

## • 动物及兽医生物技术 •

## 抗鸡白细胞介素 4 单克隆抗体的制备及鉴定

关晓宇, 徐志超, 王永强, 李晓齐, 曹红, 郑世军

中国农业大学 动物医学院 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

关晓宇, 徐志超, 王永强, 等. 抗鸡白细胞介素 4 单克隆抗体的制备及鉴定. 生物工程学报, 2017, 33(1): 44–54.

Guan XY, Xu ZC, Wang YQ, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against chicken interleukin 4. Chin J Biotech, 2017, 33(1): 44–54.

**摘要:** 为了制备鸡白细胞介素 4 (chIL-4) 单克隆抗体, 将成熟的 *chIL-4* 基因亚克隆至原核表达载体 pET-28a 和 pGEX-6P-1 上, 然后在大肠杆菌中分别诱导重组蛋白 His-chIL-4 和 GST-chIL-4 的表达, 并纯化。将纯化后的 His-chIL-4 作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 经 4 次免疫后, 取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 (SP2/0) 融合。将纯化后的 GST-chIL-4 作为筛选抗原, 利用间接 ELISA 筛选阳性克隆。阳性细胞株经 3 次亚克隆后, 获得 3 株稳定分泌抗 chIL-4 蛋白的杂交瘤细胞株, 分别命名为 1G11-3B、2E5-3D 和 1G11-5H。经 ELISA 检测, 3 株单克隆抗体的亚型均为 IgG1, 亲和力解离常数 ( $K_d$ ) 分别为  $1.79 \times 10^{-9}$ 、 $1.61 \times 10^{-9}$  和  $2.36 \times 10^{-9}$ 。经 Western blotting 及间接免疫荧光试验鉴定, 3 株单克隆抗体均能特异性识别原核和真核表达的 chIL-4 蛋白。Western blotting 试验证明 1G11-3B、2E5-3D 和 1G11-5H 识别的抗原表位区域分别为 chIL-4 蛋白 N 端的第 1–40、80–112 和 40–80 位氨基酸。该单克隆抗体的制备为 chIL-4 的检测和生物学功能研究奠定了基础。

**关键词:** 鸡白细胞介素 4, 原核表达, 单克隆抗体

**Received:** June 6, 2016; **Accepted:** August 15, 2016

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31272543, 31430085), Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (No. NYCYTX-41).

**Corresponding authors:** Shijun Zheng. Tel/Fax: +86-10-62734861; E-mail: sjzheng@cau.edu.cn

Yongqiang Wang. Tel: +86-10-62732842; E-mail: vetwyq@cau.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31272543, 31430085), 现代农业产业技术体系建设专项资金 (No. NYCYTX-41) 资助。

网络出版时间: 2016-09-29

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160929.1048.002.html>

# Generation and characterization of monoclonal antibodies against chicken interleukin 4

Xiaoyu Guan, Zhichao Xu, Yongqiang Wang, Xiaoqi Li, Hong Cao, and Shijun Zheng

State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** To develop monoclonal antibodies (McAbs) against chicken interleukin 4 (chIL-4), we subcloned the mature *chIL-4* gene into prokaryotic expression vectors pET-28a and pGEX-6P-1, then expressed and purified the recombinant proteins. We immunized BALB/c mice with the purified His-chIL-4 protein and fused the murine splenocytes with SP2/0 after 4 times of immunization. We used the GST-chIL-4 protein as a coating antigen to establish an indirect ELISA to screen positive clones. After screening and 3 rounds of cloning process, we obtained 3 hybridomas that stably secreted McAbs against chIL-4, and named 1G11-3B, 2E5-3D, and 1G11-5H. The isotypes of these McAbs were all IgG1 and the dissociation constant ( $K_d$ ) of these McAbs were  $1.79 \times 10^{-9}$ ,  $1.61 \times 10^{-9}$ , and  $2.36 \times 10^{-9}$ , respectively. These McAbs specifically bound to chIL-4 expressed by either prokaryotic or eukaryotic system as determined by Western blotting and indirect immunofluorescence assay. The binding domains of chIL-4 recognized by 1G11-3B, 2E5-3D, and 1G11-5H were located between aa 1–40, 80–112, and 40–80, respectively, as determined by Western blotting. These McAbs would help to detect chIL-4 and to elucidate the biological roles of chIL-4 in immune responses.

**Keywords:** chicken interleukin 4, prokaryotic expression, monoclonal antibody

白细胞介素 4 (Interleukin 4, IL-4) 是 20 世纪 80 年代初发现的, 具有多种免疫学调节功能的细胞因子, 对 B 细胞、T 细胞等免疫细胞以及造血细胞等非免疫细胞均有免疫调节作用, 可通过与多种类型细胞相互作用来调节宿主的免疫应答<sup>[1]</sup>。

