

分类号:

密级:



华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

人 IFN- γ 阻断抗体的制备及其双抗夹心 ELISA
检测方法的建立

PREPARATION OF HUMAN IFN- γ BLOCKING
ANTIBODY AND ESTABLISHMENT OF ELISA
DETECTION METHOD WITH DOUBLE ANTIBODY

研究生: 张浩东

CANDIDATE: ZHANG HAODONG

导师: 梁新军 教授

丰明乾 教授

SUPERVISOR: PROFESSOR LIANG XINJUN

PROFESSOR FENG MINGQIAN

学位类别: 工程硕士

DEGREE TYPE: MASTER OF ENGINEERING

领域: 生物与医药

BIOLOGY AND MEDICINE

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇二三年六月

JUNE, 2023

华中农业大学硕士学位论文

人 IFN- γ 阻断抗体的制备及其双抗夹心 ELISA 检测方法的建立

Preparation of human IFN- γ blocking antibody and establishment of ELISA detection method with double antibody sandwich

研 究 生： 张浩东

学 号： 2020304120191

指导教师： 梁新军 教授

丰明乾 教授

学位类型： 工程硕士

研究方向： 生物与医药

华中农业大学生命科学技术学院

中国 武汉

College of Life Sciences and Technology,
Huazhong Agricultural University
Wuhan, China

目 录

1.前言.....	1
1.1 干扰素.....	1
1.1.1 IFN- γ 的分子特征	1
1.1.2 IFN- γ 的分泌及调节	2
1.1.3 IFN- γ 参与信号通路	3
1.1.4 IFN- γ 与免疫细胞间的交流	5
1.1.5 IFN- γ 在治疗中的双重作用	8
1.2 噬菌体文库展示技术.....	8
1.2.1 噬菌体展示技术原理.....	9
1.2.2 噬菌体展示技术优缺点.....	9
1.2.3 噬菌体展示技术研究进展及展望.....	10
1.3 研究目的与意义.....	11
2.材料与方法.....	12
2.1 实验材料.....	12
2.2 主要实验仪器.....	13
2.3 实验试剂及配置方法.....	14
2.4 IFN- γ 表达载体构建	16
2.4.1 IFN- γ 基因片段 PCR 扩增	16
2.4.2 PCR 产物及表达载体的双酶切	17
2.4.3 IFN- γ 片段与 pPBSPS 表达载体的连接	17
2.4.4 重组表达载体的转化.....	18
2.4.5 菌液 PCR 检测	18
2.4.6 质粒提取.....	18
2.5 IFN- γ 的真核表达及纯化	20
2.5.1 IFN- γ 的瞬时表达	20
2.5.2 IFN- γ -His 的纯化	20
2.5.3 IFN- γ -h Fc 的纯化.....	21
2.6 IFN- γ 的动物免疫	21
2.6.1 IFN- γ 的鸡免疫	21
2.6.2 IFN- γ 多抗血清的效价测定	22
2.7 噬菌体文库构建及筛选.....	22
2.7.1 提取鸡脾脏中的总 RNA	22
2.7.2 总 RNA 反转录	23
2.7.3 噬菌体展示文库构建.....	24

2.8 抗体的表达与纯化.....	24
2.8.1 两种标签抗体蛋白的分泌表达及纯化	24
2.8.2 脱盐及过滤除菌.....	26
2.8.3 SDS-PAGE 实验操作流程.....	26
2.9 酶联免疫吸附实验.....	27
2.9.1 间接 Elisa 测定抗体亲和力.....	27
2.9.2 夹心 Elisa 筛选检测抗体对.....	28
2.10 Western Blot.....	29
2.11 流式细胞分析实验.....	30
2.11.1 流式分析检测细胞表面 IFN- γ 受体表达情况	30
2.11.2 流式分析检测 IFN- γ 抗体的阻断功能	30
3.结果与分析.....	32
3.1 两种标签的人 IFN- γ 的真核表达纯化.....	32
3.2 IFN- γ 噬菌体文库的构建及筛选.....	33
3.2.1 鸡的免疫.....	33
3.2.2 文库构建及筛选.....	34
3.3 IFN- γ 抗体的表达及纯化.....	34
3.4 Elisa 检测抗体亲和力.....	36
3.5 Western blot 检测抗体结合能力	37
3.6 夹心 Elisa 抗体对的筛选	38
3.7 流式细胞分析 IFN- γ 受体表达情况.....	40
3.8 流式细胞分析抗体阻断能力	41
4.讨论.....	44
参考文献.....	47

摘 要

干扰素 (interferon, IFN) 最初被发现具有干扰或阻止病毒复制的功能。干扰素 γ (IFN- γ) 是 II 型干扰素家族中的唯一成员, 其分子由于糖基化程度的不同, 在正常情况下呈现出三种大小。在先天免疫的情况下, IFN- γ 的分泌主要受到自然杀伤细胞 (NK) 和自然杀伤 T 细胞 (NKT) 的调节; 而在后天免疫中, IFN- γ 主要由 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞通过旁分泌产生。不同浓度下的 IFN- γ 会激活不同的信号通路: 在高浓度情况下, JAK/STAT 通路被激活; 而在低浓度条件下, IFN- γ 则会诱导 ICAM-PI3K-Akt-Notch1 信号的激活。IFN- γ 可作用于分泌自身的细胞而形成正反馈, 同时也能帮助免疫细胞识别和消灭病原体。IFN- γ 作为调节人体生理活动的细胞因子, 对于人体具有双重影响, 在传染病、移植物抗宿主病、自身免疫性疾病和肿瘤免疫中均发挥着重要的作用。

噬菌体展示技术将多肽、蛋白或是抗体片段与噬菌体外壳蛋白中的一种结合, 并表达在噬菌体的表面的蛋白外壳上。与传统的抗体制备技术相比, 噬菌体展示技术不仅能筛选出种类更丰富的抗体, 同时还具备筛选周期短、成本低、应用范围广、筛出的抗体易于人源化改造等优势。

本研究基于噬菌体展示技术, 制备了靶向人 IFN- γ 的阻断抗体并建立了 IFN- γ 检测方式。在通过真核表达纯化得到 IFN- γ 蛋白后, 利用动物免疫和噬菌体展示技术, 筛选到了靶向 IFN- γ 的 11 条不同的单链抗体序列, 并通过大肠杆菌分泌表达纯化。以这 11 种抗体序列为基础, 筛选出了对 IFN- γ 亲和力最高且满足其他实验要求的抗体对, 以便后续开发更经济精准的检测体系; 同时, 通过流式细胞分析, 分析了各个抗体序列在细胞水平上阻断 IFN- γ 与其受体结合的能力。主要的研究结果如下:

- 1) 利用 HEK 293F 细胞纯化得到了 His 标签和 hFc 标签的人 IFN- γ 蛋白。
- 2) 用 2 种标签的 IFN- γ 蛋白免疫鸡, 建立并筛选鸡噬菌体抗体文库, 得到了 11 条具有代表性且靶向 IFN- γ 的鸡源抗体序列: C03、C04、C06、C08、C11、C12、C13、C15、C25、C35、C48。
- 3) 利用大肠杆菌分泌表达方式, 纯化得到了两种不同标签的 22 条抗体序列,

两种抗体蛋白的纯度和活性良好。

4) 利用 Elisa 和 Western Blot 检测各个抗体序列的亲和力, 结果显示 11 条抗体序列均有对 IFN- γ 的结合活性, 其中 5 条序列能结合线性表位。

5) 利用双抗夹心的方法筛选得到了 4 组亲和力较高的抗体对; 结合软件分析结果, 从中选出了结合力最高的 1 组的抗体对以进行后续开发。

6) 通过流式细胞术分析, 从 5 种细胞系中选出了 IFN- γ 受体表达量最高的细胞。

7) 通过流式细胞术分析, 筛选出了 2 条阻断效果最好的抗体序列, 以及其他 5 条有阻断效果的序列。

关键词: 干扰素 γ ; 噬菌体展示; 阻断抗体; 双抗夹心 Elisa; 流式细胞术

Abstract

Interferon (IFN) was initially found to have the function of interfering or preventing the replication of virus. Interferon- γ (IFN- γ) is the only member of the type II interferon family, and its molecules present with three sizes under the normal circumstances due to different degrees of glycosylation. In the case of innate immunity, the secretion of IFN- γ is mainly regulated by natural killer cell and natural killer T cells. And in adaptive immunity, IFN- γ is mainly produced by CD8⁺ and CD4⁺ T cells through paracrine pathways. At different concentrations of IFN- γ , different signaling pathways are activated: the JAK/STAT pathway is activated at high concentrations of IFN- γ while the activation of ICAM-PI3K-Akt Notch 1 signal will be induced at a low concentration of it. IFN- γ can act on the cells which secrete itself to form the positive feedback, and it can also act on immune cells, helping to identify and eliminate pathogens. As a cytokine that regulates human physiological activities, IFN- γ has a dual impact on the organism and plays an important role in infectious diseases, graft versus host diseases, autoimmune diseases, tumor immunity.

Phage display technology combines polypeptides, proteins or antibody fragments with one of the phage shell proteins and expresses them on the surface of the phage shell protein. Compared with the traditional antibody preparation technology, phage display technology can not only screen more kinds of antibodies, but also has the advantages of short screening cycle, low cost, wide application range, and easy humanization of the screened antibodies

Based on phage display technology, this study prepared the blocking antibodies targeted human IFN- γ and established the detection method of IFN- γ . After purifying IFN- γ through eukaryotic expression, we immunized animals with this protein and screened 11 different single-chain antibody sequences targeted IFN- γ by phage display technology. Then, we expressed and purified them through the secretory expression and

intracellular soluble expression of *Escherichia coli*. With these 11 antibody sequences, we screened for antibody pairs target IFN- γ with the highest affinity and meeting experimental requirements, in order to develop more economical and accurate detection systems in the future; Meanwhile, through flow cytometry analysis, we analyzed the blocking ability of different antibodies for the binding of IFN- γ to its receptor at the cellular level. The main results are as follows:

1) Purification of human IFN- γ protein with His and hFc tags using HEK 293F cells.

2) After immunizing chicken with 2 kinds of IFN- γ protein, we established and screened the phage library of chicken antibodies, and 11 chicken derived antibody sequences (C03, C04, C06, C08, C11, C12, C13, C15, C25, C35, C48) which were representative and targeted IFN- γ were obtained.

3) 22 antibody sequences, which purity and activity met the expectations, with two different tags were purified by secreting expression of *Escherichia coli*.

4) The affinity of each antibody sequence was detected by Elisa and Western Blot. The results showed that all 11 antibody sequences were positive for IFN- γ and 5 sequences of them can bind to linear epitope.

5) Four groups of antibody pairs with high affinity were screened by the sandwich Elisa method and the highest binding antibody pair was selected by the software analysis for subsequent development.

6) The cell line with the highest expression of IFN- γ receptors was selected from 5 cell lines through flow cytometry analysis.

7) 2 antibody sequences with the best blocking effect were selected by flow cytometry analysis, as well as five other sequences with blocking effect.

Keywords: Interferon- γ ; Phage display; Blocking antibodies; Double-antibody-sandwich Elisa; Flow cytometry

缩略词表

缩略词	英文名称	中文名称
Abbreviation	English full name	Chinese meaning
AP1	activator protein 1	激活蛋白 1
CAM	cell adhesion molecule	胞间黏附因子
CBP	cAMP responsive-element-binding protein	cAMP 反应元件结合蛋白
CEACAM	carcinoembryonic antigenrelated cell adhesion molecule	癌胚抗原相关细胞黏附分子
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	细胞毒性 T 淋巴细胞
Eomes	Eomesodermin	脱中胚蛋白
FOXP3	forkhead box P3	叉状头转录因子 P3
GAS	IFN-gamma-activated site	干扰素- γ 激活位点
GVHD	Graft-versus-host disease	移植物抗宿主病
IDO	Indoleamine-2,3-Dioxygenase	吲哚胺 2,3-双加氧酶
ISG	Interferon Signature Genes	干扰素信号基因
MAPKs	mitogen-activated protein kinases	丝裂原活化蛋白激酶
MDSC	myeloid-derived suppressor cell	髓系抑制性细胞
mTOR	mammalian target of rapamycin	雷帕霉素哺乳动物靶点
T-bet	T-box transcription factor	T-box 转录因子
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand	肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

1. 前言

1.1 干扰素

干扰素最早是由艾萨克斯 (Isaacs) 和林德曼 (Lindemann) 于 1957 年发现的。在最初的实验中, 人们发现在流感病毒的刺激下, 鸡的绒毛膜尿囊膜会产生一种蛋白质, 可以干扰或阻止病毒的复制, 后被命名为 IFN。目前已经发现了大约 10 种哺乳动物 IFN, 但在人类身上只发现 7 种, 除 IFN- γ 属于 II 型外, 其余均为 I 型 (Pestka 2007)。

1.1.1 IFN- γ 的分子特征

1.1.1.1 IFN- γ 分子形态及分子量

人 IFN- γ 由位于第 12 号染色体长臂上的单拷贝基因编码, 该基因包含三个内含子 (Naylor et al 1983, Trent et al 1982)。人血液中的 IFN- γ 有三种不同的大小 (17、20 和 25 kDa), 这与分子的糖基化程度有关; 一种代表 IFN- γ 的活性游离态, 而另外两种则被认为是成熟的 IFN- γ 分子。生物活性形式的 IFN- γ 是一种由非共价连接的同源二聚体, 由两个相同的 17 kDa 多肽单体组成 (Alspach et al 2019, Lilkova et al 2019)。IFN- γ 同源二聚体不含任何共价键的发现有助于解释 IFN- γ 对极端温度和 pH 特别敏感的现象。

1.1.1.2 IFN- γ 分子结构及与受体的结合

在非共价同源二聚体中, IFN- γ 由两条反向平行的多肽链组成, 这使得第一个单体的 N 末端与第二个单体的 C 末端非常接近, 同时第二单体的 N 末端也与第一单体的 C 末端相连。相连两分子的两个末端连接处形成了一个复杂的受体结合界面。X 射线晶体分析显示, 在 62% 的人 IFN- γ 分子中, 每个单体都由 6 个 α 螺旋组成, 连接着非结构化区域和包含 21 个氨基酸的柔性 C 末端 (Ealick et al 1991, Lilkova et al 2019, Thiel et al 2000)。

IFN- γ 的受体至少由两个亚基组成 (IFNGR1 和 IFNGR2), 每个亚基分子都与 JAK 家族的一个成员相互作用 (Platanias 2005)。其中 IFNGR1 在皮肤、神经、胎

盘和合胞体滋养层等非淋巴细胞组织中表达量最高；而免疫细胞中 IFNGR1 的表达水平不同，单核细胞表达水平最高，其次是 B 细胞、NK 细胞，最后是 T 细胞（Sun et al 2014）；而 IFNGR2 的表达受到转录因子 SP1、激活蛋白 2（AP-2）和 NF- κ B 的诱导调控（Gocher et al 2022）。在结构作用下，IFN- γ 与其高亲和力受体以 1:2 的化学计量比结合形成对称络合物，并以此来介导其对细胞的多种作用。IFN- γ 的受体结合界面处的 C 末端结构域并不直接与受体形成接触界面。这一 C 末端尾巴部分缺乏刚性，暴露在外并带高正电荷（Grzesiek 1992），它非常容易被蛋白质降解处理；而它的长度在人 IFN- γ 与其受体的亲和中起着调节作用，尤其是 Arg¹²⁹-Lys-Arg-Ser¹³² 肽段显著促进了与 hIFN- γ R1 的亲亲和相互作用（Haelewyn et al 1997, Nacheva et al 2003, Schein 1995）。切割部分 C 端氨基酸残基（最多 9 个）甚至会导致 IFN- γ 与其受体结合的亲和力增加，而去掉整个尾巴会导致细胞因子失活（Nacheva et al 2003）。

1.1.1.3 IFN- γ 的糖基化修饰

天然的人 IFN- γ 是一种糖蛋白，在每个单体链上有两个独立且不同的 N-糖基化位点 Asn²⁵ 和 Asn⁹⁷（Sareneva et al 1994）。Asn²⁵ 上的多糖由岩藻糖基络合物和混合结构组成，这一位点的糖基化对于 IFN- γ 的折叠生产是重要的，同时还介导了对几种细胞蛋白酶的抗性；Asn⁹⁷ 上的多糖则由高分子甘露糖组成和混合残基组成，在蛋白生成和抗降解方面的作用并不明显（Mørtz et al 1996）。糖基化对于 IFN- γ 的活性并不重要。有实验数据表明，糖基化和非糖基化的人 IFN- γ 具有相同的抗病毒活性，并在相同程度上刺激巨噬细胞消除肿瘤（Arakawa et al 1986, Varesio et al 1984）。后续的研究表明，这种化学修饰增加了干扰素在血液中的半衰期，并延长了 IFN- γ 介导的效应（Gordon-Alonso et al 2017）。

1.1.2 IFN- γ 的分泌及调节

在先天免疫的情况下，IFN- γ 的产生除了受到 NK 调控外，还受到 NKT 的调节作用；而在获得性免疫应答中，IFN- γ 则主要由 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞通过旁分泌产生（Burke and Young 2019）。

在炎症或肿瘤组织微环境中，促炎细胞因子会与分泌 IFN- γ 的细胞上的受体结合，激活转录元件，如 STAT 家族的成员（主要是 STAT4）、T-bet、AP1 或 Eomes，从而进一步促进 IFN- γ 的产生（Kanhere et al 2012, Negishi et al 2018, Thieu et al 2008, Pearce et al 2003）。例如，IL-12 是一种由抗原提呈细胞（APC）如巨噬细胞、树突状细胞（DC）和 B 细胞分泌的促炎细胞因子，可诱导 CD4⁺ T 细胞中 STAT4 的激活，使其磷酸化，进而促进 IFN- γ 转录。同时，低浓度的 IL-12 也可使调节性 CD8⁺ T 细胞中的 STAT4 磷酸化，从而刺激原发性胆管炎患者产生 IFN- γ （Liaskou et al 2018）。此外，IFN- γ 具有促进自己分泌的信号途径，它可作用于 APC 细胞，形成一种正向反馈调节。这一现象在肿瘤和炎症环境中都能检测到（Garris et al 2018）。

除上述反应外，MAPK 途径的激活也能上调 IFN- γ 的表达并刺激其合成（Schoenborn and Wilson 2007）。总之，IFN- γ 是特定组织环境在多种刺激物的作用下产生的。然而，其启动信号和转录驱动因素仍然需要我们更深入地了解。

