

血卵涡鞭虫单克隆抗体的制备与初步应用

查智辉^{1,2}, 施慧¹, 许文军^{1,2*}, 谢建军¹, 孙忠¹

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江海洋学院海洋与渔业研究所, 浙江舟山 316100;

2. 浙江省海水增养殖重点实验室, 浙江舟山 316100)

摘要: 用血卵涡鞭虫可溶性抗原免疫 BALB/c 小鼠, 经常规融合、间接 ELISA 方法筛选, 将所得阳性克隆再经 3 次亚克隆后, 共获得 3 株针对血卵涡鞭虫的单克隆抗体 (2B₂、3G₄、4G₇), 单克隆抗体亚类鉴定表明, 三者为 IgG 类抗体。用筛选的杂交瘤细胞株制备小鼠腹水抗体, 其细胞上清及腹水效价分别为 5.12×10^{-4} 和 8.00×10^{-4} 。进一步利用单克隆抗体建立间接荧光抗体方法对单抗特异性进行鉴定, 阳性虫体被染上黄绿色荧光, 而正常梭子蟹血淋巴则未被染色。用单克隆抗体和多克隆兔抗血清以羊抗鼠 HRP-IgG 为酶标抗体, 建立了检测血卵涡鞭虫的双抗体夹心 ELISA 方法, 该方法对血卵涡鞭虫阳性标本检测符合率为 100%。结果表明, 制备的单克隆抗体效价高、特异性好, 可用于血卵涡鞭虫的早期临床诊断。

关键词: 三疣梭子蟹; 血卵涡鞭虫; 单克隆抗体; 间接荧光抗体法; 双抗体夹心 ELISA 法

中图分类号: Q 176; S 941.5

文献标识码: A

血卵涡鞭虫 (*Hematodinium* sp.) 是近年来危害浙江省养殖三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 以及锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 的重要病原, 其宿主范围分布广、致病性强、流行迅速, 而且死亡率极高^[1], 大部分病蟹具有蟹体消瘦、肌肉白浊、蟹盖内充满大量乳白色液体等典型的临床症状, 显微镜检发现血淋巴细胞数量急剧下降, 代之以大量的寄生原虫^[2-4]。随着梭子蟹和青蟹养殖规模的扩大和集约化程度的不断提高, 由该寄生原虫引起的病害问题亦日渐突出。

有关血卵涡鞭虫病的研究, 国外自 CHATTON 等^[5]首次报道法国沿岸血卵涡鞭虫感染绿蟹以来, 其他学者相继报道了挪威龙虾 (*Nephrops norvegicus*)^[6]、蓝蟹 (*Callinectes Sapidus*)^[7]、白氏雪蟹 (*Chionoecetes bairdi*)^[8] 及蛛雪蟹 (*Chionoecetes opilo*)^[9] 等许多重要经济甲壳类也都出现了被该寄生虫感染的情况。在国内许文军等^[1-3]首次报道了血卵涡鞭虫可以感染

三疣梭子蟹、锯缘青蟹, 并给沿海经济蟹的养殖造成了极大的危害。由于血卵涡鞭虫与蟹类血淋巴细胞在形态学上很难区分, 临床早期感染阶段普通显微镜检诊断十分困难, 加上其生活史特征还不是十分清楚^[4], 所以对该寄生虫开展更深入细致的研究是非常必要的。自 1975 年 KOHLER 等^[10]建立体外淋巴细胞杂交瘤技术以来, 抗体技术在生物医学、自然科学的各个领域获得了极广泛的应用。本研究利用单抗特异性高、专一性强的特点, 用血卵涡鞭虫营养体阶段虫体制备抗原免疫 BALB/c 小鼠, 获得抗血卵涡鞭虫的单克隆抗体, 以期在血卵涡鞭虫早期诊断和生活史研究方面找到新的途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

羊抗鼠 HRP-IgM、HRP-IgG, 羊抗兔 HRP-IgG 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司; 弗氏完全

