

文章编号:1000-0615(2009)05-0840-07

中华鳖虹彩病毒单克隆抗体的制备及其抗原表位的初步分析

朱春华^{1,2}, 刘 荭³, 刘晓东¹, 杨金先¹, 郑在予¹, 林天龙¹

(1. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003;

2. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;

3. 深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518001)

摘要:以纯化的中华鳖虹彩病毒为抗原免疫 Balb/C 小鼠, 取免疫鼠脾细胞经杂交融合获得了 8 个能稳定分泌抗中华鳖虹彩病毒特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株。单克隆抗体亚级份分析结果表明, Mab2A4 属 IgA, Mab8E1 是 IgG2a, 其他的 6 株单抗 Mab1D3、Mab2H1、Mab3A1、Mab4B5、Mab5E1 和 Mab6F2 均为 IgG1。酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 分析表明, 8 株单抗均能特异性地识别中华鳖虹彩病毒, 与 EPC、CO、FHM 等宿主细胞不产生交叉反应, 腹水抗体的 ELISA 效价在 $10^5 \sim 10^6$ 。IFA 分析表明, 8 株单抗中仅 Mab5E1 没有免疫荧光反应特性, 其余 7 株单抗均能对染毒病灶产生特异性的荧光染色。中和试验结果证实 8 株单抗均没有中和病毒的特性。应用 Western-blotting 进行中华鳖虹彩病毒的抗原表位初步分析, 结果显示: Mab1D3 和 Mab2A4 分别识别分子量为 84 ku 和 35 ku 中华鳖虹彩病毒结构蛋白, Mab3A1 能够同时识别分子量分别为 14 ku 和 16 ku 的两条多肽, 说明这 3 株单抗结合位点是非构象依赖性抗原决定簇, 其余单抗不具备 Western-blotting 反应特性。这些结果提示上述单抗对中华鳖虹彩病毒抗原特异、灵敏, 可用于中华鳖虹彩病毒的检测和结构蛋白分析。

关键词:中华鳖; 虹彩病毒; 单克隆抗体; 抗原

中图分类号:S 917; S 947.1⁺1

文献标识码:A

虹彩病毒是一种具有正二十面体衣壳结构细胞质型的双链 DNA 病毒, 病毒粒子直径 125 ~ 300 nm^[1]。中华鳖虹彩病毒是虹彩病毒科 (Iridoviridae) 蛙病毒属 (Ranavirus) 的一个成员^[2-3], 是危害中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 的重要病原之一。根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 的第八次报告^[4], 虹彩病毒科下分 5 个病毒属, 即虹彩病毒属、绿虹彩病毒属、淋巴囊肿病毒属、肿大细胞病毒属和蛙病毒属。其中蛙病毒属的病毒宿主范围广泛, 主要感染鱼类、两栖类和爬行类等低等脊椎动物^[5], 给水产养殖业造成巨大的经济损失, 严重制约了养殖业的发展。建立蛙病毒属病毒的早期诊断和监测方法是防控水产动物虹彩病毒病的关键环节, 具有重要应用价值。

单克隆抗体是由同源的细胞克隆产生分泌

的, 具有相同的结构和亲和力, 性质均一, 它能特异地识别单个抗原决定簇, 具有良好的特异性。在水产动物疾病研究方面, 该技术已被广泛地用于病原诊断^[6-7], 也被用于鱼类病毒的结构蛋白分析与定位^[8-9]。为了深入探讨中华鳖虹彩病毒的病原学问题, 建立中华鳖病毒快速、灵敏、特异的检测技术, 本研究应用纯化的中华鳖虹彩病毒作为抗原, 制备了抗中华鳖虹彩病毒单克隆抗体并对其免疫生物学特性进行了研究, 获得了较为理想的结果。

1 材料与方法

1.1 实验动物、病毒和细胞

SPF 级、6 ~ 8 周龄的 Balb/C 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。小鼠骨髓瘤细胞

