

分类号：
学 号：20212113042

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



重组猪干扰素 α 和 λ 真核表达纯化及其单克隆抗 体制备

学 位 申 请 人	孙波涛
指 导 教 师	冷青文 副教授 秦晓东 副研究员
申 请 学 位 类 别	专业硕士
专 业 名 称	兽医
研 究 领 域	动物疫病诊断与防控技术
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2023 年 6 月

分类号：
学 号：20212113042

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



重组猪干扰素 α 和 λ 真核表达纯化及其单克隆抗体制备

学 位 申 请 人	孙波涛
指 导 教 师	冷青文 副教授 秦晓东 副研究员
申 请 学 位 类 别	专业硕士
专 业 名 称	兽医
研 究 领 域	动物疫病诊断与防控技术
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2023 年 6 月

**Eukaryotic expression and purification of recombinant porcine
interferon- α and λ and preparation of their monoclonal antibodies**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Veterinary

By

Sun Botao

(Veterinary)

Dissertation Supervisor: **A. Prof. Leng Qingwen;**

A. Researcher. Qin Xiaodong.

Jun, 2023

Shihezi, Xinjiang, China

摘要

目的:

非洲猪瘟病毒严重影响了我国生猪安全,而干扰素发挥的抗病毒作用对抑制非洲猪瘟感染至关重要。干扰素(Interferon, IFN)在抗病毒、抑制肿瘤和免疫调节等方面发挥着重要作用。干扰素 α (IFN- α)作为 I 型 IFN 的一种,主要参与抗病毒免疫过程;干扰素 λ (IFN- λ)是 III 型 IFN,其对抗病毒免疫反应的作用仅限于暴露和感染风险较高的上皮组织,在粘膜感染中。而且通过仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary, CHO)表达系统表达的重组蛋白,它的分子结构和生物学功能与天然蛋白分子最相似,同时具备外源性蛋白表达量较高等优势。单克隆抗体在免疫分析领域发挥着重要作用,极大提升了免疫学检测的特异性和灵敏度。本研究拟构建猪源 IFN 重组质粒并通过 CHO 表达系统进行高效表达,从而制备灵敏度高、特异性强的单克隆抗体,为在以后的研究中更好地建立不同 IFN 分子的检测方法以及建立研究猪病毒感染和免疫过程中不同细胞因子的分泌情况的关键技术平台奠定基础。

方法:

(1) 构建猪源重组干扰素(rPoIFN)质粒:提取猪外周血淋巴细胞总 RNA 并反转录为 cDNA,以 GenBank 中目的基因的序列(GenBank 登录号: α : NM_214393.1; λ : NM_001142837.1)为模板设计引物,聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)扩增目的基因 PoIFN- α 和 PoIFN- λ ,将 pcDNA3.1 真核表达载体通过 Hind III 和 Xho I 双酶切后回收纯化,通过 T4 连接酶连接目的基因与载体得到重组质粒并测序。(2) CHO 表达纯化 IFN 蛋白;参照 ExpiCHO™ 表达系统操作说明进行复苏、传代、转染和收集纯化,并对纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定。(3) 单克隆抗体制备:蛋白乳化免疫小鼠,检测阳性血清效价后将脾细胞与 SP2/0 细胞进行融合并建立间接酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)筛选所需的阳性杂交瘤细胞,亚克隆扩大培养后制备腹水得到单克隆抗体,纯化制备的抗体并进行鉴定。(4) 通过免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)技术检测猪不同部位 IFN 分子的产生与分布情况。

结果:

(1) 扩增出 PoIFN- α 和 PoIFN- λ 两条特异性条带,大小分别为 612 bp 和 630 bp;经过 T4 连接酶连接成功构建出重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- α 和 pcDNA3.1-PoIFN- λ 。(2) 通过 CHO 真核表达系统成功表达并纯化出正确大小的可溶性蛋白,IFN- α 大小为 20 kDa 左右、浓度为 1.2 mg/mL,IFN- λ 大小为 25 kDa 左右、浓度为 0.86 mg/mL。(3) 血清效价检测符合细胞融合要求;建立间接 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤,通过间接 ELISA 筛选和 5 次亚克隆 IFN- α 得到一株能稳定分泌抗 IFN- α 蛋白的单克隆细胞株(3c6)、IFN- λ 得到一株能稳定分泌抗 IFN- λ 蛋白的单克隆细胞株(3e8);亚型鉴定二者均为 IgG1 亚型、IgG κ 轻链;Western-blot 显示抗体可以特异识别 IFN- α 与 IFN- λ ,抗体纯化后 IFN- α 效价检测可达 1:256000、IFN- λ 效价检测可达 1:32000。(4) IHC 可知在脾脏中可见广泛 IFN 阳性细胞,且红脾区较多,白脾区、脾小体等相对较少,肝脏中阳性细胞主要集中于中央静脉周围。

结论:

(1) 成功构建出猪源干扰素重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- α 和 pcDNA3.1-PoIFN- λ 。(2) 成功表达并纯化出正确大小的可溶性蛋白,且重组蛋白纯度好、浓度高。(3) 成功制备出 rPoIFN- α 和 rPoIFN- λ 的单克隆抗体,且抗体灵敏度高、特异性强。(4) 利用制备的单抗成功在 ASFV 攻毒猪脏器组织中特异性检测到组织中产生的 IFN- α 与 IFN- λ 阳性细胞以及二者在肝脏和脾脏组织中的分布状态。

关键词：干扰素；真核表达；蛋白纯化；单克隆抗体

Abstract

Object:

African swine fever virus has seriously affected the safety of Chinese pigs, and the antiviral function of interferon is very important to inhibit the infection of African swine fever. Interferon (IFN) plays an important role in antiviral, tumor inhibition and immune regulation. Interferon alpha (IFN- α), as a type I IFN, is mainly involved in the antiviral immune process. Interferon λ (IFN- λ) is type III IFN whose effect against the viral immune response is limited to epithelial tissues at higher risk of exposure and infection, in mucosal infections. Moreover, the recombinant proteins expressed through the expression system of Chinese Hamster Ovary (CHO) show that their molecular structure and biological function are most similar to those of natural proteins, and at the same time they have the advantages of high exogenous protein expression. Monoclonal antibodies play an important role in the field of immunoassay, greatly improving the specificity and sensitivity of immunological detection. This study intends to construct porcine IFN recombinant plasmid and express it efficiently through CHO expression system, so as to prepare monoclonal antibodies with high sensitivity and specificity, which will lay a foundation for future studies to better establish detection methods for different IFN molecules and establish a key technical platform to study the secretion of different cytokines in the process of porcine virus infection and immunity.

Methods:

(1) Construction of recombinant pig interferon (rPoIFN) plasmid: Total RNA was extracted from pig peripheral blood lymphocytes and reverse transcribed into cDNA. Primers were designed based on the sequence of the target gene in GenBank (α : NM_214393.1; λ : NM_001142837.1), and the PoIFN- α and PoIFN- λ genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The pcDNA3.1 eukaryotic expression vector was digested with enzymes of Hind III and Xho I, purified, and then connected by T4 ligase to obtain the recombinant plasmid, which was then sequenced. (2) CHO cell expression and purification of IFN protein: Following the instructions of the ExpiCHOTM expression system, the cells were revived, passaged, transfected, and the protein was collected and purified. The purified protein was then identified by SDS-PAGE and Western-blot. (3) Preparation of monoclonal antibody: immunize mice with protein emulsion, detect the titer of positive serum after three times of immunization, fuse spleen cells with SP2/0 cells, establish an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to screen the required positive hybridoma cells, prepare ascites after subclone expansion culture to obtain monoclonal antibody, purify the prepared antibody and appraisal it. (4) The production and distribution of IFN molecules in different parts of pigs were detected by immunohistochemistry (IHC) technique.

Results:

(1) Specific bands of PoIFN- α and PoIFN- λ were amplified by PCR, with sizes of 612 bp and 630 bp, respectively. Recombinant plasmids pcDNA3.1-PoIFN- α and pcDNA3.1-PoIFN- λ were successfully constructed by T4 ligase. (2) The correctly sized soluble proteins were successfully expressed and purified using the CHO eukaryotic expression system. The size of IFN- α was 20 kDa with a concentration of 1.2 mg/mL, and the size of IFN- λ was 25 kDa with a concentration of 0.86 mg/mL. (3) Serum titer detection met the requirements of cell fusion. A single clone cell line (3c6) stably secreting anti-IFN- α protein and another single clone cell line (3e8) stably secreting anti-IFN- λ protein were obtained by indirect ELISA

screening and 5 rounds of subcloning for both isotypes, which were identified as IgG1 subtype and IgG κ light chain. Western-blotting experiments showed that the antibodies could specifically recognize IFN- α and IFN- λ , and the purified antibodies had an IFN- α titer of 1:256000 and an IFN- λ titer of 1:32000. (4) IHC revealed a widespread presence of IFN-positive cells in the spleen, with more in the red pulp than in the white pulp and marginal zone. Positive cells in the liver were mainly concentrated around the central veins.

Conclusion:

(1) Recombinant plasmids pcDNA3.1-PoIFN- α and pcDNA3.1-PoIFN- λ of porcine interferons were successfully constructed. (2) Soluble recombinant proteins of correct size were successfully expressed and purified, with high purity and concentration. (3) Monoclonal antibodies against rPoIFN- α and rPoIFN- λ were successfully prepared, with high sensitivity and specificity. (4) IFN- α and IFN- λ positive cells and their distribution in liver and spleen tissues were detected in ASFV-challenged pigs by using the monoclonal antibodies.

Key words: Interferon; Eukaryotic expression; Protein purification; Monoclonal antibody

目 录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 干扰素.....	1
1.1.1 干扰素简介.....	1
1.1.2 干扰素的分类.....	1
1.1.3 干扰素的生物学功能.....	2
1.1.4 I 型和 III 型干扰素的部分共同点和特异性.....	9
1.1.5 干扰素的临床应用.....	10
1.2 表达系统.....	11
1.2.1 原核表达系统.....	12
1.2.2 真核表达系统.....	12
1.3 抗体.....	13
1.3.1 多克隆抗体.....	14
1.3.2 单克隆抗体.....	14
1.4 酶联免疫吸附试验-ELISA.....	16
1.5 免疫组织化学 IHC.....	17
第 2 章 重组猪干扰素质粒的构建.....	18
2.1 实验材料.....	18
2.2 实验方案.....	18
2.2.1 猪外周血淋巴细胞分离和诱导培养.....	18
2.2.2 猪外周血淋巴细胞总 RNA 提取.....	18
2.2.3 设计引物,PCR 扩增目的片段.....	19
2.2.4 PCR 产物的回收与纯化.....	19
2.2.5 对载体质粒双酶切并对产物进行回收纯化.....	20
2.2.6 连接与转化.....	20
2.2.7 小量提取质粒并鉴定.....	20
2.2.8 转化后大量提取质粒.....	21
2.3 结果与分析.....	22
2.3.1 信号肽与跨膜区预测分析.....	22
2.3.2 目的片段 PCR 扩增鉴定.....	23
2.3.3 重组质粒酶切鉴定.....	24
2.3.4 重组质粒图谱.....	25
2.4 讨论.....	25
第 3 章 重组猪干扰素蛋白的表达与纯化.....	27
3.1 实验材料.....	27

3.2 实验方案.....	27
3.2.1 通过 Expi CHO™ 系统对重组质粒进行表达(参考 Thermo Fisher 的 Expi CHO™ 表达系统操作手册).....	27
3.2.2 蛋白纯化与鉴定.....	29
3.3 结果与分析.....	30
3.3.1 重组表达 IFN- α 和 IFN- λ 蛋白纯化后 SDS-PAGE 鉴定.....	30
3.3.2 重组表达 IFN- α 和 IFN- λ 蛋白纯化后 Western-blot 鉴定.....	31
3.4 讨论.....	31
第 4 章 重组猪干扰素单克隆抗体的制备.....	32
4.1 实验材料.....	32
4.2 实验方案.....	32
4.2.1 BALB/c 小鼠免疫.....	32
4.2.2 小鼠加强免疫前血清效价检测.....	33
4.2.3 细胞融合.....	33
4.2.4 亚克隆间接 ELISA 检测方法的建立.....	35
4.2.5 筛选阳性杂交瘤并亚克隆扩大培养.....	36
4.2.6 杂交瘤细胞的冻存与复苏.....	36
4.2.7 腹水的制备与纯化.....	36
4.2.8 单克隆抗体特异性鉴定.....	37
4.2.9 单克隆抗体效价检测与亚型鉴定.....	37
4.3 结果与分析.....	37
4.3.1 小鼠加强免疫前血清效价检测.....	37
4.3.2 间接 ELISA 检测方法建立.....	37
4.3.3 阳性杂交瘤细胞的筛选.....	37
4.3.4 腹水纯化.....	38
4.3.5 Western-blot 检测.....	38
4.3.6 间接 ELISA 检测.....	39
4.3.7 抗体效价与亚型鉴定.....	39
4.4 讨论.....	40
第 5 章 免疫组织化学 IHC 检测单克隆抗体.....	41
5.1 实验材料.....	41
5.2 实验方案.....	41
5.2.1 取材.....	41
5.2.2 脱水过程.....	42
5.2.3 透明.....	42
5.2.4 浸蜡.....	42
5.2.5 包埋.....	42

5.2.6 切片	43
5.2.7 脱蜡	43
5.2.8 过梯度酒精	43
5.2.9 洗涤	43
5.2.10 抗原修复并洗涤	43
5.2.11 消除过氧化物酶并洗涤	43
5.2.12 添加非特异染色阻断剂	44
5.2.13 加一抗并洗涤	44
5.2.14 加生物素标记物	44
5.2.15 加链霉菌抗生物素蛋白	44
5.2.16 显色	44
5.2.17 苏木素染色	44
5.2.18 脱水	44
5.2.19 封片	45
5.3 结果与分析	45
5.3.1 IFN- α 抗体 IHC 结果分析	45
5.3.2 IFN- λ 抗体 IHC 结果分析	46
5.4 讨论	47
第 6 章 全文结论	49
参考文献	50
附录	59

主要缩写词

英文缩写	英文名称	中文名称
IFN	Interferon	干扰素
CHO	Chinese hamster ovary cell	中国仓鼠卵巢细胞
HCV	Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
HTNV	Hantaan virus	汉坦病毒
HBV	Hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
EMCV	Encephalomyocarditis virus	脑心肌炎病毒
VSV	Vesicular Stomatitis Virus	水疱性口炎病毒
IAV	Influenza A virus	甲型流感病毒
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
PKR	Double-stranded RNA-dependent protein kinase	双链 RNA 依赖蛋白质激酶
ISGs	IFN stimulated genes	干扰素刺激基因
EP	Eppendorf	离心管
SFM	Serum-Free Media	无血清培养基
bp	Base pair	碱基对
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	脱氧核糖核酸
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光实验
mg	milligram	毫克
min	minute	分钟
ml	milliliter	毫升
OD	Optical density	光密度值
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链式反应
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
IHC	Immunohistochemistry	组织免疫化学

第1章 绪论

1.1 干扰素

1.1.1 干扰素简介

刺激机体免疫细胞和某些非免疫细胞后合成、分泌的分子量一般不超过 60 kDa 的一种小分子量蛋白质，被称为细胞因子，多数由 100 个左右的氨基酸组成，可以分为白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子等，其生物学功能包括调控炎症反应、参与免疫反应和抗病毒反应等^[1]。近年来关于细胞因子调控宿主与病原互作机制的研究成为分子生物学研究的热点^[2]。

干扰素 (Interferon, IFN) 是 II 类细胞因子家族的一部分，该家族还包括白细胞介素-10(IL-10)相关的细胞因子(IL-10、IL-19、IL-20、IL-22、IL-24 和 IL-26)，IFN 有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等生物学功能^[3]。1957 年 Issacs 和 Lindenmann 通过在使用鸡胚绒毛尿囊研究流感病毒时，将灭活的流感病毒和鸡胚绒毛尿囊膜组织块一起培养，在合适的条件下去除组织块，然后添加新鲜的组织块过夜培养后进行攻毒，可以发现流感病毒的繁殖明显被抑制^[1]。这说明细胞产生了一种可以抑制病毒繁殖的活性物质，由于该类活性物质在阻碍同源和异源病毒的繁殖方面具有重要作用，因此被赋予了“干扰素”的名称^[1]。1958 年，Nagano 和 Kojima 发表了与此相关的研究，自此干扰素的研究进入了热潮时期^[4]。

1.1.2 干扰素的分类

根据分子结构、抗原特性、受体、产生细胞以及氨基酸序列等差异将 IFN 分为 I 型、II 型和 III 型三个类型，其中 I 型 IFN 包括 IFN- α 、IFN- β 等多个亚型，无内含子，主要参与抗病毒免疫过程。I 型 IFN 目前研究较为透彻且广泛的为 α 和 β ；IFN- α 亚型多达 20 多种，但目前了解比较详细的有约 13 种，其相对分子质量多在 19×10^3 至 26×10^3 之间，由 160 个左右的氨基酸组成^[5]。成纤维细胞是 IFN- β 的主要来源，属于糖蛋白，大小在 166 个氨基酸左右，发挥其生物学活性所必需的二硫键在 Cys31/141 之间，与 IFN- α 同源性较高，在 DNA 水平有 30%，两者结合于同一 IFN 受体^[5]。II 型 IFN，仅有一个亚型 IFN- γ ，为单基因编码，抗病毒活性不如 I 型 IFN，但免疫调节及抗肿瘤活

性高于 I 型 IFN^[6]，主要由 T 细胞和 NK 细胞刺激所产生，多由 143 个氨基酸组成，与 I 型干扰素没有显著的同源性^[5]。III 型 IFN，也称为 IFN-λ，主要分为 IFN-λ₁、IFN-λ₂、IFN-λ₃ 等几种亚型^[7]，也分别称为 IL-29、IL-28A 和 IL28B^[8]，与 I 型 IFN 一样，主要参与抗病毒过程，但其靶细胞受限，到目前为止，已报道在体外细胞系中人类免疫缺陷病毒（HIV）-1、乙型肝炎病毒（HBV）等病毒的活性能被 IFN-λ 抑制。在体内，IFN-λ 可以抑制甲型流感病毒（IAV）、乙型肝炎病毒（HBV）等病毒的活性，所以抗病毒谱不如 I 型 IFN 广泛^[7]，但是在黏膜免疫中作用显著，各亚型的信号传递都是通过同一组受体系统完成的^[5]。

1.1.3 干扰素的生物学功能

干扰素是由病毒或者其他种类的 IFN 诱生剂（如不同种类细菌或化学合成物等），刺激巨噬细胞、淋巴细胞和体细胞等产生的一类糖蛋白。它可以转录细胞内多种功能基因，同时还可以调节控制多种信号通路的协同，IFN 的基本特征如图 1-1^[9]所示。IFN 与细胞表面特异性受体结合继而诱使细胞表达大量 IFN 调节蛋白，从而发挥其生物学功能，图 1-2^[10]所示为 I 型和 III 型 IFN 的产生过程。IFNs 的生物学功能主要包括抗病毒、抑制肿瘤和免疫调节等。

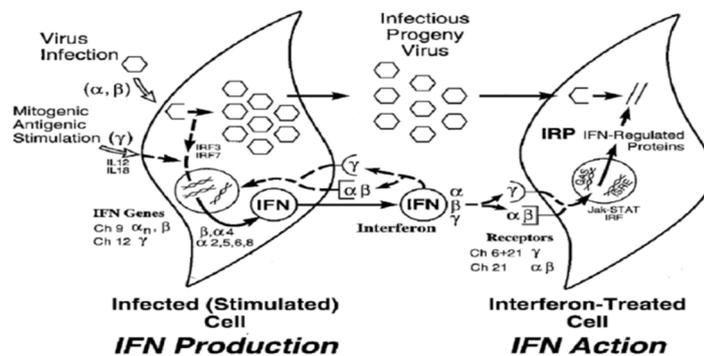


图 1-1 IFN 基本特征概要图^[9]