由于 IL-4 重要的生物学活性, 近年来关于鸡白细胞介素 4 (chIL-4) 的体外表达及生物学功能的研究变得越来越热。2004 年 Avery 等<sup>[2]</sup>在克隆鸡 T2 细胞因子基因簇时发现单拷贝的功能性 *IL-4* 基因, 发表了鸡 *Gallus gallus* (AJ621249) *IL-4* mRNA 基因序列, 其全长为 411 bp, chIL-4 前体是 137 肽, 信号肽为 25 个氨基酸, 分泌的成熟的 chIL-4 有 112 个氨基酸残基, 含 3 个分子内二硫键和 2 个可能的 N 端糖基化位点。日本学者 Kubota 等<sup>[3]</sup>从外周血和胸腺中提取 mRNA, 反转录成 cDNA 后插入

pFastBac1, 通过昆虫表达系统转入 AcNPV 杆状病毒表达, 获取的成熟的 chIL-4 蛋白分子量大约为 12.4 kDa。戴华等<sup>[4]</sup>利用 RT-PCR 从被诱导的鸡脾脏淋巴细胞中扩增出 *chIL-4* 基因的 cDNA, 并构建出原核表达载体 pGEX-6P-*chIL-4* 和 pET-*chIL-4*, 经 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 分析, 结果表明, *chIL-4* 基因在上述载体中均获得表达, 融合蛋白大小分别为 38 kDa 和 18 kDa。

目前, 已有在蛋白水平上检测人和小鼠 IL-4 的商品化试剂盒, 但是由于 chIL-4 与人和小鼠 IL-4 的同源性仅分别为 22.48% 和 21.23%, 所以在学术研究和临床疾病分析中主要还是以 RT-PCR 检测 chIL-4 的相对含量。因此, 建立针对 chIL-4 在蛋白水平上的检测方法, 将有助于评价 chIL-4 在机体内的动态变化水平, 对于了解禽类传染性疾病的发生、发展、转归情况及机体保护性免疫反应的动态规律具有重要意义。

单克隆抗体制备技术为建立蛋白质检测方法提供了有利的条件。翁凌等<sup>[5]</sup>利用抗鸡白细胞介素 2 (chIL-2) 单克隆抗体作包被抗体、生物素标记的抗 chIL-2 多克隆抗体作检测抗体建立了双抗体夹心 ELISA 测定方法, 该方法对 chIL-2 的检测灵敏度为 50 pg/mL。王肖祎<sup>[6]</sup>利用抗鸡白细胞介素 18 (chIL-18) 单克隆抗体为包被抗体、HRP 标记的抗 chIL-18 单克隆抗体为检测抗体建立的双抗体夹心 ELISA 方法, 其检测灵敏度可达 31.5 pg/mL。郑玉妹<sup>[7]</sup>利用生物素-链霉亲和素放大系统建立的双抗体夹心 ELISA 方法, 以鼠抗鸡 IFN- $\gamma$  单克隆抗体为包被抗体, 以针对不同抗原表位的生物素化单克隆抗体为检测抗体对 IFN- $\gamma$  进行定量测定, 结果显示, 在 10–1 000 pg/mL 的浓度范围内, IFN- $\gamma$  标准品浓度与吸光度值线性关系良好, 相关系数为  $r=0.9921$ 。

本研究旨在利用重组 chIL-4 蛋白制备识别不同抗原表位的抗 chIL-4 单克隆抗体, 为建立 chIL-4 双抗体夹心 ELISA 检测方法奠定基础, 为监测鸡体免疫状态和研究鸡体免疫机制提供技术平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、细胞、质粒及实验动物

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  和 BL21, 骨髓瘤细胞 SP2/0 和鸡胚成纤维细胞 DF-1, pGEX-6p-1、pET-28a 和 pRK5-flag 质粒为本实验室保存; pMD19-T-*chIL-4* 由中国农业大学索勋教授惠赠; BALB/c 小鼠购自中国医学科学院实验动物研究所。

### 1.2 主要试剂及仪器

限制性内切酶、LA *Taq* 酶和 DNA 连接酶购

自 TaKaRa 公司; dNTPs 购自 CNS 公司; DNA 胶回收试剂盒购自 ZYMO RESEARCH 公司; 高纯度质粒小量快速提取试剂盒购自北京艾德莱公司; 鼠源 His-tag、GST-tag 单克隆抗体购自 Abmart 公司; HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、马抗山羊 IgG 和 FITC 标记兔抗小鼠 IgG 购自北京鼎国公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HAT、HT、flag-tag 单克隆抗体以及 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 购自 Sigma 公司; PEG4000 购自 MERCK 公司; DMEM 高糖培养基、非必需氨基酸购自 Gibco 公司; 标准胎牛血清购自 Hyclone 公司; Vigofect 转染试剂购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司; 压力搅拌式浓缩杯购自默克化工技术(上海)有限公司; Centrifuge5810R 型低温冷冻高速离心机购自 Eppendorf 公司; Alpha Imager<sup>TM</sup> 2200 型凝胶成像分析仪购自美国 Alpha 公司; Kodak 医学 X 光显影机 102 型购自美国 Kodak 公司; Sunrise 型 96 孔酶标仪购自 TECAN 公司。