1.1.3 IFN- γ 参与信号通路

1.1.3.1 JAK-STAT 通路相关

IFN- γ 受体的两个亚基分别与 JAK1 和 JAK2 在细胞内相互作用，进而使转录因子 STAT1 磷酸化、活化和二聚化。之后 STAT1 同源二聚体转移到细胞核，然后与被称作 GAS 的 DNA 序列结合，启动许多基因的转录，并介导了不同的生物反应（Gao et al 2016, Negishi et al 2018, Poggi and Giuliani 2016）。STAT1 同源二聚体在与转录共激活蛋白（如 p300、CBP 等）相互作用后将获得完整的转录能力（Platanias 2005）。

IFN- γ 诱导的下游基因称为 ISG，这类基因能够调节炎症信号，在不同情况下促进或抑制炎症的发生。而在效应基因转录的过程中，大部分的 ISG 也可作为拥有促进转录功能的转录因子，如驱动 IRF-1 的转录激活，进而诱导多种基因的表达。这些基因又会在各种各样的生物过程中发挥作用，如细胞正常的周期性生长、细胞的程序性死亡、细胞的生长抑制和防止疾病发生等过程（Schroder et al 2004）。IRF-1 可以激活主要组织相容性复合体（MHC）I 类相关分子的合成，从而增加了暴露于 IFN- γ 的细胞对 CTL 攻击的敏感性（Yang et al 2018）。另外，IFN- γ 通过激活

JAK-STAT-IRF-1 级联途径，可以诱导肿瘤和 T 细胞上某些免疫检查点配体的表达（Abiko et al 2015, Garcia-Diaz et al 2017）。

JAK-STAT 通路的失调会导致免疫力下降，这一现象经常与肿瘤发生有关。此外，STATs 还参与免疫系统的发育与功能发挥，并在维持免疫耐受和肿瘤监测方面发挥作用（Saha et al 2010）。

这一信号通路受 SHP 磷酸酶（Shp2）或 SOCS 家族蛋白（主要是细胞质中的 SOCS1 和 SOCS3）的负调控。此外，这一途径还可能被激活的 STATs 蛋白抑制物（PIAS）所抑制。PIAS 通过诱导 STAT1 去磷酸化和 DNA 释放来阻止基因转录（Alspach et al 2019）。

1.1.3.2 非典型 IFN- γ 激活途径

在 Jorgovanovic 等的研究中，非小细胞肺癌（NSCLC）组织中 IFN- γ 的浓度决定了 IFN- γ 与其受体结合后激活的信号通路（Jorgovanovic et al 2020）。另一项研究也显示，JAK/STAT 通路在高浓度的 IFN- γ 刺激下会被激活，这被认为是经典的 IFN- γ 信号途径；而在另一种浓度较低的情况下，IFN- γ 会激活以 ICAM-PI3K-Akt-Notch1 为轴的信号，进而导致 CD133 表达增加，甚至会诱导肿瘤干细胞生成（Song et al 2019）。通过研究 IFN- γ 信号下游基因（如 CXCL9、CXCL10、PD-L1 等）的表达变化，有人提出在肿瘤细胞对 IFN- γ 的响应过程中，两个信号路径之间存在交流（Gao et al 2018）。

mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，在促进 mRNA 翻译和蛋白质合成方面起着重要作用（Setoguchi et al 2015）。一项研究表明，IFN- γ 可以通过激活 PI3K-Akt-mTOR 信号诱导肺上皮细胞的 CEACAM1 亚型的表达，CEACAM1 可通过正反馈进一步促进该途径，或诱导炎性细胞因子（如 IL-6、IL-8）的转录和翻译（Zhu et al 2019）。另外，有人证实，在人骨肉瘤细胞系中，IFN- γ 能激活类似 IFN- α 和 IFN- β 所诱导的通路反应——通过 PI3K/mTOR 的协同作用，激活 mTOR 的主要效应蛋白 p70S6 而使其磷酸化，同时刺激真核细胞的翻译起始因子 4E 结合蛋白 1（4E-BP1）的失活（Lekmine et al 2003, 2004）。

而 IFN- γ 调节 PI3K-Akt-mTOR 通路这一过程，是否独立于 STAT 信号还需要进一步的解释。有报道称，Akt 的缺失不会影响 ISGs 的转录，但会导致 IFN- γ 诱导蛋

白的缺陷，导致干扰素诱导的抗病毒反应显著减少。因此，干扰素受体激活的 Akt 通路补充了干扰素激活的 JAK-STAT 通路的功能，允许 ISG 的 mRNA 翻译，并最终产生生物学效应（Kaur et al 2008）。

总之，IFN- γ 介导的 PI3K-Akt 轴的激活可能参与炎症反应、效应蛋白的翻译和 IFN- γ 依赖的生物学效应，但我们仍需进一步研究以充分解释该通路在 IFN- γ 信号中的意义。

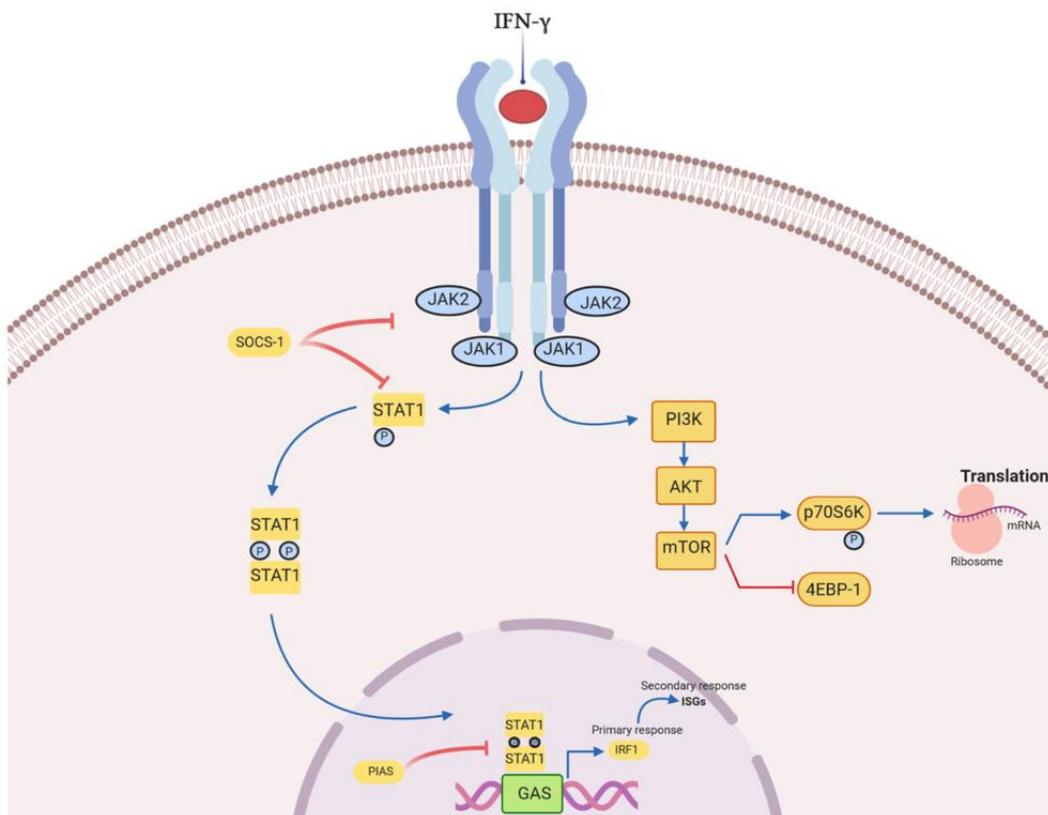


图 1-1 IFN- γ 的两种信号转导途径（Jorgovanovic et al 2020）

Figure 1-1 Two Signal Transduction Pathways of IFN- γ (Jorgovanovic et al 2020)

1.1.4 IFN- γ 与免疫细胞间的交流

对于能够产生 IFN- γ 的免疫细胞，IFN- γ 可利用正调节促进自我分泌。除此之外，IFN- γ 也能对肿瘤和炎症下的多种基质细胞起作用，如巨噬细胞、MDSC、树突状细胞（DC）和 B 细胞等（Parker et al 2016），帮助免疫细胞识别和消灭病原体。因此，了解 IFN- γ 与宿主免疫间的相互作用尤为重要。

1.1.4.1 IFN- γ 与 APC

抗原提呈细胞（APC）是进行抗原提呈活动和激活适应性免疫（如针对病原体和肿瘤的 CTL 反应）所必需的。IFN- γ 激活细胞信号通路，使下游参与抗原提呈的多种蛋白质上调，如与抗原处理相关的转运蛋白 TAP-1 和 TAP-2。它们将蛋白酶切割好的短肽从胞浆中运送到内质网，并加载到 MHC I 类分子上（Pamer and Cresswell 1998）。同时，APC 中的 IFN- γ 信号也会导致参与 Teff 产生的共刺激分子和细胞因子的上调。而缺少 IFN- γ 信号的情况下，成熟的 DC 会降低 CAM1、CD86 和 IL-1 β 等分子的表达（Pan et al 2004）。

1.1.4.2 IFN- γ 和巨噬细胞

在 IFN- γ 的作用下，巨噬细胞可转化为经典活化型（M1）来促进非特异性免疫反应。在调节巨噬细胞增强对 Toll 样受体配体以及 TNF 等炎症分子的反应过程中，IFN- γ 参与了巨噬细胞的激活（Hu and Ivashkiv 2009）。巨噬细胞杀伤、吞噬微生物和肿瘤细胞的能力是通过 IFN- γ 控制其特定基因表达程序实现的，这些基因表达程序涉及众多细胞因子、细胞标记、信号介质以及调节因子相关的基因（Castro et al 2018）。

1.1.4.3 IFN- γ 与 T 细胞

T 细胞向 Th1 和 Th2 细胞的分化分别受转录因子 T-bet 和 GATA3 的调控（Kanhere et al 2012）。T-bet 能够促进 Th1 相关分子的转录，特别是 IL-12 受体和 IFN- γ （Szabo et al 2002）。IFN- γ 的产生由 IL-12 激活的 Th1 细胞控制，而 Th1 细胞表型的稳定又是通过释放 IFN- γ 来维持的（Hu and Ivashkiv 2009）。已知 IFN- γ 作用于其受体后，刺激增加了 STAT1 活性，从而诱导了 T-bet 的表达。而作为转录因子的一员，T-bet 可以将另一转录因子 GATA3 引导到 Th1 的特异性结合部位，从而抑制 CD4⁺ T 细胞向 Th2 以及 Th17 分化，但 GATA3 的活性并未受到影响（Jenner et al 2009, Kanhere et al 2012）。IFN- γ 也可以诱导 CD4⁺ T 细胞的凋亡，从而影响 CD4/CD8 比例，降低二次抗肿瘤免疫反应（Berner et al 2007）。

除 Th1 外其他亚类的 CD4⁺ T 细胞，由 IL-4/IL-5/IL-13 的产生和 GATA3 的表达来定义。IFN- γ 与这些亚型的分化间的联系仍是 T-bet。例如有研究发现，IL-4 沉默一定伴随着 T-bet 和 Runx3 的共同表达，这控制着 Th1-Th2 间的转换（Djuretic et al

2007)。另外,在炎症条件下,IFN- γ 的产生与产生 IL-17 的 T 细胞之间(或者说 Th1 和 Th17 亚群之间)呈负相关(Weaver et al 2006)。还有研究显示,IFN- γ 抑制 STAT3 或 Smad3 (TGF- β 的典型信号蛋白)是 Th17 分化所必需的(Tanaka et al 2008)。

Tregs 由于可表达转录因子 FOXP3,被认为是 CD4⁺ T 细胞的免疫抑制亚群,该细胞具有产生 IL-10、IL-35、TGF- β 等抑制性细胞因子的能力,其产生对于防止效应 T 细胞过度激活和组织损伤是必不可少的(Gocher et al 2022, Vignali et al 2008)。在关于 PD-1/PD-L1 免疫检查点的治疗研究中,IFN- γ 可诱导 Treg 表达 PD-L1,同时 IFN- γ 可诱导 Treg 发生功能障碍,从而使在抗 PD-1 治疗中 CTL 介导的抗肿瘤效果大幅提高(Halim et al 2017, Wu et al 2018)。

Teff 的特征是分泌 IFN- γ 、细胞毒性分子、穿孔素以及颗粒酶(Jorgovanovic et al 2020); T-bet 和它的旁系同源分子 Eomes 共同调节 Teff 表达这些分子(Intlekofer et al 2005, Pearce et al 2003)。而 IFN- γ 的分泌与 T-bet 的表达以及抗原的呈递都有明显的联系,因此 IFN- γ 能够影响 T 细胞的增殖和功能是在意料之中的。例如,CTL 是 IFN- γ 的主要来源,在抗肿瘤免疫中起重要作用(Gocher et al 2022)。在有病毒感染的情况下,IFN- γ 通过直接与结合其表面受体以激活 CD8⁺ T 细胞,促使其扩增(Whitmire et al 2005)。此外,IFN- γ 还可通过上调参与细胞凋亡过程的关键蛋白,如颗粒酶 B 和 TRAIL,来增加 Teffs 的细胞毒性(Ravichandran et al 2019)。然而,IFN- γ 对 Teffs 的作用并不全是正向的,有证据表明,IFN- γ 可以负向调节 T 细胞的增殖或限制其反应(Driver et al 2017, Refaeli et al 2002)。

DC 上有 iNKT 的配体,两者相互作用时,会使 DC 释放 IL-12 并结合 iNKT 细胞上的 IL-12 受体,诱导 iNKT 产生 IFN- γ ,而 IFN- γ 又会通过上调共刺激分子促进 DC 成熟(Das et al 2013, Wolf et al 2018)。

1.1.4.4 IFN- γ 与 NK 细胞

NK 细胞可识别非自身靶点,并在 IL-2 和 IL-12 诱导以及 TNF 增强的条件下产生 IFN- γ ,以此介导细胞毒作用(Almishri et al 2016)。有研究表明,NK 细胞肿瘤侵袭程度越强,肿瘤预后越好,而且肿瘤阶段性发展与 NK 细胞的 IFN- γ 表达程度呈负相关(Henriksen et al 2020, Lee et al 2014, Villegas et al 2002)。

1.1.4.5 IFN- γ 与 B 细胞

B 细胞除了能分泌抗体，还能通过分泌细胞因子来介导抗体非依赖性功能。一种先天的 B 细胞亚群在细菌感染早期产生 IFN- γ ，与 NK 细胞相似。在肿瘤的免疫治疗中，CD40 激动剂的作用可能与这一 B 细胞亚型诱导 IFN- γ 产生有关，但这仍是猜想，并未得到证实（Piechutta and Berghoff 2019, Vitale et al 2019）。

1.1.5 IFN- γ 在治疗中的双重作用

IFN- γ 作为调节人体生理活动的细胞因子，在传染病、移植物抗宿主病、自身免疫性疾病和肿瘤等疾病中扮演着重要的角色。正如之前所陈述的，已有充足的证据能够证明其对于疾病的积极影响。然而值得注意的是，许多研究表明 IFN- γ 并不只发挥积极作用，甚至一些疾病的发生与它有一定联系。

Zaidi 和 Merlino 提出，在组织重塑和修复的过程中，IFN- γ 可能在保护细胞免受损害方面发挥生理作用，而这对于含有致癌基因突变的细胞同样适用（Zaidi and Merlino 2011）。更明显的案例是，有发现称 IFN- γ 能通过下调内源性肿瘤抗原 gp70 促进 CT26 结肠癌肿瘤的免疫逃逸（Beatty and Paterson 2000）。Brody 等人表明，IFN- γ 可以上调黑色素瘤细胞中的 IDO，并招募 Treg 细胞以逃避免疫识别（Brody et al 2009）。另外有研究表明，IFN- γ 的慢性激活会诱导小胶质细胞发生与形态改变、种群扩张、MHC II 和 CD68 上调、促炎细胞因子和一氧化氮释放有关的反应，进而刺激小胶质细胞损害成熟海马神经，抑制动物的成熟海马神经形成，并长期表现出行为绝望、快感减退以及认知障碍（Zhang et al 2020）。而在过度的炎症反应中，IFN- γ 与细胞死亡机制错综复杂地联系在一起，并参与了一个正反馈循环。在这个循环中，细胞因子的释放造成了细胞过度炎症，进而致使细胞死亡，从而促进了致病细胞因子的进一步释放，最终导致细胞因子风暴，威胁到人的生命（Karki et al 2021）。

总而言之，IFN- γ 作为宿主免疫系统中必不可少的保护因子，它介导了大量的生物学活性，但其对生理活动的负面影响不容我们忽视。

1.2 噬菌体文库展示技术

噬菌体展示技术已发展 30 多年，其基础是在噬菌体病毒粒子表面呈现多肽序列。由于其在展示多肽和抗体方面的优秀能力，该技术在 2018 年被授予了诺贝尔化学奖。

最初的实验是在 1985 年，G P Smith 将一个 57 肽与丝状噬菌体外壳蛋白 III 中暴露在外的序列连接，成功研制出其与外源多肽连接的融合蛋白（Smith 1985），并在 1988 年对技术进行了完善。这样的技术不仅将免疫活性良好的融合蛋白呈现在了噬菌体表面，还保留了病毒的传染性以及外壳蛋白 III 的完整功能。完善后的技术降低了对抗体的要求，提高了筛选出稀有克隆的能力，这对于文库的筛选十分必要（Barderas and Benito-Peña 2019）。之后的发展中，噬菌体展示技术在抗体筛选等方面发挥出了巨大作用，该技术对化学及生物制药产生了重大的影响，并为之后开发更多的新型抗体以及高亲和力定向筛选等打下坚实基础（Hess and Jewell 2020）。