收稿日期: 2010-11-16 修回日期: 2011-02-09

资助项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y3080181, Y3080317, Y3090402); 2009 浙江省大学生科技创新项目 (新苗孵化项目); 2010 浙江省大学生科技创新项目 (2010R411037); 浙江省科技厅项目 (2009C32062, 2010F20006)

通讯作者: 许文军, E-mail: xwenjun@sina.com

佐剂、不完全佐剂、聚乙二醇(PEG2000)、羊抗鼠 FITC-IgG、单克隆抗体亚类鉴定试剂盒为 Sigma 公司产品;胎牛血清为 Bioind 公司产品;Tween-20、邻苯二铵(OPD)、浓硫酸等均为国产分析纯试剂;血卵涡鞭虫多抗兔血清本实验室制备^[4]。

1.2 实验动物及细胞

清洁级 BABL/c 小鼠及 ICR 小鼠,购自浙江省实验动物中心,为 6~8 周龄雌鼠;骨髓瘤细胞为 SP2/0,由上海生物制品研究所丁亚红老师惠赠。

1.3 抗原制备及动物免疫

将实验室冷冻保存的血卵涡鞭虫用适量 0.01 mol/L 的 PBS 稀释后反复冻融 3 次,超声粉碎方法制备可溶性抗原,紫外分光光度法测定抗原蛋白含量,分装后置 -40 °C 保存备用。

取制备的可溶性抗原与等体积弗氏完全佐剂完全乳化后皮下注射免疫 BABL/c 小鼠,每只鼠注射 100 μg;间隔 3 周后用抗原与等量弗氏不完全佐剂同法同剂量免疫;再 3 周后等量抗原不加佐剂直接腹腔注射;2 周后两倍计量抗原腹腔注射加强免疫,3 d 后进行细胞融合。

1.4 细胞融合

取免疫小鼠脾细胞(1×10^8)与骨髓瘤细胞 SP2/0(2×10^7),用 50% PEG 为融合剂,按常规方法进行融合,融合当天,小鼠眼眶采血,间接 ELISA 测血清抗体效价。融合后定时观察细胞生长情况,最终筛选出融合成功的杂交瘤细胞并统计融合率。

1.5 阳性杂交瘤细胞的筛选、克隆化及稳定性测定

首先用方阵法测得抗原的最佳包被浓度和小鼠阳性、阴性血清的最佳工作浓度;按最佳包被浓度,将制备的抗原包被 ELISA 板;以杂交瘤细胞培养上清作为待检材料、羊抗鼠 HRP-IgG 为第二抗体、OPD 为显色底物建立用于筛选阳性杂交瘤细胞的间接 ELISA 法,以 P/N > 2.1 作为阳性标准。连续 2 次检测抗体均为阳性的孔,按有限稀释方法进行亚克隆,再次检测,当阳性率达 100% 定株。

对筛选出的阳性杂交瘤细胞株进行扩大培养,并进行连续传代测定抗体稳定性。

1.6 单克隆抗体的制备

以体内诱生法进行单抗的大量制备^[12],单抗

的效价通过间接 ELISA 法进行测定,将单抗细胞上清和腹水用 PBS 分别按比例倍比稀释,间接 ELISA 法测定 OD_{492nm},能与靶抗原发生免疫反应的单抗最大稀释度即为其效价。

1.7 单克隆抗体鉴定

单抗 Ig 亚类的鉴定 将单克隆阳性杂交瘤腹水用 PBS 以 1:800 比例稀释,取 100 μL,按照 Sigma 公司的单克隆抗体亚类测定试剂盒说明书,用抗原介导的 ELISA (Atigen-Mediated ELISA)测定单克隆抗体阳性的杂交瘤细胞培养上清。

单抗的特异性鉴定 对经 PCR 鉴定为阳性的血卵涡鞭虫标本,用制备的单克隆抗体进行 ELISA 检测,同时和蟹血淋巴细胞,从梭子蟹体内分离出的溶藻弧菌、酵母菌、副溶血弧菌等样本进行交叉反应以判断单抗的特异性。