Figure.1-1 Summary diagram of IFN basic characteristics^[9]

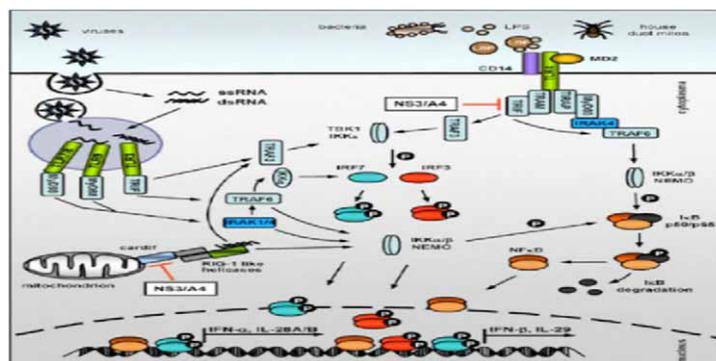


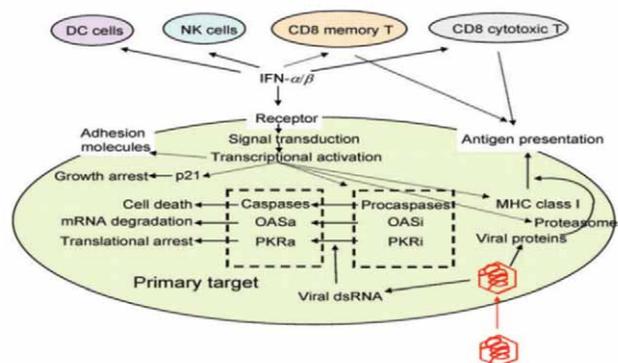
图 1-2 I 型和 III 型 IFN 的产生^[10]

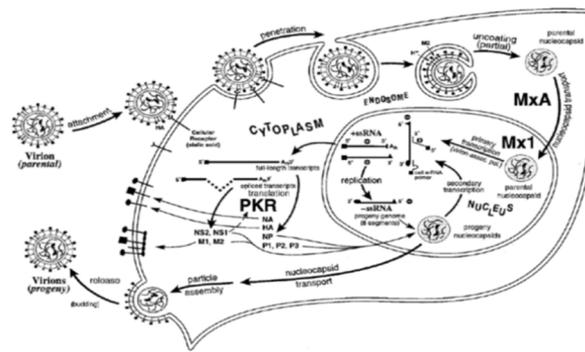
Figure.1-2 Generation of type I and type III IFN^[10]

1.1.3.1 干扰素的抗病毒作用

IFN 并不会直接干扰病毒复制,而是通过受体介导的信号转导引发特异的生化反应,从而诱导效应分子表达最终达到干扰病毒复制的目的。I 型 IFN 在 IFNs 中主要发挥抗病毒作用,是病毒感染过程中第一批产生的细胞因子中的一类,它的早期产生在被感染的细胞内诱导抗病毒反应以及激活天然免疫细胞过程十分重要^[11]。它能够通过激活经典的 JAK-STAT 信号通路诱导多种 IFN 刺激基因(Interferon-stimulated genes, ISGs)的表达。ISGs 是抗病毒作用中发挥直接效应的蛋白,不同的 ISGs 能够根据病毒不同阶段特点针对性地通过利用不同机制发挥作用,比如病毒的入侵、脱壳、基因转录、蛋白翻译和颗粒释放等。用 IFN- α/β 处理细胞可以上调数百个基因的表达,结合起来,这些基因可指定抗病毒状态,如图 1-3 所示^[12]。抗病毒过程中不存在某个关键的单独基因,对于任何给定的病毒,都可能需要一个基因子集来限制病毒的复制。其中一些上调基因编码的 ISGs 已得到深入研究和全面审查,例如 dsRNA 依赖性蛋白激酶 R (PKR)、寡腺苷酸合成酶(OAS)以及 ISG15、ISG54、ISG56 等^[13]和 Mx 蛋白等^[14]。

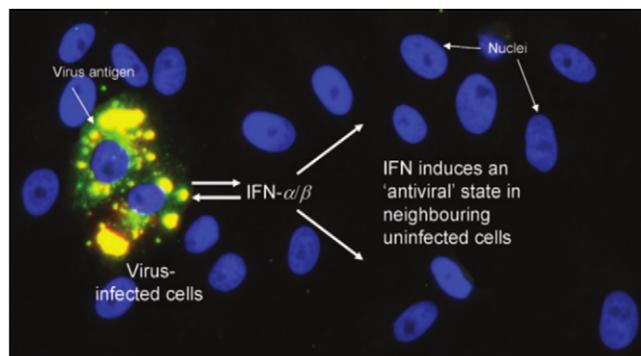
ISG 抑制病毒入侵:以 MX 蛋白为例,Mx 蛋白通过识别核衣壳样结构并限制其在细胞内的定位来发挥作用,从而限制病毒的复制。Mx 蛋白是广谱抗病毒活性蛋白,除了能明显抑制 RNA 病毒的病毒活性,还能显著降低大型胞质 DNA 病毒的复制效率,比如非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)等^[15]。Mx 蛋白属于人类细胞,分为 Mx1 和 Mx2,具备不同的生物学功能。Mx1 能够与病毒衣壳结合从而在细胞外阻碍病毒入侵;Mx2 能阻碍人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)侵袭细胞核,进而阻止反转录基因组入核,阻断 HIV 的复制,如图 1-4^[9],例举了流感病毒复制及被 Mx 和 PKR 抑制的机理。IFITM 蛋白家族有其余成员在抑制病毒入侵过程中也发挥作用,但 IFITM 蛋白呈现出选择性抑制病毒,比如:IFITM 1 可以抑制丙肝病毒感染,但 IFITM3 不能^[16]。

图 1-3 IFN α/β 的生物学特性^[12]Figure.1-3 Biological characteristics of IFN α/β ^[12]

图 1-4 流感病毒复制及被 Mx 和 PKR 抑制机理^[9]Figure.1-4: Mechanism of influenza virus replication and inhibition by Mx and PKR^[9]

ISG 阻碍病毒蛋白合成：病毒通过宿主核糖体翻译蛋白从而合成多种不同的蛋白，保证了正常的生命活动的维持。以 PKR 为例，PKR 以非活性形式合成，并对病毒复制过程中产生的辅因子 dsRNA 作出反应，经历二聚和激活。除了通过 dsRNA 激活外，PKR 还被一种称为蛋白激酶 R (PKR)-激活蛋白 (PACT) 的应激激活蛋白激活^[17]。蛋白激酶 PKR 识别病毒双链或中间体 RNA 后会磷酸化翻译起始因子 2 α 亚单位 (eIF2 α)，导致病毒蛋白合成被阻断，导致病毒复制被抑制。IFN 诱导的 TRIM22 阻碍病毒复制的方式是降解 HCV 非结构蛋白 NS5A 或者降低 HBV 的基因转录水平^[18]。IFN 诱导的 TRIM22 阻碍病毒复制的方式是降解 HCV 非结构蛋白 NS5A，也可以通过降低 HBV 的基因转录水平来抑制病毒蛋白合成及病毒复制^[19]，这表明 ISG 蛋白能够阻断病毒复制主要是通过抑制蛋白质合成来实现。

如图 1-5 简介了 IFN- α/β 系统的激活^[12]，分泌 IFN- α/β 的细胞有模式识别受体 (PRRs) 来检测与感染相关的分子；这些分子包括病毒核酸，如 dsRNA 等。这些 PRRs 一旦被合适的配体刺激，就会激活细胞内信号级联，导致 IFN- α/β 基因的转录；分泌后 IFN- α/β 就会结合到邻近未感染细胞 (以及初始感染细胞) 上的相应受体，并激活细胞内信号级联，导致数百个 IFN- α/β 响应基因上调，其中很多都具有抗病毒作用，抗病毒状态下的细胞对于病毒在胞内的复制具有很好的抑制作用。

图 1-5 IFN- α/β 系统概述^[12]Figure.1-5 System overview of IFN- α/β ^[12]

干扰素无法直接抑制病毒本身，其发挥相关生物学作用主要途径是作用于相关靶细胞上的受体。IFN- λ 受体是一种单一异源二聚体复合物，由 IFNLR1 信号链和 IL-10R- β 辅助链组成^[20]。IFN- λ 首先结合的是 IFN LR1 链，并且二者结合形成的二元复合物会快速使构象发生变化，继而促进第二个受体链 IL-10R- β 募集到 IFN LR1 链上，如图 1-6^[21] 所示简述了 I 型 IFN 及 IFN- λ 激活的 JAK-STAT 信号通路。因为 IFN LR1 的表达主要是在黏膜上皮细胞中，所以 IFN- λ 产生的特异的抗病毒反应主要集中在黏膜屏障位点，从而避免了全身促炎性免疫反应的产生。I 型和 III 型 IFN 在抗病毒感染功能极其相似但也有不同，I 型 IFN 几乎对能使所有有核细胞都对其产生反应，然而 III 型 IFNs 仅局限于在病毒侵袭和感染的上皮组织中产生反应，比如肠道、呼吸道等粘膜的表面。因此在粘膜感染中，IFN- λ 是最佳的抗病毒制剂。III 型干扰素同样不会直接发挥抗病毒作用，它在利用 JAK-STAT 信号通路的基础上，大量激活表达下游 ISGs，表达后的 ISGs 通过各种不同的机制对抗病毒感染，比如提高 MxA、OAS 和 ISG15 等的表达。

比如在 ISGs 中，OAS 通过合成 2'-5'寡腺苷酸在抗病毒免疫中起关键作用^[22]。由于结构域数量和寡聚化水平不同 OAS 也有多个类型。比如 OASL 蛋白，在病毒感染后 OASL 蛋白通过 C 端泛素化可以快速激活 RIG-I 信号通路，大大提升提高机体免疫力，高效抑制病毒的繁殖与复制^[23]。



图 1-6 I 型 IFN 及 IFN- λ 激活的 JAK- STAT 信号通路^[21]

Figure.1-6 JAK - STAT signal pathway activated by type I IFN and IFN- λ ^[21]

1.1.3.2 干扰素的抗肿瘤作用

最初人们对 IFN 的描述主要关注于其抗病毒功能，但后来研究发现所有类型的 IFN 在体内促进抗肿瘤功能方面都显示出相当大的潜力^[24, 25]。1967 年，Gresser 等人首次报告 IFN 制剂的重复给药延缓了小鼠白血病的演变；第二年，他在 Rauscher 白血病中获得了类似的结果；后来，他们发现小鼠 IFN 制剂显著延长了植入肿瘤细胞病毒颗粒的小鼠的存活时间^[26]；然后纯化 IFN 并用于临床试验，随后的结果进一步证实了其在多种血液恶性肿瘤和转移性实体瘤中的持续抗肿瘤作用。本文主要从以下四点介绍 IFN 的抗肿瘤作用。

IFN 抑制肿瘤细胞增殖

恶性肿瘤的无限增殖是通过解除对正常生长信号的调控而实现的^[27]。1978年, Balkwill 等人发现 IFN-I 制剂治疗可以延长乳腺癌细胞周期的所有阶段; 自此以后, 又有许多研究小组研究证实, IFN 可以通过阻断不同细胞周期阶段从而延长肿瘤细胞周期, 达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。例如, IFN 在淋巴瘤中显示为 G0 期/G1 期阻滞, 以阻止淋巴瘤细胞进展到 S 期; 此外, IFN 还通过抑制端粒酶的活性来抑制癌细胞的增殖, 如经 IFN- α 处理的 Daudi-Burkitt 淋巴瘤细胞表现出由端粒酶活性抑制介导的 G1 期细胞周期阻滞, 经 72 小时 IFN- α 处理后, G1 期细胞的端粒酶活性显著降低, 而 S 期和 G2 期细胞仍具有端粒酶活性, 表明 IFN- α 以细胞周期依赖的方式抑制端粒酶活性^[28]。

IFN 促进肿瘤细胞凋亡

IFN 可通过外源性和内源性凋亡途径减轻肿瘤细胞的抗凋亡作用。以外源性凋亡途径为例, 细胞外配体的参与, 例如 TNF 相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 和 Fas, 可以通过与细胞表面受体结合来激活启动蛋白 caspase-8 和 caspase-10^[29]。以及在黑色素瘤或骨髓瘤细胞中, IFN 诱导的凋亡可被 TRAIL 中和抗体或 DR5 (TRAIL 受体) 抗体抑制^[30], 表明 IFN 诱导的凋亡可通过 TRAIL 实现。

IFN 抑制肿瘤血管生成

新生血管为肿瘤的持续生长提供了必需的氧气和丰富的营养, 已证实累积的内皮祖细胞 (EPCs) 通过分化为肿瘤血管增加肿瘤血供和肿瘤体积^[31]。有趣的是, IFN- β 治疗抵消了内皮祖细胞的肿瘤进展特征和肿瘤体积。其机制可能是 IFN 抑制血管内皮生长因子 (VEGF), VEGF 是一种有效的血管生成细胞因子^[32]。IFN 可降低小鼠和患者 VEGFA 基因的转录和翻译^[33], 通过下调 VEGF, IFN- β 直接抑制血管生成, 间接改变肿瘤微循环和间质压力, 调节血管生成分子向内皮细胞的扩散^[34]。

IFN 抑制肿瘤转移

研究中发现, 在高转移性肝癌模型中, IFN- α 显著抑制培养的肿瘤内皮细胞中 VE 钙粘蛋白的细胞-细胞接触分布和乙酰化低密度脂蛋白的摄取, 表明 IFN- α 可以抑制肿瘤内皮细胞的血友病粘附^[35]。此外, 将 IFN- β 脂转染到黑色素瘤细胞后, 细胞外基质 (ECM) 蛋白质的粘附和肿瘤细胞的迁移均显著减少^[36], 表明 IFN- β 可能通过降低细胞外基质 (ECM) 的粘附来抑制肿瘤转移。

如图 1-7 所示, 简介了 I 型 IFN 在抗肿瘤反应中的积极作用^[37]。

a 可以看到 IFN 通过下调一些促进细胞增殖的原癌基因的表达、上调抑癌基因的表达、降低细胞周期蛋白和 cdk 的表达以及抑制端粒酶的过度激活来抑制肿瘤细胞增殖。

b 所示为 IFN 通过外源和内源途径促进肿瘤细胞凋亡。在外源性凋亡途径中,

IFN 上调 TRAIL 和 Fas 的表达。在内源性途径中, IFN 促进细胞色素 c 和 SMAC 的释放, 抑制 XIAP。

c 是 IFN 通过减少内皮生长因子 VEGF 和 bFGF 的产生以及增加血管生成抑制 ISG 的转录来抑制肿瘤血管生成。

d 是 IFN 通过降低细胞间粘附和细胞外基质粘附来抑制肿瘤转移。

e 可以看出 IFN 通过直接上调肿瘤抗原的表达、增强 $CD8\alpha+$ 树突状细胞向 $CD8+T$ 细胞交叉递呈抗原的能力、增强多种免疫细胞的杀瘤活性、调节细胞因子分泌和减少 Tregs 和 MDSCs 介导的免疫抑制来触发多种抗肿瘤免疫反应。

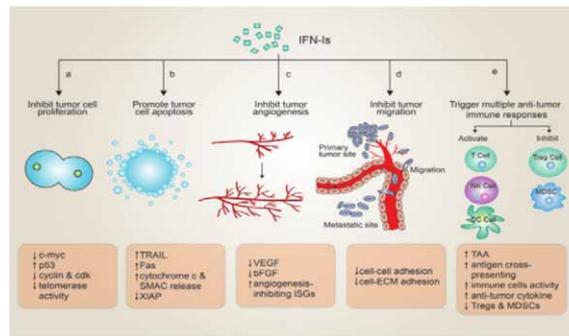


图 1-7 I 型 IFN 在抗肿瘤反应中的积极作用^[37]

Figure.1-7 Positive role of type I IFN in anti-tumor response^[37]

1.1.3.3 干扰素的免疫调节作用

在 I 型 IFN 中, 各种亚型的组织表达方式各有不同, 尽管它们结合并发出信号的方式都是类似的^[38], 但它们结合亲和力差别很多, 从而产生的抗病毒、免疫调节等结果大相径庭^[39]。研究证明, IFN- β 与 IFNAR1 的受体结合亲和力大概是 IFN- α 的 50 倍^[40], 从而能产生更有效的抗增殖作用, 且可能具有独特的免疫调节作用^[39]。研究发现, 只有 IFN- β 刺激能够实现 IFNAR1 和 IFNAR2 亚单位的共同免疫沉淀^[41]。此外, IFNAR2 亚单位结合 I 型 IFN 的亲和力相对高于 IFNAR1, 但 IFNAR1 对于信号转导来说是必需的^[42]。I 型 IFN 触发的免疫调节作用可作用于先天性和适应性免疫^[43]。IFN α/β 对于 IL-10 的分泌和 PD-L1 的表达能起到有效的诱导调节作用^[44,45]。研究表明缺乏以其在次级淋巴器官中的独特分布和激发 $CD8+T$ 细胞的抗原处理能力而闻名的 $CD169+$ 巨噬细胞群, 会损害病毒控制、IFN- α 的产生, 并最终导致小鼠死亡, 从而证实 I 型 IFN 对巨噬细胞和 $CD8+$ 反应的调节功能^[45]。

III 型 IFN 中, 以 IFN- λ 为例, 一项研究发现, 在体外和体内观察到的抗病毒活性之间存在差异, 表明 III 型 IFN 确实具有免疫调节特性^[46], 主要从 IFN- λ 对以下两种细胞产生的影响进行探讨。

中性粒细胞: 中性粒细胞作为免疫系统的首道防线, 在受到病原体入侵或组

织损伤使会被大量招募到屏障部位,通过快速释放毒性介质来杀死入侵的病原体^[47]。在后期,中性粒细胞被动调节炎症反应的方式是凋亡和关闭其毒性潜能,还能通过分泌抗炎细胞因子等主动调节炎症反应^[48]。与淋巴细胞相比,人类中性粒细胞表达 IFNLR1 的水平更高^[49],并在用促炎剂(如 LPS)治疗后^[50]或接触烟曲霉后上调其表达。除此之外,受到 IFN- λ 刺激后小鼠和人类中性粒细胞也会对此作出反应,并激活典型的 JAK-STAT 通路,导致 STAT1、STAT2 和 STAT3 发生磷酸化^[49, 50],并诱导 ISG 水平上调^[50]。最近的一项研究指出,受到 IFN- λ 刺激后,真菌感染期间中性粒细胞也可以起到保护宿主的功能^[49]。还有研究表明,IFN- λ 对中性粒细胞的抑制活性可用于治疗:事实上,IFN- λ 给药对流感病毒肺部感染、DSS 结肠炎^[50]和类风湿性关节炎或血管损伤小鼠模型^[51]等炎症环境具有保护作用。

树突状细胞:在早期报告种表明,当 IFN- λ 刺激树突状细胞时,它们能促进 FOXP3+Treg 的增殖并起到表型调节的作用^[52],因此,T 细胞反应可以在体外向 Th1 表型倾斜^[53]。近期研究发现,常规小鼠 DC 和人浆细胞样 DC (PDC) 表达低水平的 IFNLR1,但对 IFN- λ 刺激有反应。在小鼠中,来自肺的树突状细胞表达低水平的 IFNLR1^[54]。尽管表达水平较低,但树突状细胞在适应性免疫和先天性免疫之间的交叉点的中心作用使其对 IFN- λ 的反应非常显著。结合前期与近期的研究综述,人类 PDC 在 IFN- λ 生物学中起着重要作用。人 PDC 表达 IFNLR1,能够产生 IFN- λ ^[55]并对其作出反应。当用 IFN- λ 刺激时,它们诱导典型的 JAK-STAT 途径^[56, 57],并上调 ISG 转录^[56-58]。

