF 后培养 4 h, 分别加入不同浓度的 du_{IFN} γ 孵育细胞 12 h, 收集感染后 12 h 的各组上清样进行噬斑试验。由图 3-22 可以看出, 在 DEF 感染 DTMUV 后加入不同浓度的 du_{IFN} γ 均能使病毒滴度显著下降 ($p < 0.001$), 而各浓度组间并无差异。结果表明, du_{IFN} γ 在一定浓度范围内都对 DEF 感染 DTMUV 有着清除作用。

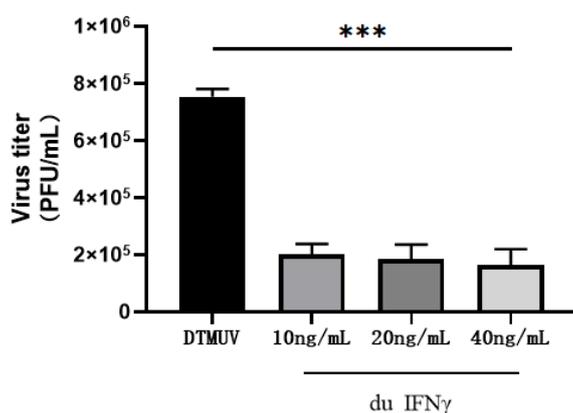


图 3-22 不同浓度 du_{IFN} γ 在 DEF 中对 DTMUV 的清除作用

Fig 3-22 Effects of different concentrations of du_{IFN} γ in accelerating the clearance of DTMUV infection in DEF

注: T 检验分析各组数据间差异, ***表示 $p < 0.001$

3.10 du_{IFN} γ 在 PBMC 中的抗 DTMUV 作用

3.10.1 DTMUV 感染后 PBMC 中 du_{IFN} γ 的表达情况

检测 DTMUV 感染 PBMC 后 12 h、24 h、36 h 细胞中的病毒拷贝数 (图 3-23a) 及各时间点培养上清中的病毒滴度 (图 3-23b), 可以看出 DTMUV 在感染 PBMC 后其 NS3 拷贝数和滴度的变化趋势是一致的, 在 12 h 到 24 h 间呈现一个上升的状态, 而在 24 h 到 36 h 略有下降。RT-qPCR 分别检测细胞中 du_{IFN} γ 的相对表达量, 发现在 DTMUV 的刺激下, du_{IFN} γ 的转录水平在 24 h 和 36 h 均显著上调, 且在 24 h 时其转录水平达到最高 (图 3-23c); 利用本试验所建立的双抗体夹心 ELISA 方法检测细胞培养上清中 du_{IFN} γ 蛋白的分泌, 发现 du_{IFN} γ 的蛋白分泌

量也在各时间点明显升高（图 3-23d）。以上结果表明 DTMUV 感染可以刺激 PBMC 内 $du_IFN\gamma$ 的表达， $du_IFN\gamma$ 在 PBMC 抵抗 DTMUV 感染中也起到作用。