间接荧光抗体试验 新载玻片经洗液处理,乙醇浸泡,风干后用明胶甲醛溶液浸 10 min 烘干备用。实验选取包括血卵涡鞭虫营养体、腰鞭孢子、合胞体等不同生活史阶段的虫体进行检测。检测开始先将待检样品稍许滴加到备好的载玻片,均匀涂成圆面,室温风干,55 °C 固定 5 min;滴加适度稀释的单抗腹水,37 °C 免疫温盒孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次,自然风干;滴加适度稀释的 FITC 羊抗鼠 IgG,37 °C 免疫温盒孵育 40 min, PBST 洗涤 3 次后用甘油碳酸盐缓冲液封片,同时设立蟹血淋巴细胞作为阴性对照,495 nm 激发光下镜检。进一步验证单抗的特异性,以确定制备单抗是否具有针对血卵涡鞭虫不同阶段的共同表面抗原。

1.8 单抗的初步应用

检测方法的建立 双抗体夹心 ELISA 方法的建立,首先用方阵法测得单抗腹水的最佳包被浓度、兔抗阳性血清的最佳工作浓度以及样本和 HRP-IgG 的工作浓度,最终确定,单抗 10 μg/mL,37 °C 孵育包被 1 h;用 0.05% Tween-20 的 PBS 洗涤后,加 5% 脱脂奶封闭过夜;用上述 PBST 洗涤后加待检样本 37 °C 作用 1 h;用上述洗液洗涤后加多抗兔血清 37 °C 作用 1 h;再次洗涤后加 HRP-IgG 羊抗鼠抗体 37 °C 作用 1 h,显色后用 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止,测定 OD_{492nm},同时设立血卵涡鞭虫可溶性抗原为阳性对照,PBS (pH 7.4)为阴性对照。

1.9 数据处理

单克隆抗体效价测定时,每个稀释度平行进行3次重复实验,测定 OD_{492nm} 取均值,利用EXCEL软件对试验结果进行统计分析,试验数值均以平均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm SD$ 表示)。

2 结果

2.1 免疫小鼠血清效价检测结果

选取健康小鼠经过4次严格免疫后,测其血清抗体效价,用同一批次健康BLAB/c小鼠作阴性对照,通过间接ELISA测其效价,最终选取效价较高的3号小鼠取其脾脏做细胞融合(表1)。

表1 全部免疫小鼠血清抗体效价检测结果
Tab.1 The results of detecting titers of the total immunized mice

| 免疫小鼠序号 sequence number | 血清不同稀释度 OD_{490} different dilution | | | 对照 control |
|------------------------------|--|-------|-------|---------------|
| | 1:200 | 1:400 | 1:800 | |
| 1 | 0.863 | 0.480 | 0.229 | 0.147 |
| 2 | 1.225 | 0.601 | 0.346 | 0.130 |
| 3 | 1.467 | 0.792 | 0.352 | 0.128 |

2.2 杂交瘤细胞系的建立

在融合后的4块96孔板上统计有320孔生长杂交瘤细胞,融合率为83.3%(320/384),细胞融合7d后开始筛选杂交瘤细胞阳性集团。通过间接ELISA法测定,融合后第7天可检测到抗体,分泌特异性抗体的杂交瘤细胞的阳性率为4.8%。用有限稀释法对效价较高、细胞形态完整的克隆连续进行3次亚克隆,最后筛选出3株杂交瘤细胞,分别命名为 $2B_2$ 、 $3G_4$ 、 $4G_7$,经60代的体外传代培养(图1),间接ELISA测定其仍能稳定分泌高效价抗体。