1.2.1 噬菌体展示技术原理

基于噬菌体 DNA 的遗传修饰，噬菌体展示技术将多肽、蛋白或是抗体片段与噬菌体外壳蛋白中的一种结合，并表达在噬菌体的表面的蛋白外壳上（Sioud 2019）。当噬菌体感染宿主后，其基因开始在细菌内表达，插入的外源片段（编码外壳蛋白相关基因和克隆序列的融合产物）随后展示在噬菌体的表面（Aghebaty-Maleki et al 2016）。大肠杆菌单链丝状噬菌体 M13 及其近亲 fd 和 f1 在文库构建中的使用最为广泛。此外，噬菌体展示还可以基于如 T7、T4 和 λ 之类的有尾噬菌体，以及小的单链 RNA 二十面体噬菌体（Q β 和 MS2）（Tan et al 2016）。M13 噬菌体的所有外壳蛋白都能被用来展示外源多肽和大、小蛋白，但使用最广泛的是它次要的外壳蛋白 pIII，其次是主要的外壳蛋白 pVIII。而且，在所有丝状噬菌体外壳蛋白中，只有 pIII 大到足以向 B 细胞和 T 细胞呈现几个表位（Aghebaty-Maleki et al 2016, Irving et al 2001）。pIII 蛋白出现在噬菌体的末端，有 3 到 5 个拷贝，并由三个不同的结构域（N1、N2 和 C 末端结构域）组成（Omidfar and Daneshpour 2015）。相对较大的分子会被结合到 pIII 蛋白的 N 端，以保证噬菌体的感染性（Arap 2005）。pVIII 很适合展示小蛋白和小分子多肽，但它不是展示大分子多肽的有效平台（Aghebaty-Maleki et al 2016）。

1.2.2 噬菌体展示技术优缺点

首先，噬菌体文库库容很大。文库构建所使用的丝状噬菌体为半溶原性，它们

可以在保持细菌宿主存活的情况下不断复制和分泌，形成大库容量病毒库（Hess and Jewell 2020）。这种产生大病毒库的能力源自细菌在分裂期间对复制调控的缺乏和游离基因的转移能力（Lebani et al 2017）。其次，展示在噬菌体表面的多肽或蛋白质种类丰富，并可针对所需特性调整亲和筛选条件；而且与传统的筛选方法相比，噬菌体展示技术具有结合鉴定快速、简单和低成本等优点（Hamzeh-Mivehroud et al 2013）。此外，该技术还可以在未知相互作用类型和性质的情况下识别多肽、蛋白质或抗体片段的相互作用区域（Arap 2005, Bábíčková et al 2013）。

在抗体制备过程中，该技术可以用来解决一些困难抗原的抗体生产（如一些毒性较高或免疫原性差的抗原，很难用杂交瘤技术生产抗体）。同时制备出的抗体易于人源化，可以做一些抗体改构。

另一方面，该技术也有一些限制。从文库设计上讲，所有丝状噬菌体衣壳蛋白都是噬菌体生长所必需的，要将外源序列插入其中，蛋白质排列的变化有很大的限制；若插入片段过长，噬菌体会变大很多，稳定性会变差，繁殖速度会变慢（Lebani et al 2017）。同时，细菌细胞质中含有多种还原二硫键的途径，这会导致所展示的多肽或蛋白质构象和生物学功能受损。因此，噬菌体上的展示主要适合于在大肠杆菌周质空间中折叠的表面蛋白和分泌蛋白（Gagic et al 2016）。此外，由于丝状噬菌体从宿主细胞中释放出来时，不能破坏细胞膜完整性，所以衣壳蛋白必须能穿过内膜的脂双层。如果组成融合衣壳蛋白的某部分阻碍其穿透细胞膜，那么衣壳蛋白可能会停止正确的转移和组装（Castagnoli et al 2012）。

尽管丝状噬菌体展示系统具有一定的限制，但这项技术的弹性加上独特的噬菌体属性依旧吸引了越来越多研究者的注意（Peltomaa et al 2016, Petrenko 2008a）。

1.2.3 噬菌体展示技术研究进展及展望

噬菌体展示技术经过长时间的发展，其价值不言而喻。作为宝贵的蛋白展示工具其应用范围相当广泛，从材料科学到诊断，再到新治疗方法的开发，其应用案例不胜枚举（Petrenko 2008b, Lee et al 2013, Lebani et al 2017）。这项技术已使首批的 6 种商业化抗体药物得以生产，其他几种基于人类抗体和抗体片段的药物正在开发中（Barderas and Benito-Peña 2019）。

该技术目前仍有巨大的潜力，一些存在已久的问题有待解决，如噬菌体表面呈现疏水性多肽影响其释放的问题以及重组蛋白形成聚集体的问题。有研究提出，在嗜热噬菌体中构建噬菌体展示系统也许是一种解决方案，但至今未有这方面的报告（Jaroszewicz et al 2022）。一项较新的报告总结了包括抗体展示形式的选择、抗原呈递方式、筛选策略以及文库构建四个主要方面的优化以改善抗体的开发（Ledsgaard et al 2022）。

基于噬菌体展示以及其他多肽展示系统的新型工具在不断涌现，解决各种科学、医疗和技术问题的有关方法，有望在不久的将来出现在我们的视野中。

1.3 研究目的与意义

IFN- γ 是细胞因子检测中最常检测的指标。作为免疫反应过程中重要的调节因子，它的异常表达和多种自身免疫疾病相关。在很多不同病理包括感染、移植排斥、过敏反应等情况下可作为疾病标志，因此在临床上有助于疾病的快速诊断。然而 IFN- γ 在人血清中浓度较低，研究表明健康成人血清中的 IFN- γ 一般在每毫升几皮克到几十皮克左右，其数值因人的年龄所患疾病以及所在地区的不同而略有差异，因此需要较为精确的检测体系。而现有市售的 IFN- γ 检测体系价格昂贵，存在不能兼顾灵敏度高、检测范围广、成本低廉的矛盾。并且由于 IFN- γ 在特定条件下的促癌效应以及过度免疫中的负面效应，对其结合与功能的阻断也显得十分重要。

本研究采用噬菌体展示文库和动物免疫，筛选出 11 条靶向人 IFN- γ 的单链抗体，并通过这 11 条抗体序列筛选得到了 IFN- γ 的双抗夹心检测体系，以便后续开发更经济精准的检测体系，如在此基础上的低成本化学发光检测体系。另外，通过流式分析，确定了这些序列中能够封闭 IFN- γ 活性位点并阻断其与受体结合的几种抗体，并从中挑选出了阻断效果最好的 2 种。

2. 材料与方法

2.1 实验材料

BL21(DE3)感受态细胞	本实验室制备保存
HB2151 感受态细胞	本实验室制备保存
Stb13 感受态细胞	本实验室制备保存
DH5 α 感受态细胞	本实验室制备保存
多粘菌素 B	Sigma
HEK 293T	本实验室保存
HEK 293F	本实验室保存
表皮癌细胞株 A431 细胞	本实验室保存
HepG2 肝癌细胞	本实验室保存
Hep3B 肝癌细胞	本实验室保存
Huh7 肝癌细胞	本实验室保存
PEI	本实验室保存
细胞培养瓶	赛默飞世尔 (ThermoFisher)
台盼蓝染色剂	Absin
Primer STAR 酶	TAKARA
T4 DNA 连接酶	本实验室制备
T4 Buffer	NEB
Phusion DNA 聚合酶	本实验室制备
BamHI 限制性内切酶	NEB
EcoRV 限制性内切酶	NEB
NotI限制性内切酶	NEB
10 \times Cutsmart buffer	NEB
质粒小提试剂盒	TIANGEN
无内毒素小提中量/大提试剂盒	TIANGEN
DNA 纯化胶回收试剂盒	TIANGEN

RNA 提取试剂盒	南京诺唯赞生物科技有限公司
免疫佐剂 QuickAntibody-Rabbit	北京博奥龙公司
Goat-anti-Chicken HRP	亚科因 (Abbkine)
Mouse-anti-FLAG HRP	爱博泰克生物 (ABclonal)
Goat-anti-Human HRP	亚科因 (Abbkine)
Cy5-山羊抗人 IgG	博奥龙免疫技术有限公司
SDS-PAGE 凝胶试剂	上海生工
PDVF 膜	美国 Millipore 公司
BCA 试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司
TMB 显色底物	上海碧云天生物技术有限公司
胰蛋白胨	安琪酵母股份有限公司
酵母粉	安琪酵母股份有限公司
NaCl	国药
TRIzol	Ambion
RNaseOUT™	Sigma
M-MLV 反转录酶	Sigma
0.25%胰酶	GIBCO
DMSO	Sigma
Opti-mem	GIBCO
DMEM 培养基	赛默飞世尔 (ThermoFisher)
咪唑	上海吉至 (ACMEC)
双抗	山东鲁抗
家鸡	华中农业大学实验动物中心

2.2 主要实验仪器

MCO-15AC CO₂ 细胞培养箱 (SANYO 公司, 日本)

AE2000 光学显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司, 中国)

DYY-6D 型电脑三恒多用电泳仪电源 (北京六一仪器厂, 中国)

DYY-III7B 转移电泳仪（北京六一仪器厂，中国）
DYCZ-24DN 迷你双垂直电泳槽（北京六一仪器厂，中国）
-80°C超低温冰箱（青岛海尔集团，中国）
IMS-20 小型雪花制冰机（常熟市雪科电器有限公司，中国）
WD-9045 型生化水平摇床（北京沃德生物医学仪器公司，中国）
WD-9045B 型水平摇床（北京沃德生物医学仪器公司，中国）
5804R 台式高速冷冻离心机（Eppendorf 公司，德国）
TG16-W 台式高速离心机（长沙平凡仪器仪表有限公司，中国）
PB-10 标准型电化学分析仪/pH 计（Sartorius 公司，德国）
电热恒温水浴锅（北京市长风仪器仪表公司，中国）
Direct-Q3 实验室纯水/超纯水一体化系统（Millipore 公司，德国）
AB204-S 基础型电子分析天平（METTLER TOLEDO 公司，瑞士）
高压灭菌锅（HIPAY AMA 公司，日本）
GZX-9070 MBE 数显鼓风干燥箱（上海博讯实验有限公司医疗设备厂，中国）
MF-ChemBIS 3.2 蛋白成像仪（DNR Bio-Imaging Systems 公司，以色列）
Merinton SMA4000 微量紫外分光光度计（美林恒通公司，北京）

2.3 实验试剂及配置方法

1. LB 液体培养基：分别称取 10 g 胰蛋白胨，5 g 酵母提取物，10 g NaCl，溶于一定量双蒸水，调节 pH 值至 7.0，定容至 1000 mL，高压灭菌锅 121°C，灭菌 15 min 后，4°C 备用。

2. 2YT 液体培养基：分别称取 16 g 胰蛋白胨，10 g 酵母提取物，5 g NaCl，溶于适量双蒸水，调节 pH 值至 7.0，最后定容至 1000 mL，高压灭菌后 4°C 备用。

3. LB 固体培养基：在配好的 LB 液体培养基中加入适量琼脂粉至终浓度 1.5% (w/v)，高压灭菌后，冷却至 50°C-70°C 左右时，无菌条件下分装至已高压的无菌平皿内，室温凝固后置于 4°C 冰箱保存备用。

4. LB 液体选择性培养基：在一定量 LB 液体培养基中加入适量氨苄青霉素（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）或卡那霉素（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），4°C 保存备用。

5. 2YT 液体选择性培养基: 在一定量 2YT 液体培养基中加入适量 Amp⁺ (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 Kan⁺ (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。
6. 50 \times TAE 核酸缓冲液 (1 L): 分别将 242 g Tris 碱、37.2 g Na₂EDTA \cdot 2H₂O、57.1 mL 冰醋酸, 用双蒸水定容至 1000 mL, 室温保存, 使用时稀释成 1 \times TAE 缓冲液即可。
7. 10 \times PBS 缓冲液: 分别将 2.7 g 磷酸二氢钾、14.2 g 磷酸氢二钠、80 g 氯化钠、2 g 氯化钾溶于 500 mL 双蒸水中, pH 调至 7.4, 用双蒸水定容至 1 L, 0.22 μm 滤膜过滤后室温保存。
8. HEK293 细胞培养基: 在 DMEM 培养基中加入 10% 血清, 1% 双抗, 1% 谷氨酰胺。
9. 1M IPTG (分子量为 238.31): 将 2.3 g 粉末状 IPTG 溶于适量双蒸水中, 定容至 10 mL, 无菌条件下用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。
10. 多粘菌素 B: 取 5 g 粉末试剂溶于 60 mL 双蒸水中。
11. PBST: 2 L 的 1 \times PBS 加 1 mL TWEEN-20 混匀。
12. SDS-PAGE 电泳缓冲液: 25 mmol/L Tris、0.25 mol/L 甘氨酸、0.1% SDS。
13. 考马斯亮蓝 R250 染色液: 0.1% 考马斯亮蓝 R250、10% 冰醋酸、25% 异丙醇。
14. 考马斯亮蓝脱色液: 5% 无水乙醇、10% 冰醋酸, 用蒸馏水配置。
15. 封闭液 (Blocking buffer): 称取谷氨酸 5.88 g, 精氨酸 6.96 g, 聚乙烯吡咯烷酮 2 g, 脱脂奶粉 4 g, 牛血清白蛋白 10 g, 加入 1 mL TWEEN-20 于 1 \times PBS 溶液中并定容至 2 L, 搅拌溶解。
16. pH 2.0 缓冲液: 15 g 甘氨酸溶解于 ddH₂O 中, 用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 2.0, 定容至 2 L, 0.45 μm 滤膜抽滤。
17. pH 5.0 缓冲液: 23.5 g C₆H₅Na₃O₇ \cdot 2H₂O, 2.3 g NaCl, 用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 5.0, 定容至 2 L, 0.45 μm 滤膜抽滤。
18. Washing buffer: 1L 1 \times PBS 中加入 250 mmol NaCl 和 20 mmol 咪唑。
19. Binding buffer: 1L 10 \times PBS 中加 3 mol NaCl 和 100 mmol 咪唑。
20. Elution buffer: 1L 1 \times PBS 中加入 250 mmol NaCl 和 500 mmol 咪唑。
21. Buffer A: 1L 1 \times PBS 中加入 500 mmol NaCl。

22. Buffer B: 1L Buffer A 中加 200 mmol 咪唑。

2.4 IFN- γ 表达载体构建

2.4.1 IFN- γ 基因片段 PCR 扩增

1) 引物设计

构建两种不同表达载体 pPBSPS-IFN- γ -His 和 pPBSPS-IFN- γ -hFc。在 NCBI 中查阅人 IFN- γ (后文简称 IFN- γ) 的 DNA 序列。该序列及其引物由上海生物工程有限公司合成。根据引物设计原则, 用 Primer 5.0 软件设计扩增引物。

2) PCR

引物由擎科生物有限公司合成。PCR 实验体系如下所示, PCR 反应程序: 94°C, 5 min \rightarrow [(95°C, 30 s \rightarrow 65°C, 30 s \rightarrow 72°C, 2 min) 循环 25 次] \rightarrow 72°C, 5 min \rightarrow 2°C 进行 PCR 反应, 获得 PCR 产物。退火温度及延伸时间根据不同的需求有所调整, 一般为引物 T_M 值 $\pm 5^\circ\text{C}$ 。

表 2.1 PCR 体系

Table 2.1 PCR system

试剂	质量或体积
5 \times buffer	10 μL
dNTP mix	4 μL
Forward primer(10 μM)	1 μL
Reverse primer(10 μM)	1 μL
Taq DNA Polymerase	0.5 μL
Template	50 ng
ddH ₂ O	补足至 50 μL

扩增结束后, 向 PCR 产物中加入 5 \times loading buffer, 做 0.8%琼脂糖凝胶进行电泳, 电压 180 V, 15 min 后 DNA 凝胶成像, 切下目的片段, 按胶回收说明书操作回收片段。

2.4.2 PCR 产物及表达载体的双酶切

使用 NotI 与 EcoRV 限制酶组合，在 37°C 水浴锅对载体及 PCR 片段酶切 3 h。反应体系如下：

表 2.2 双酶切体系

Table 2.2 Double enzyme digestion system

试剂	质量或体积
pPBSPS 载体	3 μg
EcoRV	1 μL
NotI	1 μL
Buffer	5 μL
ddH ₂ O	补足至 50 μL

酶切结束后，对载体酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，切下目的片段后，按照 DNA 胶回收试剂盒对载体及 PCR 产物进行回收。

2.4.3 IFN- γ 片段与 pPBSPS 表达载体的连接

将胶回收得到的空载体和片段进行酶连，混匀组分后，于 16°C 恒温水浴锅过夜连接。反应体系如下：

表 2.3 连接反应体系

Table 2.3 Ligation reaction system

试剂	质量或体积
pPBSPS 载体	3 μg
PCR 产物	1 μg
T4 连接酶	1 μL
T4 Buffer (10 \times)	2 μL
ddH ₂ O	补足至 20 μL

2.4.4 重组表达载体的转化

取出制备好的 Stble 感受态细胞，放在冰上解冻 5 min。将 20 μL 连接产物加入到感受态细胞中，用移液器轻轻吸打均匀，冰上放置 30 min。之后放入 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中，热激 90 s，然后立即冰浴 3 min。在超净台中加入 500 μL 不含抗生素的 LB 培养基，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床上温育 1 h。将菌液 4000 r/min 离心 3 min，留 100 μL 上清将菌体打散均匀涂布于含卡那霉素的琼脂平板表面，平板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱，倒置培养过夜。

2.4.5 菌液 PCR 检测

待平板上的菌落生长至合适大小，用无菌的枪头挑取 8 个圆且饱满的克隆菌落，分别接种于 500 μL 含抗性的 LB 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床培养 4 h。待培养基中菌清晰可见，进行菌液 PCR 验证。以载体上的通用引物与插入片段的特异性引物为检测引物，配制 PCR 反应液，PCR 体系如下。PCR 反应程序：95 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min \rightarrow [(98 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s \rightarrow 55 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min) 循环 30 次] \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min 进行 PCR 反应，获得 PCR 产物。进行琼脂糖凝胶电泳，记录下阳性单克隆的菌落编号。

将阳性克隆的菌液送往上海生工武汉分公司进行测序，保留测序正确的阳性菌液。取 800 μL 菌液中加入 400 μL 的 60% 甘油，混匀后放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

表 2.4 菌液 PCR 体系

Table 2.4 PCR system of bacterial fluid

成分	体积
2x Fast Taq PCR Master Mix	5 μL
ddH ₂ O	2 μL
10 μmol primer F	1 μL
10 μmol primer R	1 μL
菌液	1 μL

2.4.6 质粒提取

1) 柱平衡步骤：向吸附柱 CP4 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μL 的平衡

液 BL, 12000 r/min 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。(请使用当天处理过的柱子)。注意: 使用前请先在漂洗液 PW 中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶上的标签。

2) 取 5-15 mL 过夜培养的菌液加入离心管中, 12000 r/min 离心 1 min, 尽量吸除上清。注意: 菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中。收集的菌体量以能够充分裂解为佳, 菌体过多裂解不充分会降低质粒的提取效率。

3) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 500 μ L 溶液 P1 (请先检查是否已加入 RNase A), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。注意: 如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。