收稿日期: 2008-11-09 修回日期: 2009-03-17

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA100306); “十一五”国家科技支撑计划重点项目 (2006BAK10B06); 国家质量监督检验检疫总局科研项目 (2007IK022); 福建省科技计划项目 (2009N2003)

通讯作者: 林天龙, Tel: 0591-87817514, E-mail: lint05@163.com

(SP2/O)由本实验室保存。鲤表皮瘤细胞系(epithelioma papulosum cyprini cell line, EPC)、草鱼卵巢细胞系(grass carp ovary cell line, CO)、胖头鲮肌肉细胞系(fathead minnow, FHM)等细胞系和中华鳖虹彩病毒(soft-shelled turtle iridovirus, STIV)由深圳出入境检验检疫局保存。

1.2 Balb/C 鼠免疫

免疫分3次进行。首次免疫取蔗糖密度梯度离心纯化的中华鳖虹彩病毒(STIV)与等体积弗氏完全佐剂充分乳化后,由腹腔注射6周龄 Balb/C 鼠,每只 10 μg 病毒。第2次免疫注射 50 μg STIV 与等体积弗氏不完全佐剂乳化后的抗原,第3次免疫注射 50 μg STIV,免疫间隔期均为 21 d。第3次免疫后第4天摘眼球采血,制备血清,以间接酶联免疫吸附剂测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法测定脾脏供体鼠血清抗体效价,取其脾细胞用于杂交融合。

1.3 细胞杂交融合

融合按常规方法进行^[10]。脾细胞与 SP2/O 骨髓瘤细胞按 3:1 的比例混合。

1.4 杂交瘤细胞的筛选及腹水抗体制备

以间接 ELISA 方法筛选抗体阳性细胞。将纯化的病毒抗原用 PBS 稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 包被酶标板,每孔 50 μL ,一抗为杂交瘤细胞培养上清液,二抗为羊抗鼠 HRP 酶标抗体(1:5 000 稀释),以 $P:N \geq 2.1$ 且 $OD > 0.2$ 时,判断为杂交瘤细胞分泌抗体阳性。对照抗原为经差速离心提取的 EPC 细胞成分,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$;阳性抗体对照为免疫鼠血清、阴性对照为正常小鼠血清。抗体阳性细胞经有限稀释法3次亚克隆后扩大培养,按每只 5×10^6 个细胞,经腹腔接种诱导 Balb/C 小鼠,10~14 d 后收集腹水,10 000 r/min 离心 5 min 取上清,冻存于 -70°C 。

1.5 单克隆抗体亚级份的测定

按照鼠源单抗分型试剂盒(mouse monoclonal antibody isotyping reagents, Sigma 077k4825)介绍的方法进行。

1.6 单克隆抗体的中和能力测定

采用固定病毒稀释抗体的方法测定各株单抗对 STIV 的中和能力。用含 5% 小牛血清的 M199 培养液将 STIV 稀释成终浓度 200 TCID₅₀/50 μL ,各种单抗腹水从 1×10^{-2} 开始 10 倍稀释至 1×10^{-6} ,取各稀释度的腹水抗体 50 μL 与等体积病

毒液混合,27 $^\circ\text{C}$ 感作 2 h,然后接种到新鲜制备的单层 EPC 细胞上,每个抗体稀释度加 5 孔,每孔 100 μL ,置 27 $^\circ\text{C}$ 生化培养箱中培养。设正常细胞对照、阳性和阴性血清对照、单抗毒性对照和病毒对照。接种 24 h 后在显微镜下观察细胞病变(CPE),连续观察 7 d,按 Reed-Muench 法计算单抗中和效价。

1.7 腹水抗体效价的测定

以间接 ELISA 测定腹水抗体效价,抗原为纯化的中华鳖虹彩病毒,病毒蛋白包被量为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔 50 μL ,EPC 细胞经相同处理后作空白对照,一抗为 8 株杂交瘤细胞株腹水抗体(起始稀释度为 1:1 000,开始 10 倍比稀释至 1:10¹²),每孔 50 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 反应 60 min,对照抗原和随后操作步骤同杂交瘤细胞的筛选及腹水抗体制备。