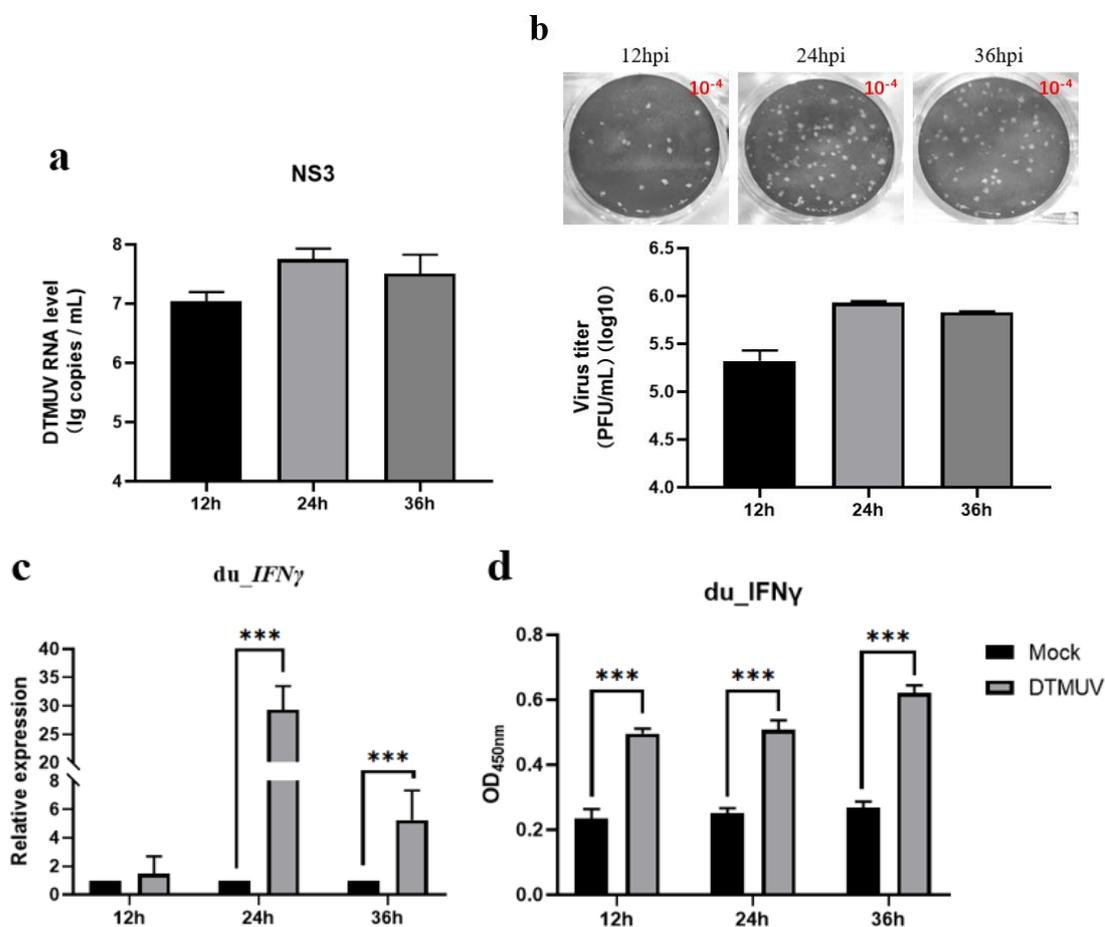


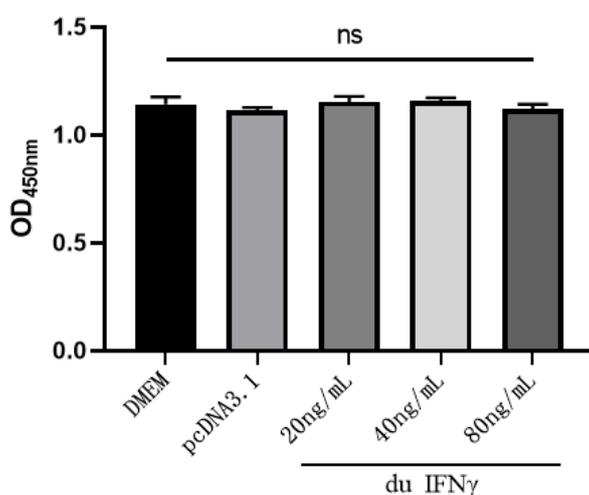
图 3-23 DTMUV 感染 PBMC 后的增殖及 $du_IFN\gamma$ 相对表达情况

Fig 3-23 Proliferation of DTMUV after infecting PBMC

注：(a) DTMUV NS3 拷贝数；(b) DTMUV 病毒滴度及噬斑形态图；(c) 细胞中 $du_IFN\gamma$ mRNA 相对表达情况；(d) 细胞培养上清中 $du_IFN\gamma$ 的分泌量。T 检验分析各组数据间差异，***表示 $p < 0.001$

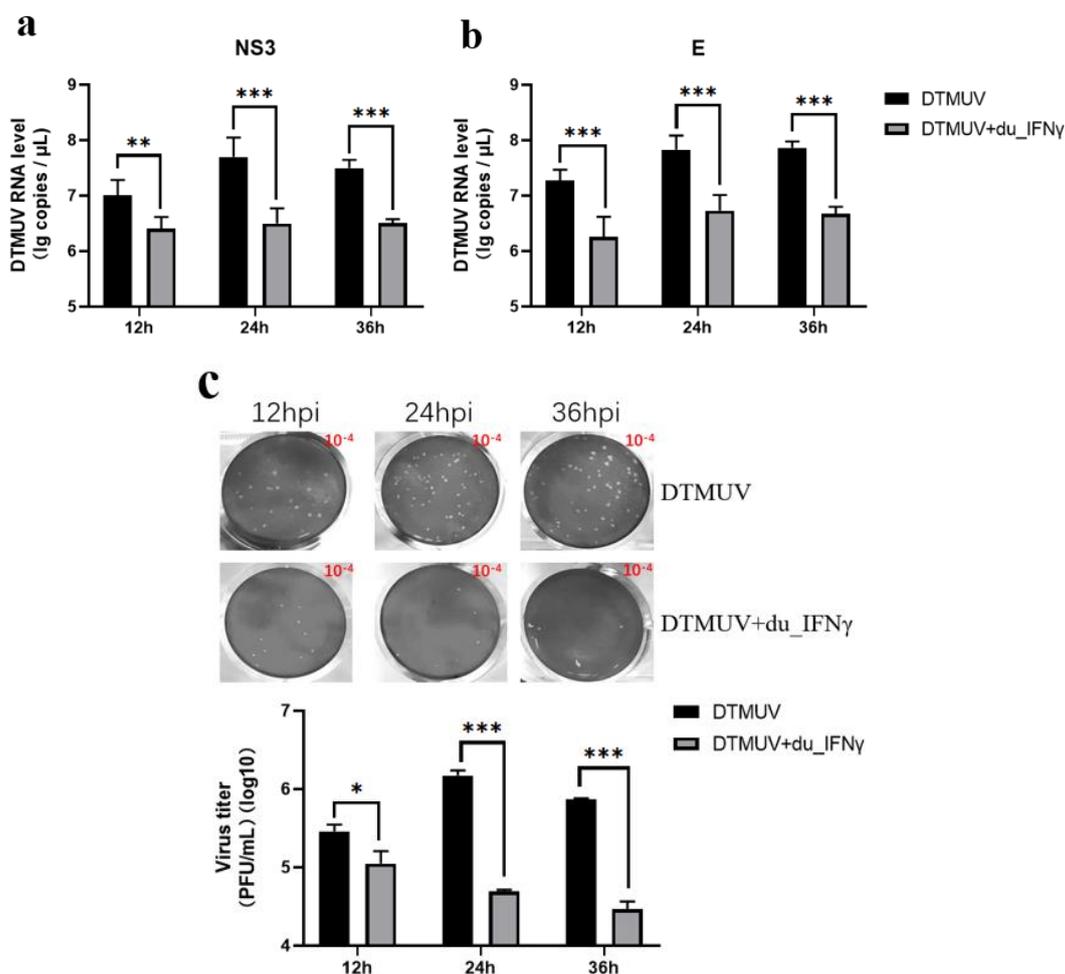
3.10.2 CCK-8 法检测 $du_IFN\gamma$ 孵育对 PBMC 活性的影响