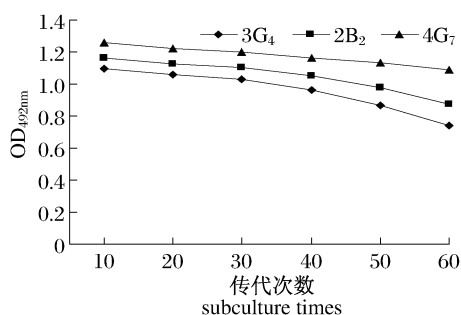


图1 杂交瘤细胞稳定性分析

Fig.1 Stability analysis of the tybridoma cell

2.3 单克隆抗体亚类鉴定

单抗免疫球蛋白亚类测定试剂盒检测结果表明,3株单抗均属于IgG蛋白,其中 $2B_2$ 为IgG₃, $3G_4$ 、 $4G_7$ 为IgG₁,未见有其它类和亚类的交叉反应。可见,获得的杂交瘤细胞是具有分泌单一抗体能力、来源于单一细胞系的杂交瘤细胞。

2.4 单克隆抗体效价测定结果

筛选的3株单克隆抗体,通过间接ELISA测定细胞培养上清和腹水效价,其下限滴度分别达到了 5.12×10^{-4} 和 8×10^{-4} (图2和图3),从图中看出,在能与靶抗原发生免疫反应的单抗稀释度之内,随抗体稀释度增大,其效价均呈现平稳下降趋势,通过标准差作图,平行组之间效价测定变异较小,说明效价测定稳定、可靠。

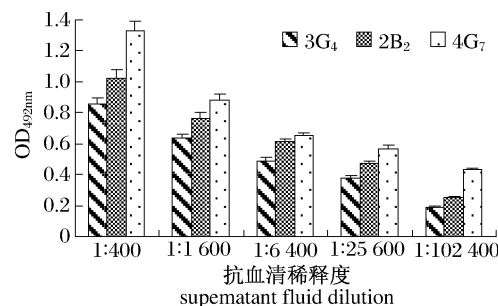


图2 间接ELISA测定3株单抗血清效价

Fig.2 Supernatant fluid titres of three McAbs by indirect ELISA

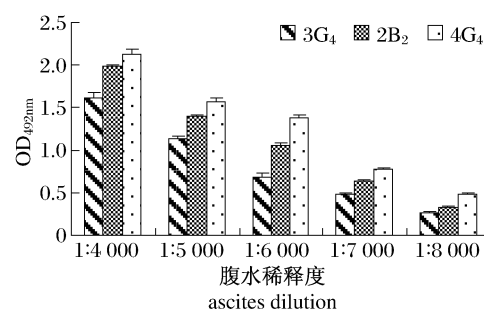


图3 间接ELISA测定3株单抗的腹水效价

Fig.3 Ascites titres of three McAbs by indirect ELISA

通过测定3株单抗上清和腹水效价值,经t检验,不同稀释度平行组之间效价测定差异性均不显著($P > 0.05$),在同一稀释度内抗体组间效价值差异均不显著($P > 0.05$)(表2),检测结果反应了筛选的3株单抗无论是抗血清还是制备的腹水抗体均滴度稳定,与抗原发生特异性反应稳定,专一性强。

表 2 3 株单抗不同稀释度免疫效价测定结果

Tab.2 The efficiency value of three monoclonal antibodies with different titres

| 抗血清稀释度 supernatant fluid titres | 抗体种类 antibody species | | | 腹水稀释度 ascites titres | 抗体种类 antibody species | | |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | 3G ₄ | 2B ₂ | 4G ₇ | | 3G ₄ | 2B ₂ | 4G ₇ |
| 1:400 | 0.86 ± 0.04 | 1.02 ± 0.06 | 1.33 ± 0.05 | 1:4 000 | 1.62 ± 0.05 | 1.98 ± 0.03 | 2.12 ± 0.07 |
| 1:1 600 | 0.64 ± 0.02 | 0.76 ± 0.04 | 0.88 ± 0.03 | 1:5 000 | 1.13 ± 0.04 | 1.39 ± 0.02 | 1.57 ± 0.05 |
| 1:6 400 | 0.49 ± 0.02 | 0.61 ± 0.02 | 0.65 ± 0.02 | 1:6 000 | 0.69 ± 0.04 | 1.06 ± 0.02 | 1.38 ± 0.03 |
| 1:25 600 | 0.38 ± 0.01 | 0.47 ± 0.02 | 0.57 ± 0.02 | 1:7 000 | 0.48 ± 0.02 | 0.64 ± 0.01 | 0.77 ± 0.02 |
| 1:102 400 | 0.19 ± 0.01 | 0.25 ± 0.01 | 0.43 ± 0.01 | 1:8 000 | 0.27 ± 0.01 | 0.33 ± 0.01 | 0.48 ± 0.02 |