4) 向离心管中加入 500 μ L 溶液 P2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。注意: 温和地混合, 不要剧烈震荡, 以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮粘稠, 所用时间不应超过 5 min, 以免质粒受到破坏。如果菌液没有变清亮, 可能是由于菌体过多, 裂解不彻底, 应减少菌体量。

5) 向离心管中加入 700 μ L 溶液 P3, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 此时会出现白色絮状沉淀。12000 r/min 离心 10 min, 此时在离心管底部形成沉淀。注意: P3 加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。

6) 将上一步收集的上清液分次加入吸附柱 CP4 中(吸附柱放入收集管中, 其容量为 750-800 μ L), 注意尽量不要吸出沉淀。12000 r/min 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP4 放入收集管中。

7) 可选步骤: 向吸附柱 CP4 中加入 500 μ L 去蛋白液 PD, 12000 r/min 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP4 重新放回收集管中。如果宿主菌是 end A⁺ 宿主菌 (TG1, BL21, HB101, JM101, ET12567 等), 这些宿主菌含有大量的核酸酶, 易降解质粒 DNA, 推荐采用此步。

8) 向吸附柱 CP4 中加入 600 μ L 漂洗液 PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 12000 r/min 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP4 放入收集管中。

9) 重复操作步骤 8。

10) 吸附柱 CP4 放入收集管中, 12000 r/min 离心 2 min, 目的是将吸附柱中残

余的漂洗液去除。注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱 CP4 开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

11) 将吸附柱 CP4 置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 100-300 μL 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2-5 min，12000 r/min 离心 2 min，将质粒溶液收集到离心管中。注意：洗脱缓冲液体积不应少于 100 μL ，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序，需使用 ddH₂O 做洗脱液，并保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。且 DNA 产物应保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ ，以防 DNA 降解。为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，再次离心。

2.5 IFN- γ 的真核表达及纯化

2.5.1 IFN- γ 的瞬时表达

1) 将贴满 T 75 细胞培养瓶的 HEK 293F 细胞用无血清 DMEM 培养基重悬，转移至 200 mL 小摇瓶中培养。

2) 待细胞密度达到 2×10^6 cell/mL 时，将小摇瓶中的细胞转移至 1 L 的摇瓶中培养，培养体系放大到 200 mL，密度培养至 $2-3 \times 10^6$ cell/mL。

3) 转染前用台盼蓝试剂染色，观察细胞状态，将细胞状态调整至最佳。每 1×10^6 个细胞转染 1 μg 除内毒素的 pPBSPS 质粒，PEI 与质粒按质量比 3:1 混合。将 PEI 与质粒每 1 μg 分别溶解到约 10 μL 的 150 Mm NaCl 溶液中，静置 5 min；之后将 PEI 溶液加入到质粒溶液中，静置 30 min。

4) 将混合好的质粒加入到细胞培养液中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞摇床中培养 7 d，期间每 2 d 观察细胞状态。

2.5.2 IFN- γ -His 的纯化

1) 收集表达后的细胞上清液，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下依次离心：2000 r/min 10 min，4000 r/min 10 min，8000 r/min 1 h，之后用 0.45 μm 的滤膜抽滤。

2) 离心的同时，冲洗镍柱。依次为 ddH₂O 5-10 个柱体积 \rightarrow Washing buffer 5-

10 个柱体积。

- 3) 上样液中加入 Binding buffer (将 10 \times buffer 稀释到 1 \times), 上样。
- 4) 之后在 AKTA 蛋白纯化仪上用 Washing buffer 洗杂, 至 UV 值水平。
- 5) 用 Elution buffer 梯度洗脱, 收集蛋白。
- 6) ddH₂O 冲洗镍柱, 5-10 个柱体积。
- 7) 20%乙醇冲洗镍柱, 5-10 个柱体积, 收柱子。

2.5.3 IFN- γ -hFc 的纯化

- 1) 样品处理方式同 His 标签蛋白纯化。
- 2) 冲洗 protein A 亲和层析柱并上样洗脱。依次为: ddH₂O 5-10 个柱体积 \rightarrow 1 \times PBS 5-10 个柱体积 \rightarrow 上样 \rightarrow 1 \times PBS 5-10 个柱体积 \rightarrow pH 5.0 5-10 个柱体积(洗杂) \rightarrow pH 2.0 5-10 个柱体积(洗脱), 收集蛋白。
- 3) 清洗层析柱, 冲 20%乙醇 5-10 个柱体积, 收柱保存。

2.6 IFN- γ 的动物免疫

2.6.1 IFN- γ 的鸡免疫

- 1) 挑选 2 只成年(约 4 个月龄)的家鸡, 分别编号为 C1、C2。在免疫前, 取少量鸡翅静脉血液, 作为抗体滴度检测的对照样本。
- 2) 在首次免疫的时候, 将 50 μ g 抗原蛋白 IFN- γ -His 用 1 \times PBS 缓冲液稀释到 100 μ L, 然后以体积比为 1:1 的比例与 QuickAntibody 混匀, 然后在鸡的颈部皮下注射 4 个点(左右各两个)。每隔 14 d 重复一次上述免疫操作, 总共进行 3 次免疫。IFN- γ -His 与 IFN- γ -hFc 两种抗原交替免疫。
- 3) 每次免疫 7 d 后, 在鸡的翅静脉处采集血液, 分离血清, 免疫次数依次记为 M1、M2、M3, 通过间接 ELISA 的方法测定血清中特异性多克隆抗体的滴度。
- 4) 最后一次测定血清滴度, 若达到预期效果, 则将鸡进行安乐死, 取其脾脏, 剪碎浸泡在 TRIzol 中并冻存于 -80 $^{\circ}$ C, 用于后续的噬菌体文库构建。

2.6.2 IFN- γ 多抗血清的效价测定

- 1) 用 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 IFN- γ -His 抗原包被 Elisa 板, 每孔 50 μL , 放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 30 min。每一个血清样品做一个重复。
- 2) 倒掉液体, 用 PBST 洗一遍, 拍干后, 用 blocking buffer 加满孔封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- 3) 将血清用 blocking buffer 梯度稀释。首孔稀释 100 倍, 之后按 1:2 稀释。倒掉液体, 将稀释好的样本每孔 50 μL 分别加入, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- 4) 倒掉液体, 用 PBST 洗两遍。显色抗体 Goat-Anti-chicken HRP 按 1: 8000 稀释, 每孔 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- 5) 倒掉液体, 用 PBST 洗四遍, 按照碧云天 TMB 显色液试剂盒说明书配制显色液, A 液和 B 液按 1:1 混合, 每孔 100 μL , 显色 5-10 min 至显色完全。加入 0.1 M 的浓硫酸终止显色, 每孔 100 μL 。
- 6) 酶标仪测定 A450 条件下的 OD。

2.7 噬菌体文库构建及筛选

2.7.1 提取鸡脾脏中的总 RNA

- 1) 鸡脾脏组织从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出称重后放入研钵中, 以每 50 mg 组织对应 1 mL TRIzol 试剂 (AMBIION, 美国) 的比例加入相应量的 TRIzol 试剂, 在液氮环境中使用研磨棒研磨至均匀状态后取出, 立即分装到多个 1.5 mL 离心管中并储存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于后续 RNA 实验。
- 2) 将研磨好的组织样本和 TRIzol 的混合物置于室温孵育 10 min, 使 TRIzol 试剂充分裂解组织样本;
- 3) 加入 1/5 体积的氯仿 (4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷储藏), 上下剧烈颠倒充分混匀 1 min, 室温静置 5 min;
- 4) 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心机预冷, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12000 r/min 离心 15 min;
- 5) 将上清转移到新的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积异丙醇 (4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷保存), 上下轻轻颠倒充分混匀, 室温放置 10 min, 充分沉淀 RNA;
- 6) 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min 离心 15 min, 此时 RNA 沉淀析出, 贴于管底;

7) 小心吸出上清并丢弃, 加入 1 mL 75%乙醇 (DEPC 水预先配制并预冷保存于 4°C) 并上下轻轻颠倒 5-10 次;

8) 4°C 12000 r/min 离心 5 min, 重复操作一次;

9) 小心吸出上清并丢弃, 于冷冻离心机中 4°C 12000 r/min 离心 1 min;

10) 用 10 μ L 小枪头小心吸出并丢弃剩余液体, 55°C 干浴 1 min 至酒精完全挥发;

11) 加入灭菌的 DEPC 水溶解干燥后的总 RNA, 55°C 干浴 1 min 至完全溶解。

2.7.2 总 RNA 反转录

1) 反应体系如下表, 程序设定为 65 °C, 5 min (待 PCR 仪的热盖温度和模块温度到达指定温度后, 再将体系放上去)。

表 2.5 RNA 反转录体系 1

Table 2.5 System 1 of RNA reverse transcription

试剂	质量
RNA 模板	10 μ g
Oligo (dT)	2 μ L
dNTP	2 μ L
RNaseOUT™	补足至 26 μ L

2) 反转录体系如下表 (加在上一步的体系中), 程序设定为 54 °C, 30 min \rightarrow 80°C, 10 min, 得到 cDNA。

表 2.6 RNA 反转录体系 2

Table 2.6 System 2 of RNA reverse transcription

试剂	质量
5 \times SSIV buffer	8 μ L
100 mmol DTT	2 μ L
RNaseOUT™	2 μ L
M-MLV 反转录酶	2 μ L

2.7.3 噬菌体展示文库构建

文库的构建简要过程见参考文献 (Bashir and Paeshuyse 2020)。

2.8 抗体的表达与纯化

2.8.1 两种标签抗体蛋白的分泌表达及纯化

1) 重组质粒转化: 从 -80°C 冰箱取 HB2151 感受态在冰上解冻, 将文库筛选得到的携带有抗体 scFv 片段的重组载体 pComb3X 50 ng 加到感受态中, 慢轻柔吸吹均匀后在冰上静置 30 min, 使重组质粒在形成抗 DNA 酶的羟基-钙磷酸复合物后充分黏附于感受态细胞表面。然后在 42°C 水浴锅中热激 90 s 使重组质粒进入感受态细胞, 之后迅速冰浴 3 min。向混合液中加入 500 μL 不含抗生素的 LB 培养基使感受态细胞复苏, 于恒温摇床中 37°C 、220 r/min 振荡培养 1 h。从恒温摇床中取出菌液, 再以 4000 r/min 的转速离心 3 min, 吸出 450 μL 的上清液丢弃, 用离心管中剩余的上清液将菌体沉淀吹打均匀, 最后将菌液均匀涂布于含氨苄青霉素的培养基平板上, 待平板表面干燥后, 将平板倒扣, 做好标记后置于 37°C 恒温培养箱中培养过夜。

2) 菌液 PCR: 第二天分装 500 μL 含氨苄青霉素的 LB 培养基于 1.5 mL 离心管, 挑取大且饱满的单个菌落于单个管中, 做好标记放于 37°C 摇床中 220 r/min 振荡培养 4 h, 进行菌液 PCR, 之后将产物进行凝胶电泳。将条带正确的阳性菌液取 600 μL 加入 1.5 mL 离心管中, 再加入 300 μL 的 60% 甘油混匀, 做好标记, 于 -20°C 冰箱中冻存。

3) 一次扩繁: 取 100 μL 阳性克隆菌液加入装有 20 mL 含氨苄青霉素 LB 培养基的 100 mL 小药瓶中, 做好标记, 置于摇床中 37°C 、220 r/min 培养 8 h。

4) 二次扩繁: 每种重组质粒准备 2 个装有 1 L 2YT 培养基的 2 L 摇瓶, 向每个摇瓶中各加入 1 mL 的氨苄青霉素溶液, 再各转接 15 mL 扩繁的菌液, 做好标记后置于摇床中 37°C 、220 r/min 振荡培养 3 h, 使用 Nanodrop 在细胞液模式下检测菌液 OD 值, 待 OD 值达到 0.9 左右时即可取出摇瓶, 如果未达到则继续振荡培养。

5) IPTG 诱导: 每个摇瓶中各加入 500 μL 的 1 mol/L IPTG 溶液, 利用 IPTG 对载体上乳糖操纵子的诱导作用, 诱导细菌大量表达重组质粒上的目的基因, 置于

摇床中 25°C、220 r/min 振荡诱导培养 12 h 后取出摇瓶。

6) 收集、洗涤菌体：将 25°C 诱导培养后的菌液用 1 L 离心瓶，在高速冷冻离心机中以 20°C、5000 r/min、5 min 的条件离心，弃上清液并收集菌体沉淀。之后用 PBS 先冲洗一遍菌体表面，弃 PBS 后用新的 PBS 重悬洗涤菌体，继续在高速冷冻离心机中，以 20°C、5000 r/min、5 min 的条件离心，弃上清液并收集洗涤后的菌体沉淀。

7) 菌体破碎离心：1 L 2YT 培养基的菌体用 100 mL Buffer A 重悬，彻底重悬菌体沉淀，使悬液中不含颗粒或絮状物。每 100 mL 重悬液中加入 1 mL 配置好的多粘菌素 B 溶液，之后在 37°C 摇床中 220 r/min 裂解 1 h。严格控制时间，若裂解时间过长，用于裂解细胞壁的多粘菌素 B 会正常裂解细胞膜，膜内的蛋白会和膜壁间的蛋白混合，给纯化蛋白增加难度。裂解细胞壁后，在在高速冷冻离心机中以 4°C、8000 r/min、45 min 的条件离心，保留上清液并弃沉淀。离心后的离心瓶置于冰上。

9) 抽滤：将上清液使用真空泵、抽滤瓶和 0.45 μ m 规格的微孔滤膜进行抽滤，之后向抽滤液中加入咪唑至终浓度为 50 mmol/L，通过咪唑竞争性结合镍离子，使结合力弱的杂蛋白无法结合镍离子。

12) 洗杂：用蠕动泵进行洗杂过程，将镍柱用 10 个柱体积的双蒸水冲洗，以除去柱内保存用的 20%乙醇，再用 10 个柱体积的 Buffer A 对镍柱进行平衡预处理，将抽滤后的蛋白液全部上样，之后用 5 个柱体积加入咪唑至终浓度为 50 mmol/L 的 25% Buffer A 冲洗镍柱，进一步除去与镍离子结合力较低的杂蛋白，流速均为 1 mL/min。

13) 用 AKTA pure 蛋白质纯化系统洗脱蛋白：先用 100 mL 双蒸水冲洗管道除去管道内的 20%乙醇，再用 50 mL Buffer A 缓冲液冲，使管道内充满 Buffer A，以上 2 步均设置流速为 10 mL/min，A、B 泵各占 50%。之后将流速调为 1 mL/min，将 B 泵含量先设为 0%，后将洗过杂的镍柱安装在仪器上，将 A 泵放入 Buffer A 缓冲液中，B 泵放入 Buffer B 缓冲液中，将 B 泵设置为 10 min 含量从 0 达到 100% 梯度洗脱目的蛋白。B 泵约 80% 后出峰，待 UV 值增加 20 后，使用 Fraction Collection 功能，用 1.5 mL EP 管收集洗脱液，每管收集 1 mL。待 UV 值逐渐上升至峰值之

后, 下降至比记录 UV 值高 40 时停止收集洗脱液。蛋白洗脱完毕后, 用 100 mL 双蒸水和 50 mL 20%乙醇依次冲洗镍柱和管道, 流速为 1 mL/min。

2.8.2 脱盐及过滤除菌

根据观察凝胶脱色的结果, 选取合适条带所对应的蛋白洗脱液进行脱盐, 由于脱盐柱的体积为 50 mL, 只可对 10 mL 以内体积的蛋白质溶液进行凝胶过滤层析脱盐, 体积过大则可能脱盐无效, 因此, 需要先将所选取的蛋白液浓缩至 10 mL。将 10 kDa 规格的超滤浓缩离心管依次用双蒸水、PBS 清洗, 之后加入少量 PBS, 在低温水平离心机上以 4°C、2500 r/min 水平离心 3 min, 以清洗超滤浓缩离心管的滤膜。将选取的蛋白洗脱液全部加入超滤浓缩离心管中, 在低温水平离心机上以 4°C、2500 r/min 水平离心 10 min, 取出超滤浓缩离心管用移液枪对着滤膜吹打, 以将滤膜上吸附的蛋白质吹打下来, 使其不堵住滤膜, 之后继续以相同条件离心, 直至蛋白液体积浓缩至 10 mL, 用移液枪充分吹打滤膜后将蛋白液全部吸出, 置于一个 50 mL 空离心管中。

2.8.3 SDS-PAGE 实验操作流程

(1) 清洗玻璃板: 一只手扣紧玻璃板, 另一只手蘸点洗衣粉轻轻擦洗。两面都擦洗过后用自来水冲, 再用蒸馏水冲洗干净后立在筐里晾干。

(2) 胶板检漏: 将 1.5 mm 的胶板洗干净, 把胶板放入制胶的夹板中, 调整胶板底部两块玻璃板的边缘, 使其平行, 夹好胶板, 将其放入制胶架上, 加紧固定好之后, 向胶板中加满纯水, 静置 5 min, 观察液面是否下降, 不下降则说明胶板固定紧密, 可进行下一步实验。

(3) 分离胶和浓缩胶的制备:

配制 12%分离胶 (12% SDS-PAGE 5 mL): 蒸馏水 1.6 mL, 30%凝胶贮备液 2 mL, 分离胶缓液 (1.5 mol/L Tris-HCl pH 8.8) 1.3 mL, 10% SDS 50 μ L, 10%过硫酸铵 50 μ L, TEMED 3 μ L。

配制 5%浓缩胶 (5% SDS-PAGE 2 mL): 蒸馏水 1.4 mL, 30%凝胶贮备液 0.33 mL, 浓缩胶缓冲液 (1.0 mol/L Tris-HCl pH 6.8) 0.25 mL, 10% SDS 20 μ L, 10%过硫酸铵 20 μ L, TEMED 2 μ L。

(4) 灌胶：玻璃板对齐后放入夹中卡紧。然后垂直卡在架子上准备灌胶。(操作时要使两玻璃对齐，以免漏胶)。在加入 TEMED 后立即摇匀即可灌胶。灌胶时，可用 3 mL 的吸管或 10 mL 枪吸取适量的胶沿玻璃放出，待胶面升到绿带中间线高度时即可。然后胶上加一层水，液封后的胶凝的更快。(灌胶时开始可快一些，胶面快到所需高度时要放慢速度。操作时胶一定要沿玻璃板流下，这样胶中才不会有气泡。加水液封时速度不宜过快，否则凝胶表面会不平整)。