为确定 $du_IFN\gamma$ 的孵育是否会影响 PBMC 的细胞活性，分别用 pcDNA3.1 真核表达上清、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL 的 $du_IFN\gamma$ 孵育 PBMC 12 h，后通过 CCK-8 法检测细胞活性。由图 3-24 可知，对照组与各试验组的细胞活性并无差异 ($p > 0.05$)，提示在 80 ng/mL 浓度内的真核 $du_IFN\gamma$ 的孵育对 PBMC 无细胞毒性。

图 3-24 CCK-8法检测du_IFN γ 孵育对PBMC活性的影响Fig 3-24 Effect of du_IFN γ incubation on cytoactive of PBMC

3.10.3 du_IFN γ 在 PBMC 中抗 DTMUV 感染的作用

为探究 du_IFN γ 在 PBMC 上是否拥有和在 DEF 上一样的抑制 DTMUV 感染的作用，用 20 ng/mL 的 du_IFN γ 孵育 PBMC 12 h，后以 MOI=1 接毒 DTMUV，对感染后 12 h、24 h、36 h 的样本进行检测。RT-qPCR 检测 DTMUV 的 NS3、E 基因的表达量，由图 3-25a、3-25b 可见，du_IFN γ 孵育组的病毒基因 mRNA 水平在各个时间点均显著低于接毒对照组，($p < 0.01$, $p < 0.001$)，且 NS3 的 mRNA 水平在 24 h、36 h 与 12 h 对比，几乎没有升高，说明 du_IFN γ 很好地抑制了 NS3 的转录。噬斑试验检测各组的病毒滴度，由图 3-25c 可以看出，du_IFN γ 孵育组在 12 h 时的病毒滴度 (5.05 log₁₀ PFU/mL) 低于接毒对照组 (5.46 log₁₀ PFU/mL) ($p \leq 0.5$)，而到了 24 h、36 h (分别为 4.69 log₁₀ PFU/mL 和 4.46 log₁₀ PFU/mL)，活性病毒的增殖受到了很强的抑制，其病毒滴度不仅显著低于接毒对照组 (24 h 为 6.17 log₁₀ PFU/mL; 36 h 为 5.87 log₁₀ PFU/mL) ($p < 0.001$)，甚至比 12 h 时更低。以上结果表明，du_IFN γ 的预孵育可以有效地抑制 DTMUV 在 PBMC 中的增殖，其抑制作用比在 DEF 中的效果更为明显。

图 3-25 du_IFN γ 在PBMC中的抗DTMUV作用Fig 3-25 The anti-DTMUV effect of du_IFN γ in PBMC

注：(a) DTMUV NS3 转录水平；(b) DTMUV E 转录水平 (c)；DTMUV 病毒滴度及噬斑形态图。T 检验分析各组数据间差异，*表示 $p \leq 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ；***表示 $p < 0.001$ 。

3.10.4 du_IFN γ 在 PBMC 中对 DTMUV 感染的清除作用

为探究 du_IFN γ 是否也可以加速 PBMC 对 DTMUV 感染的清除，将 DTMUV 以 MOI=1 感染 PBMC，待培养 6 h，加入 20 ng/mL 的 du_IFN γ 孵育 24 h，收集样品。RT-qPCR 检测 DTMUV 的 NS3 及 E 基因的表达量，结果显示，du_IFN γ 组 NS3 和 E 的转录水平均显著低于对照组 ($p < 0.01$ ； $p < 0.001$) (图 3-26a、3-26b)。噬斑试验检测病毒滴度，结果显示 du_IFN γ 组的病毒滴度 (5.87 log₁₀ PFU/mL) 也显著低于对照组 (6.52 log₁₀ PFU/mL) ($p < 0.001$)。以上结果表明，在 PBMC