注:抗体效价值用平均值 ± 标准差表示(n=3)。

Notes: The efficiency value means($\bar{X} \pm SD$)(n=3).

2.5 单克隆抗体特异性鉴定

通过间接 ELISA 方法对健康蟹血淋巴细胞和其它病原菌进行检测,结果显示,3 株单抗均不与血淋巴细胞和弧菌、酵母菌发生交叉反应,显示

了单抗检测较好的特异性。

间接荧光抗体实验结果显示,感染有血卵涡鞭虫的血淋巴与单抗进行反应,可观察到黄绿色荧光的虫体,而健康蟹的血淋巴未被染色(图 4)。

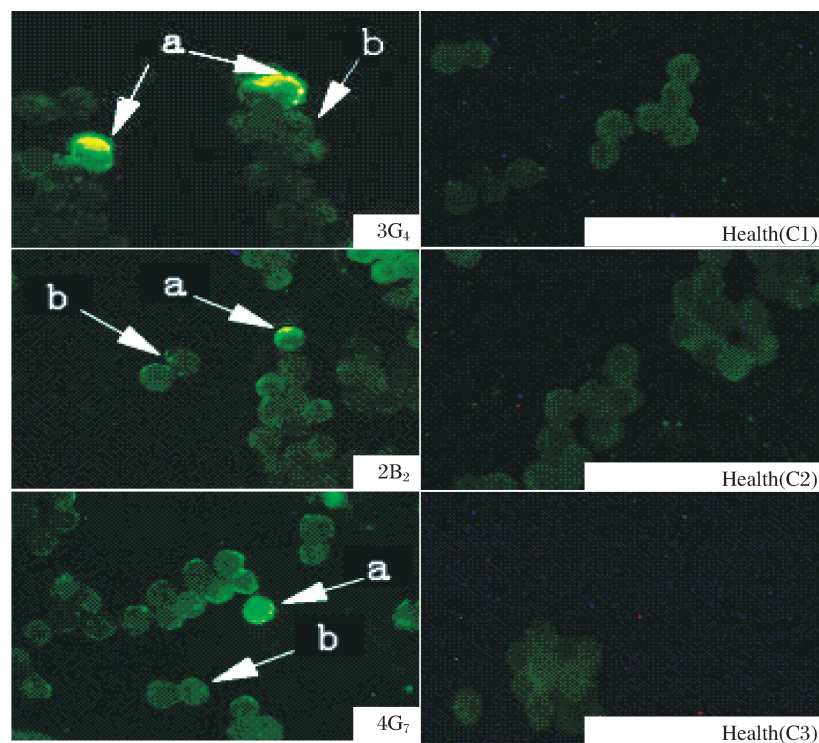


图 4 间接免疫荧光检测 McAb 特异性

单抗 3G₄、2B₂、4G₇ 的腹水分别与感染有血卵涡鞭虫的血淋巴进行反应,图中箭头 a 所示带荧光血卵涡鞭虫,箭头 b 所示蟹颗粒细胞; 2. Health(C1)、Health(C2)、Health(C3) 所示健康蟹血淋巴与单抗 3G₄、2B₂、4G₇ 反应结果。

Fig.4 Assay of *Portunus trituberculatus* in infected *Hematodinium* sp. with the McAb by IFAT

IFAT of reaction between McAb ascites (3G₄, 2B₂, 4G₇) and blood corpuscle infected *Hematodinium* sp., arrow "a" showing *Hematodinium* sp., arrow "b" showing haemocyte; 2. "Health(C1), Health(C2), Health(C3)" showing detection results of health blood corpuscle with three McAbs(3G₄, 2B₂, 4G₇).