### 1.3 原核表达载体的构建及蛋白纯化

以 pMD19-T-*chIL-4* 为模板, 设计引物 F1 (5'-GGATCCTTACAGCTCTCAGTGCCG-3')、R1 (5'-CTCGAGCTTATTTTCTAGTAGTTG-3')、F2 (5'-GGATCCTTACAGCTCTCAGTGCCG-3')、R2 (5'-CTCGAGTCACTTATTTTCTAGTAG-3') 扩增不含信号肽序列的 *chIL-4* 基因, 经胶回收、双酶切、连接, 分别构建到 pET-28a 和 pGEX-6p-1 原核表达载体上, 得到质粒 pET-28a-*chIL-4* 和 pGEX-6p-1-*chIL-4*, 将其转化到 *E. coli* BL21 中, 在 37 °C、6 h、IPTG 浓度为 1 mmol/L 的条件下诱导重组蛋白的表达。通过 SDS-PAGE 分析蛋白的表达情况并用 Western blotting 进行验证后, 提取包涵体, 并按照文

献[8]所述方法进行稀释复性,获得重组蛋白。

#### 1.4 chIL-4 单克隆抗体的制备

以重组蛋白 His-chIL-4 为抗原,免疫 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠。首次免疫,抗原与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化,颈背部皮内多点注射,50  $\mu\text{g}/\text{只}$ 。3 周后进行二免,抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合乳化,颈背部皮下多点注射,50  $\mu\text{g}/\text{只}$ 。3 周后进行三免,免疫剂量与途径同二免<sup>[9]</sup>。三免 1 周后,小鼠断尾采血分离血清,以重组蛋白 GST-chIL-4 所包被的酶标反应板用间接 ELISA 的方法测定血清抗体效价,当效价大于 1 10 000 时,小鼠达到融合以制备单克隆抗体的标准。在细胞融合前 3 d,进行加强免疫,小鼠腹腔注射抗原,50  $\mu\text{g}/\text{只}$ 。

细胞融合,阳性杂交瘤细胞的筛选参照文献[10]。筛选时用重组蛋白 GST-chIL-4 包被的酶标反应板进行间接 ELISA,初次筛选后,间隔 2 d 进行第 2 次筛选。选取 2 次筛选阳性值较高的孔按照有限稀释法进行亚克隆,连续亚克隆 3 次,选择能稳定分泌单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞作为建株细胞。

腹水的制备和纯化采用常规方法<sup>[11]</sup>,挑选经产 BALB/c 小鼠,腹腔注射灭菌液体石蜡 1 mL/只,7 d 后腹腔注射杂交瘤细胞  $2.0 \times 10^6$  个/只,收集的腹水经离心后收集上清。按照正辛酸饱和和硫酸铵沉淀法进行纯化,透析除盐,分装保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.5 chIL-4 单克隆抗体的鉴定

#### 1.5.1 单克隆抗体亚型的鉴定

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

#### 1.5.2 单克隆抗体亲和力的鉴定

利用间接 ELISA 方法测定单克隆抗体的亲和力,以 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  重组蛋白 GST-chIL-4 包被酶标反应板,封闭后加入倍比稀释的单克隆抗体,以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗,酶标仪读取  $OD_{450}$  吸光值。当连续几个稀释度的  $OD_{450}$  读数不再增大时视为抗原抗体 100% 结合,以抗体浓度 (mol/L) 为横坐标, $OD_{450}$  吸光值为纵坐标做散点图,生成对数趋势线和公式。将  $OD_{450}$  最大值的一半带入公式,求出此时的抗体浓度即为单克隆抗体的亲和力解离常数 ( $K_d$ )<sup>[12]</sup>。

#### 1.5.3 单克隆抗体特异性的鉴定

以原核表达的重组蛋白 His-chIL-4、His-chIL-2、His-chIL-10 和 His-chIFN- $\gamma$  为抗原,分别以 His-tag 单克隆抗体和 3 株 chIL-4 单克隆抗体 1G11-3B、2E5-3D 和 1G11-5H 为一抗,以 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 为二抗进行 Western blotting,检测单克隆抗体的特异性。

#### 1.5.4 间接免疫荧光鉴定单克隆抗体

将 DF-1 细胞接种于 48 孔板,  $4 \times 10^4$  个细胞/孔,待细胞密度达到 60% 左右时,按照 Vigofect 的转染方法转染 pRK5-flag-chIL-4 和 pRK5-flag 质粒,并设置相应对照组。转染 24 h 后依次用 4% 多聚甲醛固定,0.2% Triton X-100 透化,1% BSA 封闭,然后以制备的单克隆抗体作为一抗,以 FITC 标记的兔抗小鼠 IgG 抗体为二抗,进行间接免疫荧光试验,以鉴定单克隆抗体能否识别真核表达的 chIL-4。

#### 1.5.5 单克隆抗体抗原识别区的确定

成熟 chIL-4 含有 112 个氨基酸 (aa) 残基,分别以 N 端第 80 位和第 40 位氨基酸为截点,构建 chIL-4 的截短表达载体  $\Delta 1$  (His-chIL-4 1–80 aa) 和  $\Delta 2$  (His-chIL-4 40–112 aa)。在 *E. coli*