感染 DTMUV 后加入 du_IFN γ 可以明显抑制病毒的增殖，du_IFN γ 对 DTMUV 感染 PBMC 也有着一定的清除作用。

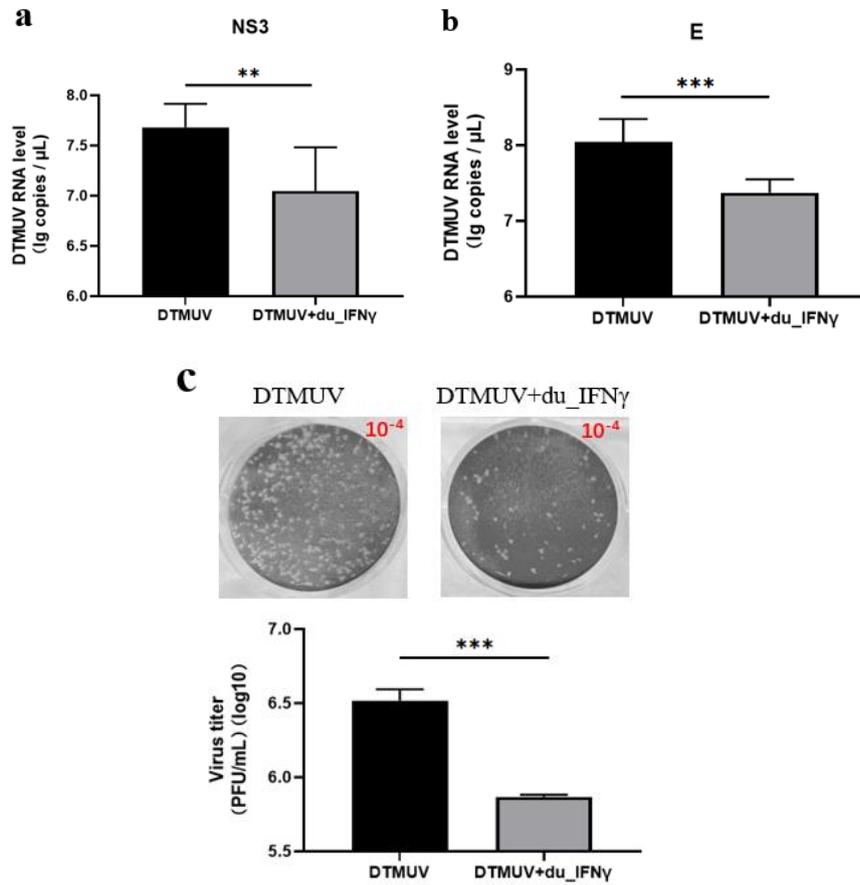


图 3-26 du_IFN γ 在PBMC中对DTMUV感染的清除作用

Fig 3-26 Effect of du_IFN γ in accelerating the clearance of DTMUV infection in PBMC

注：(a) DTMUV NS3转录水平；(b) DTMUV E转录水平；(c) DTMUV病毒滴度及噬斑形态图。T检验分析各组数据间差异，**表示 $p < 0.01$ ；***表示 $p < 0.001$ 。

4 讨论

作为一种多功能的细胞因子，IFN γ 在抵抗病毒感染、抑制肿瘤侵袭等临床医学相关领域都发挥着重要的作用。本研究通过构建 du_IFN γ 原核表达载体，制备 du_IFN γ 多克隆抗体，成功建立 du_IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法，为监测 du_IFN γ 表达提供一种实验室检测手段。另，探究了 du_IFN γ 在体外抗 DTMUV 的作用，为进一步解析 du_IFN γ 的抗病毒作用提供理论依据。

4.1 du_IFN γ 的原核表达

试验初期，我们对所得的序列进行分析，结果表明 du_IFN γ 的 CDs 区全长 495 bp，前 20 个氨基酸为信号肽，成熟蛋白 144 个氨基酸，有一个跨膜区。真核基因在蛋白质合成过程中需要信号肽穿膜转运，其通过定位于内质网并引导核糖体的附着，在蛋白肽链合成完成前，信号肽会在内质网中信号肽酶的作用下被切割^[71]。但原核表达系统缺乏翻译后的加工过程，使得真核生物的信号肽难以被切除，从而影响蛋白的表达^[72]。因此本试验在构建原核表达质粒时对 du_IFN γ 的信号肽部分进行了截断处理。pET 原核表达载体系统是现今所知在 E.coli 中克隆表达重组蛋白的功能最强大的系统，为了使 du_IFN γ 在该系统中顺利表达，我们将其序列进行了针对大肠杆菌表达系统的密码子优化。本试验前期使用了 pET28a 和 pET32a 两种载体进行了原核表达质粒的构建，但在纯化阶段，pET28a-du_IFN γ 始终无法很好地结合于镍柱上，故选择了 pET32a-du_IFN γ 作为表达质粒进行后续的试验操作。