图 1-8 简述了 III 型 IFN 的免疫调节功能^[59],其中,×=IFN λ s 表示不能直接作用于这种细胞;“?”表示路径未完全确认;绿色表示促进,红色表示抑制。

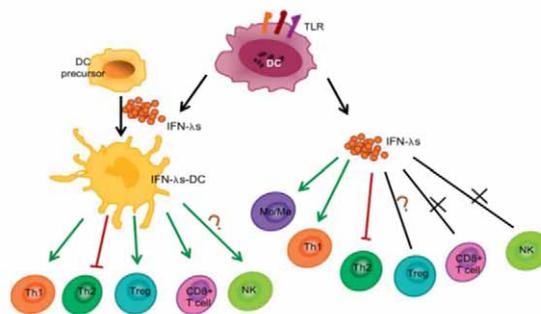


图 1-8 III 型干扰素的免疫调节功能^[59]

Figure.1-8 Immunomodulatory function of type III interferon^[59]

1.1.4 I型和III型干扰素的部分共同点和特异性

信号传导方面：I型和III型干扰素均通过 JAK-STAT 途径，激活异源二聚体驱动，并与 IRF9 一起组成干扰素刺激基因因子 3 (ISGF3)。激活的 ISGF3 转移至细胞核后与 ISG 上游启动子的 IFN 刺激反应元件 (ISRE) 结合，该元件编码通过多种机制发挥作用的蛋白质，以限制病毒感染^[19]，所有 I 型干扰素信号的发出都是通过异二聚体受体 IFNAR 完成的，主要是通过结合受体的两个亚单位：IFNAR1 和 IFNAR2。首先 I 型干扰素以较高的亲和力结合 IFNAR2，然后与亲和力较低的 IFNAR1 结合，形成三元复合物行使信号传导能力；所有 III 型干扰素都通过共享的异二聚体受体 IFNLR 发出信号，IFNLR 由 IFNLR1(也称为 IL28R α) 和 IL10R β 组成。IFN- λ 以高亲和力结合 IFNLR1，然后招募低亲和力 IL10R β (与其他 IL-10 家族细胞因子共享) 以创建具有信号活性的三元复合物；与 I 型干扰素 (干扰素- ω) 三元复合物相比，干扰素 λ 三元复合物具有独特的几何形状^[60]。

产生方式：I 型和 III 型干扰素都是在检测到病原体相关分子模式 (PAMP) 和细胞溶质 (例如 RIG-I、MDA5 和 CGA) 或内体 (例如 TLR3 和 TLR4) 模式识别受体 (PRR) 的结合和激活后诱导产生的。对于某些 PRR，PAMP 接合位置的差异可能会影响产生的 IFN 的类型。内体中的 TLR4 信号导致 I 型干扰素的产生^[61]，而 TLR4 在质膜上的结合诱导 III 型干扰素^[62]，这种特殊的 IFN 诱导模式可能有助于 III 型 IFN 在持续遇到共生微生物群及其 PAMP 的上皮屏障上的保护活性。

由表 1-1 可大致分析 I 型 IFN 在调节抗病毒天然免疫应答中的部分作用：

表 1-1 I 型干扰素在调节抗病毒天然免疫应答中的部分作用

Table.1-1 The role of type I interferon in the regulation of antiviral natural immune response

细胞类型 Type of cell	正向调节 Forward regulation	负向调节 Negative adjustment
DCs 树突状细胞	T 细胞活化： - 增加 CD40、CD80、CD86、OX40L 和 MHC II 的表面表达； - 刺激终末 DC 增强 MHC II 和 B-7 表达； - 支持 Ag 处理和 MHC II 表达； 抑制功能： - 慢性 I 型干扰素刺激增加 IL-10 和 PD-L1 的表达； 区别： - pDC 转换为 mDC.	区别： - 慢性 I 型干扰素刺激可减少 BM 衍生的 cDC 分化和增殖； - 分化过程中的刺激抑制 CD11c、MHC-II 和 B-7 表达.
Inflammatory monocytes 炎症性单核细胞	招募： - CCL2 诱导炎症性单核细胞募集； 区别： - IFNAR 的缺失导致 Ly6Chi 炎症性单核细胞分化减少，并导致 Ly6C ^{intermediate} 单核细胞水平升高.	功能 - 下调 IFN γ R 的表达，继而下调 NOS2 的表达
Macrophages 巨噬细胞	功能： - IL-10 和 PD-L1 上调.	功能： - IFN γ R 表达下调
Neutrophils 中性粒细胞	无相关表述证据	招募： -抑制 CXCL1 和 CXCL2 的生成.
IL C2 白介素 C2	无相关表述证据	扩散： - 减少 ILC2 增殖； 功能： - 减少 IL-5, IL-6 和 IL-13 的表达；

1.1.5 干扰素的临床应用

自最初发现以来，人们一直致力于利用 IFN 的抗病毒特性用于治疗用途，迄今为止最大的成功是丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus，简称 HCV）。在直接作用的抗病毒疗法（靶向 HCV 蛋白酶聚合酶和 NS5A 蛋白）出现之前，单独或与利巴韦林联合使用 IFN- α 是抗 HCV 治疗的主要手段^[63]。1976 年首次报道了 IFN- α 治疗慢性乙型肝炎病毒（HBV）感染，当时四名接受治疗的患者显示出病毒抗原显着减少或抗原被清除^[64]。与标准 IFN- α 相比，每周一次给予 24 周量的聚乙二醇化 IFN- α 2A 治疗过程会产生更高的反应率，其

定义是 HBV 抗原血症的丧失, 血液中 HBV DNA 的减少和血清肝酶的改善^[65]。治疗 HCV 和 HBV 等促癌感染是 IFN 疗法对抗癌症的间接手段, 但 IFN 的抗肿瘤作用也得到了更直接的评估。I 型 IFN 被认为通过增加浸润肿瘤的抗原呈递细胞的数量, 减少循环调节性 T 细胞的数量, 改变细胞因子环境, 改变肿瘤细胞和宿主淋巴细胞中的 STAT1 和 STAT3 信号传导平衡, 以及用自身抗体诱导自我识别来发挥其对黑色素瘤的活性^[66]。一项针对黑色素瘤患者的整合分析发现, IFN- α 改善了无病结局和生存期^[67]。将来, IFN- α 治疗可能会与其他免疫疗法相结合, 以控制或消除肿瘤和转移性疾病。虽然失调的 IFN 信号传导可以介导一些自身免疫性疾病, 但 I 型 IFN 已被用于治疗多发性硬化症(MS), IFN- β 于 1993 年获得批准, 成为用于治疗 MS 的第一个主要药物类别。

关于 IFN 的临床应用还在不断研究与发展中。

1.2 表达系统

一般根据宿主细胞的生长速度和生长方式, 靶基因的表达水平和合成蛋白的翻译后处理来作为选择合适的表达系统的依据。无论哪种表达系统, 其基本要素都是载体和表达宿主。蛋白质的表达和纯化在生物化学中起着核心作用。重组蛋白可通过原核系统(大肠杆菌等)、真核系统(酵母和哺乳动物细胞等)或体外系统等表达。我们对不同的表达系统进行了系统的介绍并进行了比较, 如表 1-2^[68]所示。

表 1-2 不同表达系统的比较^[68]

Table.1-2 Comparison of different expression systems^[68]

因素 Factor	细菌 Bacteria	酵母 Yeast	杆状病毒 Baculovirus	哺乳动物 Mammal
优点	简单、价格低; 细胞密度高; 基因研究透彻; 可规模化生产; FDA 批准的 SOP。	简单、价格低; 细胞密度高; 适合发酵; 遗传特征良好; 不产生内毒素; 蛋白质分泌水平高; FDA 批准的 SOP。	类似于高等真核生物的翻译后修饰; 蛋白质生产水平高; 非感染性, 安全性高; FDA 批准的 SOP。	翻译后修饰类似于天然蛋白; 安全无免疫原性; FDA 批准的 SOP。
劣势和挑战	无翻译后修饰; 蛋白质分泌水平低; 重组蛋白聚集在包涵体中; 产生内毒素;	外源蛋白容易被自身分泌的蛋白酶降解; 容易形成多聚体和过度糖基	生长缓慢; 价格昂贵; 表达耗时费力; 限制性修饰; 不能产生复杂	生长缓慢; 价格昂贵; 耗时费力; 蛋白产量低, 有动物病毒污

1.2.1 原核表达系统

大肠杆菌系统是最初筛选重组蛋白表达的首选宿主，因为它操作简便快捷、繁殖速度快、培养成本较低、且有遗传背景清晰、转导效率高等优点，能在较短时间内获得大量重组蛋白^[69]。另外，大肠杆菌外源基因表达水平明显高于其它表达系统，这使得大肠杆菌表达系统被广泛应用于蛋白科研和工业生产中^[70]。大肠杆菌表达系统目前已被广泛研究，但使用该系统表达的外源蛋白在进行修饰和折叠时十分困难，并且大部分都是无法溶解的包涵体形式，使得蛋白表达和纯化费时且费力，目前通过研究实践，采用了并行、高通量的方法进行蛋白的表达和纯化，这一直是后基因组时代^[71]蛋白功能、结构和应用研究的瓶颈。随着高通量蛋白质生产方法在本世纪初^[72]的提出，该技术得到了广泛的应用^[73]。

1.2.2 真核表达系统

1.2.2.1 毕赤酵母真核表达系统

酵母（如酿酒酵母和毕赤酵母等）是最简单的真核生物之一，用于生产 FDA 批准的治疗性蛋白质，例如胰岛素、乙肝抗原、胰高血糖素等^[74]。它们可以在较为简单通用的培养基上快速生长到高细胞密度，并且与发酵过程高度兼容。作为一种食物有机体，酵母不含病毒，也不产生内毒素^[75]。这些酵母菌株具有良好的遗传特性，许多差异调节和组成载体结构获得途径十分广泛，另一个优点是它们能够分泌目标蛋白，从而以更低的成本获得更高的纯化蛋白回收率^[76]。当然它也存在缺陷，例如，酵母中的 N-和 O-连接糖基化模式可能与其他宿主中的不同，酿酒酵母将甘露糖添加到从内质网输出的碱性聚糖的结构中，而高等真核生物更喜欢唾液酸 O 连接的侧链，这就导致糖蛋白的高甘露糖基化，可能影响重组蛋白的折叠、稳定性、活性和免疫原性^[77]。此外，在酿酒酵母中产生的异源蛋白质可能在液泡中发生蛋白水解降解，并与泛素蛋白体系统特异性偶联^[77]。

1.2.2.2 哺乳动物细胞表达系统

1986 年，人类组织纤溶酶原激活剂被批准为第一种来自重组哺乳动物细胞的治疗性蛋白质，这使得哺乳动物细胞培养参与到生物制药中来，尽管目前有多种替代表达系统，但哺乳动物细胞是商业生产治疗性蛋白质的主要宿主。现在有许多其他哺乳动物细胞系可用，如幼仓鼠肾、小鼠骨髓瘤衍生 NS0、人类

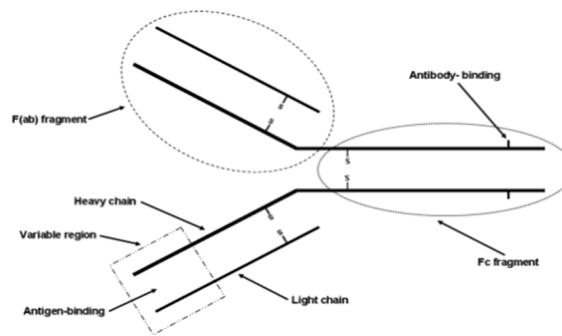
胚胎肾(HEK)-293等,但目前生产的所有重组治疗蛋白中中国仓鼠卵巢(CHO)细胞占比将近70%^[78]。作为真核表达系统的一类,CHO表达系统主要有以下几个方面的优势:(1)CHO细胞在过去几十年中已被证明是安全的宿主,更容易获得FDA等监管机构的批准,从而将治疗性蛋白质推向市场;(2)可以用更加强大的基因扩增克服生产率低的问题;(3)CHO细胞具有高效翻译后修饰的能力,可以产生与人体相容且具有生物活性的糖类重组蛋白,表达的蛋白质与人类天然蛋白相似度极高。(4)外源蛋白分泌到细胞外且几乎没有内源蛋白的分泌,使得其容易纯化;(5)更容易适应在化学成分明确且无血清条件下生长,适用于大规模培养^[79]。

1.2.2.3 杆状病毒表达系统

杆状病毒在20世纪80年代中期被用作表达系统^[80]。在杆状病毒表达载体系统中,使用昆虫细胞进行蛋白质表达的优势是这些昆虫细胞具有信号肽处理和寡聚功能,同时也具有正确修饰所需的糖基化、酰化、磷酸化和二硫键形成等能力,可以正确地形成真核蛋白质^[81],且昆虫细胞在无血清培养基中生长,可以在常温振荡培养中放大培养。但其仍有许多局限性:比如裂解感染过程导致宿主和病毒蛋白酶的释放,影响蛋白质质量以及某些病毒蛋白会阻碍分泌途径等^[82];

1.3 抗体

抗体(Antibody)指抗原刺激机体免疫系统后,由B淋巴细胞分化为浆细胞之后产生的、可与刺激机体的抗原发生特异性结合反应的一种免疫球蛋白。抗体结构呈Y型,由两条相同的轻链和重链组成,如图1-9所示^[83]。Y的尾部称为Fc,大多数脊椎动物的轻链有两种不同的形式,称为kappa和lambda,轻链由两个不同的区域组成:链的C-末端一半是恒定的,称为CL(恒定:轻链),而链的N-末端一半具有丰富的序列可变性,称为VL(可变:轻链)区域,Fab区是抗体的抗原结合部分,包含可变区和恒定区,抗体的Fc部分决定了其生物学功能,并允许抗体与具有Fc受体的其他抗体、补体和炎症细胞结合^[83]。目前我们制备的抗体主要分为多克隆抗体与单克隆抗体。

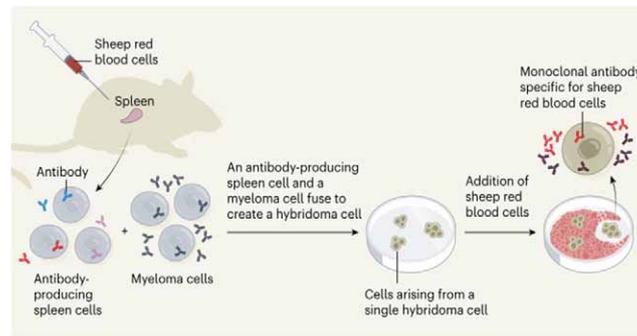
图 1-9 抗体分子结构图^[83]Figure.1-9 Molecular structure diagram of antibody^[83]

1.3.1 多克隆抗体

将纯化后的蛋白脱盐乳化后进行动物免疫，后期分离采集的血清即为多克隆抗体，克隆抗体制备原理主要是抗原刺激机体后免疫反应的发生。初次免疫往往会产生数量较少的 IgM 抗体；进行二次免疫后会在初免的基础上产生更多数量的 IgG 抗体；三次免疫后，血清中抗体数量会有大幅的增加，可以通过分离全血获得血清后纯化的方法得到纯度较高的多克隆抗体^[84]。在应用方面，品质较好的多克隆抗体可以抗某种抗原的多种不同表位。正因为如此，在固定比较深的样本中也会产生反应效应，在免疫组织化学（Immunohistochemistry, IHC）染色中也因此常选用品质较好的多克隆抗体，多克隆抗体也会根据具体实验的不同需要而应用于标记相应抗原。

1.3.2 单克隆抗体

来自单个 B 细胞克隆的具有独特特异性的抗体称为单克隆抗体。1890 年，两位科学家 Emil von Behring 和 Shibasaburo Kitasato 在动物试验时发现接触过破伤风毒素的动物血液中存在一种抗体，用作保护性抗毒素，因为发现的这种抗体在适应性中起着关键作用，而且特异性非常广泛，所以自此之后抗体一直是一个研究的热点^[84]。在 1975 年的《自然》杂志论文^[85]中，免疫学家 Georges Köhler 和 César Milstein 描述了具有预定特异性的单克隆抗体的产生，每一种单克隆抗体都是由不断增长的细胞系制成的，该细胞系是由免疫小鼠的抗体生产细胞与专门用于抗体分泌的不朽癌细胞融合而成，论文解决了如何生成连续分裂细胞克隆的问题，这些细胞可以产生已知特异性的抗体，产生这种单克隆抗体的能力彻底改变了抗体研究，并为临床进展铺平了道路，如图 1-10 所示，基于此，两人获得了 1984 年的诺贝尔奖。

图 1-10 单克隆抗体的产生^[85]Figure.1-10 Production of monoclonal antibodies^[85]

单克隆抗体制备的基本原理如下：纯化蛋白后以该蛋白为抗原乳化并注射入动物体内，当动物受到外来抗原刺激后，机体通过体液或细胞免疫途径产生针对于此的特异性免疫应答；脾脏细胞经过外来物质刺激后增殖并分化为能分泌抗体的浆细胞（效应 B 细胞）以及与刺激关联的记忆 B 淋巴细胞；浆细胞由于存活时间很短只能暂时存在于动物体内，但是当机体再次受到同种抗原刺激时，记忆细胞活化并快速产生大量针对此类抗原的特异性抗体。经过重复刺激后小鼠脾脏中会形成许多此类的浆细胞；无菌提取脾细胞后，将获得的脾细胞与 SP2/0 进行细胞融合便可得到杂交瘤细胞；但是 SP2/0 细胞不仅会和目的细胞融合，也会和非目的细胞融合以及和同种的 SP2/0 融合，因此就需要用 HAT 培养基选择性初步筛选；DNA 作为膜结构生物的遗传物质，其合成有主路和旁路两种途径。在主路途径中，TK 胸苷激酶和 HGPRT 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶是必不可少的两种酶类，但是小鼠 SP2/0 细胞中缺乏这两种酶，只有与目的浆细胞融合形成杂交瘤细胞之后才有 TK 或者 HGPRT 酶，此时获得的杂交瘤细胞才能正常生长；杂交瘤细胞在 HAT 培养基中孵育 7 d 后进行换液，但因为氨甲喋呤的作用会抑制杂交瘤细胞的生长，所以之后再次换液时需将培养基更换为 HT 培养基，这样可以更好促进杂交瘤细胞的生长；通过 HAT 初筛、后期 HT 培养和亚克隆，可以获得多株目的杂交瘤细胞，称为阳性杂交瘤细胞株。收集阳性杂交瘤细胞株并通过腹腔注射打进小鼠体内（或者体外培养杂交瘤株），待腹部明显隆起时抽取腹水（取细胞培养液）并通过纯化柱进行纯化，便可以获得特异性识别目的蛋白的单克隆抗体^[86]。

应用方面，在临床试验中，单克隆抗体是发展最快的分子生物技术衍生分子^[87]，它在分子生物学试验及医学免疫学研究中具有很大的应用价值，可应用于生物学免疫试验和医学免疫检验等^[88]，是生物治疗的高效导向性武器。抗体市场的全球价值每年大约为 200 亿美元^[89]。1998 年，曲妥珠单抗（Herceptin）通过重重筛查被批准用于转移性 Her-2 过表达乳腺癌的治疗^[90]；2001 年，阿仑单抗（Campath），一种 FDA 批准的人源化 IgG1 单克隆抗体抗 CD52（一种由正常和恶性 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞表达的细胞表面糖蛋白）用于治疗耐药性慢性淋巴细胞白血病^[91]，FDA 批