1.8 间接免疫荧光试验

在 96 孔板中培养单层的 EPC 细胞、CO 细胞、FHM 细胞,STIV 接种 24 h 后,以 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次,用预冷的丙酮:甲醇(1:1),4 $^\circ\text{C}$,固定 20 min,每次 5 min;加入一抗(杂交瘤细胞上清)37 $^\circ\text{C}$ 孵育 60 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;然后加羊抗鼠 IgG-FITC 标记抗体(1:200,稀释液为含 2% BSA 的 PBS),37 $^\circ\text{C}$ 作用 60 min,PBS 洗 3 次;以 50% 甘油-PBS 封片镜检,荧光倒置显微镜(Nikon, TE2000)观察结果。阴性抗原对照为正常 EPC 细胞,阴性抗体对照为免疫前鼠血清,阳性抗体对照为免疫鼠血清。

1.9 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析

采用 Mini-Protein cell 系统(Bio-Rad)按蛋白质技术手册^[11]方法进行 SDS-PAGE 和 Western-blotting。分离胶的浓度为 12%,堆积胶的浓度为 4%,病毒样品上样量为每孔 8 μg 。Western-blotting 采用 1 孔梳,病毒样品上样量为每孔 120 μg ,一抗为免疫鼠血清(1:2 000)或腹水(1:1 000),二抗为 AP 酶标记羊抗鼠 IgG(1:20 000),Quantity One 软件(version 4.6.2)进行条带分析。

2 结果与分析

2.1 免疫鼠血清效价

以间接 ELISA 法测定脾脏供体鼠血清效价,当包被的 STIV 抗原浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,免疫鼠血清抗体效价为 1:128 000。

2.2 细胞的融合、筛选及检测

本次试验共融合了 10 块 96 孔细胞板,融合率达 90% 以上,经过初筛、复筛及 3 次有限稀释克隆后最终获得 8 株能稳定分泌抗 STIV 的杂交瘤细胞株,分别命名为 Mab1D3、Mab2A4、Mab2H1、Mab3A1、Mab4B5、Mab5E1、Mab6F2、Mab8E1。这 8 株杂交瘤细胞在体外连续培养 2 个月能稳定分泌抗体,经液氮冻存、复苏后,细胞生长良好,且上清抗体效价稳定。取杂交瘤细胞培养上清与纯化的病毒抗原进行 ELISA 反应,结果显示 8 株杂交瘤细胞上清均能特异地识别

STIV 的抗原,与宿主细胞 EPC、CO、FHM 不产生交叉反应。增加宿主细胞蛋白包被量到病毒抗原的 20 倍量也不产生反应,说明制备的单抗特异性好(表 1)。

2.3 单克隆抗体的免疫生物学特性分析

单抗的免疫球蛋白亚类详见表 2。Mab2A4 的亚级份是 IgA 型, Mab8E1 的亚级份是 IgG2a 型,其余的单抗的亚级份都是 IgG1 型。由于 IgG 与抗原的亲和能力比 IgM 高,因此这些单抗可广泛地用于血清学的检测。中和试验证实 8 株单抗均没有中和病毒的特性。

表 1 单克隆抗体的特异性检测
Tab.1 Detection the specificity of mabs against STIV

单抗 mabs	1D3	2A4	2H1	3A1	4B5	5E1	6F2	8E1
STIV	+	+	+	+	+	+	+	+
EPC	-	-	-	-	-	-	-	-
CO	-	-	-	-	-	-	-	-
FHM	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2 单抗的特性分析
Tab.2 Characterization of mabs to STIV