2.6 单克隆抗体初步应用

利用建立的双抗体夹心 ELISA 法对确诊的 20 个血卵涡鞭虫标本进行检测,结果显示,血卵

涡鞭虫样品均呈现阳性反应,对照血淋巴则成阴性反应(表 3),说明利用单抗作为捕获抗体建立的夹心 ELISA 用于对样本的检测是可行的。

表 3 双抗体夹心 ELISA 实验测定单抗反应结果
Tab.3 Reactive character of mAbs detected by sandwich ELISA (OD_{492nm})

| 样品名称 sample | 样品品种及来源 sample species and sources | 检测结果 results | | | 样品名称 sample | 样品品种及来源 sample species and sources | 检测结果 results | | |
|----------------|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | B ₂ | G ₄ | G ₇ | | | B ₂ | G ₄ | G ₇ |
| 1 | 梭子蟹-桃花 1 | + | + | + | 11 | 梭子蟹-白沙 1 | + | + | + |
| 2 | 梭子蟹-桃花 2 | + | + | + | 12 | 梭子蟹-白沙 2 | + | + | + |
| 3 | 梭子蟹-普陀 1 | + | + | + | 13 | 梭子蟹-蚂蚁 1 | + | + | + |
| 4 | 梭子蟹-普陀 2 | + | + | + | 14 | 梭子蟹-蚂蚁 2 | + | + | + |
| 5 | 梭子蟹-登步 1 | + | + | + | 15 | 梭子蟹-秀山 1 | + | + | + |
| 6 | 梭子蟹-登步 2 | + | + | + | 16 | 梭子蟹-秀山 2 | + | + | + |
| 7 | 梭子蟹-朱家尖 1 | + | + | + | 17 | 青蟹-三门 1 | + | + | + |
| 8 | 梭子蟹-朱家尖 2 | + | + | + | 18 | 青蟹-三门 2 | + | + | + |
| 9 | 梭子蟹-马目 1 | + | + | + | 19 | 梭子蟹血淋巴 | - | - | - |
| 10 | 梭子蟹-马目 2 | + | + | + | 20 | 青蟹血淋巴 | - | - | - |

注：“+”代表阳性；“-”代表阴性。

Notes: “+” means positive result; “-” means negative result.

3 讨论

血卵涡鞭虫作为海水甲壳类的重要病原,其危害已引起了广泛的关注,国内外已相继开展有关该寄生虫致病性、生活史、流行规律,诊断及防控技术等方面的研究。在该寄生虫的检测方面,国外已建立起了聚合酶链式反应 PCR^[11-15]、酶联免疫吸附试验 ELISA^[16-17] 以及间接荧光抗体检测技术 IFAT^[4,18] 等多种现代生物学诊断技术,并用于该类寄生虫不同阶段的检测;国内对血卵涡鞭虫的检测尚研究不多,通常用显微镜检、PCR 等方法进行检测^[3-4,13-15],尚无血卵涡鞭虫单克隆抗体制备的有关报道。本研究通过对血卵涡鞭虫单克隆抗体的研制,以便寻找更方便快捷的检测方法,以期解决该寄生虫病的早期诊断困难问题,并探索该病原的生活史特征和传播途径。

通过杂交瘤细胞系的建立,本研究共获得 3 株能稳定分泌抗血卵涡鞭虫抗体的杂交瘤细胞株,经传代培养,杂交瘤细胞在上世纪 60 代仍具有分泌高滴度抗体的能力,采用间接 ELISA 方法对抗血清和腹水效价的测定,效价分别达到了 5.12×10^{-4} 和 8.00×10^{-4} 。同一株抗体稀释度增大其变化趋势均为稳定,通过其特异性鉴定均不与蟹血淋巴细胞和从蟹体内分离出的弧菌、酵母菌、副溶血弧菌等发生交叉反应,与已确诊的血卵涡鞭虫标本进行反应,阳性符合率达 100%,说明制备的单抗均是特异性强,效价稳定的抗体。