准临床使用的首个抗血管生成药物是贝伐珠单抗(Avastin),这是一种人源化的^[92]小鼠抗血管内皮生长因子 165^[93]单克隆抗体。目前, FDA 已批准了 30 多种单克隆抗体应用于临床治疗, 这些单抗可被应用于病毒性疾病、特异性免疫反应如器官移植以及癌症等各个领域疾病的治疗^[94]。单克隆抗体在诊断组织病理学中的应用尤其广泛, 这些分子可以根据它们表达的某些反映组织或细胞起源的确定标记来对组织和肿瘤进行分类。克隆抗体介导的治疗涵盖多个领域, 到现在为止依然是研究的热点与前沿。

1.4 酶联免疫吸附试验-ELISA

酶联免疫吸附试验(ELISA)是世界卫生组织推广的病毒检测的标准方法^[95], 它具有特异性强、简便快捷、敏感度高、易于标准化、污染少等优点, 也是目前检测使用最广泛的方法之一^[96]。ELISA 检测方法不仅是一种高通量的检测方法, 适用于大量样品检测, 也适用于检测多种样本抗体类型, 是一种运用较为广泛的诊断方法^[97]。目前已广泛应用于畜牧业的饲料农药残留测定、疾病诊断等方面。目前有间接 ELISA、直接竞争 ELISA、双抗夹心 ELISA、竞争抑制 ELISA 等, 如表 3 所示, 主要简单介绍了以下几种不同的 ELISA 方法^[98]:

表 1-3 不同类型 ELISA 简述^[98]

Table.1-3 Brief description of different types of ELISA^[98]

分类 Classification	用途 Purpose	所需试剂 Required reagents	评价 Evaluate
间接 ELISA	抗体筛选; 表位作图	纯化或半纯化的抗原; 含抗体的试验溶液; 酶结合物, 结合免疫物种的 Ig	不需要使用预先存在的 特异性抗体; 需要相对大量的抗原
直接竞争 ELISA	抗原的筛选; 检测可溶性抗原	纯化或半纯化的抗原; 含抗原的检测液; 酶抗体偶联物特异性抗原	两步快速分析; 非常适合测量抗原交叉 反应性
抗体夹心 ELISA	抗原的筛选; 检测可溶性抗原	捕获抗体(纯化或半纯化的特 异性抗体); 含抗原的检测液; 酶抗体偶联物特异性抗原	最敏感抗原测定; 对于纯化(半纯化)的 特异性抗体需求量很大
双抗夹心 ELISA	抗体筛查; 抗原决定基映射	捕获抗体:(免疫种 Ig 专用); 含抗原的检测液; 酶-抗体偶联物特异性抗原	不需要纯化抗原; 实验时间较长, 有五个 步骤

1.5 免疫组织化学 IHC

Coons 等人在 1941^[99]年发表的一篇文章描述了用于检测组织切片中细胞抗原的免疫荧光技术，标志着免疫组织化学（IHC）的开始，IHC 的基本概念是通过特异性抗体(Abs)证明组织切片中的抗原(Ag)的存在。与众多蛋白质检测方法比较，IHC 独特且显著的优势是能够将抗原的定位与其在组织或细胞中的位置相关联，但影响结果的因素也有很多，主要因素如图 11^[83]所示。

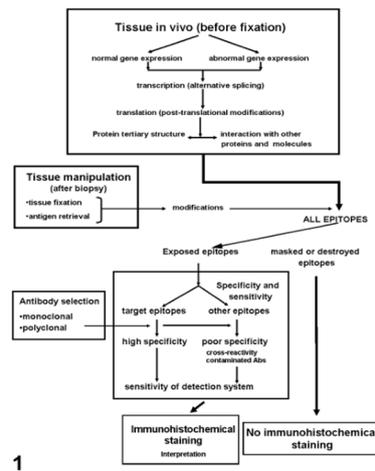


图 1-11 影响免疫组织化学研究结果的主要因素^[83]

Figure.1-11 Main factors affecting the results of immunohistochemistry^[83]

第2章 重组猪干扰素质粒的构建

重组人干扰素从1986年美国FDA以及1989年我国SFDA批准投放市场到现在也有37年和34年了，干扰素的基础和临床研究直至现在仍在不断进步与发展。IFN的作用已经得到了更广泛的研究，以IFN- α 为例，干扰素- α 的治疗现在已经涵盖了但不止于慢性乙、丙型肝炎；HPV感染；肾细胞癌；膀胱癌和宫颈癌等疾病^[100]。我国还批准其用于带状疱疹等的防治，干扰素 α 2b也被批准作为一种技术储备药物用作预防SARS^[100]。然而关于重组猪IFN的研究目前非常少且尚不成熟，本试验以pcDNA3.1为载体，以PoIFN- α 和PoIFN- λ 为目的基因连接构建重组质粒并进行酶切和测序鉴定，为下一步蛋白通过CHO表达系统表达与亲和纯化以及后续的试验提供了先行条件。

2.1 实验材料

所需试剂与耗材：见附录1；

所需仪器：见附录2；

所需相关溶液的配制：见附录3。

（注：本试验所涉及ASFV等高危病原均来自于中国农业科学院兰州兽医研究所P3实验室）

2.2 实验方案

2.2.1 猪外周血淋巴细胞分离和诱导培养

猪外周血淋巴细胞分离和诱导培养方法参照参考文献^[101]进行。

2.2.2 猪外周血淋巴细胞总RNA提取

猪外周血淋巴细胞总RNA的提取方法参照参考文献^[102]进行；

2.2.3 设计引物, PCR 扩增目的片段

根据 GenBank 中 PoIFN- α 和 PoIFN- λ 目的基因序列预测信号肽与跨膜区并设计引物 (PoIFN- α GenBank 登录号: NM_214393.1; PoIFN- λ GenBank 登录号: NM_001142837.1), 以上述提取的总 RNA 作为反转录的模板, 按照 RT-PCR 试剂盒说明书与参考文献^[102] 分别对猪干扰素 α 和 λ 基因进行扩增。反应体系为: Mix 2 μ L, 2 \times Buffe 25 μ L, Forward/Reverse Primer 各 1 μ L, RNA 2 μ L, RNase Free H₂O 19 μ L;

引物序列如下表所示:

表 2-1 基因扩增 PCR 引物

Table.2-1 Gene amplification PCR primer

基因 Gene	引物名称 Primer name	序列 (5' -3') Sequence (5' -3')	产物长度
PoIFN- α	Hind III-IFN- α -F	GGTCATCATCATCATCATCA	612bp
	Xho I-IFN- α -R	TTCTTCCTGAGTCTGTCTTG	
PoIFN- λ	Hind III-IFN- λ -F	CTCCTGCTATGGGTACTGCT	630bp
	Xho I-IFN- λ -R	GGAGGTAATCTGTAAAGTCTG	

PCR 反应程序如下:

50 $^{\circ}$ C 30 min;

94 $^{\circ}$ C 2 min;

94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环;

72 $^{\circ}$ C 10 min;

4 $^{\circ}$ C 退火。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.2.4 PCR 产物的回收与纯化

①加入 300 μ L Binding Buffer 到切胶杯中, 55 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min, 期间不断拿出颠倒以便融化;

②将化好的混合液加入吸附柱中, 每次 700 μ L 至全部加完, 静置 4 min, 12000 rpm 离心 1 min, 弃掉滤液;

③向吸附柱中加入 700 μ L Wash Buffer, 静置 5 min 后 12000 rpm 离心 1 min, 之后弃掉滤液;

④重复步骤③;

⑤弃掉液体后吸附柱 12000 rpm 离心 2 min, 然后弃掉外层管;

⑥将吸附柱放置于新的 1.5 mL 离心管中, 打开离心管盖室温静置 4 min 以晾干柱芯;

⑦向吸附柱中间的白色膜上滴加 20-30 μL Elution Buffer, 静置 5 min 后 12000 rpm 离心 2 min;

⑧弃掉吸附柱, 取回收 DNA 5 μL 加上样缓冲液进行电泳鉴定。

2.2.5 对载体质粒双酶切并对产物进行回收纯化

利用限制性内切酶 Xho I 和 Hind III 对真核表达载体 pcDNA3.1(+)进行双酶切。反应体系为 Hind III 酶 2 μL , Xho I 酶 2 μL , PCR 产物或 pcDNA3.1 5 μg , dd H₂O 补至 50 μL ; 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 1 h 后配置 1%琼脂糖凝胶(见附录 3), 5 \times loading 制样后跑胶, 切胶后对载体和产物进行回收纯化, 步骤同 2.2.4。

2.2.6 连接与转化

①参照生物公司 T 载体使用说明书进行, 反应体系如下:

2 \times buffer 5 μL ;

胶回收 PCR 产物 4 μL ;

pcDNA3.1(+)载体 0.5 μL ;

T4 连接酶 0.5 μL ;

总反应体积 10 μL ;

离心混匀后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜或室温连接 2 h。连接产物直接用于转化。

②从冰箱拿出 DH5 α 感受态细胞后迅速插入冰盒中, 静置 10 min 待细胞缓慢融化, 在生物安全柜中取用无菌高压 EP 管加入连接产物, 迅速放入冰中静置 30 min;

③42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热敷 45 s, 之后迅速放回冰盒静置 2 min;

④向离心管加入 700 μL 无抗的无菌 LB 培养基, 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 rpm 复苏 60 min;

⑤将菌液 5000 rpm 离心 1 min, 留取 100 μL 左右上清轻轻吹打重悬, 并使用涂布棒均匀涂到相应抗生素的培养基平板上;

⑥将平板倒置平放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置 7 h 以上。

2.2.7 小量提取质粒并鉴定

①准备摇菌管, 加入 5 mL 相应抗性的 LB 培养基中, 从菌板中挑取较大且单独的菌加入培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 摇床培养 12-16 h, 待培养液浑浊后取出。10000 rpm 离心 1 min, 弃掉上清;

②加入 250 μL RNase A 并充分涡旋。并将悬浮液转移到一个新的 1.5 mL 的 EP 管中;

- ③添加 250 μL Solution II，倒置并轻轻翻转试管几次后静置 2 min，从而获得清晰的裂解液；
- ④添加 350 μL Solution III后立即倒转几次，直到形成白色絮状沉淀，静置 10 min；
- ⑤16000 rpm 离心 10 min 后将 HiBind DNA mini 柱放置到 2 mL 收集管中。将离心获得的上清小心吸入到 HiBind DNA mini 柱中，16000 rpm 离心 1 min 并弃去滤液；
- ⑥加入 500 μL HBC 缓冲液后 16000 rpm 离心 1 min，弃掉滤液；
- ⑦加入 700 μL 洗涤缓冲液，16000 rpm 离心 1 min，弃掉滤液；
- ⑧将 HiBind DNA mini 柱 16000 rpm 空离 2 min，转入超净台后打开盖子静置使柱基质干燥；
- ⑨在柱膜中心加入 35 μL 预热的 Elution Buffer，静置 2 min；
- ⑩16000 rpm 离心 2 min，对提取的质粒进行浓度测定。送生物公司进行测序。

2.2.8 转化后大量提取质粒

- ①转化过程同 2.2.7 中转化步骤，不需要在 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 rpm 的摇床培养箱中培养，可直接涂板。
- ②准备摇菌管，加入 5 mL 相应抗性的 LB 培养基中，从菌板中挑取较大且单独的菌加入培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ ，220 rpm 摇床培养 12-16 h，待培养液浑浊后取出，将培养液加入 200 mL 相应抗性的培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$,220 rpm 摇床继续培养 12-16 h；
- ③质粒大提实验前先预热 Elv、Tris 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中；
- ④将过夜培养的菌液 5000 rpm 离心 10 min，之后进行裂解；
- ⑤首先在菌液沉淀中加入 Buffer RES（4 $^{\circ}\text{C}$ 保存），按照 8 mL/100 mL 比例加入，要充分重悬不能有沉淀；之后加入 Buffer LYS，按照 8 mL/100 mL 比例加入，加之前要注意摇匀，不能使 SDS 沉淀，上下反转 5-8 次，不能有白色残留，在室温下静置 5 min；在此期间进行柱子的平衡，将柱子放在支架上，底层放置 15 mL 离心管，加入 12 mL Buffer EQU，沿着柱子周围加入以浇湿柱体；静置好后加入 Buffer NEU 8 mL，来回颠倒 10-15 次直到出现的蓝色消失为止；上下混匀后加入柱子中过滤，注意要沿柱口周围加入，再加入 Buffer EQU 5 mL 进行第一次洗涤，之后弃掉柱芯；柱芯去除后在收集管中加入 8 mL Wash Buffer 进行第二次洗涤，加入 5 mL 预热好的 Buffer ELV 洗脱，弃去柱外管；将 3.5 mL 异丙醇加入到 15 mL 离心管的洗脱液中用于沉淀质粒，来回颠倒 10-15 次后室温下静置 2 min；之后将液体转移至 50 mL 注射器中并连接好过滤器，推掉上述的液体，此时质粒会吸附到滤器膜上；在注射器中加入 2 mL 70%的乙醇，推打洗涤后空推 6 次左右吹干滤器，注意空推后要取下滤器，不能抽吸滤器；用 1 mL 注射器抽取

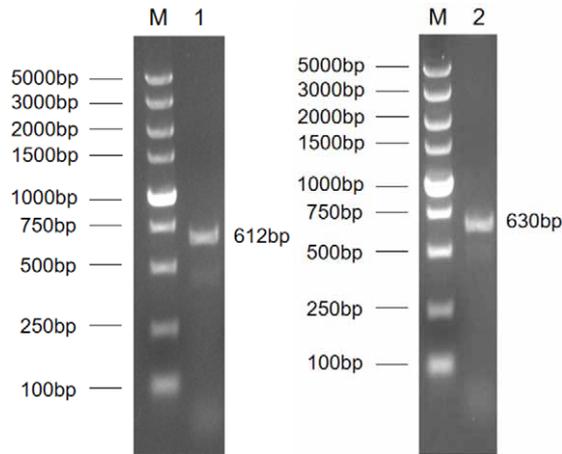
图 2-5 PCR 扩增 PoIFN- α 和 PoIFN- λ 目的基因片段鉴定结果

Figure.2-5 PCR amplification of PoIFN- α And PoIFN- λ Identification results of target gene fragments

注: M: DNA 分子质量标准; 1: 干扰素 α ; 2: 干扰素 λ

Note: M: DL5000 marker; 1: PoIFN- α ; 2: PoIFN- λ

2.3.3 重组质粒酶切鉴定

如图 2-2 所示, 将构建好的 pcDNA3.1-PoIFN- α 、pcDNA3.1-PoIFN- λ 用 Hind III 和 Xho I 限制性内切酶进行双酶切后产生了四条特异性条带, 分别为两条 5348 bp 的载体片段和 612 bp、630 bp 的目的基因片段, 大小均与预计相符, 根据测序结果最终显示重组质粒构建成功。

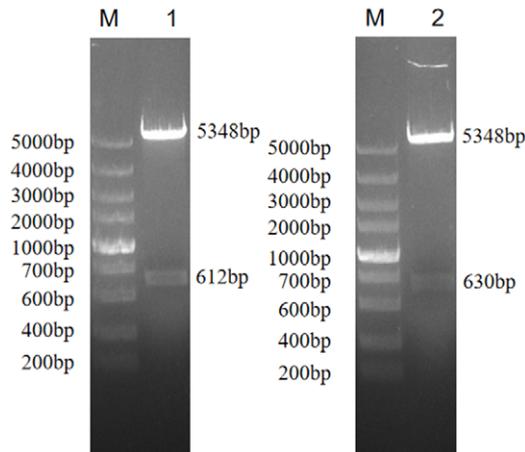
图 2-6 重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- α 和 pcDNA3.1-PoIFN- λ 双酶切鉴定结果

Figure.2-6 Recombinant plasmid pcDNA3.1-PoIFN- α and pcDNA3.1-PoIFN- λ Identification results of double enzyme digestion

注: M: DNA 分子质量标准; 1: 重组质粒 α ; 2: 重组质粒 λ

Note: M: DL5000 marker; 1: pcDNA3.1-PoIFN- α ; 2: pcDNA3.1-PoIFN- λ

2.3.4 重组质粒图谱

构建完成后的重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- α 和 pcDNA3.1-PoIFN- λ 图谱如下图所示。

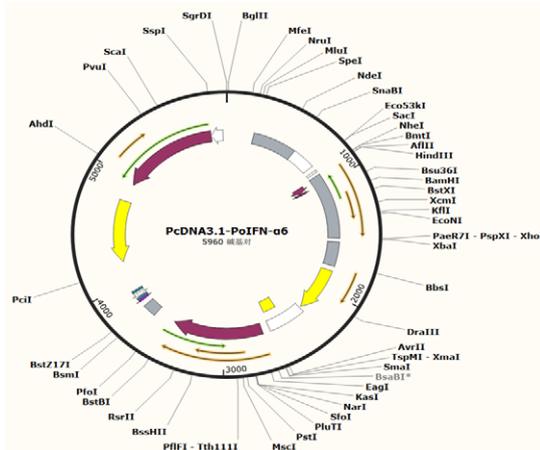


图 2-7 IFN- α 重组质粒图谱

Figure.2-7 IFN- α map of recombinant plasmids

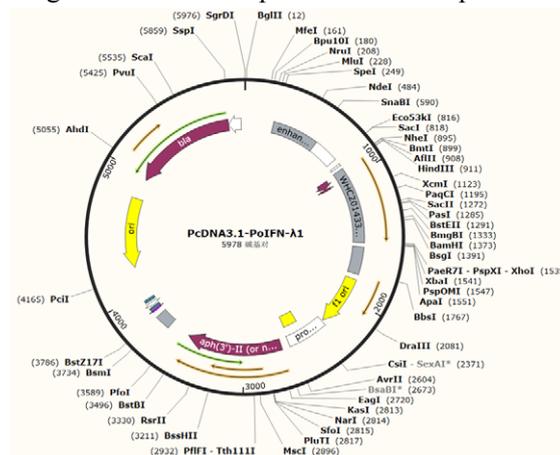


图 2-8 IFN- λ 重组质粒图谱

Figure.2-8 IFN- λ map of recombinant plasmids

2.4 讨论

提取猪外周血淋巴细胞 RNA 后反转录为 cDNA，随后根据 GenBank 中目的基因序列设计引物后进行 PCR 扩增，将载体与目的基因通过 Hind III 和 Xho I 限制性内切酶进行酶切并对产物进行胶回收，用 T4 连接酶将目的基因与载体相连接，获得重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- α 、pcDNA3.1-PoIFN- λ ，随后将获得的重组质粒进行双酶切鉴定并小提质粒送公司测序，测序成功后进行质粒大提用于后续表达。结果显示扩增后的基因片段大小与预期一致，构建成功后经过双酶切鉴定和测序鉴定也都与预期相符，表明重组质粒构建成功。

IFN 具有抗病毒、抑制肿瘤和免疫调节等多种生物学功能，随着人源 IFN 的不断发展与进步，IFN 的机制研究与临床应用研究也越来越成熟，但目前为止猪源 IFN 的研究尚少也不够成熟，研究价值很高，本研究通过构建猪源 IFN 重组质粒为后期的表达纯化与相关实验建立基础，也为后续猪源 IFN 的其他研究奠定了一定程度的基础。

第3章 重组猪干扰素蛋白的表达与纯化

目前常用的表达系统主要有以大肠杆菌表达系统为代表的原核表达系统、以毕赤酵母表达系统为代表的真核表达系统以及腺病毒载体表达系统、杆状病毒表达系统等，CHO 表达系统作为真核表达系统的一种，具有高效翻译后修饰的能力，表达的蛋白质与天然蛋白相似度极高；虽然内源性蛋白自身分泌的很少，但外源性蛋白分泌分泌较多，使得其容易纯化，且 CHO 表达系统更适用于大规模培养。本试验用 CHO 表达系统对构建的重组质粒进行高生物活性表达，随后应用镍柱亲和层析技术对表达的蛋白进行纯化，为后续单抗的制备以及其他相关实验奠定了基础。