4.2 du_IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法的建立

本实验使用 du_IFN γ 原核蛋白作为抗原，免疫小鼠和兔，并对免疫后采集的血清进行了特异性分析，获得了鼠抗 du_IFN γ 多克隆抗体和兔抗 du_IFN γ 多克隆抗体。我们分别使用两种抗体作为包被抗体对 du_IFN γ 原核蛋白进行了间接 ELISA 方法的检测，发现两种抗体都能够很好地识别 du_IFN γ 原核蛋白，且兔抗 du_IFN γ 能在相同稀释度的情况下更好地结合 du_IFN γ 原核蛋白。因此，我们以

兔抗 du_IFN γ 为捕获抗体，鼠抗 du_IFN γ 为检测抗体，通过对酶标抗体工作浓度、捕获抗体与检测抗体间的工作浓度、封闭时间、抗原孵育时间、检测抗体作用时间、酶标抗体作用时间的优化，建立了 du_IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法。后对该方法进行评价，试验结果显示，该方法特异性良好，可检测原核及真核表达 du_IFN γ ，不与其他蛋白发生反应；敏感度高，可以检测 2 ng/100 μ L 的 du_IFN 蛋白；重复性良好，批间及批内变异系数均小于 10%。本实验所建立的方法相比商用的试剂盒可能有一定的差距，但可用于 du_IFN γ 的实验室检测。

4.3 du_IFN γ 体外抗病毒试验

已有大量研究表明 IFN γ 具有抗病毒活性，du_IFN γ 的抗病毒作用也相继被阐述^[11-13]。很多研究所使用的重组 IFN γ 为原核表达蛋白，但真核表达蛋白能够进行翻译后的修饰，更接近天然蛋白，故本试验构建了鸭源密码子优化的 du_IFN γ 真核表达质粒，利用表达的 du_IFN γ 真核蛋白探究其抗 DTMUV 的作用。通过本试验所建立的 du_IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法对浓缩后的 du_IFN γ 进行浓度的测定，是为了更好地控制后续试验中 du_IFN γ 的工作浓度，并为其它相关研究提供一些参考。

本试验对病毒基因转录水平、蛋白表达水平、活性病毒含量几个方面进行考虑，对 du_IFN γ 的抗病毒作用进行了探究。已有研究证明，du_IFN γ 对细胞的预处理可以激活相关信号通路，如 JAK-STAT1，刺激下游 ISGs 的表达，使得细胞呈现一个抗病毒的状态^[8, 73]。在用 du_IFN γ 预孵育 DEF 12h 后接种 DTMUV，试验结果表明，du_IFN γ 孵育组在各个时间点的 DTMUV NS3 拷贝数、病毒滴度均显著低于接毒对照组，且三个时间点病毒滴度的差异均在 10 倍以上，36h 时各组间差异达到了 70 倍。WB 检测病毒蛋白的表达情况，可以发现 du_IFN γ 处理的细胞样中，在 24h 均未检测到 DTMUV NS3、NS1 的蛋白条带，且 36h 时蛋白灰度值明显低于接毒对照组和空载表达上清孵育组，而后两者的蛋白表达水平是一致的。说明 du_IFN γ 的预处理可以有效地抑制 DTMUV 在 DEF 中的增殖，且其抑制作用与使用浓度存在一定的正相关性。为了进一步确定 du_IFN γ 的预处理会对 DTMUV 感染 DEF 的生命周期的影响，我们采用了实验室所建立的研究方法进行

试验, 结果表明 du-IFN γ 的预处理并不会影响 DTMUV 吸附和进入 DEF 的过程, 但对其复制周期有所影响。根据相关文献报道, IFN γ 的确可以通过干扰 RNA 聚合酶的合成、阻断病毒蛋白加工修饰, 抑制病毒基因组复制等多个生理阶段对病毒的增殖起到抑制作用^[74, 75]。

在人类上, IFN γ 已被广泛用于临床的治疗, 其可以治疗慢性肉芽肿、恶性骨硬化、风湿类关节炎等多种疾病^[76]。动物上也被用于治疗一些病毒性疾病, 如犬瘟。为探究 du-IFN γ 除了在预孵育后使得 DEF 产生抗病毒状态, 是否还能加速 DEF 对 DTMUV 感染的清除作用, 本试验在接毒后的 DEF 中加入了相同剂量的 du-IFN γ , 结果表明, 病毒基因转录水平和病毒滴度均显著低于接毒对照组, 说明 du-IFN γ 对 DTMUV 的感染也有一定的清除作用。

du-IFN γ 在体细胞中有着这样的抗 DTMUV 作用, 那么在免疫细胞中呢? PBMC 主要包括淋巴细胞 (T 细胞、B 细胞和 NK 细胞), 单核细胞、吞噬细胞、树突状细胞和少量其它细胞。我们在 PBMC 中同样做了 du-IFN γ 预处理的抗 DTMUV 试验, 结果表明, 病毒基因转录水平和病毒滴度均显著低于接毒对照组, 这与在 DEF 中的结果是一致的。另外, 我们还发现 du-IFN γ 在 PBMC 中对 DTMUV 的抑制作用比在 DEF 中更为明显, 这可能是因为 IFN γ 可以刺激 PBMC 中大多数细胞的活化, 而活化的 T 细胞和 NK 细胞又具有分泌 IFN γ 的活性, 所以其作用效果得到了加强。同样的, du-IFN γ 在 PBMC 中也有着清除 DTMUV 感染的作用。