单抗 mabs	Ig 亚类 Isotype	腹水效价 ascites titer	中和活力 neutralization activity	免疫荧光 immunofluorescence activity	免疫印迹 western-blotting
1D3	IgG1	10 ⁵	-	+	+
2A4	IgA	10 ⁵	-	+	+
2H1	IgG1	10 ⁵	-	+	-
3A1	IgG1	10 ⁶	-	+	+
4B5	IgG1	10 ⁶	-	+	-
5E1	IgG1	10 ⁵	-	-	-
6F2	IgG1	10 ⁶	-	+	-
8E1	IgG2a	10 ⁵	-	+	-

2.4 腹水 ELISA 效价测定

对两只不同 Balb/C 鼠制备的同株单抗的腹水分别进行效价测定,由间接 ELISA 的结果可知,不同的 Balb/C 鼠制备的腹水 ELISA 的 OD₄₉₀ 值比较接近,差异不显著。8 株杂交瘤细胞株的腹水效价在 10⁵ ~ 10⁶ (表 2)。

2.5 免疫荧光试验结果

免疫荧光的结果如图 1 所示。8 株单抗中仅 Mab5E1 没有荧光反应特性,其余的 7 株单抗均能对染毒病灶产生特异性的荧光染色,在尚未感染的区域呈现阴性反应,且所有的单抗上清与正常 EPC、CO、FHM 细胞都没有反应,表明 STIV 单

抗具备良好的特异性。免疫鼠血清抗体在胞质和病毒装配区域都能观察到绿色的荧光信号,而且是整个视野呈现均匀的荧光深色,特异性比较差。

2.6 SDS-PAGE 和 Western-blotting 结果

SDS-PAGE 分析蔗糖密度梯度离心纯化后的病毒,至少能看到 20 条以上的多肽(图 2)。由图可知,约 50 ku 的位置有一条丰度很高的类似主要衣壳(MCP)的蛋白带,该结果与文献报道相一致,Zhao 等^[3]研究发现中华鳖虹彩病毒的 MCP 分子量是 50 ku,同时虹彩病毒的 MCP 占整个病毒粒子多肽的 40% ~ 45%^[12]。