3.1 实验材料

所需试剂与耗材：见附录 1；

所需仪器：见附录 2；

所需相关溶液的配置：见附录 3。

3.2 实验方案

3.2.1 通过 ExpiCHO™ 系统对重组质粒进行表达（参考 ThermoFisher 的 ExpiCHO™ 表达系统操作手册）

解冻 ExpiCHO-S™ 细胞：

①将所需细胞管从液氮中取出，在 37℃ 水浴中复苏 1-2 min，使细胞迅速解冻，不可将细胞管完全浸没于水中；

②提前配置 70%乙醇，在细胞快要完全解冻之前，用配置的乙醇溶液擦拭冻存管外周用以去除与预防污染，然后在层流通风橱内打开；

③使用 2 mL 或 5 mL 移液器，准备含有 30 mL 预热 ExpiCHO™ 表达培养基的 125 mL 锥形瓶，将冻存管中的全部溶液转移至锥形瓶中；

④将细胞置于 25 mm 轨道摇床（37℃，8% CO₂ 湿化空气培养箱）培养，速度设置

为 120 ± 5 rpm;

⑤解冻 3 天后, 检测活细胞密度和存活率, 细胞存活率应在 90%以上;

⑥继续监测细胞密度和存活率, 当活细胞密度达到 4×10^6 - 6×10^6 个/mL 时, 进行传代。

传代 ExpiCHO-S™ 细胞:

①根据表 3-1、表 3-2 推荐的接种密度和培养体积, 利用活细胞密度, 计算接种新细胞所需细胞悬液体积, 本次做四天培养, 选用 1L 培养瓶;

表 3-1 日常细胞培养推荐接种密度

传代时间 Generation time	推荐接种密度 Recommended inoculation density
传代后准备做三天培养	0.2×10^6 - 0.3×10^6 个活细胞/mL
传代后准备做四天培养	0.1×10^6 - 0.2×10^6 个活细胞/mL

表 3-2 不同大小培养瓶推荐培养体积

培养瓶规格 Specification of culture bottle	推荐培养体积 Recommended culture volume
125 mL	30-35 mL
250 mL	60-70 mL
500 mL	120-140 mL
1 L	240-260 mL

②在培养瓶中提前预热新鲜的 ExpiCHO™ 表达培养基, 将细胞转移至瓶中;

③将培养瓶置于轨道摇床上培养, 直至活细胞密度达到 4×10^6 - 6×10^6 个/mL;

④重复第 1-3 步, 维持或扩增细胞用于转染。

转染 ExpiCHO-S™ 细胞:

①转染前一天分种 ExpiCHO-S™ 培养物, 将活细胞密度调整为 3×10^6 - 4×10^6 个/mL, 过夜培养观察;

②次日, 检测活细胞密度达到 7×10^6 - 10×10^6 个/mL 且存活率在 95%以上时方可继续进行转染;

③预热新鲜的 ExpiCHO™ 表达培养基, 将第①步中的活细胞密度稀释至 6×10^6 个/mL, 轻轻晃动培养瓶;

④将试剂瓶轻轻上下颠倒几次以充分混匀;

⑤使用冷的 OptiPRO™ 培养基稀释质粒 DNA, 将试管晃动几次以便混匀;

⑥使用 OptiPRO™ 培养基稀释 ExpiFectamine™ CHO 试剂, 晃动试管混匀;

⑦将稀释的试剂加入到稀释的 DNA 中, 晃动试管混匀;

⑧室温下孵育质粒/DNA 复合物 5 min, 然后将溶液慢慢地通过一遍添加一遍晃动培

养瓶的方式转移到第③步的培养瓶中；

⑨将细胞置于轨道摇床上培养；

⑩转染后次日，添加 CHO 增强剂和 ExpiCHO 辅料；转染后的第 5 天，第二次添加辅料至培养瓶，将培养瓶立即放回 32℃ 培养箱中振荡培养；转染后 12 天收集蛋白。

3.2.2 蛋白纯化与鉴定

①镍柱再生：准备好镍柱，首先用 5 倍体积的 NaOH 和纯水过柱，之后 EDTA 过柱直至镍柱变为白色，5 倍体积纯水过柱后约用 5 倍体积 NiSO₄ 过柱挂镍直至柱子变为蓝色即挂镍完成，再用 5 倍体积纯水过柱；

②平衡镍柱：用 PH8.0 的 Binding Buffer 过柱，设置 10 mL/min，走 100 mL 以上；

③上样：将蛋白过柱，流速减慢，设置 5-8 mL/min，紫外可见光吸收度大于 20 时起收，其余液体收集为流穿液；

④淋洗：用 PH 8.0 的 Binding Buffer 过柱，设置 10 mL/min，淋洗 100 mL 以上；

⑤洗脱：用 80 mm、160 mm、300 mm、500 mm 等不同浓度的咪唑进行洗脱，当 UV 280 数值出现起升时进行收样，峰值下降平缓后继续过柱 100 mL 左右即可换下一浓度咪唑，所收集液体即为纯化后蛋白；

⑥脱盐浓缩：鉴定后用等体积脱盐液与所收集的纯化后蛋白进行混合，经过膜包对蛋白进行脱盐浓缩，直至符合需求为止。小剂量操作时将蛋白放到透析袋中，用 PEG-20000 铺满透析袋表面，随时观察体积变化。

⑦SDS 与 WB 鉴定：

SDS-PAGE：

参照附录 3 配置蛋白胶，并配置 1×电泳液，将收集的上样、流穿、洗脱各取 80 μL，与 20 μL 的 5×Loading Buffer 混合，之后于金属浴 100℃ 加热 10 min，按照每个样 10 μL 的量跑胶，80 v 30 min 后电压转为 120 v，直至蛋白跑至胶板底部，将所得胶用考马斯染色液微波加热 3 min，于摇床摇 10 min 后回收染色液，之后用脱色液微波加热 2 min，于摇床摇 2 h 后更换脱色液，摇床过夜。

Western-blot：

取 80 μL 纯化后的 IFN-α 和 IFN-λ 蛋白，用 20 μL 5×SDS Loading Buffer 处理，金属浴 100℃ 10 min 后，取 10 μL 样品进行 SDS-PAGE，在此期间按照附录 3 配置 1×转膜液并预冷，并准备好转膜槽、转膜夹、冰盒、转膜用盆、镊子、滚筒、海绵垫、滤纸、PVDF 膜和甲醇，先用纯水浸泡准备的滤纸、垫子等以清洗残留的污渍，之后换转膜液浸泡，PVDF 膜需用甲醇浸泡 1 min 激活后转移至转膜液中；

电泳完成后，按照海绵垫-滤纸-蛋白凝胶-PVDF 膜-滤纸-海绵垫的顺序放入转膜槽

进行转膜，用铅笔在 PVDF 膜上标正，转膜盒周围使用冰水混合物进行降温，电流调制 230 mA 转膜 2 h，转膜完成前 30 min 可配置 5% 脱脂奶粉封闭液（见附录 3）并置于 4℃ 保存使用；

转膜完成后将 PVDF 膜放置于封闭液中浸泡，常温下于慢速摇床封闭 2 h，封闭完成前 30 min 配置一抗，使用 His-Tag 标签抗体与封闭液以 1:1000 比例配置；

封闭完成后，将膜浸泡于一抗中，放置于 4℃ 220 rpm 摇床过夜孵育；

第二天将一抗回收后，用 1×TBST 在快速摇床上清洗 6 次，每次 5 min。使用鼠抗与 1×TBST 以 1:5000 的比例配置二抗，将 PVDF 膜浸泡于二抗中室温下于慢速摇床上孵育 1 h，之后用 1×TBST 于快速摇床上清洗 3 次，每次 10 min；

按照附录 3 配置显影液并通过高分辨图像采集系统，对 PVDF 膜进行曝光显影。

3.3 结果与分析

3.3.1 重组表达 IFN- α 和 IFN- λ 蛋白纯化后 SDS-PAGE 鉴定

重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- α 和 pcDNA3.1-PoIFN- λ 通过 ExpiCHOTM 表达系统成功表达后利用 AKTA 镍柱亲和层析进行纯化，并用 12.5% 的蛋白凝胶进行了 SDS-PAGE 鉴定，如图 3 所示，所得目的条带 IFN- α 在 20 kDa 左右，IFN- λ 在 25 kDa 左右，均与预期大小相符。

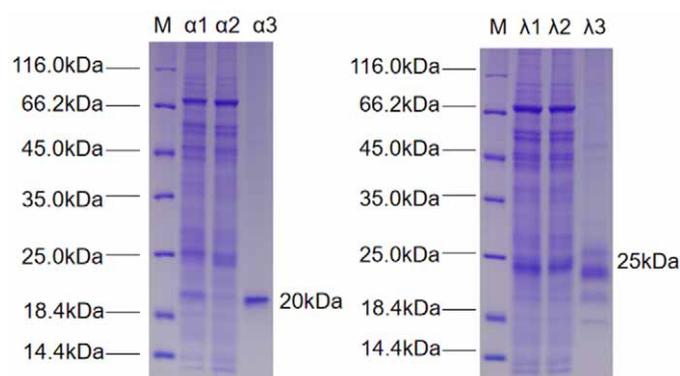


图 3-1 PoIFN- α 和 PoIFN- λ 蛋白纯化后 SDS-PAGE 鉴定

Figure.3-1 PoIFN- α and PoIFN- λ proteins were identified by SDS-PAGE

注：M:蛋白分子质量标准 26610; α 1: IFN- α 上样液; α 2: IFN- α 流穿液; α 3: IFN- α 洗脱液; λ 1: IFN- λ 上样液; λ 2: IFN- λ 流穿液; λ 3: IFN- λ 洗脱液

Note: M: Protein MW Marker 26610; α 1: IFN- α Loading solution; α 2: IFN- α Flowthrough; α 3: IFN- α Eluent; λ 1: IFN- λ Loading solution; λ 2: IFN- λ Flowthrough; λ 3: IFN- λ Eluent

3.3.2 重组表达 IFN- α 和 IFN- λ 蛋白纯化后 Western-blot 鉴定

对重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- α 和 pcDNA3.1-PoIFN- λ 通过 ExpiCHOTM 表达系统成功表达后利用 AKTA 镍柱亲和层析进行纯化, 用 12.5% 的蛋白凝胶进行了 SDS-PAGE 鉴定后, 以 His 标签抗体为一抗 (1:1000), 以鼠抗为二抗 (1:5000), 用 Western-blot 法对蛋白进行了免疫印迹检测, 如图 4 所示, 所得目的条带 IFN- α 在 20 kDa 左右, IFN- λ 在 25 kDa 左右, 同样均与预期大小相符且目的条带特异性强, 无杂蛋白。

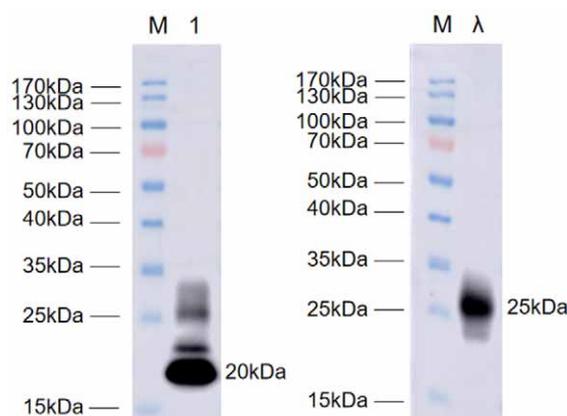


图 3-2 PoIFN- α 和 PoIFN- λ 蛋白纯化后 Western-blot 鉴定

Figure.3-2 PoIFN- α and PoIFN- λ proteins purification followed by Western-blot identification

注: M: 蛋白分子质量标准 26616; 1: 干扰素 α ; 2: 干扰素 λ

Note: M: Protein MW Marker 26616; 1:IFN- α ; 2:IFN- λ

3.4 讨论

通过 ExpiCHOTM 系统对重组质粒进行表达后, 用镍柱亲和层析技术对收集的蛋白进行了纯化, 并用分光光度计对蛋白进行了浓度测定, 随后用 SDS-PAGE 和 Western-blot 对所得蛋白进行了鉴定。鉴定可知本试验成功表达出正确大小的可溶性蛋白, IFN- α 在 20kDa 左右, IFN- λ 在 25kDa 左右, 浓度测定后 IFN- α 为 1.2 mg/mL, IFN- λ 为 0.86 mg/mL, 所得蛋白在相近的研究中, 原核表达下所得蛋白浓度 IFN- α 为 0.254 mg/mL, IFN- γ 为 0.211 mg/mL^[103], 另有研究在原核表达下所得蛋白浓度 IFN- λ 为 0.5 mg/mL^[104], 本试验通过 CHO 表达系统表达的 IFN- α 与 IFN- λ 蛋白在浓度与纯度上相对于原核表达等其他表达方式表现出一定的优势。

第4章 重组猪干扰素单克隆抗体的制备

单克隆抗体是一种高纯度抗体，由筛选后的单株杂交瘤细胞分泌，只能识别特定的一种抗原决定簇。当机体受到抗原刺激时免疫系统被激活，针对抗原不同的蛋白结构，经 APC 传递识别的抗原信息，通过 T 淋巴细胞的协同作用，B 淋巴细胞能分化为浆细胞并分泌一种抗体，该抗体能特异性结合抗原蛋白^[105, 106]。单克隆抗体技术目前广泛应用于临床疾病诊断、治疗等领域，在疾病和传染病方面，通过 ELISA 和 IFA 等实验原理制备相应的试剂盒进行临床诊断和检测；在治疗方面，利用与抗原特异性结合的原理，通过双特异性抗体等技术起到治疗的效果^[107, 108]。

本试验在 CHO 细胞表达系统基础上制备重组猪 IFN- α 和 IFN- λ 蛋白并纯化后制备相应抗体，为后续检测方法的建立以及更为深入的机制和临床应用研究等其他相关实验奠定了基础。

4.1 实验材料

所需试剂与耗材：见附录 1；

所需仪器：见附录 2；

所需相关溶液的配置：见附录 3。

注：本试验中所应用的非洲猪瘟病毒阳性血清等病毒血清均来自于中国农业科学院兰州兽医研究所 P3 级实验室。

4.2 实验方案

4.2.1 BALB/c 小鼠免疫

通过兰州兽医研究所实验动物中心领取 BALB/c 小鼠共 10 只，分为两笼，饲养一周；参照免疫流程^[109]，将纯化后的 IFN- α 和 IFN- λ 蛋白与完全弗氏佐剂混合、乳化，按 100 μg /只的剂量进行皮下注射；15 天后将蛋白与不完全弗氏佐剂乳化进行第二次皮下注射免疫；间隔 15 天后，用相同方法进行第三次免疫；三免 7 天后对小鼠进行眼底采血检测血清效价；融合前 3 天，用不加佐剂的蛋白进行加强免疫，免疫程序如下。

表 4-1 免疫程序^[109]
Table.4-1 The immune Program^[109]

免疫次数 Immunization times	免疫时间 Immunization timing	免疫剂量 Immunization dose	佐剂 Adjuvant	免疫方式 Immune modalities
首免	第 1 天	100 μg/只	完全弗氏佐剂	皮下注射
二免	第 15 天	100 μg/只	不完全弗氏佐剂	皮下注射
三免	第 30 天	100 μg/只	不完全弗氏佐剂	皮下注射
加强免疫	融合前 3 天	100 μg/只	无	皮下注射

4.2.2 小鼠加强免疫前血清效价检测

将接种过三次 IFN- α 和 IFN- λ 蛋白的小鼠进行眼底采血, 37°C 培养箱放置 2 h 后, 4°C 过夜静置, 第二天在 4°C 离心机中 12000 rpm 离心 20 min, 获得小鼠血清。

包被: 取 ELISA 板, 每孔 ASFV 阳性血清与包被液各 50 μL 震荡混匀后滴加, 之后 4°C 过夜包被。

封闭: 配置 5% 脱脂奶粉封闭液, 弃掉包被液并拍打干净, 每孔加入 100 μL 封闭液于 37°C 培养箱封闭 2 h;

孵育一抗: 随即按 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:4000、1:8000、1:12000 的比例将阳性血清与 1×PBS 混合摇匀配置一抗, 待封闭结束后弃掉封闭液并拍打干净。每孔滴加 100 μL 一抗, 于 37°C 培养箱孵育 2 h, 阴性对照为阴性小鼠血清。

孵育二抗: 弃掉一抗, PBST 清洗 6 次并拍打干净, 随后按 1:15000 比例配置山羊抗鼠二抗, 每孔滴加 100 μL, 避光条件下于 37°C 培养箱孵育 1 h。

显色: 弃掉二抗, PBST 清洗 8 次并拍打干净, 随后每孔滴加 100 μL 显色液, 避光条件下于 37°C 培养箱静置 15 min, 随即读取结果。

4.2.3 细胞融合

SP2/0 骨髓瘤细胞制备^[109]:

①将冻存的 SP2/0 细胞取出后迅速置于 37°C 水浴锅中进行复苏, 之后转移至生物安全柜;

②将解冻的细胞转移至 2 mL 的 EP 管中, 3000 rpm 离心 5 min 后弃掉上清;

③用 1640 培养基 (含 20% FBS) 吹打重悬后转移至细胞培养皿中, 在细胞培养箱 (37°C, 5% CO₂) 中静置培养, 待融合前 2 天将其扩大培养以备用。

饲养层细胞制备^[109]:

①准备 4 周龄的 SPF BALB/C 雌性小鼠、消毒好的剪刀镊子、无菌注射器和所需培养基等;

②在细胞融合的前将其脱颈处死，用 75%酒精浸泡进行彻底的全身消毒，之后转移至生物安全柜准备好的容器中并做好固定；

③小心地剪开小鼠的腹部，但不要伤及腹膜，使腹膜充分暴露；用 75%酒精棉小心擦小鼠拭腹膜以达到消毒的目的，然后用 10 mL 的无菌注射器吸取 HAT 选择培养基（含 20% FBS）注射入小鼠腹腔，但注意不要戳破体内脏器，如肠管、脾脏、胃脏等；

④用 75%酒精棉球轻柔地按摩小鼠的腹部，以便培养基能充分的冲洗到小鼠腹腔，大约按摩 2 min 之后吸出培养基，3000 rpm 离心 5 min，弃掉上清；

⑤细胞沉淀 HAT 选择培养基重新悬起并轻轻吹打混匀，调整细胞密度使其最终浓度为 2×10^5 个细胞/mL；

⑥准备 8 个 96 孔板，按照每个孔 100 μ L 将 24-48 h 后观察 96 孔板，若细胞生长状态良好且没有污染即可留存备用；

脾细胞制备^[109]：

①加强免疫后，对小鼠眼球拆除进行采血，随即脱颈处死，并提前准备好高压灭菌过的剪刀镊子、平皿、无菌注射器和所需培养基等；

②用 75%酒精浸泡彻底清洁小鼠后，转移至生物安全柜中并做好固定，用酒精灯灼烧高压灭菌过的剪刀镊子，小心地用剪刀镊子剪开小鼠腹部露出腹膜，在左侧腹膜位置小心剪开腹膜取出脾脏，置于提前准备好的带有 1640 培养基的平皿内；

③首先使用 1mL 针头在脾脏的一侧扎数个孔洞，然后牵引起脾脏，用 10 mL 注射器吸取培养基在脾脏内反复吹吸，直至脾脏失去血色为止；

④弃掉脾脏，用巴氏吸管反复吹吸血内的培养基，然后将其转入 50 mL 离心管内，1500 rpm 离心 5 min 后弃掉上清，吸取 10 mL 1640 培养基轻轻吹打混匀，细胞计数后备用。

细胞融合^[109]：

①参照免疫程序，在 50 mL 离心管中将 SP2/0 细胞与脾细胞按照 1:9 的比例混匀，加入适量 1640 培养基后 1500 rpm 离心 5 min 并在 37℃ 水浴锅中预热 PEG 融合剂和 1640 培养基；