在间接荧光抗体实验中,选取了血卵涡鞭虫不同生活阶段的虫体作为鉴定对象,结果显示,

只有感染了血卵涡鞭虫的血淋巴内可观察到有黄绿色荧光的虫体,而健康蟹的血淋巴未被染色,说明其营养体、腰鞭孢子、多合胞体阶段都具有一定的共同表面抗原,说明制备的 3 株单抗具有较好的特异性,从而为血卵涡鞭虫抗原的批量检测奠定了基础。

利用 3 株单抗较好的特异性,建立了检测血卵涡鞭虫抗原的双抗体夹心 ELISA 法,在比较了不同的包被抗体、标记抗体浓度,通过实验优选,最终确定了最佳单抗包被浓度、多抗血清、酶标抗体的稀释度。双抗体夹心 ELISA,一方面采用酶标抗体检查多种大分子抗原,它不仅不必标记每一种抗体,还可提高试验的敏感性;另一方面实验检验过程所用抗体浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$,在临床应用可以大量节省抗体用量。实验初期考虑到单抗的抗原决定簇比较单一,只能结合特异的抗原位点,酶标放大效果不好;而用多抗包板结合的抗原位点又太杂,其特异性存在缺陷,综合其利弊最终选用单抗包板,用多抗进行酶标记,其检测特异性均远远高于其他包被及标记方法。通过对采集的 9 个发病区域的 18 个病样进行对比分析发现,该实验技术检测血卵涡鞭虫抗原,不受反应体系中的非特异性蛋白影响,只要样本中含有一定量的特异性抗原,均可获得阳性的定性结果,这对于血卵涡鞭虫病临床标本检测,以及开展血卵涡鞭虫流行病学的研究工作具有重要意义。

参考文献:

[1] 许文军,施慧,徐汉祥,等. 养殖梭子蟹血卵涡鞭虫

<http://www.scxuebao.cn>

- 感染的初步研究[J].水生生物学报,2007,31(5):27-32.
- [2] 许文军,徐汉祥,施慧,等.三疣梭子蟹血卵涡鞭虫病诊断与综合防治措施[J].现代渔业信息,2006(21):27-28.
- [3] 许文军,绳秀珍,徐汉祥,等.血卵涡鞭虫在养殖锯缘青蟹中的寄生[J].中国海洋大学学报,2007,37(6):916-918.
- [4] 谢建军,许文军,施慧,等.海产蟹类血卵涡鞭虫间接荧光抗体快速检测技术[J].水产学报,2009,33(1):126-128.
- [5] CHATTON É, POISSON R. Sur l'existence, dans le sand des Crabs, de Péridiniens parasites; *Hematodinium perezii* n. g., n. sp. (Syndinidae) [J]. CR Seances Soc Biol Paris, 1931, 105:553-557.
- [6] FIELD R H, HILLS J M, ATKINSON R J A, et al. Distribution and seasonal prevalence of *Hematodinium* sp. infection of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) around the west coast of Scotland [J]. ICESJ Mar Sci, 1998, 55:846-858.
- [7] MESSICK G A. *Hematodinium perezii* infections in adult and juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* from coastal bays of Maryland and Virginia, USA [J]. Dis Aquat Org, 1994, 19:77-82.
- [8] SHIELDA J D. The parasitic dinoflagellates of marine crustaceans [J]. Annu Rev Fish Dis, 1994, 4:241-271.
- [9] TAYLOR D M, KHAN R A. Observations on the occurrence of *Hematodinium* sp. (Dinoflagellate; Syndinidae), the causative agent of bitter crab disease in Newfoundland snow crab (*Chionoecetes opilio*) [J]. J Invertebr Pathol, 1995, 65:283-288.
- [10] KOHLER G, MILSTEIN C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. Nature, 1975, 256(5517):495-497.
- [11] HUDSON D A, ADLARD R D. PCR-techniques applied to *Hematodinium* spp. and *Hematodinium*-like dinoflagellates in decapod crustaceans [J]. Dis Aquat Org, 1994, 20:203-206.
- [12] UEHL T, FRISCHERM E, SHEPPARD M, et al. Development of an 18S rRNA genotargeted PCR based diagnostic for the blue crab parasite *Hematodinium* sp. [J]. Dis Aquat Org, 2002, 49:61-70.
- [13] 施慧,许文军,徐汉祥,等.三疣梭子蟹感染血卵涡鞭虫 PCR 检测方法的建立[J].上海水产大学学报,2008,17(1):28-33.
- [14] 施慧,许文军,李鹏飞,等.应用 PCR 方法检测患“黄水病”锯缘青蟹中的血卵涡鞭虫[J].海洋水产研究,2008,30(1):75-78.
- [15] 施慧,许文军,徐汉祥,等.引起三疣梭子蟹“牛奶病”的酵母菌 18SrRNA 序列测定与分析[J].海洋水产研究,2008,29(4):35-38.
- [16] STENTIFORD G D, NEIL D M, COOMBS G H, et al. Development and application of an immunoassay diagnostic technique for studying *Hematodinium* infections in *Nephrops norvegicus* populations [J]. Dis Aquat Org, 2001d, 46:223-229.
- [17] SMALLH J, WILSON S, NEIL D M, et al. Detection of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* in the Norway lobster *Nephrops norvegicus* by ELISA [J]. Dis Aquat Org, 2002, 52:175-177.
- [18] FIELD R H, APPLETON P L. An indirect fluorescent antibody technique for the diagnosis of *Hematodinium* sp. infection of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* [J]. Dis Aquat Org, 1996, 24:199-204.