BL21 中分别诱导截短蛋白表达后,以此为抗原,以单克隆抗体为一抗,通过 Western blotting 分析 3 株单克隆抗体的抗原识别区。

## 2 结果与分析

### 2.1 原核表达载体的构建及蛋白纯化

所构建的载体经菌液 PCR 鉴定,所得结果与预期一致(图 1A 和 1B)。构建成功的载体在

*E. coli* BL21 中诱导表达后,经 SDS-PAGE 分析及 Western blotting 鉴定,确定重组蛋白 His-chIL-4 和 GST-chIL-4 均以包涵体的形式表达(图 1C 和 1D),通过稀释复性的方法对重组蛋白进行纯化,获得较好的纯化效果(图 1E 和 1F)。

### 2.2 chIL-4 单克隆抗体的制备

小鼠经 3 次免疫后,血清中 chIL-4 抗体效价达到  $1:64\,000$ 。细胞融合后利用间接 ELISA

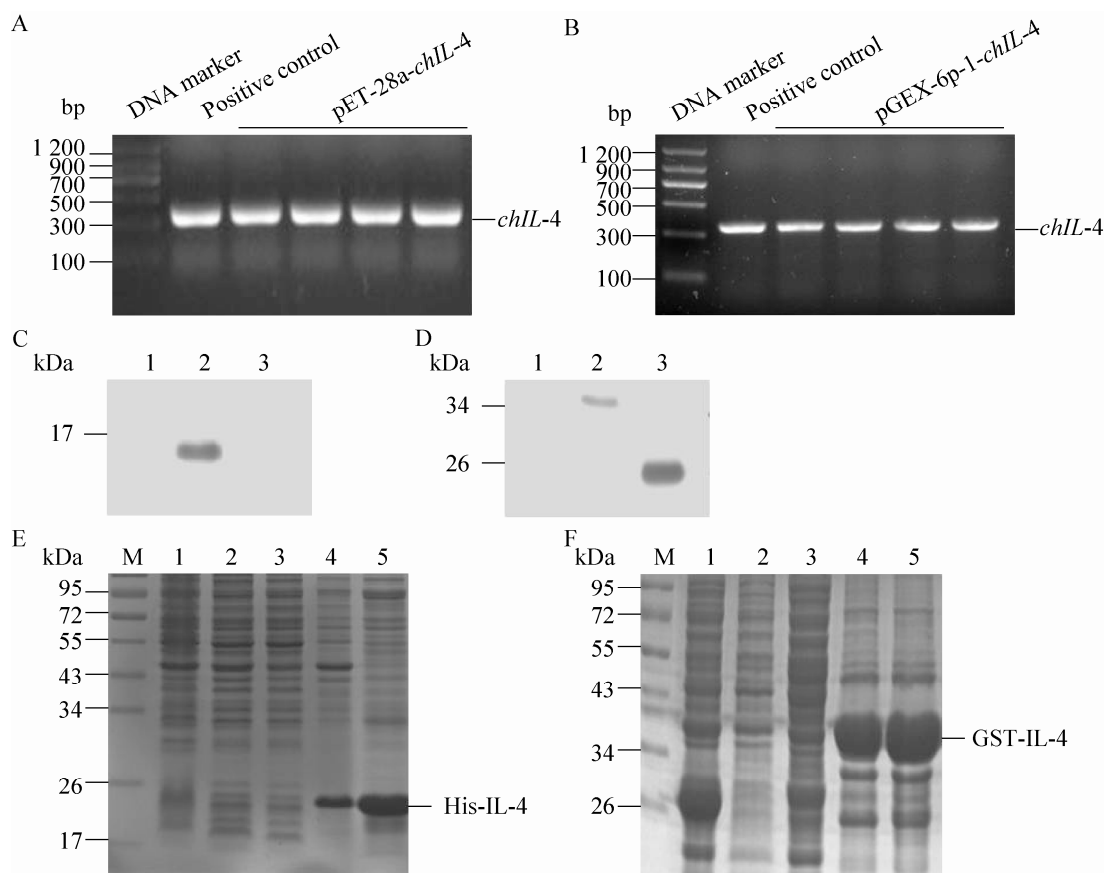


图 1 原核表达载体的构建及蛋白纯化

Fig. 1 Construction of prokaryotic expression vectors and purification of the recombinant proteins. (A) Identification of pET-28a-chIL-4 by PCR. (B) Identification of pGEX-6p-1-chIL-4 by PCR. (C) Western blotting analysis of His-chIL-4 protein. 1: uninduced His-chIL-4; 2: induced His-chIL-4; 3: induced pET-28a. (D) Western blotting analysis of GST-chIL-4 protein. 1: uninduced GST-chIL-4; 2: induced GST-chIL-4; 3: induced pGEX-6p-1. (E) Purification of His-chIL-4 protein. M: protein marker; 1: induced pET-28a; 2: uninduced His-chIL-4; 3: supernatant of induced His-chIL-4; 4: precipitate of induced His-chIL-4; 5: purified His-chIL-4. (F) Purification of GST-chIL-4 protein. M: protein marker; 1: induced pGEX-6p-1; 2: uninduced GST-chIL-4; 3: supernatant of induced GST-chIL-4; 4: precipitate of induced GST-chIL-4; 5: purified GST-chIL-4.