②弃掉上清后，首先吸取 1 mL 的 PEG 融合剂，在 1 min 内慢慢地匀速滴加到离心管中并轻轻搅拌，之后在 40℃ 水浴锅中静置 90s；

③吸取 1 mL 预热的 1640，1 min 内慢慢地匀速滴加到离心管中并轻轻搅拌；

④同样吸取 1 mL 预热的 1640，1 min 内慢慢地匀速滴加到离心管中并轻轻搅拌；

⑤吸取 3 mL 预热的 1640，1 min 内慢慢地匀速滴加到离心管中并轻轻搅拌；

⑥吸取 10 mL 预热的 1640，1min 内慢慢地匀速滴加到离心管中并轻轻搅拌；

⑦吸取 10 mL 预热的 1640，1 min 内慢慢地匀速滴加到离心管中并轻轻搅拌，之后静置 2 min，轻轻颠倒两下后静置 7 min，1000 rpm 离心 8 min，弃掉上清后 800 rpm 离

心 5 min; 此过程全程在 37℃ 水浴中进行;

⑧细胞沉淀用含有 20% FBS 的 HAT 选择培养基将细胞沉淀重悬并按每孔 100 μL 加到制备好的饲养层细胞上, 于细胞培养箱 (37℃, 5% CO_2) 中静置培养, 5 天后用 HAT 培养基换出一半, 10 天后用 HT 培养基全部换出, 待细胞长到板底的 1/4 时, 检测阳性孔。

4.2.4 亚克隆间接 ELISA 检测方法的建立

①最佳包被浓度与一抗稀释浓度的确定:

用方阵滴定法确定抗原包被与一抗稀释的最佳浓度, 本次试验使用碳酸盐缓冲液, 分别包被 50 ng/孔、100 ng/孔、200 ng/孔的蛋白作为抗原, 每孔 100 μL , 4℃ 包被过夜; PBST 清洗后用 5% 脱脂奶粉封闭液进行封闭, PBST 清洗后随后采取加强免疫后的阳性小鼠血清作为一抗, 分别以 1:1000、1:2000、1:4000 三个梯度进行比较, 在 37℃ 孵育 2h; PBST 清洗后选择带有 HRP 标签的鼠抗作为二抗, 稀释度 1:10000, 在 37℃ 培养箱中孵育 1 h, PBST 清洗后于 37℃ 培养箱中显色 10min, 随后加入终止液读取 OD_{450} 数值, 选取 OD_{450} 值小于 0.2 的作为阴性, P/N 值 2.1 以上的作为最佳包被浓度与一抗稀释浓度。

②最佳包被液的确定:

本次试验选用碳酸盐缓冲液与磷酸盐缓冲液两种不同的缓冲液作为包被液, 根据已经确定好的包被浓度与一抗稀释度, 进行 ELISA 检测, 显色后加入终止液读取 OD_{450} 数值, 选取 P/N 值 2.1 以上的作为最佳包被液。

③最佳封闭液的确定:

选用确定好的包被液根据检测出的包被浓度进行包被后, 选取 5% 脱脂奶粉与 1% BSA 两种溶液作为封闭液, 进行 ELISA 检测, 显色后加入终止液读取 OD_{450} 数值, 选取 P/N 值 2.1 以上的作为最佳封闭液。

④最佳封闭时间的确定:

选定出封闭液后, 于 37℃ 分别封闭 1 h 和 2 h, 进行 ELISA 检测, 显色后加入终止液读取 OD_{450} 数值, 选取 P/N 值 2.1 以上的作为最佳封闭时间。

⑤最佳二抗稀释度的确定:

选定好封闭时间后, 将鼠二抗按照 1:10000、1:15000 两个梯度进行稀释, 进行 ELISA 检测, 显色后加入终止液读取 OD_{450} 数值, 选取 P/N 值 2.1 以上的作为最佳二抗稀释度。

⑥最佳优化条件的确定:

筛选出的各项指标即为最佳优化条件。

4.2.5 筛选阳性杂交瘤并亚克隆扩大培养

杂交瘤细胞长至 96 孔板底部 1/4 左右时, 用建立好的间接 ELISA 方法进行筛选。选取 $P/N > 2.1$, $OD_{450} > 2$ 的阳性孔进行亚克隆, 每次克隆前要提前制备饲养层细胞。用 200 μL HT 选择培养基 (含有 20% FBS) 将阳性杂交瘤细胞重悬, 吸取 20 μL 细胞悬液加入至 2 mL 含有 HT 选择培养基的 EP 管内进行倍比稀释, 将阳性杂交瘤细胞按照有限稀释法进行稀释, 将稀释好的细胞悬液按照每孔 100 μL 添加至新制备的饲养层细胞中, 在细胞培养箱 (37°C , 5% CO_2) 中静置培养约 5~7 天, 待细胞长到板底的 1/3 时进行检测。与此同时, 原始孔中的阳性杂交瘤细胞继续换液, 将其扩大培养后冻存备用。经 6 次左右亚克隆, 杂交瘤细胞阳性率达到 100% 即可确定已获得来自单个杂交瘤细胞的单克隆细胞系。待筛选出的阳性杂交瘤细胞生长稳定后逐步扩大培养, 如从 96 孔板转移至 24 孔板之后转移至 12 孔板, 以此类推, 培养液更换为 1640 培养基 (含有 20% FBS), 并将其及时冻存^[110]。

4.2.6 杂交瘤细胞的冻存与复苏

细胞冻存: 用 1640 培养基 (含有 20% FBS) 吹打培养皿内的细胞使其脱落并将溶液移至离心管中, 3000 rpm 离心 5 min 后弃掉上清, 用细胞冻存液 (见附录 3) 将细胞浓度稀释到 1×10^6 个/mL 即可, 分装到细胞管之后将其转入含有异丙醇的常温细胞冻存盒中, 然后梯度降温, 首先于 4°C 放置 30 min, 再于 -20°C 放置 30 min, 其次于 -80°C 冰箱过夜, 次日转至液氮罐中保存^[109];

细胞复苏: 取出细胞后, 将细胞套入 PE 手套迅速放进 37°C 水浴锅静置, 待细胞完全溶化之后转入生物安全柜中, 将细胞转入 EP 管内 3000 rpm 离心 5 min, 弃掉上清, 用 1640 培养基 (含有 20% FBS) 轻轻吹打重悬, 将溶液转移至细胞培养皿培养^[109]。

4.2.7 腹水的制备与纯化

选取 10 周龄左右的 BALB/c 雌性小鼠, 制备腹水前 7 天给每只小鼠注射 500 μL 的不完全弗氏佐剂, 待细胞数量达到 2×10^6 个时, 注入小鼠腹腔中, 小鼠腹部明显胀大后用 5 mL 一次性无菌注射器收集腹水, 之后 2500 rpm 低温离心 20 min, 之后可用细胞筛过滤取清澈的腹水并可通过亲和层析对腹水进行纯化后 -20°C 冰箱保存, 每只小鼠能够取 10 mL 左右的腹水^[111]。

4.2.8 单克隆抗体特异性鉴定

Western-blot 检测：在猪肺泡巨噬细胞中接种塞内卡病毒（Seneca virus A,SVA），48 h 后收取细胞上清，以制备的单克隆抗体为一抗、HRP 标记鼠抗为二抗进行 WB 检测，WB 操作过程同 3.2.2 中蛋白纯化后鉴定。

ELISA 检测：收集免疫 ASFV、猪蓝耳病毒（Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV）后的猪阳性血清，将单克隆抗体包被于 ELISA 96 孔板上，以阳性血清为一抗、猪源 HRP 抗体为二抗，通过建立的间接 ELISA 方法进行检测。

4.2.9 单克隆抗体效价检测与亚型鉴定

根据建立的间接 ELISA 方法对获得的单克隆抗体进行效价检测。使用北京博奥龙公司生产的抗体亚类检测试剂盒对获得的单克隆抗体进行亚型检测。

4.3 结果与分析

4.3.1 小鼠加强免疫前血清效价检测

ASFV 阳性血清抗原与包被液等比混合 4℃包被过夜；通过脱脂奶粉封闭液于 37℃封闭 2 h、一抗于 37℃孵育 2 h、二抗于 37℃孵育 1 h 以及 37℃避光显色 15 min 后，得知免疫 IFN- α 蛋白的小鼠血清效价为 1:4000，免疫 IFN- λ 蛋白的小鼠血清效价为 1:8000，血清效价大于 1:1000 时可进行细胞融合，因而符合细胞融合要求，可以进行加强免疫及后续相关实验。

4.3.2 间接 ELISA 检测方法建立

通过条件优化，最终确定的最佳检测方案为采用碳酸盐缓冲液作为包被液，抗原包被浓度为 100 ng/孔，一抗最佳稀释度为 1:2000，封闭液为 5%脱脂奶粉封闭液，封闭时间为 37℃下封闭 2 h，二抗最佳稀释浓度为 1:10000。

4.3.3 阳性杂交瘤细胞的筛选

IFN- α 经过 4 次亚克隆，IFN- λ 经过 5 次亚克隆后，如图 4-1 所示，最终选取了 A5 (α : 3c6) 和 C1 (λ : 3e8) 进行扩大培养，以进行腹水的制备。

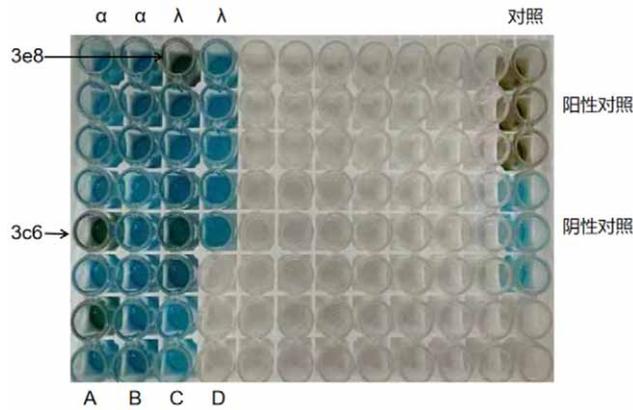
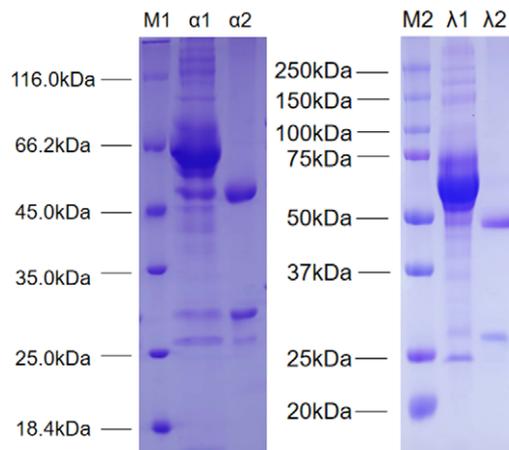


图 4-1 阳性杂交瘤细胞筛选

Figure.4-1 Positive hybridoma cell screening

4.3.4 腹水纯化

腹水纯化后可以清晰地看到抗体的重链与轻链，如图 4-2 所示。

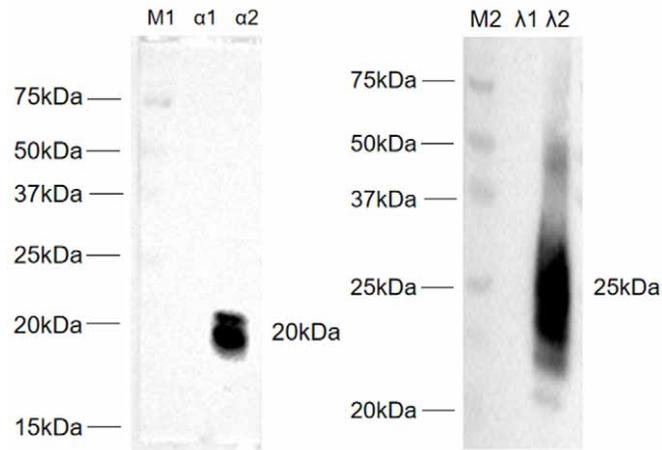
图 4-2 IFN- α 和 IFN- λ 抗体纯化后 SDS-PAGE 鉴定Figure.4-2 IFN- α and IFN- λ antibody were purified and identified by SDS-PAGE

注：M1：蛋白分子质量标准 26610； α 1：IFN- α 抗体纯化流穿液； α 2：IFN- α 抗体纯化洗脱液；M2：蛋白分子质量标准； λ 1：IFN- λ 抗体纯化流穿液； λ 2：IFN- λ 抗体纯化洗脱液；

Note: M1: Protein MW Marker 26610; α 1: IFN- α Flowthrough; α 2: IFN- α Eluent; M2: Protein MW Marker; λ 1: IFN- λ Flowthrough; λ 2: IFN- λ Eluent.

4.3.5 Western-blot 检测

如图 4-3 所示，可知 IFN- α 单抗在 SVA 感染的细胞上清中可以特异性地结合到 IFN- α 且 IFN- λ 单抗在 SVA 感染的细胞上清中也可特异性地结合到 IFN- λ 。

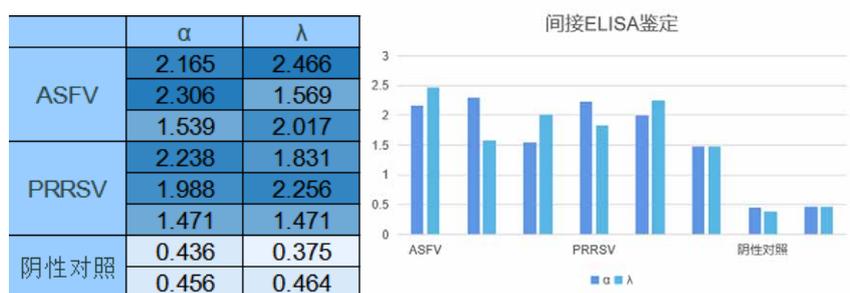
图 4-3 IFN- α 和 IFN- λ 抗体纯化后 Western-Blot 鉴定Figure.4-3 IFN- α and IFN- λ identification by western-blot after antibody purification

注: M1: 电泳蛋白标记 1610374; α 1: 控制组; α 2: 接毒后细胞上清; M2: 电泳蛋白标记 1610374; λ 1: 控制组; λ 2: 接毒后细胞上清;

Note: M1: Electrophoretic protein labeling 1610374; α 1:Control; α 2: Cell supernatant after toxicants; M2: Electrophoretic protein labeling 1610374; λ 1:Control; λ 2: Cell supernatant after toxicants.

4.3.6 间接 ELISA 检测

如图 4-3 所示, 右侧柱状图中横坐标为不同种类的攻毒猪阳性血清与阴性对照, 纵坐标为 OD₄₅₀ 数值, 可以看出 IFN- α 与 IFN- λ 单克隆抗体在 ASFV 和 PRRSV 感染的猪血清中均可特异性检测到相应的 IFN 且效果显著, 表示所制备的抗体灵敏度高、特异性强。

图 4-4 IFN- α 和 IFN- λ 抗体纯化后 ELISA 鉴定Figure.4-4 IFN- α and IFN- λ identification by ELISA after antibody purification

4.3.7 抗体效价与亚型鉴定

根据亚型鉴定试剂盒对抗体亚型进行鉴定, 以 SP2/0 培养液为阴性对照、PBS 为空白

白对照、小鼠阳性血清为阳性对照，经鉴定单抗 IFN- α 与 IFN- λ 单克隆抗体均为 IgG1 亚型、Ig κ 轻链；通过间接 ELISA 对抗体效价进行检测，IFN- α 单克隆抗体效价可达 1:256000，IFN- λ 单克隆抗体效价可达 1:32000，结果如表 5 所示。

表 4-2 IFN- α 与 IFN- λ 单克隆抗体亚型及效价测定Table.4-2 Titer determination of IFN- α monoclonal antibody

名称 Name	重链类型 Type of heavy chain	轻链类型 Type of light chain	抗体效价 Titer of McAb
α :3c6; λ :3e8	IgG1	κ	α :1:256000; λ :1:32000

4.4 讨论

单克隆抗体在免疫分析领域如 ELISA、PCR 检测等方面发挥着重要作用，极大提升了免疫学检测的特异性和灵敏度，广泛应用于食品检测和临床诊断等各大领域^[112]。虽然单克隆抗体制备技术不断发展，出现了新型的制备技术如单 B 细胞扩增和培养等，但杂交瘤技术仍是制备单抗最成熟、最稳定的方法^[113]。本试验制备的 IFN 单抗特异性强、灵敏度高，在不同 IFN 分子和天然构象的检测中应用前景广阔。

本试验将纯化的重组蛋白免疫小鼠，在经过间接 ELISA 筛选和 5 次亚克隆后得到一株能稳定分泌抗 IFN- α 蛋白的单克隆细胞株（3c6）与一株能稳定分泌抗 IFN- λ 蛋白的单克隆细胞株（3e8），亚型鉴定均为 IgG1 亚型、IgG κ 轻链；抗体纯化后 α 效价检测可达 1:256000、 λ 效价检测可达 1:32000。经 Western-blot 与间接 ELISA 验证，制备的单克隆抗体能特异性地检测到攻毒细胞上清中与攻毒猪血清中的干扰素，且单克隆抗体纯度及效价较高，可以满足进一步试验的需求。在此基础上可以在以后的研究中建立不同 IFN 分子的检测方法以及建立研究猪病毒感染和免疫过程中不同细胞因子的分泌情况的关键技术平台，在阻断 IFN 信号通路、辅助研究先天性及获得性免疫等基础研究方面也有一定的应用价值。

第5章 免疫组织化学 IHC 检测单克隆抗体

免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC) 是根据抗原和抗体之间的特异性结合反应来检测、定位细胞和组织中特定抗原的技术, 是研究环境中许多领域的标准工具, 随着抗原提取方法的出现, IHC 已成为解剖病理学临床诊断中的一项重要辅助技术^[114]。抗原提取方法能十分方便地在福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织上进行^[115, 116], 以及用于大容量处理和重复性的自动化方法^[117]。IHC 经常用于帮助肿瘤分类、确定转移瘤的起源部位以及检测日常其他染色方法中不易被发现的一些微小病灶等。此外, 随着技术的不断发展越来越多地被用于提供预测和预后信息等领域, 例如在乳腺癌中检测 HER2 扩增等^[118]。

5.1 实验材料

所需试剂与耗材: 见附录 1;

所需仪器: 见附录 2;

所需相关溶液的配置: 见附录 3。

5.2 实验方案

5.2.1 取材

5.2.1.1 取样

取 ASFV 攻毒后猪脾组织与肝组织, 长宽各 1 cm 左右, 厚度不超过 5 mm。

5.2.1.2 固定

10%福尔马林固定液: 组织块=20:1, 用温水兑 10%福尔马林固定液或甲醛溶液固定液 30 d 即可, 固定时切忌损伤黏膜; 固定时间一般在 3-5 h 即可, 如果 24 h 应封闭瓶口并封前换液。

5.2.1.3 修块

修块时拍照以便以后观察, 用铅笔写小纸条标记组织名称。

5.2.2 脱水过程

5.2.2.1 水洗

在广口瓶中放入已经固定好的组织，瓶口用纱布包裹，于流动的水下冲洗，水洗时间，一般 12 h 以上，固定时间越长则水洗时间越长。

5.2.2.2 脱水

- ①75%酒精中浸泡 1.5 h;
- ②80%酒精中浸泡 1.5 h;
- ③95%酒精 I 中浸泡 1.5 h;
- ④95%酒精 II 中浸泡 12 h 过夜;
- ⑤100%酒精 I 中浸泡 1 h;
- ⑥100%酒精 II 中浸泡 1 h。

5.2.3 透明

- ①100%酒精：二甲苯=1:1，浸泡 2 min;
- ②二甲苯 I 中浸泡 90 s，使组织块油亮，色泽分明鲜亮;
- ③二甲苯 II 中浸泡 90 s，此时组织块质地较硬。