以上结果表明, 本实验建立的 du-IFN γ 双抗体夹心 ELISA 方法可以对原核及真核表达的 du-IFN γ 进行检测, 为 du-IFN γ 的检测提供了一种补充方法。du-IFN γ 在体外具有抗病毒活性, 其在 DEF 和 PBMC 上都可以抑制 DTMUV 的增殖, 且在 du-IFN γ 预处理和感染后加入 du-IFN γ 两个层面上都有着同样的抗 DTMUV 的活性。

5 结论及主要创新点

5.1 结论

(1) 基于兔抗 du-IFN γ 多克隆抗体和鼠抗 du-IFN γ 多克隆抗体成功建立了检测 du-IFN γ 的双抗体夹心 ELISA 方法。

(2) 确认了 du-IFN γ 具有在体外抗 DTMUV 感染的作用。

5.2 主要创新点

(1) 建立了一种可用于检测 du-IFN γ 的双抗体夹心 ELISA 方法，为 du-IFN γ 的检测补充了一种新方法。

(2) 确认了 du-IFN γ 在体外抗 DTMUV 的作用，为 du-IFN γ 抗病毒活性的研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] 赵晓芬, 杨米凤, 郝婷婷, 等. 脑脊液 TNF- α 和 IFN- γ 检测在新生儿化脓性脑膜炎诊断中的意义[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(14): 59-2045.
- [2] 谢梦. IFN- γ 对鲟感染海分枝杆菌的检测及抑菌机制研究 [D]. 湖北: 长江大学, 2024.
- [3] 金海玲. 抗牛 IFN- γ 单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 方法的建立 [D]. 吉林: 吉林农业大学, 2022.
- [4] 李林姣. 羊布鲁氏菌病 IFN- γ 双夹心 ELISA 方法的建立及初步应用 [D]. 北京: 中国兽医药品监察所, 2023.
- [5] 姜艳平, 吴煜, 张希, 等. 重组犬 γ 干扰素的分泌表达及抗病毒活性鉴定[J]. 中国兽医杂志 2015, 51(06): 3-30.
- [6] 姚清侠. 猪 α 干扰素、猪 β 干扰素与猪 γ 干扰素的抗病毒活性及其免疫佐剂的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [7] 袁雪梅, 徐铃威, 黄雷, 等. 重组草鱼干扰素 IFN γ 原核表达及其抗 GCRV 效果[J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(07): 56-1348.
- [8] YUK S S, LEE D H, PARK J K, et al. Pre-immune state induced by chicken interferon gamma inhibits the replication of H1N1 human and H9N2 avian influenza viruses in chicken embryo fibroblasts [J]. Virology journal, 2016, 13: 71.
- [9] 周浩. 鹅I型和II型干扰素免疫学特性及抗病毒功能研究 [D]. 四川: 四川农业大学, 2017.
- [10] SCHULTZ U, CHISARI F V. Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes [J]. Journal of virology, 1999, 73(4): 8-3162.
- [11] 李思琪, 尹海畅, 王怡平, 等. 鸭 γ 干扰素在体外细胞中抗鸭肠炎病毒作用的研究[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(11): 73-1365.
- [12] GAO P, FAN L, DU H, et al. Recombinant Duck Interferon Gamma Inhibits H5N1 Influenza Virus Replication In Vitro and In Vivo [J]. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 2018, 38(7): 7-290.
- [13] BERTZBACH L D, HARLIN O, HÄRTLE S, et al. IFN α and IFN γ Impede Marek's Disease Progression [J]. Viruses, 2019, 11(12): 1103.
- [14] ISAACS A, LINDENMANN J. Virus interference. I. The interferon [J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences, 1957, 147(927): 67-258.
- [15] HEATH A W, PLAYFAIR J H. Conjugation of interferon-gamma to antigen enhances its adjuvanticity [J]. Immunology, 1990, 71(3): 6-454.
- [16] 孙圣兰, 江青艳, 傅伟龙. 干扰素的研究进展[J]. 动物医学进展, 2002, (06): 39-41.