(5) 上样：向蛋白样品中加入非还原的上样缓冲液或者非还原的上样缓冲液，95 °C 干浴 10 min，使蛋白变性。12000 r/min 离心 2 min，然后将样品加入制备好的 SDS-PAGE 胶中。

(6) 电泳：加样完毕后，盖好上盖，连接电泳仪，打开电泳仪开关后，样品进胶前电压控制在 80 V，大约 15-20 min；样品中的溴酚蓝指示剂到达分离胶之后，电压升到 120 V，电泳过程保持电压稳定。当溴酚蓝指示剂迁移到距前沿 1-2 cm 处即停止电泳，约 0.5-1 h。如室温高，打开电泳槽循环水，降低电泳温度。

(7) 染色与脱色：电泳结束后，关掉电源，取出玻璃板，在长短两块玻璃板下角空隙内，用刀或分模器轻轻撬动，即将胶面与一块玻璃板分开，然后轻轻将胶片托起，指示剂区带中心插入铜丝作为标志，放入大培养皿中染色，使用考马斯亮蓝染液，染色 2-4 h，必要时可过夜。弃去染色液，用蒸馏水把胶面漂洗几次，然后加入脱色液，进行扩散脱色，经常换脱色液，直至蛋白质带清晰为止。

2.9 酶联免疫吸附实验

2.9.1 间接 Elisa 测定抗体亲和力

利用间接法检测能够特异性结合抗原构象表位的抗体序列。

1) 包被抗体：用包被缓冲液稀释特异性抗体球蛋白至最适浓度 (1-10 $\mu\text{g/mL}$)，在透明酶标板的每个凹孔中加入 50 μL ，用手轻轻拍打酶标板使液体均匀覆盖板底，4°C 过夜，或 37°C 孵育 30 min，各孔中加入约 300 μL 的 PBST 洗去未结合的抗体。

2) 封闭：向各孔中加入约 300 μL 的 Blocking buffer，4°C 过夜，或 37°C 孵育 30 min

3) 稀释抗原: 用 Blocking buffer 按照一定比例梯度稀释待检测的抗原蛋白。

4) 抗原与抗体结合: 将封闭好的酶标板取出, 将其内 Blocking buffer 倒掉, 在吸水纸上倒扣并拍干液体, 将稀释好的抗原稀释液加入到对应的孔中, 每孔加入 50 μL 抗原稀释液。用手轻拍酶标板使样品铺平孔底, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

5) 孵育 HRP 酶标二抗: 取出孵育好的酶标板, 将液体倒掉, 并在吸水纸上拍干, PBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次都要拍掉多余液体, 按照所需二抗说明书上标明的比例以 Blocking buffer 稀释二抗到工作浓度, 每孔加入 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

6) 显色: 取出酶标板, 将液体倒掉并在吸水纸上拍干, PBST 缓冲液洗 4 次。按照碧云天 TMB 显色液试剂盒说明书配制显色液, A 液与 B 液按照 1: 1 比例混合, 每孔加入 100 μL 。显色 10-15 min 至完全时, 加入 100 μL 0.5mol/L H_2SO_4 溶液终止显色。

7) 观察记录结果: 用酶标仪测量各孔的 OD 值, 检测波长为 450 nm。记录数据, 并用 Prism 软件进行分析。

2.9.2 夹心 Elisa 筛选检测抗体对

1) 包被捕获抗体: 用 Blocking buffer 稀释带 His 标签的抗体蛋白至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在透明酶标板的每个凹孔中加入 50 μL , 用手轻轻拍打酶标板使液体均匀覆盖板底, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 各孔中加入约 300 μL 的 PBST 洗去未结合的抗体。

2) 封闭: 向各孔中加入约 300 μL 的 Blocking buffer, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

3) 稀释抗原: 用 Blocking buffer 按照一定比例梯度稀释待检测的抗原蛋白 IF N- γ -His。

4) 抗原与抗体结合: 将封闭好的酶标板取出, 将其内 Blocking buffer 倒掉, 在吸水纸上倒扣并拍干液体, 将稀释好的抗原稀释液加入到对应的孔中, 每孔加入 50 μL 抗原稀释液。用手轻拍酶标板使样品铺平孔底, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

5) 加入检测抗体: 用 Blocking buffer 稀释带 HisFLAG (后称 HF) 标签的抗体蛋白至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。取出孵育好的酶标板, 将液体倒掉, 并在吸水纸上拍干, PBST 缓冲液洗涤 3 次, 每孔加入 50 μL 抗原稀释液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

6) 孵育 HRP 酶标二抗: 取出孵育好的酶标板, 将液体倒掉, 并在吸水纸上拍干, PBST 缓冲液洗涤 3 次, 按照 HRP-Anti-FLAG 的二抗说明书上标明的 1: 8000 比例用 Blocking buffer 稀释二抗, 每孔加入 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

7) 显色: 取出酶标板, 将液体倒掉并在吸水纸上拍干, PBST 缓冲液洗 4 次。按照碧云天 TMB 显色液试剂盒说明书配制显色液, A 液与 B 液按照 1: 1 比例混合, 每孔加入 100 μL 。显色 10-15 min 至显色完全时, 加入 100 μL 0.5 mol/L 的 H_2SO_4 溶液终止显色。

8) 观察记录结果: 用酶标仪测量各孔 OD 值。记录数据, 并用 Prism 软件进行分析。

2.10 Western Blot

利用 Western Blot 实验检测结合线性表位的抗体序列, 实验操作步骤如下:

1) 转膜: 电泳结束后将目的条带部位的蛋白胶切下, 随后按照蛋白胶的大小裁剪 0.2 μm PVDF 膜和滤纸, 从负极到正极按照海绵, 滤纸, 蛋白胶, PVDF 膜, 滤纸, 海绵的顺序进行码放, 操作时注意不要产生气泡; 加入电泳缓冲液没过最上端后, 冰上 200 mA 转膜 1-2 h (视蛋白分子量大小而定, 蛋白分子量越大, 电转时间越长)。

2) 封闭: 电转结束后, 将 PVDF 膜 (此时膜上应清晰可见 Maker 条带) 用镊子小心取出后放入 TBS 溶液中清洗 1 遍, 而后放入由 TBST 溶液配制的 5% 脱脂奶粉溶液中, 室温孵育 1-2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

3) 孵育亲合抗体: 封闭结束后, 将 PVDF 膜放入到由脱脂奶粉溶液稀释后的亲合抗体溶液中, 室温孵育 3-5 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 抗体的终浓度为 0.6-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4) 孵育显色抗体: 亲和抗体孵育结束后, 将 PVDF 膜放入到 TBST 溶液中洗膜, 水平剧烈摇晃 5 min 2 次, 洗膜结束后, 将 PVDF 膜放入到由脱脂奶粉溶液稀释的带有 HRP 标记的显色抗体溶液中, 室温孵育 1 h, 此处显色抗体稀释比例按照说明书上进行。

5) 拍照: 孵育结束后, 将 PVDF 膜放入到 TBST 溶液中洗膜, 水平剧烈摇晃 5 min 5 次。按照碧云天的 ECL 化学发光试剂盒说明书配置显色液 (A 液与 B 液按 1:

1 混合), 将显色液加到清洗好的膜上, 使用化学发光成像仪拍照后分析结果。

2.11 流式细胞分析实验

2.11.1 流式分析检测细胞表面 IFN- γ 受体表达情况

1) 分别消化细胞系 A431-LG、HEK 293T、Hep3B-LG、HepG2-LG、Huh7-LG: 吸出细胞培养瓶中的培养基, 加 PBS 洗 1 遍, 加 1 ml 胰酶并在 37°C 细胞培养箱中消化 1-3 min, 终止消化后将其吸入 15 mL 离心管中, 常温 1000 r/min 离心 5 min 收细胞, 并用 PBS 清洗一遍。之后将细胞放置在冰上, 整个过程除上机及离心都在冰上操作;

2) 用 Blocking buffer (不含硫柳汞) 重悬细胞, 用细胞筛过滤筛除去细胞团。每种细胞株分装三管, 每管 1 mL, 分别标记为空白对照组、单一显色抗体组 (2ND 组) 和实验组, 冰上封闭 30 min。

3) 实验组每管加 10 μ g 的 IFN- γ -hFc, 冰上孵育 1-2 h (期间每 10min 轻轻颠倒一下)。

4) 4°C, 1000 r/min 5min 离心收细胞, 并用 1 ml PBS 洗一遍。

5) 配制显色抗体溶液 (Cy5-山羊抗人 IgG), 每 1ml 加 4 μ L 显色抗体, 涡旋混匀, 每管加 300 μ L 重悬细胞, 冰上孵育 30-60 min, 每 10 min 上下颠倒一次;

6) 4°C, 1000 r/min 5min, 离心收细胞, 并用 1 ml PBS 洗两遍;

7) 视细胞多少, 每管加 200-500 μ L PBS, 将细胞悬浮后转移到流式管中;

8) 流式细胞仪分析检测细胞表面 IFN- γ 受体表达情况。

2.11.2 流式分析检测 IFN- γ 抗体的阻断功能

1) 消化细胞系 Hep3B-LG, 并用 PBS 清洗一遍。之后将细胞放置在冰上, 整个过程除上机及离心都在冰上操作;

2) 用 Blocking buffer (不含硫柳汞) 重悬细胞, 用细胞筛过滤筛除去细胞团, 分装细胞至 1.5 mL 离心管, 每管 250 uL 冰上孵育 30 min。

3) 每种抗体设置三种不同浓度 (100 μ g/mL、10 μ g/mL、1 μ g/mL), 每管 250 uL, 同时设置空白对照组、单一显色抗体组 (2ND 组) 和对照抗体组。之后实验组分别

和 2 μg IFN- γ -hFc 抗原在冰上孵育 2 h, 然后将细胞和抗原抗体溶液混合 (混合后抗体浓度梯度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。冰上孵育 1 h (期间每 10 min 轻轻颠倒一下)。

4) 4 $^{\circ}\text{C}$, 1000 r/min 离心 5 min 收细胞, 并用 1 ml PBS 洗一遍。

5) 配制显色抗体溶液 (Cy5-山羊抗人 IgG), 每 1 ml 加 4 μL 显色抗体, 涡旋混匀, 每管加 300 μL 重悬细胞, 冰上孵育 30-60 min, 每 10 min 上下颠倒一次;

6) 4 $^{\circ}\text{C}$, 1000 r/min 离心 5min 收细胞, 并用 1 ml PBS 洗两遍;

7) 视细胞多少, 每管加 200-500 μL PBS, 将细胞悬浮后转移到流式管中;

8) 流式细胞仪分析检测各个抗体的受体阻断情况。

3.结果与分析

3.1 两种标签的人 IFN- γ 的真核表达纯化

在对状态良好且密度足够 HEK 293F 细胞进行瞬时转染表达后，我们得到了活性良好且纯度较高的两种 IFN- γ 单体蛋白（IFN- γ -hFc 和 IFN- γ -His），其蛋白条带结果如图 3.1 所示。两种标签的 IFN- γ 蛋白均能产生三条不同大小的带。在还原条件下，hFc 二聚体被还原成单体形态，His 标签蛋白则不受还原条件的影响。同时，糖基化修饰会影响实际显示出的蛋白条带大小。

因此综合来看，以上结果满足后续实验要求，之后我们将选定免疫这一抗原蛋白的动物宿主，并进行建库。

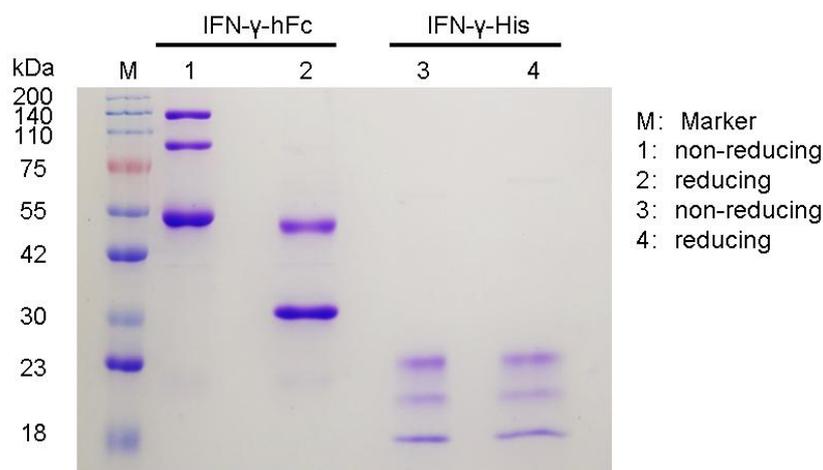


图 3.1 IFN- γ 的真核表达及纯化

利用 12% SDS-PAGE 分别检测还原与非还原条件下，两种标签的 IFN- γ 抗原蛋白纯度以及大小。每种条件的上样量为 3 μg 。

Figure 3.1 Eukaryotic expression and purification of IFN- γ

Detecting the purity and size of two tags IFN- γ in reduced and non-reduced conditions by 12% SDS-PAGE. Each kind of sample was taken 3 μg for loading.

3.2 IFN- γ 噬菌体文库的构建及筛选

3.2.1 鸡的免疫

人与鸡在种属方面差异相对较大。虽然鸡与人的基因总体约有 60% 的相似性，但控制两者免疫系统的基因相似性较小。所以为了获得亲和力高且针对更多表位的抗体序列，我们选择鸡作为动物免疫的宿主。

在经过三个周期的免疫后，我们得到了 C1、C2 两只鸡的三批血清。因为 His 标签免疫原性相对较小，我们选择 IFN- γ -His 包被 Elisa 板，测定后两次血清的免疫效价，结果如图 3.2 所示。

综合来看，C1 血清的免疫效果略优于 C2，在第三次免疫后，C1 的血清效价约有 2.5×10^4 。因此，选择 C1 来进行脾脏研磨、RNA 提取及反转录等后续实验。

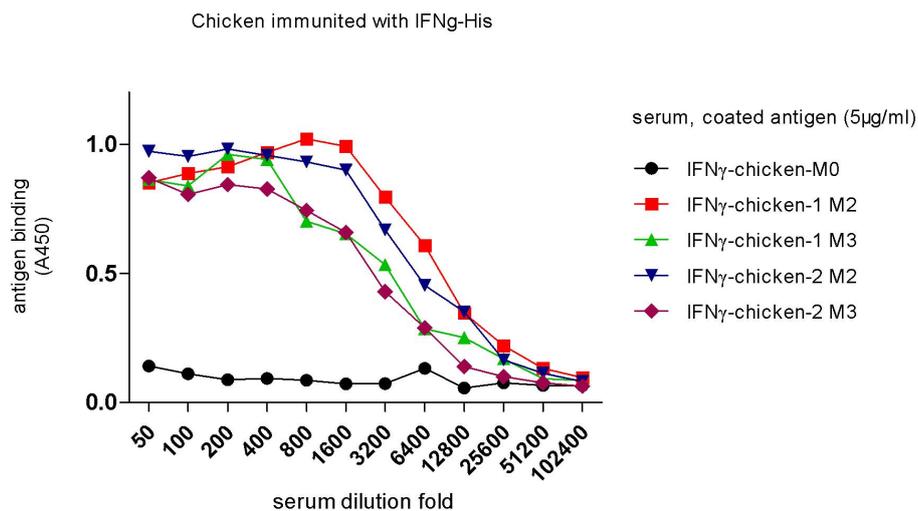


图 3.2 鸡血清抗体效价的测定

用 IFN- γ -His 和 IFN- γ -hFc 免疫 C1、C2 两只鸡，7 d 后取鸡血清，免疫结束后检测血清中抗体效价。其中 IFN- γ -His 包被平板的浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；鸡血清首孔稀释 50 倍，之后每孔按照 1:2 的比例进行梯度稀释并加入孔中，每孔 $50 \mu\text{L}$ ；最后加入 Goat-anti-Chicken HRP 的显色抗体并进行 TMB 显色，用酶标仪检测 A450 吸光值。M0：免疫前的鸡血清。M2：第二次免疫后的鸡血清。M3：第 3 次免疫后的鸡血清。

Figure 3.2 Determination of antibody titer in chicken serum

Chicken C1 and C2 were immunized with IFN- γ -His and IFN- γ -hFc. After 7 days, chicken serum was taken and the antibody titer in the serum was tested after immunizations ended. The concentration

of IFN- γ -His coated tablet is 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Chicken serum in the first well was diluted 50-fold, then the serum which was added 50 μL in each well was diluted with a gradient of 1:2. Finally, the Goat-anti-Chicken HRP chromogenic antibody was added and TMB visualization was performed. Detecting A450 absorbance value with Microplate Reader. M0: Chicken serum before immunization. M2: Chicken serum after the second immunization. M3: Chicken serum after the third immunization.