5.2.4 浸蜡

配置溶液：苯蜡：软蜡：苯=1:1；石蜡 I：软蜡；石蜡 II：软蜡：硬蜡=1:1；石蜡 III：软蜡：硬蜡=3:2；其中软蜡使用环境为 53-54℃，硬蜡使用环境为 60-62℃。

- ①苯蜡，56-58℃温箱中放置 30 min;
- ②石蜡 I，56-58℃温箱中放置 1 h;
- ③石蜡 II，56-58℃温箱中放置 2 h;
- ④石蜡 III，56-58℃温箱中放置 2 h。

注：温箱温度太高会烧坏组织，太低时会凝固。

5.2.5 包埋

包埋用石蜡：硬蜡：软蜡=3:2;

首先为了预防石蜡倒入后外溢，在框架上涂抹凡士林，然后在有石棉网的电炉上对

包埋块用石蜡及浸蜡组织块进行保温；之后先将少量包埋用石蜡倒入框架中，再用镊子将组织块迅速移入框架内倒入石蜡，完全凝固后取出备用。

5.2.6 切片

本切片要使用防脱切片，利用冷冻切片机固定好组织块后进行切割，厚度控制在20-30 μm ，切片要避免刀痕和组织折叠。

5.2.7 脱蜡

首先将切片放置于65℃烘箱中干燥30 min；之后于二甲苯 I 中浸泡20 min，再于二甲苯 II 中浸泡20 min。

5.2.8 过梯度酒精

- ①100%酒精中浸泡2 min；
- ②95%酒精中浸泡2 min；
- ③85%酒精中浸泡2 min 后流水冲洗。

5.2.9 洗涤

- ①蒸馏水清洗2 min；
- ②PBS1 清洗2 min；
- ③PBS2 清洗2 min；
- ④PBS3 信息2 min。

5.2.10 抗原修复并洗涤

向高压锅中加入柠檬酸盐溶液并于煮沸后放入切片，关闭高压锅，待高压锅冒气时开始计时2 min，然后关闭电源，待其自然冷却至室温后取出切片，洗涤过程同5.2.9，甩干后用蜡笔在组织周围画圈。

5.2.11 消除过氧化物酶并洗涤

使用内源性过氧化物酶阻断剂(试剂1)滴加在切片样品表面，常温下孵育10 min；

洗涤同 5.2.9，之后甩干。

5.2.12 添加非特异染色阻断剂

加入非特异染色阻断剂（试剂 2）每个样加 70 μ L，静置 10 min；将玻片稍微倾斜吸除山羊血清，用卫生纸将周围吸干。

5.2.13 加一抗并洗涤

用通用的抗体稀释液稀释制备出的单克隆抗体，比例为 1:10000，每个样加 70 μ L；之后洗涤同 5.2.9。

5.2.14 加生物素标记物

添加生物素标记物 2gG 聚合物（试剂 3），静置 10 min 后进行洗涤。

5.2.15 加链霉菌抗生物素蛋白

添加链霉菌抗生物素蛋白—过氧化物酶（试剂 4），静置 10 min 后进行洗涤。

5.2.16 显色

配置 DAB 显色液：浓缩 DAB 一滴与 DAB 底物 1 mL 混合；

滴加 2-5 滴 DAB 显色液，在显微镜下观察，有阳性结果时及时用流水冲洗（先放水里浸泡一下然后用流水冲）。

5.2.17 苏木素染色

苏木素染色 2 min，流水反蓝 5 min，期间分化 1 次，分化时快速将片子在分化液中蘸一下。

5.2.18 脱水

①80%酒精中浸泡 2 min；

②95%酒精 I 中浸泡 2 min；

- ③95%酒精 II 中浸泡 2 min;
- ④无水乙醇 I 中浸泡 2 min;
- ⑤无水乙醇 II 中浸泡 2 min;
- ⑥二甲苯 I 中浸泡 2 min;
- ⑦二甲苯 II 中浸泡 2 min。

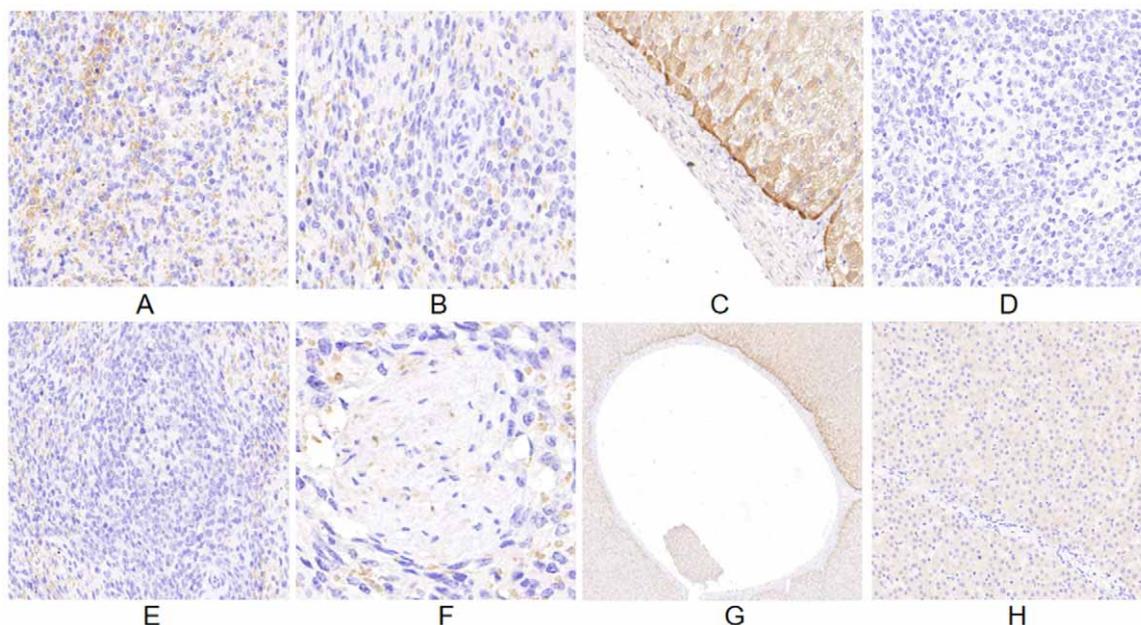
5.2.19 封片

用吹风机吹干后,用枪头将树胶滴 1 滴在片子上,然后将片子压在载玻片上,待片子干燥后镜下观察。

5.3 结果与分析

5.3.1 IFN- α 抗体 IHC 结果分析

根据图 5-1 (其中图 A、B、C、D、E、F、H 放大倍数为 30 倍,图 G 放大倍数为 9 倍)可知,在攻毒猪脾组织中,IFN- α 单抗可以特异性地结合脾组织中产生的 IFN- α ,且在红脾区结合较多,在白脾区、脾小体和髓索区域结合相对较少;肝组织中 IFN- α 主要结合在中央静脉周围而其余区域结合较少。由此可知在病毒感染状态下,组织中产生的 IFN- α 能被制备的抗体特异性识别,且 IFN- α 主要集中在红细胞较为密集的区域,如红脾区以及肝中央静脉周围,通过结论同样可证本试验制备的 IFN- α 单克隆抗体灵敏度高、特异性强,能特异性识别并结合产生的 IFN- α 。

图 5-1 IFN- α 单克隆抗体 IHC 检测Figure.5-1 IFN- α monoclonal antibody was detected by IHC

注：A：红脾区；B：白脾区；C：肝中央静脉；D：脾阴性；E：脾小体；F：椭球；G：肝中央静脉；H：肝阴性

Note: A: Red spleen region; B: White spleen area; C: Central hepatic vein; D: Spleen negative; E: Splenic corpuscle; F: Ellipsoid; G: Central hepatic vein; H: Liver negative.

5.3.2 IFN- λ 抗体 IHC 结果分析

根据图 5-2（其中图 A、B、D、E、F、G、H 放大倍数为 30 倍，图 C 放大倍数为 9 倍）可知，在攻毒猪脾组织中，IFN- λ 单抗可以特异性地结合脾组织中产生的 IFN- λ ，表明制备的 IFN- λ 单克隆抗体灵敏度高、特异性强。由于 IFN- λ 主要作用于黏膜上皮，所以整体上在组织中 IFN- λ 阳性细胞相对于 IFN- α 较少，但与 IFN- α 相同的是在红脾区结合较多，在白脾区、脾小体和椭球区域结合相对较少；肝组织中在中央静脉周围结合较多而其余区域结合相对较少。由此可知在病毒感染状态下，组织中产生的 IFN- λ 能被制备的抗体特异性识别，且 IFN- λ 同样主要集中在红细胞较为密集的区域，如红脾区以及肝中央静脉周围。

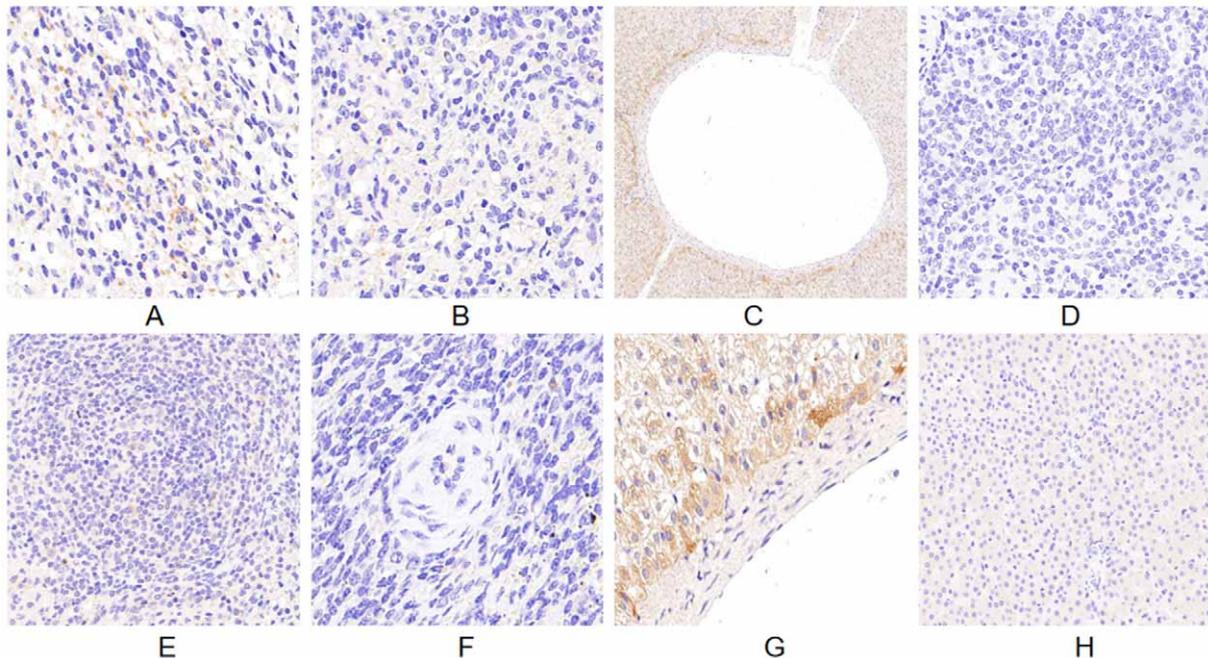


图 5-2 IFN-λ 单克隆抗体 IHC 检测

Figure.5-2 IFN-λ monoclonal antibody was detected by IHC

注：A：红脾区；B：白脾区；C：肝中央静脉；D：脾阴性；E：脾小体；F：椭球；G：肝中央静脉；H：肝阴性

Note: A: Red spleen region; B: White spleen area; C: Central hepatic vein; D: Spleen negative; E: Splenic corpuscle; F: Ellipsoid; G: Central hepatic vein; H: Liver negative.

5.4 讨论

IHC 可以使用针对特定抗原的标记抗体来识别或定位组织或细胞内的抗原，已成为诊断病理学及其他研究中确定感兴趣抗原的组织分布的重要工具^[119]。通过利用 ASFV 感染猪的脾脏与肝脏组织切片进行 IFN 特异性免疫组织化学检测，由图可知，在病毒感染猪的脏器组织中，脾脏中可见广泛 IFN 阳性细胞，且红脾区较多，白脾区、脾小体等相对较少，而脾组织对照和肝脏中信号较少，肝脏中阳性细胞主要集中于中央静脉周围。由此首先可验证本试验制备的单克隆抗体灵敏度高、特异性强，IFN- α 与 IFN- λ 单克隆抗体在 ASFV 攻毒后的猪脏器组织中均可特异性结合脾组织中产生地相应的 IFN- α 与 IFN- λ ，且表示在病毒感染状态下脾脏组织内 IFN 水平明显升高，而肝脏组织较弱，IFN 分布部位也各不相同。根据 IHC 鉴定可初步推断病毒感染状态下组织中的 IFN 部分由组织本身产生，还有一部分由血液运输而来。

本试验证明通过制备的抗体可以辅助研究天然免疫及获得性免疫等基础实验，如通过不同时间点对攻毒后的猪组织进行免疫染色，利用不同时间点不同组织中 IFN 产生分泌的情况来辅助研究获得性免疫进程，且在探索攻毒效率与保护机制等方面提供了一定

的科学依据与应用价值。

第6章 全文结论

- 1、成功构建出猪源干扰素重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- α 和 pcDNA3.1-PoIFN- λ 。
- 2、成功表达并纯化出正确大小的可溶性蛋白，IFN- α 大小在 20 kDa 左右、浓度为 1.2 mg/mL，IFN- λ 大小在 25 kDa 左右、浓度为 0.86 mg/mL。
- 3、成功制备出 rPoIFN- α 和 rPoIFN- λ 的单克隆抗体，且抗体灵敏度高、特异性强；IFN- α 效价检测为 1:256000，IFN- λ 效价检测为 1:32000；二者亚型鉴定均为 IgG1 亚型、Ig κ 轻链且 Western 与 ELISA 均可特异识别对应 IFN。
- 4、IFN- α 与 IFN- λ 单克隆抗体均成功在 ASFV 攻毒猪脏器组织中特异性检测到组织中产生的 IFN- α 与 IFN- λ 阳性细胞以及二者在肝脏和脾脏组织中的分布状态，与 Western-blot 和 ELISA 结果均验证了所制备的单克隆抗体的灵敏性与特异性。

参考文献

- [1] RODRIGUEZ J M, SALAS M L. African swine fever virus transcription [J]. *Virus Res*, 2013, 173(1): 15-28.
- [2] SALGUERO F J. Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 282.
- [3] KRAUSE C D, PESTKA S. Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives [J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 106(3): 299-346.
- [4] NAGANO Y, KOJIMA Y. [Inhibition of vaccinia infection by a liquid factor in tissues infected by homologous virus] [J]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1958, 152(11): 1627-1629.
- [5] 侯云德. 干扰素及其临床应用—干扰素概述、定义和分类 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2007, 21(04): 408-411.
- [6] 徐先军, 谭勇, 王学进. 兽用干扰素的研究进展 [J]. *中国动物保健*, 2019, 21(07): 58-59.
- [7] LASFAR A, LEWIS-ANTES A, SMIRNOV S V, et al. Characterization of the mouse IFN-lambda ligand-receptor system: IFN-lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(8): 4468-4477.
- [8] ANK N, WEST H, PALUDAN S R. IFN-lambda: novel antiviral cytokines [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2006, 26(6): 373-379.
- [9] SAMUEL C E. Antiviral actions of interferons [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(4): 778-809.
- [10] RAUCH A, KUTALIK Z, DESCOMBES P, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(4): 1338-1345.
- [11] LEE A J, ASHKAR A A. Herpes simplex virus-2 in the genital mucosa: insights into the mucosal host response and vaccine development [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2012, 25(1): 92-99.
- [12] RANDALL R E, GOODBOURN S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 1): 1-47.
- [13] CLEMENS M J. Translational control in virus-infected cells: models for cellular stress responses [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16(1): 13-20.
- [14] MARTENS S, HOWARD J. The interferon-inducible GTPases [J]. *Annu Rev Cell*

- Dev Biol, 2006, 22: 559-589.
- [15] PORTUGAL R, LEITÃO A, MARTINS C. Modulation of type I interferon signaling by African swine fever virus (ASFV) of different virulence L60 and NHV in macrophage host cells [J]. Vet Microbiol, 2018, 216: 132-141.
- [16] GARCÍA-BELMONTE R, PÉREZ-NÚÑEZ D, PITTAU M, et al. African Swine Fever Virus Armenia/07 Virulent Strain Controls Interferon Beta Production through the cGAS-STING Pathway [J]. J Virol, 2019, 93(12).
- [17] ITO T, YANG M, MAY W S. RAX, a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling [J]. J Biol Chem, 1999, 274(22): 15427-15432.
- [18] TALLÓCZY Z, VIRGIN H W T, LEVINE B. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1 [J]. Autophagy, 2006, 2(1): 24-29.
- [19] SCHNEIDER W M, CHEVILLOTTE M D, RICE C M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses [J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 513-545.
- [20] ZHANG Q, KE H, BLIKSLAGER A, et al. Type III Interferon Restriction by Porcine Epidemic Diarrhea Virus and the Role of Viral Protein nsp1 in IRF1 Signaling [J]. J Virol, 2018, 92(4).
- [21] SHEPPARD P, KINDSVOGEL W, XU W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R [J]. Nat Immunol, 2003, 4(1): 63-68.
- [22] VACHON V K, CALDERON B M, CONN G L. A novel RNA molecular signature for activation of 2'-5' oligoadenylate synthetase-1 [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(1): 544-552.
- [23] ESKILDSEN S, JUSTESEN J, SCHIERUP M H, et al. Characterization of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(12): 3166-3173.
- [24] ZHANG Q, PIZZORNO A, MIORIN L, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with critical influenza pneumonia [J]. J Exp Med, 2022, 219(11).
- [25] SNELL L M, MCGAHA T L, BROOKS D G. Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer [J]. Trends in Immunology, 2017, 38(8): 542-557.
- [26] GRESSER I, BOURALI C, LEVY J, et al. Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1969, 63(1): 51-57.
- [27] HANAHAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [28] AKIYAMA M, IWASE S, HORIGUCHI-YAMADA J, et al. Interferon- α repressed telomerase along with G1-accumulation of Daudi cells [J]. Cancer letters, 1999, 142(1): 23-30.

- [29] TAYLOR R C, CULLEN S P, MARTIN S J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2008, 9(3): 231-241.
- [30] CHAWLA-SARKAR M, LEAMAN D W, BORDEN E C. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)- β compared with IFN- α 2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines [J]. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7(6): 1821-1831.
- [31] RONCALLI J G, TONGERS J, RENAULT M A, et al. Endothelial progenitor cells in regenerative medicine and cancer: a decade of research [J]. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(5): 276-283.
- [32] BORDEN E C, JACOBS B, HOLLOVARY E, et al. Gene regulatory and clinical effects of interferon β in patients with metastatic melanoma: a phase II trial [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31(5): 433-440.
- [33] LEGROS L, GUILHOT J, HUAULT S, et al. Interferon decreases VEGF levels in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib [J]. *Leuk Res*, 2014, 38(6): 662-665.
- [34] TAKANO S, ISHIKAWA E, MATSUDA M, et al. Interferon- β inhibits glioma angiogenesis through downregulation of vascular endothelial growth factor and upregulation of interferon inducible protein 10 [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(5): 1837-1846.
- [35] ZHANG T, SUN H C, ZHOU H Y, et al. Interferon alpha inhibits hepatocellular carcinoma growth through inducing apoptosis and interfering with adhesion of tumor endothelial cells [J]. *Cancer Lett*, 2010, 290(2): 204-210.
- [36] ROSSI Ú A, FINOCCHIARO L M, GLIKIN G C. Interferon- β gene transfer inhibits melanoma cells adhesion and migration [J]. *Cytokine*, 2017, 89: 201-208.
- [37] ZHOU L, ZHANG Y, WANG Y, et al. A Dual Role of Type I Interferons in Antitumor Immunity [J]. *Adv Biosyst*, 2020, 4(11): e1900237.
- [38] PESTKA S, KRAUSE C D, WALTER M R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors [J]. *Immunol Rev*, 2004, 202: 8-32.
- [39] JAITIN D A, ROISMAN L C, JAKS E, et al. Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN- α 2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN- β [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(5): 1888-1897.
- [40] GAVUTIS M, LATA S, LAMKEN P, et al. Lateral ligand-receptor interactions on membranes probed by simultaneous fluorescence-interference detection [J]. *Biophys J*, 2005, 88(6): 4289-4302.
- [41] PLATANIAS L C, UDDIN S, DOMANSKI P, et al. Differences in interferon alpha and beta signaling. Interferon beta selectively induces the interaction of the alpha and betaL subunits of the type I interferon receptor [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(39): 23630-23633.