- [17] HAQ A U. The effect of IFN-gamma and alpha on Con-A stimulated T-cell proliferation: role of monocytes [J]. *The American journal of the medical sciences*, 1986, 292(6): 5-350.
- [18] MUSTAFA A, NYBERG F, MUSTAFA M, et al. Growth hormone stimulates production of interferon-gamma by human peripheral mononuclear cells [J]. *Hormone research*, 1997, 48(1): 5-11.
- [19] ROBERTSEN B. The interferon system of teleost fish [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2006, 20(2): 91-172.
- [20] 白宇. 马 γ -干扰素单克隆抗体的制备及细胞免疫评价方法的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [21] CARNAUD C, LEE D, DONNARS O, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells [J]. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 1999, 163(9): 50-4647.
- [22] FRUCHT D M, FUKAO T, BOGDAN C, et al. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge [J]. *Trends in immunology*, 2001, 22(10): 60-556.
- [23] GESSANI S, BELARDELLI F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance [J]. *Cytokine & growth factor reviews*, 1998, 9(2): 23-117.
- [24] SCHINDLER H, LUTZ M B, RÖLLINGHOFF M, et al. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4 [J]. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2001, 166(5): 82-3075.
- [25] 蒋磊, 张译元, 常维山. 鸭 α 、 γ -干扰素研究进展及遗传进化分析[J]. *水禽世界*, 2012, (05): 39-42.
- [26] SCHMITT M J, PHILIPPIDOU D, REINSBACH S E, et al. Interferon- γ -induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing microRNA-29 family in melanoma cells [J]. *Cell communication and signaling : CCS*, 2012, 10(1): 41.
- [27] 叶繁翔, 谭佳丽, 何锦艳, 等. 畜禽干扰素- γ 研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2017, 56(16): 45-3001.
- [28] SCHRODER K, HERTZOG P J, RAVASI T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions [J]. *Journal of leukocyte biology*, 2004, 75(2): 89-163.
- [29] ROJAS J M, ALEJO A, MARTIN V, et al. Viral pathogen-induced mechanisms to antagonize mammalian interferon (IFN) signaling pathway [J]. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2021, 78(4): 44-1423.
- [30] GREEN D S, YOUNG H A, VALENCIA J C. Current prospects of type II interferon γ signaling

- and autoimmunity [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2017, 292(34): 33-13925.
- [31] HU J, ROY S K, SHAPIRO P S, et al. ERK1 and ERK2 activate CCAAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2001, 276(1): 97-287.
- [32] GARCÍA M A, GIL J, VENTOSO I, et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action [J]. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 2006, 70(4): 60-1032.
- [33] WILLIAMS B R. PKR; a sentinel kinase for cellular stress [J]. *Oncogene*, 1999, 18(45): 20-6112.
- [34] TALLÓCZY Z, JIANG W, VIRGIN H W T, et al. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(1): 5-190.
- [35] SILVERMAN R H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response [J]. *Journal of virology*, 2007, 81(23): 9-12720.
- [36] SEN G C. Viruses and interferons [J]. *Annual review of microbiology*, 2001, 55: 81-255.
- [37] MUJTABA M G, PATEL C B, PATEL R A, et al. The gamma interferon (IFN-gamma) mimetic peptide IFN-gamma (95-133) prevents encephalomyocarditis virus infection both in tissue culture and in mice [J]. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 2006, 13(8): 52-944.
- [38] BEKISZ J, SATO Y, JOHNSON C, et al. Immunomodulatory effects of interferons in malignancies [J]. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 2013, 33(4): 61-154.
- [39] 马露. 猪白介素-18 和干扰素 γ 在乳酸乳球菌中的表达及生物活性的检测 [D]. 黑龙江: 东北农业大学, 2015.
- [40] ALLEN P M, UNANUE E R. Antigen processing and presentation at a molecular level [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 1987, 225: 54-147.
- [41] HUGHES T R, TENGKU-MUHAMMAD T S, IRVINE S A, et al. A novel role of Sp1 and Sp3 in the interferon-gamma -mediated suppression of macrophage lipoprotein lipase gene transcription [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2002, 277(13): 106-11097.
- [42] FROHMAN E M, FROHMAN T C, DUSTIN M L, et al. The induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on human fetal astrocytes by interferon-gamma, tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin, and interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation [J]. *Journal of neuroimmunology*, 1989, 23(2): 24-117.
- [43] KIM Y M, SON K. A nitric oxide production bioassay for interferon-gamma [J]. *Journal of immunological methods*, 1996, 198(2): 9-203.

- [44] MACMICKING J, XIE Q W, NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function [J]. Annual review of immunology, 1997, 15: 50-323.
- [45] FANG C H, CHENG W F, CHENG Y F, et al. Characterization of tumoricidal activities mediated by a novel immune cell regimen composing interferon-producing killer dendritic cells and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes [J]. BMC cancer, 2024, 24(1): 395.
- [46] DOAN T N, EISEN D P, ROSE M T, et al. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection: A latent-class analysis [J]. PloS one, 2017, 12(11): e0188631.
- [47] MARTIN V, CHIRIACO C, MODICA C, et al. Met inhibition revokes IFN γ -induction of PD-1 ligands in MET-amplified tumours [J]. British journal of cancer, 2019, 120(5): 36-527.
- [48] GARCÍA-TUÑÓN I, RICOTE M, RUIZ A A, et al. Influence of IFN-gamma and its receptors in human breast cancer [J]. BMC cancer, 2007, 7: 158.
- [49] VANDENBROECK K, OPDENAKKER G, GORIS A, et al. Interferon-gamma gene polymorphism-associated risk for multiple sclerosis in Sardinia [J]. Annals of neurology, 1998, 44(5): 2-841.
- [50] LONG J E, HUANG L N, QIN Z Q, et al. IFN-gamma increases efficiency of DNA vaccine in protecting ducks against infection [J]. World journal of gastroenterology, 2005, 11(32): 73-4967.
- [51] JACQUARD A C, NASSAL M, PICHOU D, et al. Effect of a combination of clevudine and emtricitabine with adenovirus-mediated delivery of gamma interferon in the woodchuck model of hepatitis B virus infection [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2004, 48(7): 92-2683.
- [52] GILES A J, HUTCHINSON M N D, SONNEMANN H M, et al. Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy [J]. Journal for immunotherapy of cancer, 2018, 6(1): 51.
- [53] REIJERS I L M, RAO D, VERSLUIS J M, et al. IFN- γ signature enables selection of neoadjuvant treatment in patients with stage III melanoma [J]. The Journal of experimental medicine, 2023, 220(5): e20221952.
- [54] NI L, LU J. Interferon gamma in cancer immunotherapy [J]. Cancer medicine, 2018, 7(9): 16-4509.
- [55] 许金俊. 奶牛 γ -干扰素基因的表达及其在乳房炎防治中的初步应用 [D]. 江苏: 扬州大学, 2004.
- [56] 王凌云. 重组猪 γ 干扰素的制备及其抗塞内卡病毒活性研究 [D]. 新疆: 塔里木大学, 2024.
- [57] KUMAR M, BEHERA A K, MATSUSE H, et al. Intranasal IFN-gamma gene transfer protects BALB/c mice against respiratory syncytial virus infection [J]. Vaccine, 1999, 18(5-6): 67-558.