方法进行筛选，将筛选到的阳性杂交瘤细胞株经过 3 次亚克隆后，得到 3 株可稳定分泌抗 chIL-4 蛋白的杂交瘤细胞株，分别命名为 1G11-3B、2E5-3D 和 1G11-5H。将杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔，收获腹水后利用正辛酸饱和硫酸铵法纯化，获得纯度较高的单克隆抗体（图 2）。

2.3 chIL-4 单克隆抗体的鉴定

2.3.1 单克隆抗体亚型的鉴定

根据 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 试剂盒的检测方法，确定 3 株单克隆抗体的亚型均为 IgG1。

2.3.2 单克隆抗体亲和力的鉴定

利用间接 ELISA 方法测定单克隆抗体的亲和力，结果表明 1G11-3B、2E5-3D 和 1G11-5H 的亲和力解离常数 ( $K_d$ ) 分别为  $1.79\times10^{-9}$ 、

$1.61\times10^{-9}$  和  $2.36\times10^{-9}$  (图 3)。

2.3.3 单克隆抗体特异性的鉴定

利用 Western blotting 鉴定单克隆抗体对原核表达的细胞因子的识别情况，结果表明 3 株单克

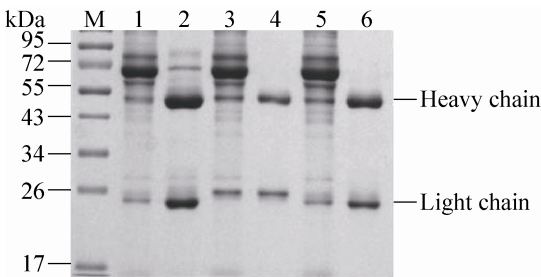


图 2 单克隆抗体的纯化  
Fig. 2 Purification of anti-chIL-4 McAbs. M: protein marker; lanes 1, 3, and 5: 1G11-3B, 2E5-3D, and 1G11-5H before purification, respectively; lanes 2, 4, and 6: 1G11-3B, 2E5-3D, and 1G11-5H after purification, respectively.

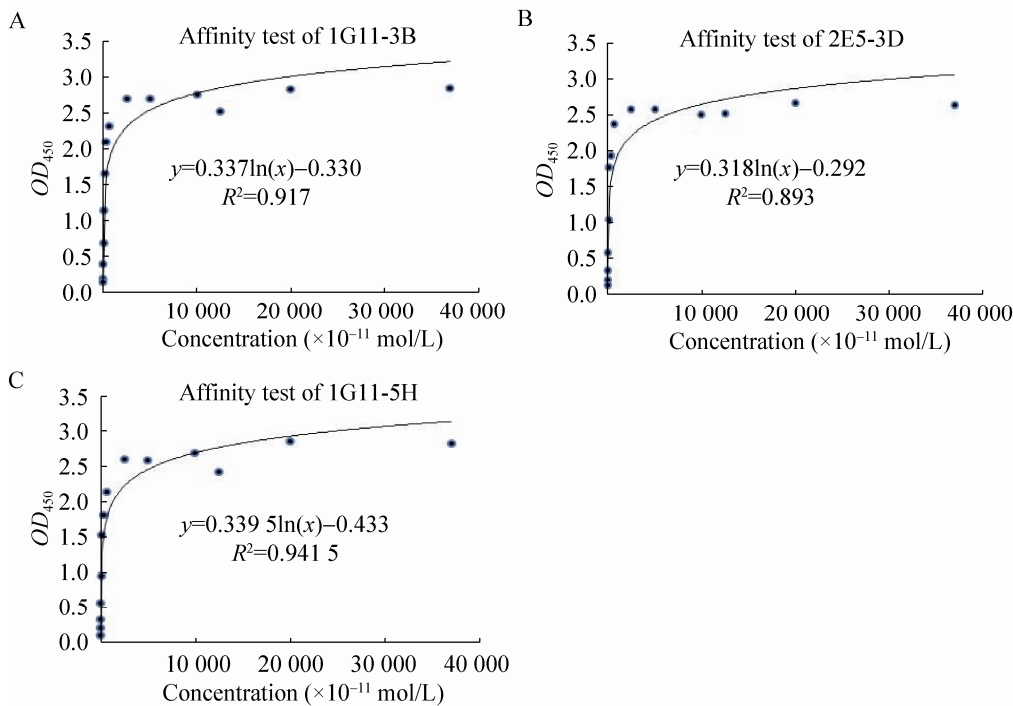


图 3 单克隆抗体亲和力测定  
Fig. 3 Affinity test of anti-chIL-4 McAbs. (A–C) Affinity test of 1G11-3B, 2E5-3D, and 1G11-5H, respectively.