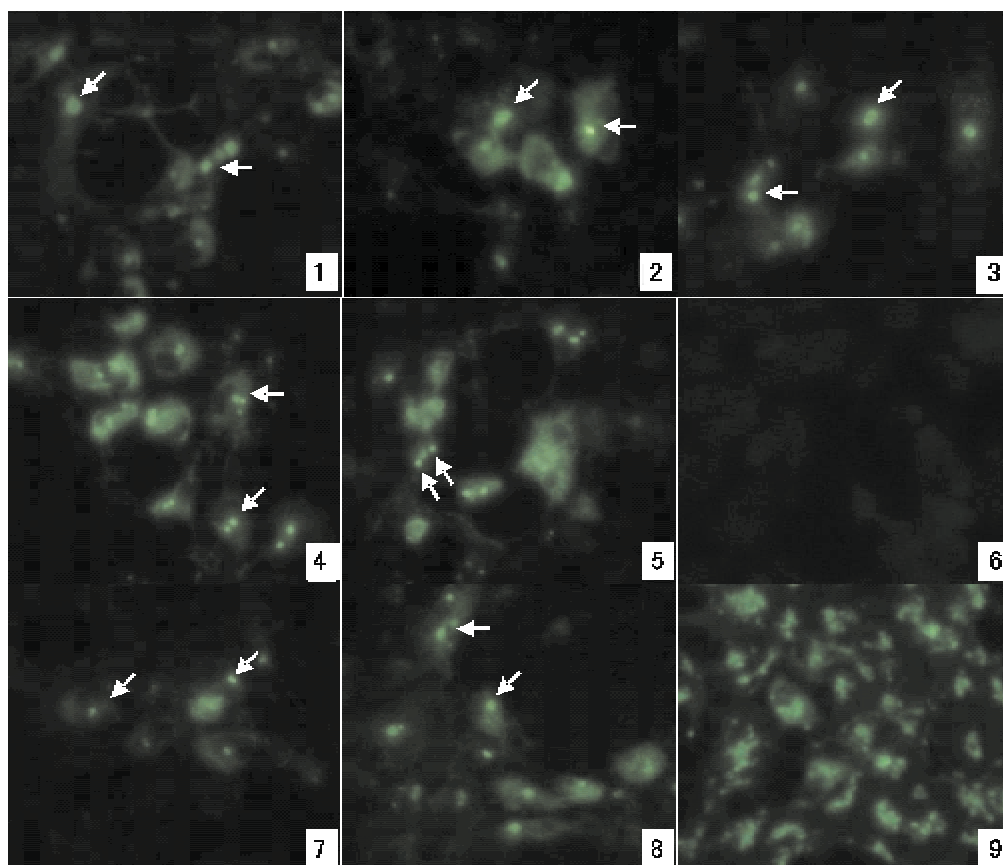


图1 免疫荧光检测 STIV 蛋白

EPC 细胞接毒后在 28 ℃ 培养 24 h。染毒的细胞分别与单抗 1D3(1), 2A4(2), 2H1(3), 3A1(4), 4B5(5), 5E1(6), 6F2(7), 8E1(8) 反应; 9, 免疫鼠血清。白色箭头代表病毒装配区

Fig.1 Detection of intracellular STIV proteins by indirect immunofluorescence

EPC cells were infected with virus and incubated for 24 h at 28 ℃. (A-H) infected cells reacted with monoclonal antibodies 1D3(1), 2A4(2), 2H1(3), 3A1(4), 4B5(5), 5E1(6), 6F2(7), 8E1(8); Polyclonal mouse anti-STIV sera(9). Viral assembly sites are indicated by white arrows

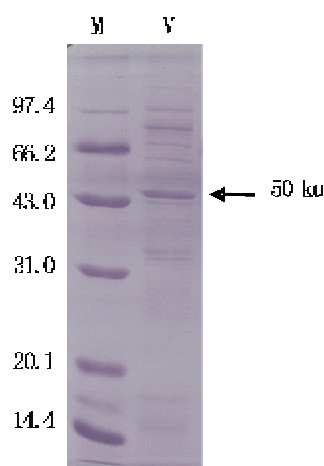


图2 SDS-PAGE 分析纯化的病毒

M. 低分子量 marker; V. 纯化后的病毒粒子

Fig.2 Purified virions were analyzed by SDS-PAGE

Lane M. low range marker; Lane V. purified virions

运用 Western-blotting 进行中华鳖虹彩病毒单抗的抗原表位的特异性分析(图3), 其中3株单抗 Mab1D3、Mab2A4、Mab3A1 与病毒蛋白产生特异的反应。Mab1D3 与 84 ku 的蛋白有很强的反应; Mab2A4 在 35 ku 位置有一条相对比较强的条带反应; Mab3A1 在 14 ku、16 ku 位置有两条带反应。以上结果说明这3株单抗针对的是中华鳖虹彩病毒的非构象依赖性抗原决定簇。Mab2H1、Mab 4B5、Mab 5E1、Mab 6F2、Mab 8E1 针对的抗原位点不能通过 Western-blotting 分析得到验证, 在 Western-blotting 上表现为阴性反应, 可能这5株单抗针对的抗原是构象依赖性的抗原决定簇。由图可知, 免疫鼠血清至少能识别10条以上的蛋白带, 主要识别的病毒抗原的分子量分别是 84、63、50、35、32、16 和 14 ku, 包括3株