Preparation and preliminary application of monoclonal antibodies against *Hematodinium* sp. in *Portunus trituberculatus*

ZHA Zhi-hui^{1,2}, SHI Hui¹, XU Wen-jun^{1,2*}, XIE Jian-jun¹, SUN Zhong¹

(1. Marine and Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Marine and Fishery Research Institute of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316100, China;

2. Zhejiang Province Key Lab of Mariculture and Enhancement, Zhoushan 316100, China)

Abstract: The *Portunus trituberculatus* from Zhoushan is seasonally infected by a parasitic dinoflagellate of the genus *Hematodinium* sp. Dinoflagellates were found in haemolymph and tissues of infected crabs where the parasite proliferates and causes mortalities. Monoclonal antibodies (McAbs) used to detect infection include a morphological index (pleopod diagnosis) and several immunoassays. The monoclonal antibodies against *Hematodinium* sp. were developed by fusing SP2/0 cells with splenocytes of 8-week-old female BALB/c mice immunized with soluble antigen of *Hematodinium* sp. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to screen hybridoma cells and limited dilution method was performed to subclone the positive clones. After three cycles of subcloning, three McAbs against *Hematodinium* sp. were selected and designated as 2B₂, 3G₄ and 4G₇ respectively. The three McAbs in culture liquid were proved to have high ELISA titers and inducing ascites by using it. The ELISA titer in culture liquid and ascites were 5.12×10^{-4} and 8.00×10^{-4} in the indirect ELISA, respectively. By using the immunoglobulin subtypes kit, three McAbs were identified to be IgG. Identification of the monoclonal antibody specificity via indirect fluorescence-antibody examination showed that *Hematodinium* sp. was specific labeled with bright yellow green under UV, while the normal haemocytes remained dark. Through monoclonal and polyclonal antibodies, double antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay detecting *Hematodinium* sp. was built. The positive compatibility rate of the double sandwich ELISA was 100%. Results showed that the monoclonal antibody characterized by high valence and high specificities, can be used to diagnose *Hematodinium* sp. in *P. trituberculatus* at an early stage.

Key words: *Portunus trituberculatus*; *Hematodinium* sp.; monoclonal antibody; indirect immunofluorescent assay; double sandwich ELISA

Corresponding author: XU Wen-jun. E-mail: xwenjun@sina.com