隆抗体均能识别 His-chIL-4，而不识别带有 His 标签的其他细胞因子，表现出良好的特异性 (图 4)。

### 2.3.4 间接免疫荧光鉴定单克隆抗体

利用间接免疫荧光试验鉴定单克隆抗体对真核细胞表达的 chIL-4 的识别情况,结果表明,3 株单克隆抗体均能识别真核细胞表达的 chIL-4。图 5 是其中 1 株的鉴定结果,另外 2 株

鉴定结果与此相同。

### 2.3.5 单克隆抗体抗原识别区的确定

以 chIL-4 截短蛋白为抗原,单克隆抗体为一抗,利用 Western blotting 确定单克隆抗体的抗原识别区。结果表明,1G11-3B、2E5-3D 和 1G11-5H 的抗原识别区分别为 chIL-4 蛋白 N 端的第 1-40 aa、80-112 aa 和 40-80 aa (图 6)。

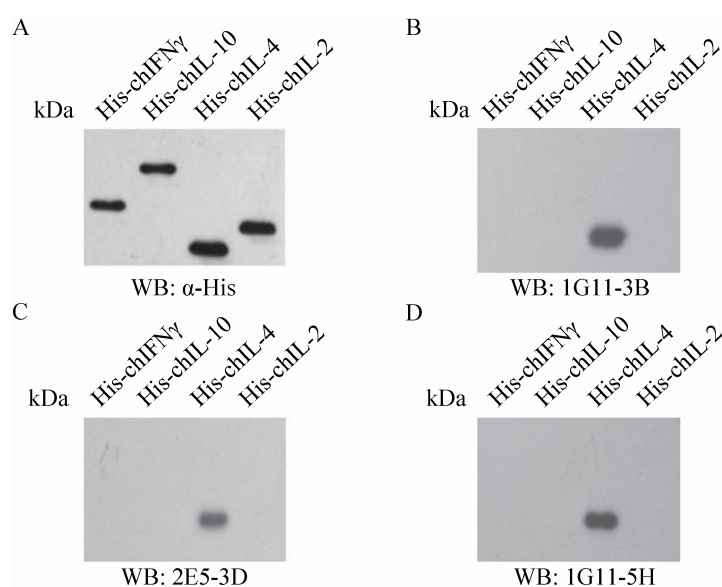


图 4 单克隆抗体特异性鉴定

Fig. 4 Identification of specificity of anti-chIL-4 McAbs by Western blotting.

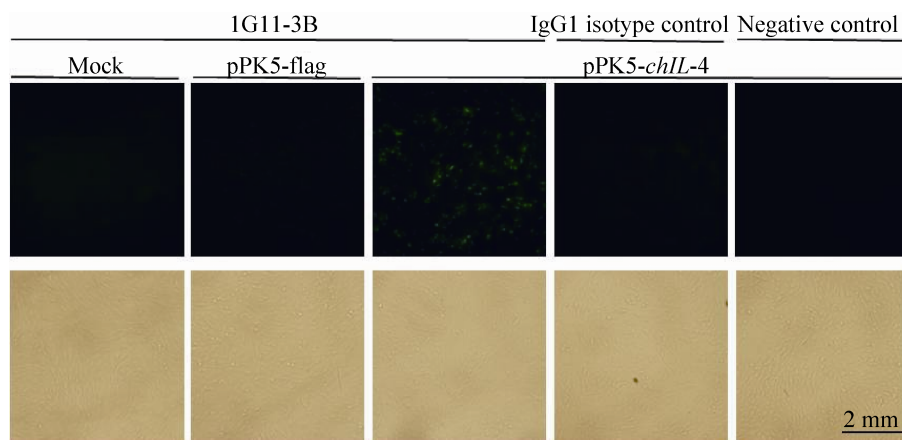


图 5 间接免疫荧光鉴定单克隆抗体

Fig. 5 Identification of anti-chIL-4 McAbs by indirect immunofluorescence assay. The scale bar represents 2 mm.

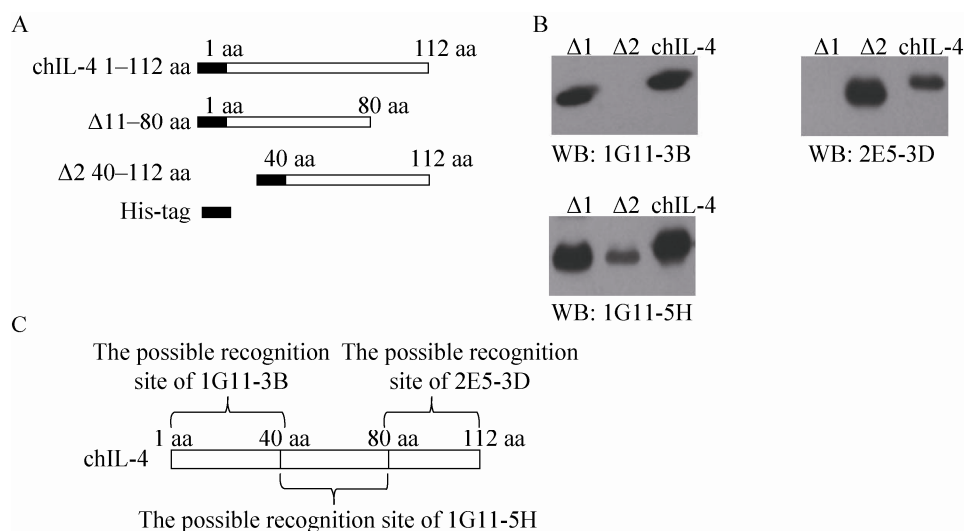


图 6 单克隆抗体抗原识别区分析

Fig. 6 Mapping of the recognition regions of anti-chIL-4 McAbs. (A) Schematic of the genes encoding the full-length or truncated chIL-4 proteins. (B) Recognition regions analysis of anti-chIL-4 McAbs by Western blotting. (C) Schematic of the possible recognition regions of anti-chIL-4 McAbs.