单抗 Mab1D3、Mab2A4、Mab3A1 能识别的病毒抗原,说明这 3 株单抗的特异性好。

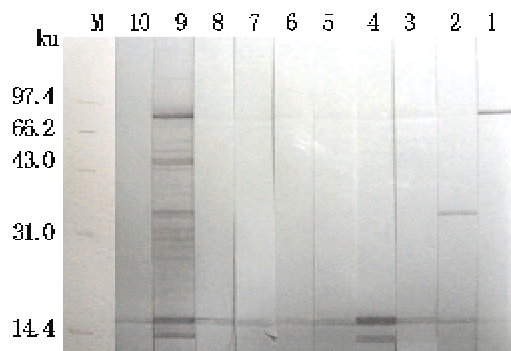


图3 Western-blotting 分析病毒的蛋白

M. 低分子量 Marker; 1~8. 分别是 Mabs1D3, 2A4, 2H1, 3A1, 4B5, 5E1, 6F2 和 8E1; 9. 免疫鼠血清; 10. 免疫前鼠血清

Fig. 3 Western-blot analyses of STIV proteins

Lane M. low range marker; Lane 1~8. Mabs1D3, 2A4, 2H1, 3A1, 4B5, 5E1, 6F2 and 8E1; Lane 9. polyclonal antiserum; Lane 10. preimmune serum

3 讨论

单克隆抗体技术已经在生命科学领域得到广泛应用,但在鱼类病原微生物的研究、鱼类疾病的快速诊断及病原的结构蛋白功能分析方面却是近二十年来才盛行起来。从 Chinchar 等^[13]和 Schultz 等^[14]先后分别研制出蛙虹彩病毒(frog virus 3, FV3)单抗和传染性造血组织坏死病(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)单抗开始,这一技术广泛应用于水生动物病毒研究的各个领域,已见报道的有针对鱼类病毒的单抗^[7-8, 15-17]、对虾病毒的单抗^[18-21]和一例抗栉孔扇贝病毒的单抗^[22]。

本研究选用 ELISA、IFA、Western-blotting 3 种方法进行中华鳖虹彩病毒的免疫生物学特性分析。ELISA 结果证实制备的单抗特异性好,与 EPC、CO、FHM 等宿主细胞不产生交叉反应。同时,已经有研究结果表明制备的单抗与 STIV 同一个属的病毒如沼泽绿牛蛙虹彩病毒(rana grytio iridovirus, RGV)、福建蛙虹彩病毒(fujian frog iridovirus, FJIV)等 4 株病毒产生免疫交叉反应,与其它科属的水生动物病毒 IHNV、病毒性出血性败血症(viral haemorrhagic septicemia virus, VHSV)、传染性胰脏坏死病毒(infectious

pancreatic necrosis virus, IPNV)等病毒没有免疫交叉反应(刘荭等,待发表),这结果证实 STIV 单抗对同一病毒属的病毒特异性好,可能提示蛙病毒属的抗原相对保守。因此,这些单抗的制备对临床上快速诊断蛙病毒属的病毒具有重要的意义。单抗 Mab5E1 有 ELISA 反应特性,没有荧光反应特性和 Western-blotting 反应特性,可能是 Mab5E1 针对的病毒抗原,在有机溶剂(丙酮、甲醇)的处理过程或 SDS-PAGE 过程中,病毒抗原表位发生构象变化或空间几何位置的改变,因此丧失与单抗的结合能力,并由此导致 ELISA 和 IFA 结果的差异。

虹彩病毒和其他大 DNA 病毒一样,病毒的装配区在胞质中靠近细胞核的位置,而且成熟的病毒粒子,大量聚集在胞质中近核的位置呈晶格状排列^[23]。本研究中所发现的具有免疫荧光特性的 7 株单抗(除了 Mab5E1),与 Chinchar 等^[13]制备的针对病毒装配位点的 Mabs 的荧光特性相类似,表现为颗粒状荧光染色,这可能是单抗所识别的抗原在病毒装配区大量聚集的结果。由此推测,图 2 中箭头所示胞浆中绿色荧光亮点(位于细胞核周边)可能是病毒的装配位点。

应用 Western-blotting 进行 STIV 单抗的抗原表位的特异性分析,其中 3 株单抗 Mab1D3、Mab2A4、Mab3A1 与病毒蛋白产生特异的反应,能识别不同的抗原位点。根据 Song 等^[24]对石斑鱼虹彩病毒结构蛋白的鉴定和分析,可推测 14、16 和 35 ku 的蛋白属于虹彩病毒穿膜蛋白(thrombomodulin protein, TM)的成分。TM 蛋白与虹彩病毒的侵染相关,能增强病毒粒子的吸附作用和提高其进入宿主的效率^[25]。TM 蛋白单克隆抗体的制备,为后续研究病毒感染的致病机理和制备亚单位疫苗提供科学依据。