- [58] 吴建君. 运用干扰素诱生剂结合中西药治疗鸭病毒性肝炎[J]. 四川畜牧兽医, 1997, (04): 37.
- [59] 漆兴桂, 孙鏊国, 颜军, 等. 鸭用干扰素对雏鸭病毒性肝炎的治疗效果观察[J]. 养殖与饲料, 2008, (08): 8-27.
- [60] 许健民, 陈荣真. 几种常见鸭病及其综合防治[J]. 水禽世界, 2006, (01): 7-36.
- [61] 叶秀华, 蔡建平, 吴志光, 等. 重组鸡 γ 干扰素的抗球虫作用[J]. 中国兽医杂志, 2004, (07): 3-5.
- [62] 范蕾. 基于特异性重组受体的牛 IFN- γ 检测的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [63] AGGER E M, ANDERSEN P. Tuberculosis subunit vaccine development: on the role of interferon-gamma [J]. Vaccine, 2001, 19(17-19): 302-2298.
- [64] TARY-LEHMANN M, HRICIK D E, JUSTICE A C, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay spot detection of interferon-gamma and interleukin 5-producing cells as a predictive marker for renal allograft failure [J]. Transplantation, 1998, 66(2): 24-219.
- [65] WALRAVENS K, WELLEMANS V, WEYNANTS V, et al. Analysis of the antigen-specific IFN-gamma producing T-cell subsets in cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis [J]. Veterinary immunology and immunopathology, 2002, 84(1-2): 29-41.
- [66] 姜勇. 猕猴 IFN- γ 基因的克隆表达及其检测方法的建立 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [67] ZHOU H, CHEN S, QI Y, et al. Development and validation of a SYBR Green real-time PCR assay for rapid and quantitative detection of goose interferons and proinflammatory cytokines [J]. Poultry science, 2015, 94(10): 7-2382.
- [68] KRZYSICA P, VERHOOG L, DE VRIES S, et al. Optimization of Capture ELISAs for Chicken Cytokines Using Commercially Available Antibodies [J]. Animals : an open access journal from MDPI, 2022, 12(21): 3040.
- [69] RUIZ-HERNANDEZ R, PEROVAL M, BOYD A, et al. An infected chicken kidney cell co-culture ELISpot for enhanced detection of T cell responses to avian influenza and vaccination [J]. Journal of immunological methods, 2015, 416: 8-40.
- [70] 吕瑶. 抗 HBsAg 鸡卵黄抗体的制备及 HBsAg 夹心 ELISA 检测方法的初步建立 [D]. 四川: 四川农业大学, 2011.
- [71] 黄亚平. 荣昌猪、内江猪干扰素 γ 基因的克隆及原核表达研究 [D]. 四川: 四川农业大学, 2008.
- [72] 龚婷, 杨孝朴, 李银聚, 等. 鸡 IL-2 全基因和去信号肽基因的原核表达[J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(01): 11-44.
- [73] ZHOU H, CHEN S, ZHOU Q, et al. Cross-Species Antiviral Activity of Goose Interferons against Duck Plague Virus Is Related to Its Positive Self-Feedback Regulation and Subsequent Interferon

- Stimulated Genes Induction [J]. *Viruses*, 2016, 8(7): 195.
- [74] VERHELST J, HULPIAU P, SAELENS X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited [J]. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 2013, 77(4): 66-551.
- [75] HALLER O, STAEHELI P, SCHWEMMLE M, et al. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity [J]. *Trends in microbiology*, 2015, 23(3): 63-154.
- [76] 李靖, 董文学, 杨美盼, 等. IFN- γ 研究进展与临床应用[J]. *卫生职业教育*, 2019, 37(23): 9-157.