### 3 讨论

IL-4 是 Th2 细胞产生的特征性细胞因子，主要由 CD4<sup>+</sup> T 细胞分泌<sup>[13]</sup>。IL-4 在免疫反应中具有重要的调控作用，不仅对 B 细胞、T 细胞、单核细胞和树突状细胞等免疫细胞有免疫调节效应，还对内皮细胞和成纤维细胞等非免疫细胞也发挥着不同的作用<sup>[14-15]</sup>。

IL-4 作为 B 细胞的生长因子，能增强 B 细胞增殖活性，上调细胞表面分子，包括 MHC II 类分子<sup>[16]</sup>、低亲和力 IgE 受体 CD23<sup>[17]</sup>和 IL-4R<sup>[18]</sup>。IL-4 作为 T 细胞的生长因子，能诱导细胞增殖和抗凋亡<sup>[19]</sup>。天然 T 细胞在抗原刺激后分化为 Th2 细胞的过程中需要 IL-4，而这些 Th2 细胞又能分泌大量的 IL-4 和其他细胞因子，如 IL-5 和 IL-13，由此激活正反馈回路，阻断分泌 IFN- $\gamma$  的 Th1 细胞的发育，由此稳定 Th2 占主导地位的免疫反应<sup>[20]</sup>。在一些感染性疾病模

型中，IL-4 对感染后免疫系统是 Th1 型还是 Th2 型免疫反应起着决定性作用。IL-4 这一重要性已经在中和抗 IL-4 抗体<sup>[20]</sup>、sIL-4R<sup>[21]</sup>或者 IL-4 基因缺失小鼠<sup>[22]</sup>等许多小鼠模型中得到证实。此外，IL-4 通过上调单核细胞 MHC II 类分子的表达增强巨噬细胞的抗原递呈作用，同时下调促炎性细胞因子的产生<sup>[23]</sup>。IL-4 还参与炎症反应，影响血管粘附分子 1 (VCAM-1)<sup>[24]</sup>或内皮型选择素<sup>[25]</sup>等内皮粘附分子的表达，促进趋化因子的产生，因而有利于嗜酸性粒细胞向感染部位的移行。

目前已有大量文献研究了人、小鼠、大鼠和猪等哺乳动物的 IL-4 基因及其生物学活性，但关于家禽 Th2 类细胞因子了解的较少<sup>[26-30]</sup>。本研究按照常规方法将 chIL-4 基因构建在 2 个不同的原核表达载体上，进而在大肠杆菌中表达带有不同标签的重组蛋白，将它们分别作为免疫蛋白和筛选蛋白。考虑到 chIL-4 全长基因



编码的蛋白包括 25 个氨基酸大小的信号肽和 112 个氨基酸大小的成熟 chIL-4,所以在设计引物时只将编码成熟 chIL-4 的碱基序列克隆到原核表达载体上。在小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合之后,利用间接 ELISA 对阳性细胞株进行筛选,然后利用有限稀释法进行 3 次亚克隆,最终获得 3 株能够稳定分泌抗 chIL-4 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。经过鉴定确定这 3 株单克隆抗体均有良好的特异性和亲和力。由于制备该单克隆抗体的最终目的是建立双抗体夹心 ELISA,因此要求所得到的单克隆抗体至少要有两个不同的抗原识别区。在本研究中,为了初步确定单克隆抗体的抗原识别区,构建了 chIL-4 的截短蛋白,然后利用 Western blotting 确定了 3 株单克隆抗体分别识别 chIL-4 不同的抗原表位。另外,免疫小鼠所用是原核细胞表达的重组蛋白,而原核细胞表达的蛋白与真核细胞表达的蛋白是有差异的,因此,本研究利用间接免疫荧光试验验证了所制备的单克隆抗体同样能够识别真核表达的 chIL-4。综上所述,本研究所获得的 3 株抗 chIL-4 单克隆抗体为制备 chIL-4 的双抗体夹心 ELISA 检测试剂盒提供了材料,也为深入研究 chIL-4 的生物学作用奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Chen JH. Development of monoclonal antibodies against chicken IL-4 and an antibody sandwich ELISA for the detection of chicken IL-4 [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2009 (in Chinese).  
陈俊华. 抗鸡 IL-4 单克隆抗体的研制及其双抗体夹心 ELISA 方法的初步建立 [D]. 扬州: 扬州大学, 2009.
- [2] Avery S, Rothwell L, Degen WD, et al. Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: the cluster contains functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokine-like transcript, KK34. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, 24(10): 600–610.
- [3] Kubota T, Yokayama M, Kishima M, et al. Gene expression of chicken interleukine-4 by baculovirus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 128(1/3): 309.
- [4] Dai H, Zheng JY, Chen JH, et al. Cloning and expression of chicken interleukin-4 gene. *Chin J Prev Veter Med*, 2008, 30(6): 473–477 (in Chinese).  
戴华, 郑佳玉, 陈俊华, 等. 鸡白细胞介素 4 基因的克隆及其原核表达. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(6): 473–477.
- [5] Weng L, Zhang LJ, Zhang QB, et al. Development of a sensitive sandwich ELISA to chicken interleukin-2(ChIL-2). *J Xiamen Univ: Nat Sci*, 2006, 45(S1): 142–145 (in Chinese).  
翁凌, 张凌晶, 张其标, 等. 抗体夹心酶联免疫吸附法测定鸡白细胞介素-2. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2006, 45(S1): 142–145.
- [6] Wang XY. Development and preliminary application of double sandwich ELISA for detecting chicken interleukin-18 [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2013 (in Chinese).  
王肖祎. 鸡白细胞介素 18 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及初步应用 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- [7] Zheng YS. Effects of immunosuppressive virus infection on interferon-gamma production in the splenic leukocytes of SPF chickens [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2006 (in Chinese).  
郑玉姝. 免疫抑制性病毒感染对 SPF 鸡脾细胞 IFN- $\gamma$  产生的影响 [D]. 泰安: 山东农业大学,