- [42] DOMANSKI P, FISH E, NADEAU O W, et al. A region of the beta subunit of the interferon alpha receptor different from box 1 interacts with Jak1 and is sufficient to activate the Jak-Stat pathway and induce an antiviral state [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(42): 26388-26393.
- [43] LE BON A, TOUGH D F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon [J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14(4): 432-436.
- [44] MCNAB F, MAYER-BARBER K, SHER A, et al. Type I interferons in infectious disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(2): 87-103.
- [45] SHAABANI N, DUHAN V, KHAIRNAR V, et al. CD169(+) macrophages regulate PD-L1 expression via type I interferon and thereby prevent severe immunopathology after LCMV infection [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(11): e2446.
- [46] ANK N, WEST H, BARTHOLDY C, et al. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo [J]. *J Virol*, 2006, 80(9): 4501-4509.
- [47] M6CSAI A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(7): 1283-1299.
- [48] MANTOVANI A, CASSATELLA M A, COSTANTINI C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(8): 519-531.
- [49] ESPINOSA V, DUTTA O, MCEL RATH C, et al. Type III interferon is a critical regulator of innate antifungal immunity [J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(16).
- [50] BROGGI A, TAN Y, GRANUCCI F, et al. IFN- λ suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(10): 1084-1093.
- [51] CHRYSANTHOPOULOU A, KAMBAS K, STAKOS D, et al. Interferon lambda1/IL-29 and inorganic polyphosphate are novel regulators of neutrophil-driven thromboinflammation [J]. *J Pathol*, 2017, 243(1): 111-122.
- [52] MENNECHET F J, UZé G. Interferon-lambda-treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells [J]. *Blood*, 2006, 107(11): 4417-4423.
- [53] JORDAN W J, ESkDaLE J, SRINIVAS S, et al. Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response [J]. *Genes Immun*, 2007, 8(3): 254-261.
- [54] KOLTSIDA O, HAUSDING M, STAVROPOULOS A, et al. IL-28A (IFN- λ 2) modulates lung DC function to promote Th1 immune skewing and suppress allergic airway disease [J]. *EMBO Mol Med*, 2011, 3(6): 348-361.
- [55] FINOTTI G, TAMASSIA N, CASSATELLA M A. Interferon- λ s and Plasmacytoid Dendritic Cells: A Close Relationship [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1015.

- [56] KELLY A, ROBINSON M W, ROCHE G, et al. Immune Cell Profiling of IFN- λ Response Shows pDCs Express Highest Level of IFN- λ R1 and Are Directly Responsive via the JAK-STAT Pathway [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2016, 36(12): 671-680.
- [57] FINOTTI G, TAMASSIA N, CALZETTI F, et al. Endogenously produced TNF- α contributes to the expression of CXCL10/IP-10 in IFN- λ 3-activated plasmacytoid dendritic cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99(1): 107-119.
- [58] FINOTTI G, TAMASSIA N, CASSATELLA M A. Synergistic production of TNF α and IFN α by human pDCs incubated with IFN λ 3 and IL-3 [J]. *Cytokine*, 2016, 86: 124-131.
- [59] ZHENG Y W, LI H, YU J P, et al. Interferon- λ s: special immunomodulatory agents and potential therapeutic targets [J]. *J Innate Immun*, 2013, 5(3): 209-218.
- [60] THOMAS C, MORAGA I, LEVIN D, et al. Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons [J]. *Cell*, 2011, 146(4): 621-632.
- [61] KAGAN J C, SU T, HORNG T, et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(4): 361-368.
- [62] ODENDALL C, VOAK A A, KAGAN J C. Type III IFNs Are Commonly Induced by Bacteria-Sensing TLRs and Reinforce Epithelial Barriers during Infection [J]. *J Immunol*, 2017, 199(9): 3270-3279.
- [63] DAVIS G L, BALART L A, SCHIFF E R, et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial [J]. *N Engl J Med*, 1989, 321(22): 1501-1506.
- [64] GREENBERG H B, POLLARD R B, LUTWICK L I, et al. Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis [J]. *N Engl J Med*, 1976, 295(10): 517-522.
- [65] COOKSLEY W G, PIRATVISUTH T, LEE S D, et al. Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B [J]. *J Viral Hepat*, 2003, 10(4): 298-305.
- [66] DI TROLIO R, SIMEONE E, DI LORENZO G, et al. The use of interferon in melanoma patients: a systematic review [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26(2): 203-212.
- [67] MOCELLIN S, PASQUALI S, ROSSI C R, et al. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(7): 493-501.
- [68] ARYA R, BHATTACHARYA A, SAINI K S. Dictyostelium discoideum--a promising expression system for the production of eukaryotic proteins [J]. *Faseb j*, 2008, 22(12): 4055-4066.

- [69] KHOW O, SUNTRARACHUN S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 2(2): 159-162.
- [70] DONG X, TANG B, LI J, et al. Expression and purification of intact and functional soybean (*Glycine max*) seed ferritin complex in *Escherichia coli* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(2): 299-307.
- [71] LESLEY S A. High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world [J]. *Protein Expr Purif*, 2001, 22(2): 159-164.
- [72] STEVENS R C. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology [J]. *Structure*, 2000, 8(9): 177-185.
- [73] DIECKMAN L, GU M, STOLS L, et al. High throughput methods for gene cloning and expression [J]. *Protein Expr Purif*, 2002, 25(1): 1-7.
- [74] GERNGROSS T U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(11): 1409-1414.
- [75] GELLISSEN G, STRASSER A W, SUCKOW M. Key and criteria to the selection of an expression platform [J]. *Production of recombinant proteins—Novel microbial and eukaryotic expression systems*, 2005(2): 1-5.
- [76] HITZEMAN R A, CHEN C Y, DOWBENKO D J, et al. Use of heterologous and homologous signal sequences for secretion of heterologous proteins from yeast [J]. *Methods Enzymol*, 1990, 185: 421-440.
- [77] WILDT S, GERNGROSS T U. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(2): 119-128.
- [78] KIM J Y, KIM Y G, LEE G M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(3): 917-930.
- [79] 李国坤, 高向东, 徐晨. 哺乳动物细胞表达系统研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(01): 95-100.
- [80] SMITH G E, SUMMERS M D, FRASER M J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector [J]. *Mol Cell Biol*, 1983, 3(12): 2156-2165.
- [81] KLENK H D. Post-translational modifications in insect cells [J]. *Cytotechnology*, 1996, 20(1-3): 139-144.
- [82] PIJLMAN G P, VAN SCHIJNDEL J E, VLAK J M. Spontaneous excision of BAC vector sequences from bacmid-derived baculovirus expression vectors upon passage in insect cells [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(Pt 10): 2669-2678.
- [83] RAMOS-VARA J A. Technical aspects of immunohistochemistry [J]. *Vet Pathol*, 2005, 42(4): 405-426.

- [84] KAUFMANN S H E. Immunology's Coming of Age [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 684.
- [85] KöHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [86] KöHLER G, MILSTEIN C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion [J]. *Eur J Immunol*, 1976, 6(7): 511-519.
- [87] NELSON A L, DHIMOLEA E, REICHERT J M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(10): 767-774.
- [88] GAO Y, HUANG X, ZHU Y, et al. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2018, 39(4): 351-364.
- [89] MAGGON K. Monoclonal antibody "gold rush" [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(18): 1978-1987.
- [90] HUDIS C A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(1): 39-51.
- [91] ALINARI L, LAPALOMBELLA R, ANDRITSOS L, et al. Alemtuzumab (Campath-1H) in the treatment of chronic lymphocytic leukemia [J]. *Oncogene*, 2007, 26(25): 3644-3653.
- [92] PRESTA L G, CHEN H, O'CONNOR S J, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(20): 4593-4599.
- [93] KIM K J, LI B, WINER J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo [J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 841-844.
- [94] HAN L N, HE S, WANG Y T, et al. Advances in monoclonal antibody application in myocarditis [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2013, 14(8): 676-687.
- [95] 尹宝英, 吴旭锦, 熊忙利. 猪流行性腹泻诊断方法研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2013, 34(12): 156-159.
- [96] 龙云凤, 王毅谦, 姜珊, 等. 猪 δ 冠状病毒检测方法研究进展 [J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49(03): 116-121.
- [97] ZHANG J. Porcine deltacoronavirus: Overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution [J]. *Virus Res*, 2016, 226: 71-84.
- [98] 孙延举. 猪圆环病毒 3 型 PCR-ELISA 检测技术研究及应用 [D]. 河南科技学院, 2022.
- [99] ADAMS J C. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains [J]. *J Histochem Cytochem*, 1992, 40(10): 1457-1463.
- [100] MEDRANO R F V, HUNGER A, MENDONCA S A, et al. Immunomodulatory and

- antitumor effects of type I interferons and their application in cancer therapy [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 71249-71284.
- [101] 王彦彬. 猪干扰素 α 和 γ 在杆状病毒/昆虫细胞系统中表达及重组蛋白初步应用 [D]. 河南农业大学, 2008.
- [102] 张丽伟. 重组猪干扰素 $\alpha 6$ 和 β 的表达及其抗口蹄疫病毒活性研究 [D]. 塔里木大学, 2021.
- [103] 赵伟鸽. 猪 α 、 γ 干扰素的原核表达、纯化及抗病毒活性初步检测 [D]. 上海交通大学, 2010.
- [104] 潘晓梅, 窦永喜, 骆学农, 等. 猪干扰素- γ 基因的表达、纯化及活性分析 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2009, 44(02): 7-12+25.
- [105] POTTER M, BOYCE C R. Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants [J]. *Nature*, 1962, 193: 1086-1087.
- [106] 夏紫金, 王颖钊, 陈俊. 开创生物医学新纪元的单克隆抗体技术 [J]. *科学通报*, 2020, 65: 3091-3099.
- [107] 郭粉粉, 梁文波, 张学梅. 单克隆抗体制备技术及应用的研究进展 [J]. *医学综述*, 2011, 17(08): 1129-1131.
- [108] 赵晓瑞, 毛晓燕. 单克隆抗体表位分析技术的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(05): 555-562.
- [109] 吴桐. 猪伪狂犬病病毒 HeN1 株 gE 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定 [D]. 黑龙江八一农垦大学, 2017.
- [110] 曹黎黎, 刘丹丹, 卫娜, 等. 牛 IFN- γ 单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2011, 41(07): 741-746.
- [111] 刘路. 抗胰岛素单克隆抗体和多克隆抗体的制备 [D]. 东北师范大学, 2016.
- [112] 李青梅, 郭军庆, 孟泽锬, 等. H9N2 亚型禽流感病毒中和单克隆抗体的制备与应用 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(10): 3761-3769.
- [113] KUMAR R, KUMARI R, KHAN L, et al. Isolation and Characterization of Cross-Neutralizing Human Anti-V3 Single-Chain Variable Fragments (scFvs) Against HIV-1 from an Antigen Preselected Phage Library [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 187(3): 1011-1027.
- [114] LIN F, CHEN Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2014, 138(12): 1564-1577.
- [115] MAGAKI S, HOJAT S A, WEI B, et al. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1897: 289-298.
- [116] SHI S R, KEY M E, KALRA K L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections [J]. *J Histochem Cytochem*, 1991, 39(6): 741-748.

- [117] PRICHARD J W. Overview of automated immunohistochemistry [J]. Arch Pathol Lab Med, 2014, 138(12): 1578-1582.
- [118] WOLFF A C, HAMMOND M E, HICKS D G, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update [J]. Arch Pathol Lab Med, 2014, 138(2): 241-256.
- [119] HUSSAINI H M, SEO B, RICH A M. Immunohistochemistry and Immunofluorescence [J]. Methods Mol Biol, 2023, 2588: 439-450.

附录

A 主要试剂与耗材

试剂与耗材名称	公司
反转录酶	诺唯赞生物科技股份有限公司
DH5 α 感受态细胞	北京全式金生物技术有限公司
病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
T4 连接酶	NEB(北京)有限公司
One Step RT-PCR 试剂盒	宝日医生物技术(北京)有限公司
DL 5000 DNA Marker	宝日医生物技术(北京)有限公司
Prestained Protein Ladder 26616	赛默飞世尔科技公司
Protein MW Marker 26610	赛默飞世尔科技公司
质粒小提试剂盒	赛默飞世尔科技公司
胶回收试剂盒	赛默飞世尔科技公司
限制性内切酶 (HindIII和 Xho I)	赛默飞世尔科技公司
1640 培养基	赛默飞世尔科技公司
质粒大提试剂盒	德国 MACHERY-NAGEL 公司
核酸酶	百川开泰生物技术(北京)有限公司
亚型鉴定试剂盒	北京博奥龙公司
FBS 胎牛血清	北京博奥龙公司
HT	美国西格玛 sigma
HAT	美国西格玛 sigma

B 主要仪器

仪器名称	厂家
生物安全柜	美国 AIRTECH
数显恒温水浴锅	晶玻
恒温金属浴	As ONE
-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱	赛默飞世尔科技公司
浓度测定仪/吸光光度仪	赛默飞世尔科技公司
CO $_2$ 细胞培养箱	赛默飞世尔科技公司
超速冷冻离心机	赛默飞世尔科技公司
移液器	赛默飞世尔科技公司
超声破碎机	上海 ATS Engineering INC

离心机	艾本德 EPPENDORF
PCR 仪	德国 Biometra
亲和纯化层析仪	AKTA pure
纯水机	四川优普超纯科技有限公司
PH 检测仪	梅特勒托利多 METTLER TOLEDO
核酸电泳仪	北京市六一仪器厂
电泳/转膜仪	美国伯乐 (Bio-Rad)
高分辨图像采集系统	美国伯乐 (Bio-Rad)
恒温培养摇床	上海旻泉仪器有限公司
全自动酶标仪	美国 Sonics
电子天平、振荡器	奥豪斯国际贸易(上海)有限公司
-40℃冰箱	海尔 Haier
制冰机	斯科茨曼(Scotsman)
脱色摇床	其林贝尔仪器制造有限公司(Kylin-Bell)
加热磁力搅拌器	杭州米欧仪器有限公司 (MIULAB)

C 主要相关溶液

溶液	配置方法
1%琼脂糖凝胶	0.3 g 琼脂糖+30 mL 1×TAE+3 μL 核酸染料
SDS-PAGE 凝胶	SDS-PAGE 分离胶+SDS-PAGE 浓缩胶 12%SDS-PAGE 分离胶(15 mL): 4.9 mL H ₂ O+6.0 mL 30%丙烯酰胺+3.8 mL 1.5M Tris-HCL(PH 8.8)+0.15 mL 10%SDS+0.15 mL 10%APS+0.006 mL TEMED SDS-PAGE 浓缩胶(5 mL): 3.4 mL H ₂ O+0.83 mL 30%丙烯酰胺+0.63 mL 1M Tris-HCL(PH 6.8)+0.05 mL 10%SDS+0.05 mL 10%APS+0.005 mL TEMED
30%丙烯酰胺	丙烯酰胺 29.2 g/100 mL+甲叉双丙烯酰胺 0.8 g/100 mL, 加入纯水充分溶解后, 定容到 100 mL, 避光保存于 4℃冰箱
1.5M Tris-HCL (PH8.8)	称取 181.7 g Tris, 加入纯水充分溶解, 调节 pH 至 8.8, 最后将溶液体积定容到 1 L, 高压灭菌后室温保存
1M Tris-HCL (PH6.8)	称取 121.1 g Tris, 加入纯水充分溶解, 调节 pH 至 6.8, 最后将溶液体积定容到 1 L, 高压灭菌后室温保存
10%SDS	称取 10g SDS, 加入纯水溶解后, 定容到 100 mL, 室温保存。
10%APS	称取 1 g 过硫酸铵, 加入纯水充分溶解后, 定容到 1 mL, 保存于 4℃冰箱, 可使用 2 周, 现配现用
5×SDS-PAGE Loading Buffer	1.25 mL 1M Tris-HCL (PH6.8) +0.5 g SDS+25 mg BPB+2.5 mL 甘油, 加入纯水后定容至 5 mL, 加入 0.25 mL 2-ME 室温保存一个月
10×电泳液	30.3 g Tris base, 144.0 g Glycine, 10.0 g SDS 之后纯水定容至 1L
1×电泳液	100 mL 10×电泳液+900 mL 纯水
10×转膜液	30.3g Tris base, 144g glycine, 之后定容至1 L
1×转膜液	100 mL 10×转膜液+200 mL 甲醇+700 mL纯水

10×TBS	24.23 g Tris, 80.06 g NaCl, 加入800 mL纯水后PH调至7.6, 之后纯水定容至1 L
1×TBST	100 mL 10×TBS+900 mL纯水+1 mL Twine
5%脱脂奶粉封闭液	2.5 g 脱脂奶粉+50 mL TBST
LB 培养基	10g Tryptone+5g Yeast Extract+10g NaCl, 加入 800 mL 纯水充分搅拌后调节PH至7.0, 定容至1L后高温灭菌, 4℃保存
LB 固体培养基	10g Tryptone+5g Yeast Extract+10g NaCl, 加入 800 mL 纯水充分搅拌后调节PH至7.0, 加入 15 g Agar 混匀, 定容至1L后高温灭菌
考马斯亮蓝 R-250 染色液	称取 1 g 考马斯亮蓝 R-250 置于 1 L 烧杯中, 量取 250 mL 异丙醇加入烧杯搅拌均匀, 加入 100 mL 冰醋酸搅拌均匀, 加入 650 mL 纯水搅拌均匀, 滤纸除去颗粒物室温保存
考马斯亮蓝染色脱色液	100 mL 醋酸+50 mL 乙醇+850 mL 纯水, 充分混合后室温保存
PBST	取 2000 mL PBS 后 PH 值调至 7.4, 按 0.5%比例加入 1 mL Tween-20
IPTG	IPTG 0.5g+10 ml 高压灭菌纯水, 细胞筛过滤后-20℃保存
Ampicillin	Ampicillin 1 g+10 ml 高压灭菌纯水, 细胞筛过滤后-20℃保存
10×Loading Buffer (RNA)	200 μL 0.5M EDTA(PH 8.0)+25 mg Bromophenol Blue+25 mg Xylene Cyanol FF 加入到 10 mL 离心管中, 再加入 4 mL DEPC 水后搅拌溶解, 加入 5 mL 甘油后充分混匀, 最后用 DEPC 水定容至 10 mL, 室温保存。
6×Loading Buffer (DNA)	4.4 g EDTA+250 mg Bromophenol Blue+250mg Xylene Cyanol FF 加入到 500 mL 烧杯, 加入 200 mL 去离子水并加热搅拌, 加入 180 mL 甘油后使用 2M NaOH 调节 PH 值至 7.0, 最后用去离子水定容至 500 mL 后室温保存。
细胞冻存液	90%血清+10%DMSO
10%中性福尔马林固定液	甲醛: 100ml+磷酸二氢钠: 4g+磷酸氢二钠: 6.5g+蒸馏水: 900ml