严格意义上一株单抗只识别一个抗原位点,而 Mab3A1 与病毒抗原之间有两个很强的反应条带,这种现象说明 STIV 抗原的复杂性,不同的抗原蛋白可能存在共同的表位,且存在于多个蛋白上。这个结果进一步表明单抗 Mab3A1 与 STIV 之间有较高的亲合力(avidity),且结合位点分布在多个结构蛋白中不易受到病毒变异的影响,可作为 STIV 临床上制备特异性和敏感的诊断试剂使用,同时该结果也提供了 STIV 抗原性的潜在信息,有助于进一步探讨病毒与宿主细胞的交互

作用。

本研究进行中华鳖虹彩病毒的单克隆抗体制备在国内外尚属首次,上述结果提示制备的单克隆抗体对 STIV 抗原特异、灵敏,可用于中华鳖虹彩病毒的检测和结构蛋白分析。虹彩病毒结构复杂,揭示虹彩病毒的致病和免疫机理难度大。中华鳖虹彩病毒单克隆抗体的成功制备为分析蛙病毒属病毒的结构蛋白与功能,病毒复制、装配,以及侵染宿主和康复过程中病毒粒子的分布与消长提供了十分有用的工具,并奠定重要的技术基础。

参考文献:

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997: 1095.
- [2] Chen Z X, Zheng J C, Jiang Y L. A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle [J]. *Virus Res*, 1999, 63(1-2): 147-151.
- [3] Zhao Z, Teng Y, Liu H, *et al.* Characterization of a late gene encoding for MCP in soft-shelled turtle iridovirus (STIV) [J]. *Virus Res*, 2007, 129(2): 135-144.
- [4] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, *et al.* Virus taxonomy: VIII report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. London: Academic Press, 2005: 145-162.
- [5] Chinchar V, Essbauer S, He J, *et al.* Iridoviridae [M]// La Fauquet C, Mayo M, Maniloff J D U B. virus taxonomy: 8th report of the international committee on taxonomy of viruses (ICTV). London: Academic Press, 2005:163-175.
- [6] Qin Q W, Gin K Y, Lee L Y, *et al.* Development of a flow cytometry based method for rapid and sensitive detection of a novel marine fish iridovirus in cell culture[J]. *J Virol Methods*, 2005, 125(1): 49-54.
- [7] Shi C, Wei Q, Gin K Y, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies to a grouper iridovirus[J]. *J Virol Methods*, 2003, 107(2): 147-154.
- [8] Shieh J R, Chi S C. Production of monoclonal antibodies against grouper nervous necrosis virus (GNNV) and development of an antigen capture ELISA[J]. *Dis Aquat Organ*, 2005, 63(1): 53-60.
- [9] Zhou G Z, Li Z Q, Zhang Q Y. Characterization and application of monoclonal antibodies against turbot (*Scophthalmus maximus*) Rhabdovirus [J]. *Viral Immunol*, 2006, 19(4): 637-645.
- [10] Zola H, 周宗安. 单手册克隆抗体技术手册[M]. 南京: 南京大学出版社, 1991: 52-58.
- [11] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 8.
- [12] Stohwasser R, Raab K, Schnitzler P, *et al.* Identification of the gene encoding the major capsid protein of insect iridescent virus type 6 by polymerase chain reaction. [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74(5): 873-879.
- [13] Chinchar V G, Metzger D W, Granoff A, *et al.* Localization of frog virus 3 proteins using monoclonal antibodies [J]. *Virology*, 1984, 137(1): 211-216.
- [14] Schultz C L, Lidgerding B C, Mcallister P E, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibody against infectious hematopoietic necrosis virus[J]. *Fish Pathol*, 1985(20): 339-341.
- [15] Reschova S, Pokorova D, Nevorankova Z, *et al.* Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) with monoclonal antibodies [J]. *Veterinari Medicina*, 2007, 52(7): 308-316.
- [16] Monini M, Ruggeri F M. Antigenic peptides of the epizootic hematopoietic necrosis virus [J]. *Virology*, 2002, 297(1): 8-18.
- [17] Coralie M, Monique L, Soasig K B, *et al.* Characterization and mapping of monoclonal antibodies against the sleeping disease virus, an aquatic alphavirus[J]. *J Gen Virol*, 2005, 86: 3119-3127.
- [18] Liu W, Qian D, Wu J, *et al.* Production and application of monoclonal antibodies to *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(4): 529-533.
- [19] Poulos B T, Pantoja C R, Bradley-dunlop D, *et al.* Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp [J]. *Dis Aquat Organ*, 2001, 47(1): 13-23.
- [20] Rukpratanporn S, Sukhumsirichart W, Chaivisuthangkura P, *et al.* Generation of monoclonal antibodies specific to *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) from *Penaeus monodon* [J]. *Dis Aquat Organ*, 2005, 65(1): 85-89.
- [21] Sithigorngul P, Chauchuwong P, Sithigorngul W, *et al.* Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon* [J]. *Dis Aquat Organ*, 2000, 42(1): 27