- 2006.
- [8] Sun BB. Identification and crystal structure of MDV CTL epitope presenting by chicken B15 and study of its immune protection [D]. Beijing: China Agricultural University, 2013 (in Chinese).  
孙贝贝. 鸡 B15 MDV CTL 表位的鉴定与晶体结构解析及其免疫保护效果研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [9] Luo Z, Liu RC, Zheng SJ. Prokaryotic expression of *Listeria monocytogene* (LM) *hly* and development of monoclonal antibodies against listeriolysin O (LLO). *Chin J Biotech*, 2009, 25(11): 1652–1657 (in Chinese).  
罗正, 刘若尘, 郑世军. 单核增生性李氏杆菌溶血素的原核表达及其单克隆抗体的制备. *生物工程学报*, 2009, 25(11): 1652–1657.
- [10] Yokoyama WM. *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley & Sonc, Inc, 1995.
- [11] Li SJ. Development and application of monoclonal antibodies against the IBDV VP2 and VP5 proteins [D]. Beijing: China Agricultural University, 2013 (in Chinese).  
李善吉. 传染性法氏囊病毒 VP2 和 VP5 单克隆抗体的制备鉴定及应用 [D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [12] Liddell JE, Cryer A. *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*. New York: John Wiley & Sonc, Inc, 1991: 110–115.
- [13] Seder RA, Paul WE, Davis MM, et al. The presence of interleukin 4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4<sup>+</sup> T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*, 1992, 176(4): 1091–1098.
- [14] Yokota T, Arai N, de Vries J, et al. Molecular biology of interleukin-4 and interleukin-5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells and hemopoietic cells. *Immunol Rev*, 1988, 102: 137–187.
- [15] Estes DM, Hirano A, Heussler VT, et al. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin-4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation *in vitro*. *Cell Immunol*, 1995, 163(2): 268–279.
- [16] Noelle R, Krammer PH, Ohara J, et al. Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(19): 6149–6153.
- [17] Defrance T, Aubry JP, Rousset F, et al. Human recombinant interleukin-4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med*, 1987, 165(6): 1459–1467.
- [18] Ohara J, Paul WE. Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85(21): 8221–8225.
- [19] Hu-Li J, Shevach EM, Mizuguchi J, et al. B cell stimulatory factor 1 (interleukin-4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. *J Exp Med*, 1987, 165(1): 157–172.
- [20] Romani L, Mencacci A, Grohmann U, et al. Neutralizing antibody to interleukin-4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *J Exp Med*, 1992, 176(1): 19–25.
- [21] Puccetti P, Mencacci A, Cenci E, et al. Cure of murine candidiasis by recombinant soluble interleukin-4 receptor. *J Infect Dis*, 1994, 169(6): 1325–1331.
- [22] Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, et al. Disruption of the murine *IL-4* gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*, 1993, 362(6417): 245–248.
- [23] Bogdan C, Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 685: 713–739.
- [24] Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL, et al. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol*,

- 1991, 146(2): 592–598.
- [25] Bennett BL, Cruz R, Lacson RG, et al. Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor  $\alpha$ -stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem*, 1997, 272(15): 10212–10219.
- [26] Wondimu A, Veit M, Kohn B, et al. Molecular cloning, expression and characterization of the *Canis familiaris* interleukin-4. *Cytokine*, 2001, 16(3): 88–92.
- [27] Nuntaprasert A, Mori Y, Fujita K, et al. Expression and purification of recombinant swine interleukin-4. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2005, 28(1): 17–35.
- [28] Chen GH, Jing ZZ, Sun SD. Cloning and expression of porcine *IL-4* gene. *Chin J Prev Veter Med*, 2005, 27(6): 469–473 (in Chinese).  
陈国华, 景志忠, 孙世铎. 猪白细胞介素-4 基因的克隆与表达. *中国预防兽医学报*, 2005, 27(6): 469–473.
- [29] Cottrez F, Auriault C, Capron A, et al. Murine interleukin-4 production with baculovirus: an easy and rapid method for a small scale production of functional interleukins. *Eur Cytokine Netw*, 1994, 5(5): 481–487.
- [30] Jayaram B, Devos R, Guisez Y, et al. Purification of human interleukin-4 produced in *Escherichia coli*. *Gene*, 1989, 79(2): 345–354.

(本文责编 陈宏宇)