3.2.2 文库构建及筛选

利用设计好的引物，将 cDNA 文库中抗体的可变区 (V_H 、 V_L) 片段扩增出来，之后通过 overlap PCR 并以 G4S linker 连接。通过 T4 连接酶将 scFv 片段连接到噬菌体载体上，电转进入 TG1 大肠杆菌中，从而得到了 IFN- γ 的单链抗体展示文库。检测构建好的文库库容量为 8.4×10^9 CFU/mL，库容量正常。

用 M13 丝状噬菌体感染扩增到合适浓度的 TG1 大肠杆菌，经过生长、释放、离心除去沉淀后，我们得到了含有噬菌体的上清液，取其中一部分检测其滴度，结果为 1.5×10^{12} CFU/mL；另一部分用 PEG 8000/NaCl 聚沉后，将离心得到的沉淀用 PBS 溶解，加 60% 甘油保存于 -80°C 。

之后用 IFN- γ -His 对得到的噬菌体进行 4 轮筛选，结果如表 3.1 所示。在 4 轮筛选结束后，我们挑取了 96 个克隆进行 Elisa 检测，得到了多个显色明显的阳性克隆，之后对这些克隆进行测序。

表 3.1 人 IFN- γ 的鸡源抗体库筛选

Table 3.1 Screening for chicken antibody library of human IFN- γ

Round	S1	S2	S3	S4
Input (CFU/mL)	1.5×10^{12}	1.8×10^{11}	1×10^{11}	6.5×10^{10}
Output (CFU/mL)	7×10^6	5×10^4	3×10^7	2.5×10^9

3.3 IFN- γ 抗体的表达及纯化

在对阳性克隆测序，并分析测得各序列之间的相似性后，我们得到了 11 条对 IFN- γ 亲和力高且有代表性的抗体序列，分别命名为 C03、C04、C06、C08、C11、C12、C13、C15、C25、C35、C48。

筛选出的抗体序列带有 6 \times His 标签及 FLAG 标签（后简称 HF），这是载体构建时设计好的，并以此命名为 scFv-IFN- γ -Cxx-HF（xx 为上述 11 条序列其中一条），用作抗体对筛选的检测抗体。为了筛选能够检测 IFN- γ 的抗体对，我们在这 11 条序列的 C 末端单独连接了 6 \times His 标签，并命名为 scFv-IFN- γ -Cxx-His，用作抗体对筛选的捕获抗体。

上述共 22 条序列分别构建表达载体，均通过大肠杆菌分泌表达的方式纯化，由 SDS-PAGE 的方式检测蛋白的纯度与大小，结果如图 3.3 所示。经检测，由大肠杆菌分泌表达的 IFN- γ 抗体，大部分具有较高的纯度和可观的表达量。

筛选抗体对需要捕获能力强且非特异性弱的捕获抗体，以及特异性及亲和力强的检测抗体。而跟据以往纯化经验，纯度不高的蛋白往往亲和力也差。因此，需要对纯化得到的抗体序列进行亲和力检测。

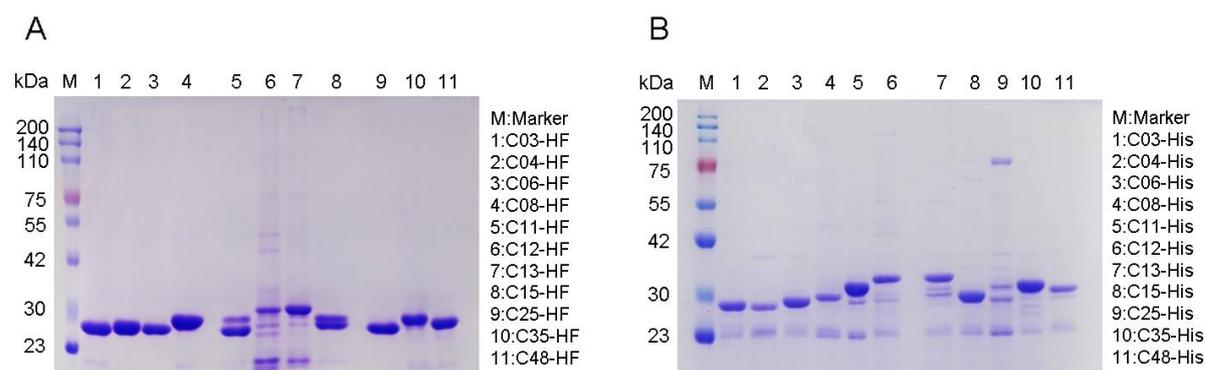


图 3.3 IFN- γ 单链抗体 SDS-PAGE 凝胶电泳图

通过大肠杆菌分泌表达 IFN- γ 抗体。利用 SDS-PAGE 检测两种表达方式得到的 IFN- γ 抗体纯度以及大小，以 3 μ g 作为每孔的上样量。（A）带有 HF 标签的 IFN- γ 抗体。（B）带有 His 标签的 IFN- γ 抗体。

Figure 3.3 SDS-PAGE of single-chain antibodies for IFN- γ

IFN- γ antibodies were purified by secreted expression of *Escherichia coli*. The purity and size of IFN- γ antibodies expressed and purified in two ways were detected by SDS-PAGE. Each kind of antibody was taken 3 μ g for loading. (A) IFN- γ antibodies with His and FLAG tags. (B) IFN- γ antibodies with His tag.

3.4 Elisa 检测抗体亲和力

在检测抗体对的筛选中,单链抗体与 IFN- γ 的结合能力与筛选出的抗体对最终性能直接相关,即结合能力越强则灵敏度越高,其优化潜力也越大。

不同标签抗体的亲和力以不同的操作方式进行检测。对于 HF 标签抗体,考虑到 hFc 标签蛋白造成的非特异性结合,将 IFN- γ -His 抗原蛋白包被到 Elisa 板上,同时以 gp350-scFv-R01-HF 做为对照抗体,加入首孔浓度为 300 nmol/L,并按 1:3 比例进行梯度稀释的抗体,最后加入 Mouse-anti-FLAG HRP 二抗孵育检测其结合能力;对于 His 标签抗体,鉴于抗 His 标签显色抗体的结合活性弱的问题,将 His 抗体包被在 Elisa 板上,并孵育首孔 5 μ g/mL 并按 1:3 梯度稀释的 IFN- γ -hFc 抗原,之后加入 Goat-anti-Human HRP 并显色。在 GraphPad Prism 上,对两种抗体结合能力及每种抗体 EC₅₀ 值进行分析,检测结果如图 3.4 所示。

带有 HF 标签的抗体蛋白都具有良好的亲和活性,其 EC₅₀ 值分别为 C03: 33.10 nmol/L、C04: 1.52 nmol/L、C06: 0.68 nmol/L、C08: 1.49 nmol/L、C11: 3.76 nmol/L、C12: 33.19 nmol/L、C13: 3.91 nmol/L、C15: 1.44 nmol/L、C25: 3.53 nmol/L C35: 1.21 nmol/L、C48: 3.71 nmol/L。其中,带 HF 标签的抗体中亲和力最强的是 C06,且 11 条代表性的序列与 IFN- γ 且均有结合能力。

带 His 标签的抗体的亲和力明显有了不同程度的减弱,且 C25 由于纯度过低而没有结合。抗体的 EC₅₀ 值分别为 C03: 33.26 nmol/L、C04: 11.38 nmol/L、C06: 11.18 nmol/L、C08: 33.24 nmol/L、C11: 3.93 nmol/L、C12: 11.30 nmol/L、C13: 11.08 nmol/L、C15: 11.11 nmol/L、C35: 11.11 nmol/L、C48: 11.21 nmol/L。

结果显示,结合力较低的捕获抗体在高浓度下能捕获足够的抗原,同时检测抗体已满足实验需求,因此可以进行后续的抗体对筛选。

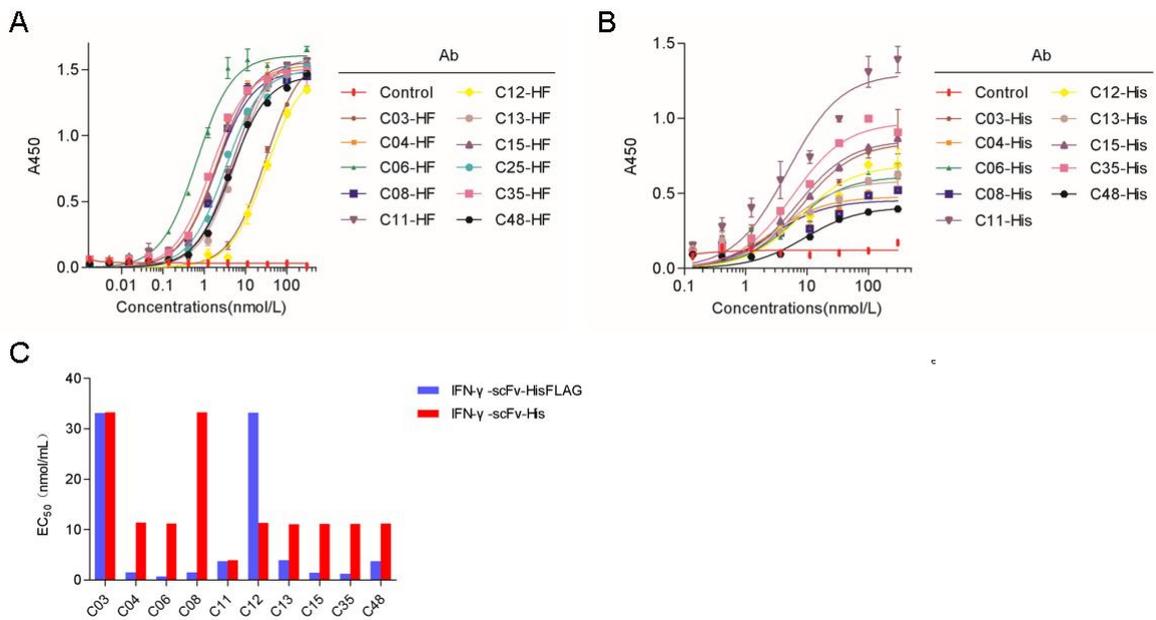


图 3.4 单链抗体与 IFN- γ 的亲合力检测

(A) HisFLAG 抗体与 IFN- γ 的亲合力。IFN- γ -His 的包被浓度为 4 μ g/mL, Mouse-anti-FLAG HRP 显色抗体以 1: 6000 稀释, 以检测 HisFLAG 标签抗体亲合力; (B) His 抗体与 IFN- γ 的亲合力。IFN- γ -scFv-His 的包被浓度为 300 nmol/L, Goat-anti-Human HRP 以 1: 5000 稀释, 以检测 His 标签抗体亲合力。(C) 两种抗体的 EC₅₀ 值。

Figure 3.4 Affinity of single-chain antibodies to IFN- γ

(A) Affinity of antibodies with His and FLAG tags to IFN- γ . To detect the affinity of antibodies with His and FLAG tags, the coating concentration of IFN- γ -His is 4 μ g/mL and the chromogenic antibody, Mouse-anti-FLAG HRP, was diluted at 1:6000. (B) Affinity of antibodies with His tag to IFN- γ . The concentration of IFN- γ -scFv-His coated is 300 nmol/L and the chromogenic antibody, Goat-anti-Human HRP, was diluted at 1:5000 to detect the affinity of antibodies with His tag. (C) EC₅₀ values of two kinds of antibodies.

3.5 Western blot 检测抗体结合能力

为了对抗体的阻断进行综合分析, 同时也为了进一步探究这些抗体序列的表位结合类型, 需要进一步检测抗体序列结合线性表位的能力。

分别使 11 种 HF 标签抗体与转移到 PDVF 膜上的还原态 IFN- γ -hFc 结合, 并用 Mouse-anti-FLAG HRP 显色抗体进行结合, 在化学发光凝胶成像系统下观察抗体的

结合情况。结果如图 3.5 所示，有 5 条序列（C04、C06、C11、C13、C35）均有线性表位结合活性。

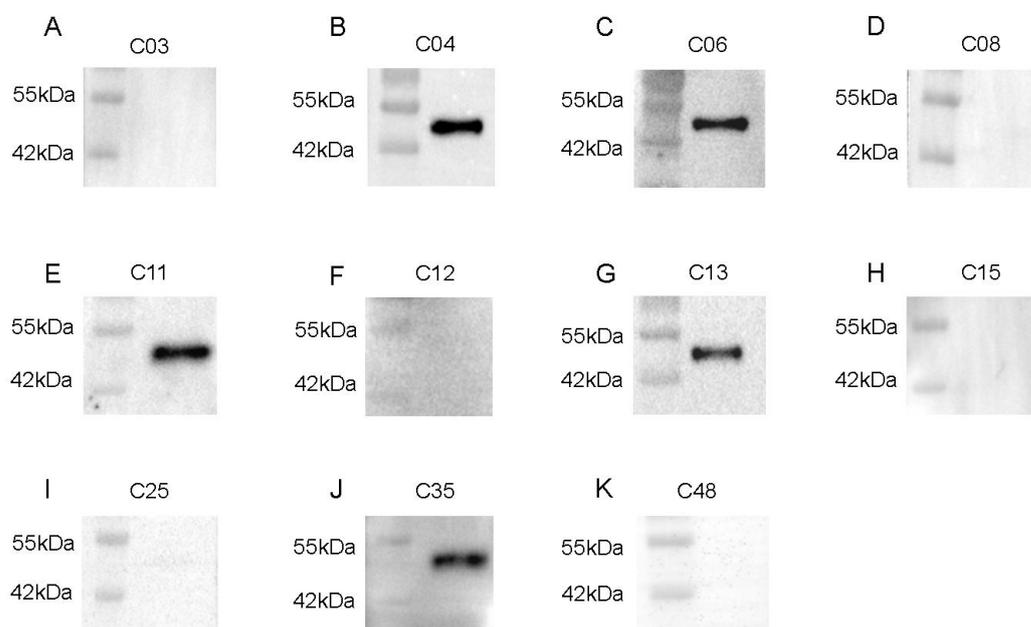


图 3.5 单链抗体与 IFN- γ 线性表位的结合能力

将 20 ng 的 IFN- γ -hFc 与还原剂混合制样，凝胶电泳并转移蛋白条带后用 5% 的脱脂奶封闭 PDVF 膜，加入 1 μ g/mL HF 标签抗体结合 1h，显色抗体以 1: 10000 比例稀释。（A-K）11 条抗体序列的 western blot 结果。

Figure 3.5 Binding ability of single-chain antibodies to liner epitopes of IFN- γ

The sample containing 20 ng IFN- γ -hFc and reducing agent. Seal PDVF membrane with 5% skim milk after SDS-PAGE and protein transfer. Adding 1 μ g/mL antibody with His and FLAG tags for 1 h. The chromogenic antibody was diluted at 1:10000. (A-K) Western blot results of 11 antibodies.

3.6 夹心 Elisa 抗体对的筛选

本实验以双抗夹心的方法建立 IFN- γ 的基础检测体系，因此被筛选出的抗体对中，捕获抗体与检测抗体应针对 IFN- γ 不同且单一的结合位点。His 标签抗体用作捕获抗体，分别包被到 ELISA 板上，封闭后加入梯度稀释的 IFN- γ -His，之后加入 FLAG 标签抗体，用抗 FLAG 的 Mouse-anti-FLAG HRP 显色抗体结合并用 TMB 显色，结果如图 3.6 所示。

C11 和 C15 抗体可以出现自己配对的情况，说明其 IFN- γ 上的结合位点可能不

止一个，不能作为显色抗体。结果显示 4 组对抗体显色强度满足实验要求，并利用 GraphPad Prism 进行了分析。其中 C03-His 与 C35-HF 有着最低的 EC₅₀ 值: 0.9418 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此选择这一组抗体对用作后续检测体系的优化。

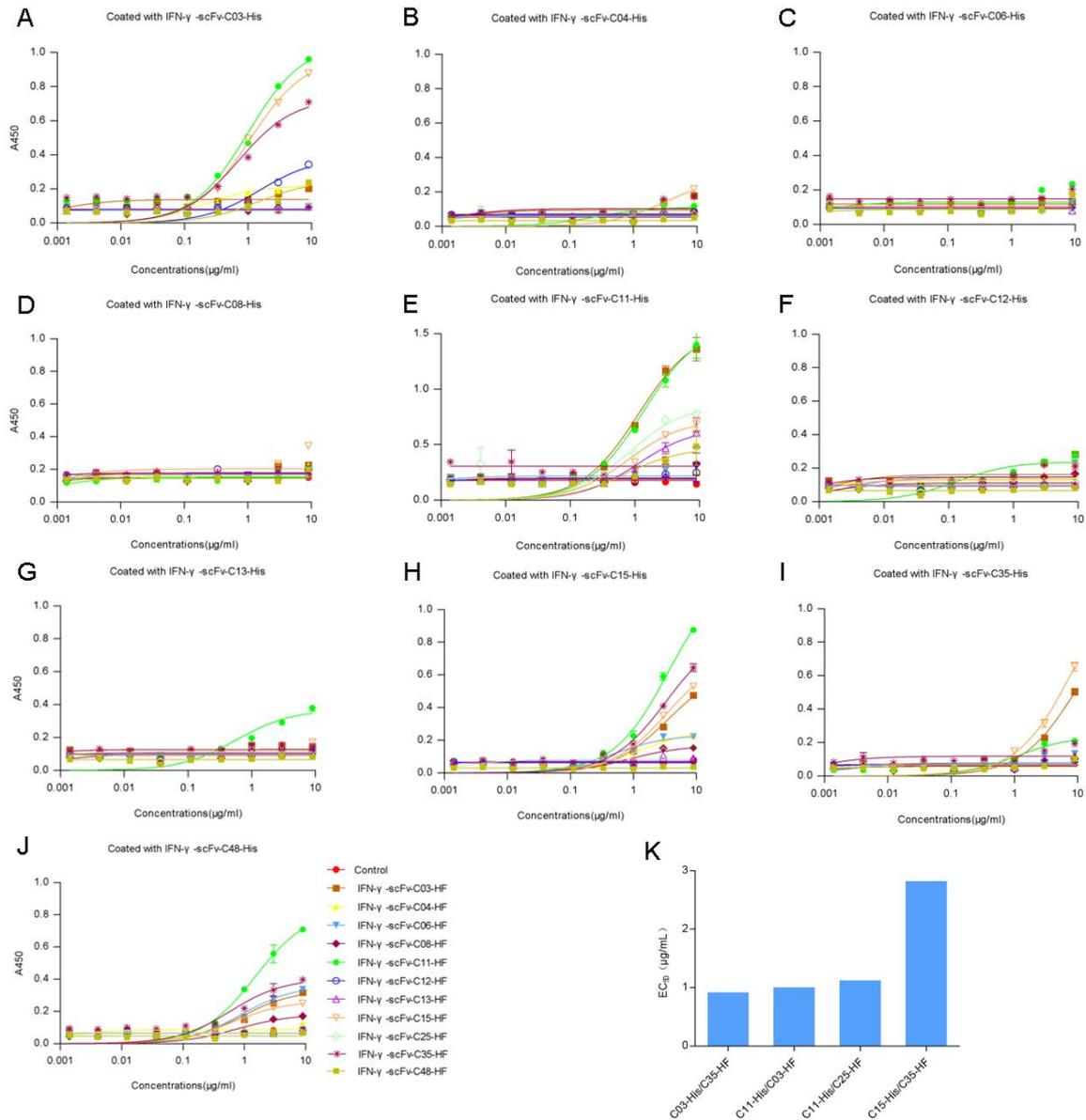


图 3.6 夹心 ELISA 筛选配对抗体

通过夹心 Elisa 筛选抗体对以检测 IFN- γ 。捕获抗体浓度: 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IFN- γ 首孔浓度: 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检测抗体浓度: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Mouse-anti-FLAG HRP 稀释比例: 1: 10000。(A-J): 各抗体配对结果。(K) 抗体对 EC₅₀ 值。

Figure 3.6 Screening for paired antibodies by sandwich ELISA

Screening antibody pairs to detect IFN- γ by sandwich Elisa. Capture antibody concentration: 7.5 $\mu\text{g/mL}$, the first well concentration of IFN- γ : 9 $\mu\text{g/mL}$, detected antibody concentration: 1 $\mu\text{g/mL}$, Mouse-anti-FLAG HRP dilution ratio: 1:10000. (A-J) Pairing results of each antibody. (K) EC₅₀ values of antibody pairs.