- 34.
- [22] Fu C, Song W, Li Y. Monoclonal antibodies developed for detection of an epizootic virus associated with mass mortalities of cultured scallop *Chlamys farreri* [J]. Dis Aquat Organ, 2005, 65(1): 17-22.
- [23] Huang X, Zhang Q. Improvement and observation of immunoelectron microscopic method for the localization of frog *Rana grylio* virus (RGV) in infected fish cells[J]. Micron, 2007, 38(6): 599-606.
- [24] Song W, Lin Q, Joshi S B, et al. Proteomic studies of the Singapore grouper iridovirus [J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(2): 256-264.
- [25] Murti K G, Goorha R, Granoff A. An unusual replication strategy of an animal iridovirus[J]. Adv Virus Res, 1985, 30: 1-19.

Preparation and epitope analysis of monoclonal antibodies against soft-shelled turtle iridovirus (STIV)

ZHU Chun-hua^{1,2}, LIU Hong³, LIU Xiao-dong¹, YANG Jin-xian¹, ZHENG Zai-yu¹, LIN Tian-long¹

(1. Biotechnology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

3. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518001, China)

Abstract: Eight stable monoclonal hybridomas were successfully produced by immunization of Balb/C mice with purified soft-shelled turtle iridovirus (STIV) antigen. The Mabs obtained were three kinds of isotype. Mab 2A4 was subclass IgA, Mab8E1 was subclass IgG2a, and the other Mabs 1D3, Mab2H1, Mab3A1, Mab4B5, Mab5E1 and Mab6F2 were subclass IgG1. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) assays showed that eight Mabs could specifically recognize the antigen of STIV, and had no cross reaction with the cell lines EPC, Co, FHM. The ELISA titers of ascites were between 10^5 and 10^6 . Immunofluorescent studies showed that all Mabs (except for Mab5E1) had fluorescence characteristics, and the specific fluorescence signals appeared in the cytoplasm of STIV-infected (EPC) cells. None of the Mabs possessed the ability to neutralize STIV in vitro cell cultures. In this experiment, Western-blot was used to analyze the epitope of monoclonal antibodies against STIV. It demonstrated that Mab1D3 and Mab2A4 reacted specifically to a single linear protein with an approximately molecular weight of 84 ku and 35 ku respectively, Mab3A1 reacted with two STIV proteins at molecular weight of about 14 ku, 16 ku. The results suggested that these three Mabs target conformation-independent determinants within STIV protein. The identity of the target antigen of the other five Mabs could not be determined by Western-blot. These Mabs against STIV might be specific and sensitive, and they might also be used to detect STIV and analyze its structure proteins.

Key words: *Trionyx sinensis*; iridovirus; monoclonal antibodies; antigen