3.7 流式细胞分析 IFN- γ 受体表达情况

为了筛选出能够阻断 IFN- γ 与其受体结合的阻断抗体,首先检测其受体表达量最高的细胞系。IFN- γ 的受体在正常的组织细胞、免疫细胞以及癌细胞表面均有表达,因此我们选择实验室保存的 HEK 293 细胞系、G1 细胞系(超表达 GPC3 的 A431 细胞系)以及 HepG2、Hep3B、Huh7 三个肝癌细胞系,进行 IFN- γ 受体表达量的分析。处理细胞后,将 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 IFN- γ -hFc 与细胞结合,采用 Cy5-山羊抗人 IgG 抗体为流式显色抗体,在流式细胞仪下分析,结果如图 3.7 所示。

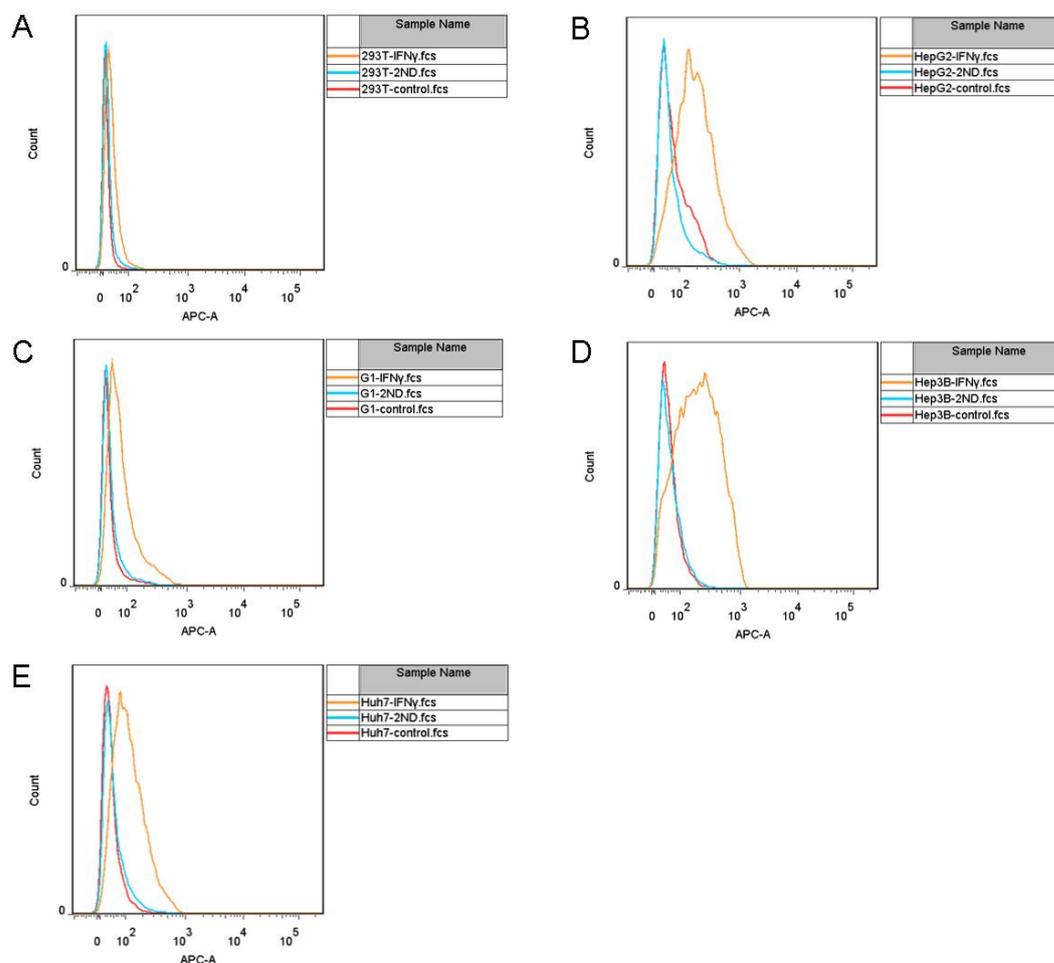


图 3.7 不同细胞表面 IFN- γ 受体的表达情况

通过流式分析检测 5 种细胞系表面 IFN- γ 受体的表达情况。实验组细胞用 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 IFN- γ -hFc 处理 1 h, 显色抗体 Cy5-山羊抗人 IgG 以 1: 500 比例稀释。Control: 不经处理的细胞。2ND: 只加显色抗体处理的细胞。(A-E) 5 种细胞系表面的受体表达量。

Figure 3.7 Expression of IFN- γ receptors on the surface of different cells

Detection the expression of IFN- γ receptor in the surface of 5 cell lines by flow cytometry. Experimental group cells were treated with 10 $\mu\text{g/mL}$ IFN- γ -hFc for 1 hour. Chromogenic antibody Cy5-goat anti human IgG was diluted in 1:500 ratio. Control: untreated cells. 2ND: Cells only treated with chromogenic antibody. (A-E) Receptor expression levels on the surface of five cell lines.

在 5 种细胞系中, HEK 293 细胞系和 A431 细胞系表面的 IFN- γ 受体表达量很低, 不能用于后续抗体阻断能力实验; 三种肝癌细胞系中, HepG2 和 Hep3B 细胞表面的 IFN- γ 受体表达量相对较高一些, 适合进行后续实验。因此, 最终选择 Hep3B 细胞系来进行后续抗体阻断效果实验。

3.8 流式细胞分析抗体阻断能力

在确定实验用细胞系后, 初步设置实验组抗体浓度梯度, 包含三个浓度: 50 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 以及 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 同时设置对照抗体组。将不同浓度的抗体与 1 $\mu\text{g/mL}$ IFN- γ -hFc 混合并置于冰上, 过夜结合封闭。之后用被抗体封闭过的抗原处理细胞, 最后通过流式分析检测抗体是否阻断了 IFN- γ 与其受体的结合, 结果如图 3.8 所示。

可以确定的是, 其中两种抗体 C11、C15 有明显的阻断作用, 在 5 $\mu\text{g/mL}$ 时已经能够完全阻断 IFN- γ 与其受体的结合; C13、C35 的阻断能力要略差一些, 但也能够做到完全阻断。另外, C12、C06、C25 有微弱的阻断效果, 但不能做到完全的阻断; 剩余 4 种抗体则没有阻断能力。

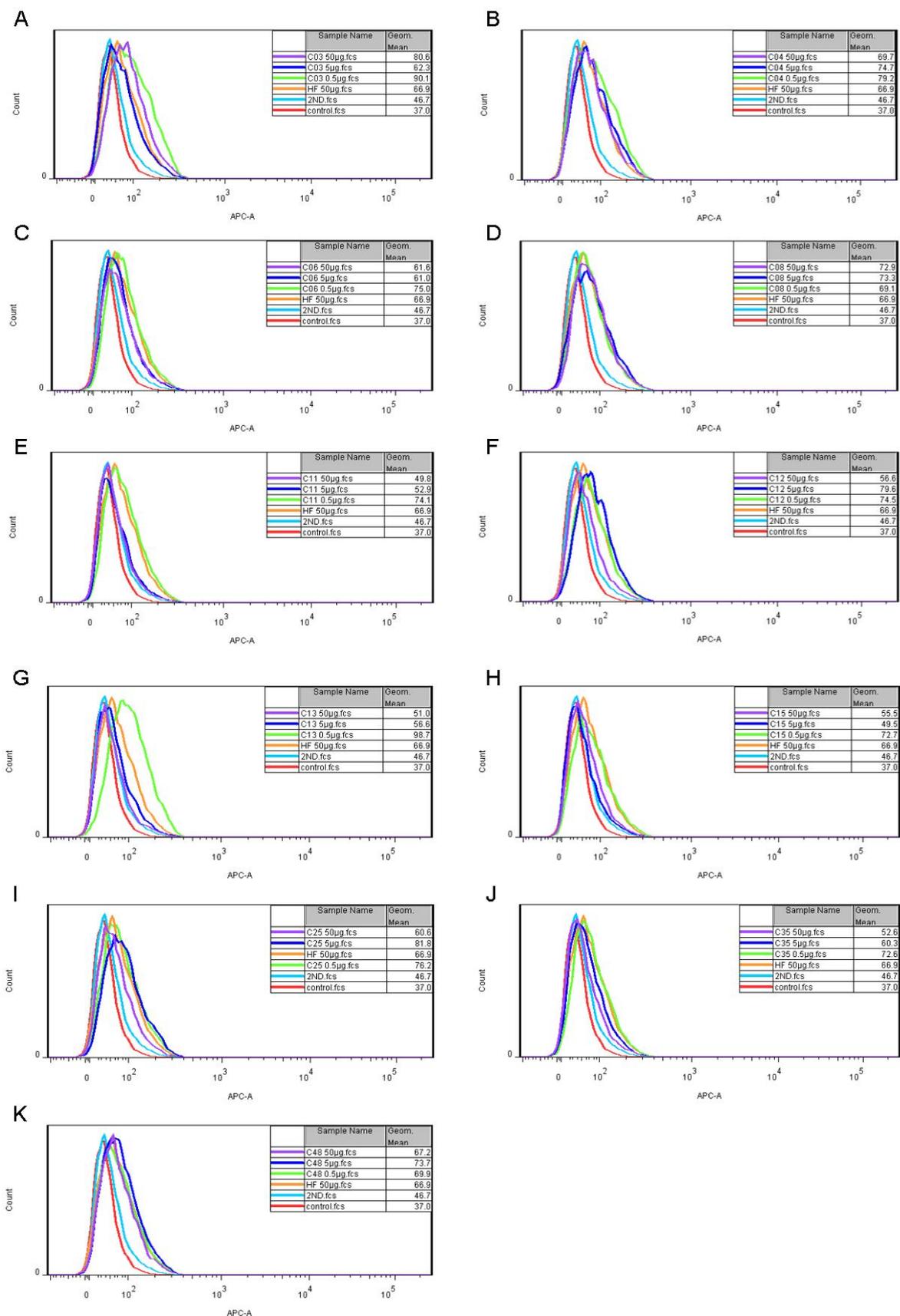


图 3.8 单链抗体对 IFN- γ 与其受体结合的阻断能力

流式分析下的不同抗体对 IFN- γ 与其受体结合的阻断能力。实验组及对照抗体组细胞用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 IFN- γ -hFc 处理, 显色抗体 Cy5-山羊抗人 IgG 以 1: 500 比例稀释。Control 为空白对照组, 2ND 为显色抗体单一处理组, HF 为对照抗体组, 其余三组为不同抗体浓度下的实验组。(A-K) 抗体在细胞水平上的阻断能力。

Figure 3.8 Blocking ability of single chain antibodies for the binding of IFN- γ to its receptor

The blocking ability of different antibodies for the binding of IFN- γ to its receptor by flow cytometry analysis. Cells in the experimental group and control antibody group were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IFN- γ -hFc. Chromogenic antibody Cy5-goat anti human IgG was diluted in 1:500 ratio. Control: blank control group. 2ND: group only treated with chromogenic antibody. HF: control antibody group. Others: experimental groups at different antibody concentrations. (A-K) The blocking ability of antibodies at the cellular level.

4. 讨论

IFN- γ 作为免疫反应过程中重要的调节因子，在 pg 级的浓度下就能在健康人体内发挥正常功能。因而细微的浓度变化，便能极大地影响免疫反应的发展方向，对疾病治疗产生影响。同时，在某些疾病确诊前，IFN- γ 便有异常升高的现象（Manna et al 2023）。因此，对 IFN- γ 进行监控与检测十分必要，需要建立一种操作简便快捷、低成本且反应灵敏的检测方式；而鉴于 IFN- γ 在肿瘤治疗中的双重作用，对于其与受体结合及信号传导的调控也十分重要。本实验建立的人 IFN- γ 检测方式以双抗夹心 Elisa 为基础，操作简便且耗时短；同时通过噬菌体展示的方法筛选抗体，能够得到覆盖更多表位的抗体序列，为检测提供了多种组合，使检测更具灵活性；这也方便之后对检测体系进行优化。

为了得到特异性靶向 IFN- γ 的单链抗体，首先制备了纯度较高且活性良好的 IFN- γ 蛋白，并将其与两种标签（hFc 和 His）连接在一起，并利用 HEK 293F 细胞表达。从理论上讲，IFN- γ 由于糖基化的程度不同，会在蛋白胶图上呈现出三种不同大小的条带。而 hFc 标签蛋白会以二硫键形成二聚体，使条带大小翻倍，在被还原剂还原后会回到单体状态；同时 IFN- γ 蛋白序列在其 C 末端有一处 furin 蛋白酶切割位点，切割后几乎将 IFN- γ 蛋白与其相连标签分离。因此，在非还原条件下最小的条带应是二聚体的 hFc（约 50kDa），其他条带为 IFN- γ -hFc。没有出现明显三条带的情况应该是因为大小相近的带重叠或连接在了一起，还原条件下的 IFN- γ 条带印证了这一点：相对于非还原条件下的两条 IFN- γ -hFc 条带，还原条件下的条带要略宽一些，说明有大小不同且相近的条带连在了一起。而 His 标签没有二聚体化的情况，在还原与非还原条件下的蛋白条带结果是一致的，均有三种大小，符合理论情况。

经过鸡免疫及文库构建筛选后，最终得到了靶向 IFN- γ 的 11 条差异明显的 scFv 序列：C03、C04、C06、C08、C11、C12、C13、C15、C25、C35、C48，并将这 11 条序列分别连接 His 标签和 His、FLAG 标签，利用大肠杆菌胞内和周质空间进行表达。大肠杆菌的周质空间是由其内膜外膜组成的双层膜结构，其中存在着附在质膜上的呼吸链复合物，这样的结构为蛋白质结构的正确折叠提供了合适的环境；同时，由于周质空间中蛋白含量低，蛋白酶活性要比胞质内低，所以这里表达的蛋白能够

避免胞内酶的降解而稳定存在。因此，分泌表达在重组蛋白活性、纯度以及操作简便程度上具有明显优势。本实验通过分泌表达，顺利地纯化出了纯度以及活性均极高的 HF 标签抗体蛋白，且纯度和活性明显优于胞内表达的 His 标签单抗。因此，在所表达蛋白结构简单且实验需求量不高的情况下，可以优先选择这一方法。

对纯化得到的抗体进行了结合活性的检测，结果显示除 His 标签 C25 外，其他抗体活性且纯度良好。HF 标签抗体的 EC₅₀ 值在 0.68-33.19 nmol/L 的范围内，其中结合力最高的是 C06，最低的是 C12；His 标签抗体的 EC₅₀ 在 3.93-33.26 nmol/L 的范围内，其中结合力最高的是 C11，最低的是 C03。总的结果显示，两种标签的 C11 均有良好的亲和活性，且 HF 标签蛋白的活性整体高于 His 标签，而活性较差的 His 抗体也能在高浓度的条件下捕获足够的 IFN- γ 抗原。

在 His 标签捕获抗体中，C11、C15、C35 在较高的结合上限下具有相对较小的 EC₅₀ 值，其夹心 Elisa 结果更具参考性。而 C11 与 C15 具有和自己配对的能力。在排除非特异性结合的可能后，我们分析认为，这两种抗体对于 IFN- γ 抗原可能存在不止一个同类的结合位点，其中 C11 能够结合线性表，因此 C11 的结合位点应该暴露在 IFN- γ 外部。若假设成立，在它们用作检测抗体时，其显色强度会因为每分子抗原的抗体结合量不确定，而不能形成有科学意义的结合曲线。因此，C11 与 C15 只应用作捕获抗体，且抗体用量需要加倍，不符合实验要求。综合分析后，我们筛选出了 4 组符合要求的检测抗体对，其中 C03-His/C35-HF 有着最低的 EC₅₀ 值：0.9418 $\mu\text{g/mL}$ ，可用作后续检测体系的优化。

通过流式分析 5 种细胞系表面 IFN- γ 受体的表达情况，我们选出了表达量较高的 Hep3B 肝癌细胞用来筛选阻断抗体。最终结果显示，C11、C15 有明显的阻断作用，在抗原抗体浓度 1: 5 的情况下能够完全阻断 IFN- γ 与其受体的结合；C13、C35 也能够做到完全阻断，但需要更高的抗体浓度；C12、C06、C25 不能做到完全的阻断；剩余 4 种抗体则没有阻断能力。因为 IFN- γ 与其高亲和力受体以 1: 2 的化学计量比结合，因此若要完全封闭其结合位点，理论上的抗体浓度应至少为 IFN- γ 浓度的 2 倍。综上所述，结合夹心 Elisa 的结果，C11 在两种标签下不仅具有对 IFN- γ 更高的亲和力，并且可能在多位点结合的情况下完全封闭 IFN- γ 与其受体的结合，具有成为研究 IFN- γ 功能实验工具的潜力。

本实验通过双抗夹心的方法建立了 IFN- γ 的检测方法,同时为之后体系的优化打下了基础;同时,通过流式分析,我们确定了 2 种具有良好阻断功能的抗体,对 IFN- γ 功能研究以及医学上 IFN- γ 引起的过度免疫等疾病的治疗具有积极意义。

但同时,本实验仍有许多不足与限制,如流式分析中并未探究出抗体浓度的最低阻断比例,同时流式分析中加入的抗原浓度不足且细胞表面受体表达量不高,导致信号并不明显;由于单独使用 IFN- γ 发挥的作用有限以及其在某些情况下的促肿瘤效果,未能在简便情况下进一步研究细胞水平上的抗体功能;实验筛选检测体系时,所选用的捕获抗体活性有待提高;相比于市售检测体系仍有广阔提升空间有待发展等,这些问题都需要我们进一步实验。IFN- γ 作为人体免疫调节的重要细胞因子,包括其信号机制等方面,仍留有许多问题需要我们去进一步探索。

参考文献

1. Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Baba T, Konishi I, Mandai M. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer*, 2015, 112: 1501-1509
2. Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, Baradaran B, Motallebnezhad M, Aghebati-Maleki A, Nickho H, Yousefi M, Majidi J. Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 66
3. Almishri W, Santodomingo-Garzon T, Le T, Stack D, Mody CH, Swain MG. TNF α Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN- γ Production through TNFR2. *J Innate Immun*, 2016, 8: 617-629
4. Alspach E, Lussier DM, Schreiber RD. Interferon- γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11: a028480
5. Arakawa T, Hsu Y-R, Chang D, Stebbing N, Altrock B. Structure and Activity of Glycosylated Human Interferon- γ . *J Interferon Res*, 1986, 6: 687-695
6. Arap MA. Phage display technology: applications and innovations. *Genet Mol Biol*, 2005, 28: 1-9
7. Bábíčková J, Tóthová L, Boor P, Celec P. In vivo phage display-A discovery tool in molecular biomedicine. *Biotechnol Adv*, 2013, 31: 1247-1259
8. Barderas R, Benito-Peña E. The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411: 2475-2479
9. Bashir S, Paeshuyse J. Construction of Antibody Phage Libraries and Their Application in Veterinary Immunovirology. *Antibodies*, 2020, 9: 21
10. Beatty GL, Paterson Y. IFN- γ Can Promote Tumor Evasion of the Immune System In Vivo by Down-Regulating Cellular Levels of an Endogenous Tumor Antigen. *J Immunol*, 2000, 165: 5502-5508

11. Berner V, Liu H-Y, Zhou Q, Alderson KL, Sun K, Weiss JM, Back TC, Longo DL, Blazar BR, Wiltout RH, Welniak LA, Redelman D, Murphy WJ. IFN- γ mediates CD4⁺ T-cell loss and impairs secondary antitumor responses after successful initial immunotherapy. *Nat Med*, 2007, 13: 354-360
12. Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ, Emmons RV, Witkiewicz AK. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle*, 2009, 8: 1930-1934
13. Burke JD, Young HA. IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Semin Immunol*, 2019, 43: 101280
14. Castagnoli L, Zuccconi A, Quondam M, Rossi M, Vaccaro P, Panni S, Paoluzi S, Santonico E, Dente L, Cesareni G. Alternative Bacteriophage Display Systems. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2012, 4: 121-133
15. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol*, 2018, 9: 847
16. Das R, Bassiri H, Guan P, Wiener S, Banerjee PP, Zhong M-C, Veillette A, Orange JS, Nichols KE. The adaptor molecule SAP plays essential roles during invariant NKT cell cytotoxicity and lytic synapse formation. *Blood*, 2013, 121: 3386-3395
17. Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol*, 2007, 8: 145-153
18. Driver JP, Racine JJ, Ye C, Lamont DJ, Newby BN, Leeth CM, Chapman HD, Brusko TM, Chen Y-G, Mathews CE, Serreze DV. Interferon- γ Limits Diabetogenic CD8⁺ T-Cell Effector Responses in Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 2017, 66: 710-721
19. Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan T L, Trotta PP, Bugg CE. Three-Dimensional Structure of Recombinant Human Interferon- γ . *Science*, 1991, 252: 698-702
20. Gagic D, Ciric M, Wen WX, Ng F, Rakonjac J. Exploring the Secretomes of Microbes and

- Microbial Communities Using Filamentous Phage Display. *Front Microbiol*, 2016, 7: 429
21. Gao J-J, Shi LZ, Zhao H, Chen J-F, Xiong L-W, He Q-M, Chen T-H, Roszik J, Bernatchez C, Woodman SE, Chen P-L, Hwu P, Allison JP, Futreal A, Wargo JA, Sharma P. Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell*, 2016, 167: 397-404
 22. Gao Y, Yang J-J, Cai Y-X, Fu S-L, Zhang N, Fu X-N, Li L-Q. IFN- γ -mediated inhibition of lung cancer correlates with PD-L1 expression and is regulated by PI3K-AKT signaling: IFN- γ in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 2018, 143: 931-943
 23. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, Zaretsky JM, Sun L, Hugo W, Wang X-Y, Parisi G, Saus CP, Torrejon DY, Graeber TG, Comin-Anduix B, Hu-Lieskovan S, Damoiseaux R, Lo RS, Ribas A. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep*, 2017, 19: 1189-1201
 24. Garris CS, Arlauckas SP, Kohler RH, Trefny MP, Garren S, Piot C, Engblom C, Pfirschke C, Siwicki M, Gungabeesoon J, Freeman GJ, Warren SE, Ong S, Browning E, Twitty CG, Pierce RH, Le MH, Algazi AP, Daud AI, Pai SI, et al. Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- γ and IL-12. *Immunity*, 2018, 49: 1148-1161
 25. Gocher AM, Workman CJ, Vignali DAA. Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment? *Nat Rev Immunol*, 2022, 22: 158-172
 26. Gordon-Alonso M, Hirsch T, Wildmann C, Van Der Bruggen P. Galectin-3 captures interferon-gamma in the tumor matrix reducing chemokine gradient production and T-cell tumor infiltration. *Nat Commun*, 2017, 8: 793
 27. Grzesiek S. ^1H , ^{13}C , and ^{15}N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma. *Biochemistry*, 1992, 31, 35: 8180-90
 28. Haelewyn J, Michiels L, Verhaert P, Hoylaerts MF, Witters R, Ley MD. Interaction of truncated human interferon- γ variants with the interferon- γ receptor: crucial importance of Arg-129. *Biochem J*, 1997, 324: 591-595

29. Halim L, Romano M, McGregor R, Correa I, Pavlidis P, Grageda N, Hoong S-J, Yuksel M, Jassem W, Hannen RF, Ong M, Mckinney O, Hayee B, Karagiannis SN, Powell N, Lechler RI, Nova-Lamperti E, Lombardi G. An Atlas of Human Regulatory T Helper-like Cells Reveals Features of Th2-like Tregs that Support a Tumorigenic Environment. *Cell Rep*, 2017, 20: 757-770
30. Hamzeh-Mivehroud M, Alizadeh AA, Morris MB, Bret Church W, Dastmalchi S. Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. *Drug Discov Today*, 2013, 18: 1144-1157
31. Henriksen JR, Donskov F, Waldstrøm M, Jakobsen A, Hjortkjaer M, Petersen CB, Dahl Steffensen K. Favorable prognostic impact of Natural Killer cells and T cells in high-grade serous ovarian carcinoma. *Acta Oncol*, 2020, 59: 652-659
32. Hess KL, Jewell CM. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. *Bioeng Transl Med*, 2020, 5: 1
33. Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon- γ : Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. *Immunity*, 2009, 31: 539-550
34. Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, Mullen AC, Gasink CR, Kaech SM, Miller JD, Gapin L, Ryan K, Russ AP, Lindsten T, Orange JS, Goldrath AW, Ahmed R, Reiner SL. Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol*, 2005, 6: 1236-1244
35. Irving MB, Pan O, Scott JK. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5: 314-24
36. Jaroszewicz W, Morcinek-Orłowska J, Pierzynowska K, Gaffke L, Węgrzyn G. Phage display and other peptide display technologies. *FEMS Microbiol Rev*, 2022, 46
37. Jenner RG, Townsend MJ, Jackson I, Sun K, Bouwman RD, Young RA, Glimcher LH, Lord GM. The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106: 17876-17881

38. Jorgovanovic D, Song M-J, Wang L-P, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res*, 2020, 8: 49
39. Kanhere A, Hertweck A, Bhatia U, Gökmen MR, Perucha E, Jackson I, Lord GM, Jenner RG. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat Commun*, 2012, 3: 1268
40. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, Zheng M, Sundaram B, Banoth B, Malireddi RKS, Schreiner P, Neale G, Vogel P, Webby R, Jonsson CB, Kanneganti T-D. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell*, 2021, 184: 149-168
41. Kaur S, Sassano A, Dolniak B, Joshi S, Majchrzak-Kita B, Baker DP, Hay N, Fish EN, Plataniias LC. Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105: 4808-4813
42. Lebani K, Jones ML, Watterson D, Ranzoni A, Traves RJ, Young PR, Mahler SM. Isolation of serotype-specific antibodies against dengue virus non-structural protein 1 using phage display and application in a multiplexed serotyping assay. *PLOS ONE*, 2017, 12: e0180669
43. Ledsgaard L, Ljungars A, Rimbault C, Sørensen CV, Tulika T, Wade J, Wouters Y, McCafferty J, Laustsen AH. Advances in antibody phage display technology. *Drug Discov Today*, 2022, 27: 2151-2169
44. Lee KH, Lee J-W, Song J, Hwang M. Nanoscale bacteriophage biosensors beyond phage display. *Int J Nanomedicine*, 2013: 3917
45. Lee S, Cha J, Kim I, Yoon JC, Lee HJ, Park SW, Cho S, Youn D-Y, Lee H, Lee CH, Lee JM, Lee KY, Kim J. A high-throughput assay of NK cell activity in whole blood and its clinical application. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445: 584-590
46. Lekmine F, Sassano A, Uddin S, Smith J, Majchrzak B, Brachmann SM, Hay N, Fish EN, Plataniias LC. Interferon- γ engages the p70 S6 kinase to regulate phosphorylation of the 40S S6 ribosomal protein. *Exp Cell Res*, 2004, 295: 173-182

47. Lekmine F, Uddin S, Sassano A, Parmar S, Brachmann SM, Majchrzak B, Sonenberg N, Hay N, Fish EN, Plataniias LC. Activation of the p70 S6 Kinase and Phosphorylation of the 4E-BP1 Repressor of mRNA Translation by Type I Interferons. *J Biol Chem*, 2003, 278: 27772-27780
48. Liaskou E, Patel SR, Webb G, Bagkou Dimakou D, Akiror S, Krishna M, Mells G, Jones DE, Bowman SJ, Barone F, Fisher BA, Hirschfield GM. Increased sensitivity of Treg cells from patients with PBC to low dose IL-12 drives their differentiation into IFN- γ secreting cells. *J Autoimmun*, 2018, 94: 143-155
49. Lilkova E, Petkov P, Ilieva N, Krachmarova E, Nacheva G, Litov L. Molecular modeling of the effects of glycosylation on the structure and dynamics of human interferon-gamma. *J Mol Model*, 2019, 25: 127
50. Samprikta Manna, Colm J Mc Elwain, Gillian M Maher, Marta Giralt Martín, Andrea Musumeci, Fergus P McCarthy, Cathal McCarthy. Heterogenous Differences in Cellular Senescent Phenotypes in Pre-Eclampsia and IUGR following Quantitative Assessment of Multiple Biomarkers of Senescence. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 3101
51. Mørtz E, Sareneva T, Haebel S, Julkunen I, Roepstorff P. Mass spectrometric characterization of glycosylated interferon- γ variants separated by gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 1996, 17: 925-931
52. Nacheva G, Todorova K, Boyanova M, Berzal-Herranz A, Karshikoff A, Ivanov I. Human interferon gamma: significance of the C-terminal flexible domain for its biological activity. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 413: 91-98
53. Naylor SL, Sakaguchi AY, Shows TB, Law ML, Goeddel DV, Gray PW. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J Exp Med*, 1983, 157: 1020-1027
54. Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10: a028423
55. Omidfar K, Daneshpour M. Advances in phage display technology for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 2015, 10: 651-669

56. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 323-358
57. Pan J-P, Zhang M-H, Wang J-L, Wang Q-Q, Xia DJ, Sun W-J, Zhang L-H, Yu H, Liu Y-J, Cao X-T. Interferon- γ is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. *Immunol Lett*, 2004, 94: 141-151
58. Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 131-144
59. Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, Banica M, DiCioccio CB, Gross DA, Mao C, Shen H, Cereb N, Yang SY, Lindsten T, Rossant J, Hunter CA, Reiner SL. Control of Effector CD8⁺ T Cell Function by the Transcription Factor Eomesodermin. *Science*, 2003, 302: 1041-1043
60. Peltomaa R, López-Perolio I, Benito-Peña E, Barderas R, Moreno-Bondi MC. Application of bacteriophages in sensor development. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408: 1805-1828
61. Pestka S. The Interferons: 50 Years after Their Discovery, There Is Much More to Learn. *J Biol Chem*, 2007, 282: 20047-20051
62. Petrenko V. Evolution of phage display: from bioactive peptides to bioselective nanomaterials. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008a, 5: 825-836
63. Petrenko VA. Landscape phage as a molecular recognition interface for detection devices. *Microelectron J*, 2008b, 39: 202-207
64. Piechutta M, Berghoff AS. New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of Cluster of Differentiation 40 (CD40/TNFR5). *ESMO Open*, 2019, 4: e000510
65. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 375-386
66. Poggi A, Giuliani M. Mesenchymal Stromal Cells Can Regulate the Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Vaccines*, 2016, 4: 41
67. Ravichandran G, Neumann K, Berkhout LK, Weidemann S, Langeneckert AE, Schwinge D, Poch T, Huber S, Schiller B, Hess LU, Ziegler AE, Oldhafer KJ, Barikbin R, Schramm C, Altfeld M, Tiegs G. Interferon- γ -dependent immune responses contribute to the

- pathogenesis of sclerosing cholangitis in mice. *J Hepatol*, 2019, 71: 773-782
68. Refaeli Y, Van Parijs L, Alexander SI, Abbas AK. Interferon- γ Is Required for Activation-induced Death of T Lymphocytes. *J Exp Med*, 2002, 196: 999-1005
69. Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of Interferon- γ . *Cytokine*, 2010, 50: 1-14
70. Sareneva T, Pirhonen J, Cantell K, Kalkkinen N. Role of N-glycosylation in the synthesis, dimerization and secretion of human interferon-gamma. *Biochem J*, 1994, 303: 831-40
71. Schein CH. Deletions at the C-terminus of interferon γ reduce RNA binding and activation of double-stranded-RNA cleavage by bovine seminal ribonuclease. *Biochem J*, 1995, 307: 123-7
72. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. *Adv Immunol*, 2007, 96: 41-101
73. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 2004, 75: 163-189
74. Setoguchi R, Matsui Y, Mouri K. mTOR signaling promotes a robust and continuous production of IFN- γ by human memory CD8⁺ T cells and their proliferation: Leukocyte signaling. *Eur J Immunol*, 2015, 45: 893-902
75. Sioud M. Phage Display Libraries: From Binders to Targeted Drug Delivery and Human Therapeutics. *Mol Biotechnol*, 2019, 61: 286-303
76. Smith GP. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*, 1985, 228: 1315-1317
77. Song M-J, Ping Y, Zhang K, Yang L, Li F, Zhang C-Q, Cheng S-Y, Yue D-L, Maimela NR, Qu J, Liu S-S, Sun T, Li Z-H, Xia J-C, Zhang B, Wang L-P, Zhang Y. Low-Dose IFN- γ Induces Tumor Cell Stemness in Tumor Microenvironment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*, 2019, 79: 3737-3748
78. Sun T, Yang Y, Luo X-G, Cheng Y, Zhang M-Y, Wang K, Ge C-L. Inhibition of Tumor Angiogenesis by Interferon- γ by Suppression of Tumor-Associated Macrophage Differentiation. *Onco. Res Featur Preclin Clin Cancer Ther*, 2014, 21: 227-235

79. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct Effects of T-bet in T_H1 Lineage Commitment and IFN- γ Production in CD4 and CD8 T Cells. *Science*, 2002, 295: 338-42
80. Tan Y-Y, Tian T, Liu W-L, Zhu Z, J. Yang C. Advance in phage display technology for bioanalysis. *Biotechnol J*, 2016, 11: 732-745
81. Tanaka K, Ichiyama K, Hashimoto M, Yoshida H, Takimoto T, Takaesu G, Torisu T, Hanada T, Yasukawa H, Fukuyama S, Inoue H, Nakanishi Y, Kobayashi T, Yoshimura A. Loss of Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Helper T Cells Leads to Defective Th17 Differentiation by Enhancing Antagonistic Effects of IFN- γ on STAT3 and Smads. *J Immunol*, 2008, 180: 3746-3756
82. Thiel D, Le Du M-H, Walter R, D'Arcy A, Chène C, Fountoulakis M, Garotta G, Winkler F, Ealick S. Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon- γ receptor complex. *Structure*, 2000, 8: 927-936
83. Thieu VT, Yu Q, Chang H-C, Yeh N, Nguyen ET, Sehra S, Kaplan MH. Signal Transducer and Activator of Transcription 4 Is Required for the Transcription Factor T-bet to Promote T Helper 1 Cell-Fate Determination. *Immunity*, 2008, 29: 679-690
84. Trent JM, Olson S, Lawn RM. Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982, 79: 7809-13
85. Varesio L, Blasi E, Thurman GB. Potent Activation of Mouse Macrophages by Recombinant Interferon- γ . *Cancer Res*, 1984, 44,10: 4465-9
86. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 523-532
87. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuñil M, Callol L. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2002, 35: 23-28
88. Vitale LA, Thomas LJ, He L-Z, O'Neill T, Widger J, Crocker A, Sundarapandiyam K, Storey JR, Forsberg EM, Weidlick J, Baronas AR, Gergel LE, Boyer JM, Sisson C,

- Goldstein J, Marsh HC, Keler T. Development of CDX-1140, an agonist CD40 antibody for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68: 233-245
89. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity*, 2006, 24: 677-688
90. Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL. Interferon- γ acts directly on CD8⁺ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med*, 2005, 201: 1053-1059
91. Wolf BJ, Choi JE, Exley MA. Novel Approaches to Exploiting Invariant NKT Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 2018, 9: 384
92. Wu S-P, Liao R-Q, Tu H-Y, Wang W-J, Dong Z-Y, Huang S-M, Guo W-B, Gou L-Y, Sun H-W, Zhang Q, Xie Z, Yan L-X, Su J, Yang J-J, Zhong W-Z, Zhang X-C, Wu Y-L. Stromal PD-L1-Positive Regulatory T cells and PD-1-Positive CD8-Positive T cells Define the Response of Different Subsets of Non-Small Cell Lung Cancer to PD-1/PD-L1 Blockade Immunotherapy. *J Thorac Oncol*, 2018, 13: 521-532
93. Yang M-Q, Du Q, Varley PR, Goswami J, Liang Z-H, Wang R-H, Li H, Stolz DB, Geller DA. Interferon regulatory factor 1 priming of tumour-derived exosomes enhances the antitumour immune response. *Br J Cancer*, 2018, 118: 62-71
94. Zaidi MR, Merlino G. The Two Faces of Interferon- γ in Cancer. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 6118-6124
95. Zhang J-Q, He H, Qiao Y, Zhou T, He H-L, Yi S-N, Zhang L-J, Mo L, Li Y-H, Jiang W-K, You Z-L. Priming of microglia with IFN- γ impairs adult hippocampal neurogenesis and leads to depression-like behaviors and cognitive defects. *Glia*, 2020, 68: 2674-2692
96. Zhu Y-C, Song D-L, Song Y-L, Wang X-D. Interferon gamma induces inflammatory responses through the interaction of CEACAM1 and PI3K in airway epithelial cells. *J Transl Med*, 2019, 17: 147