

传染性胰腺坏死病毒 VP2 COE 蛋白 单克隆抗体的制备与初步应用

连科迅¹, 赵丽丽¹, 张琳琳², 贾 鹏³, 唐立杰¹,
葛俊伟¹, 李一经^{1*}, 刘 敏^{2*}

(1. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 东北农业大学动物科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

3. 深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518045)

摘要: 为制备抗 IPNV VP2 蛋白的单克隆抗体, 对其基本特性进行鉴定并进行初步应用。实验利用 Ni-NTA 亲和层析纯化的 IPNV VP2 COE 重组蛋白作为免疫原, 免疫 8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 经 3 次免疫后, 将免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤 SP2/0 细胞融合。采用间接 ELISA 和有限稀释法筛选杂交瘤细胞, 共得到 2 株能稳定分泌特异性抗体的阳性细胞株, 分别命名为 5G10 和 5F3, 亚类鉴定均为 IgG1 亚类。2 株杂交瘤细胞的染色体数目在 75~120 之间。间接 ELISA 检测 5G10 和 5F3 细胞培养上清的效价分别为 1:10⁵、1:10², 腹水效价分别为 1:10⁸、1:10⁴。Western-blotting 和间接免疫荧光鉴定结果显示, 2 株单抗均能特异性地识别 IPNV。间接 ELISA 表明, 2 株单抗不与 IHN、VHSV、SVCV、HRV 等病毒反应, 说明获得的单抗具有高度的特异性。相加 ELISA 实验结果显示, 2 株单克隆抗体分别识别 IPNV VP2 蛋白上不同的抗原位点。应用间接免疫荧光方法对临床确定为患有 IPN 虹鳟肝组织进行检测, 结果证实该 2 株单克隆抗体可用于后续实验。

关键词: 传染性胰腺坏死病毒; VP2 重组蛋白; 单克隆抗体

中图分类号: Q 785; S 941.41

文献标志码: A

传染性胰腺坏死病 (infectious pancreatic necrosis, IPN) 是鲑科鱼类鱼苗、鱼种和海水养殖鱼类的一种严重病毒性传染病, 其病原为传染性胰腺坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)。该病主要发生于人工养殖的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 鱼场, 20 周龄以内的虹鳟苗最为易感, 死亡率可高达 90% 以上^[1], 给鲑科鱼类特别是虹鳟和大西洋鲑 (*Salmon salar*) 的养殖业造成了严重的经济损失^[2]。目前很多学者针对 IPNV 的检测建立了几种诊断方法, 如生物素标记寡核苷酸 DNA 探针法^[3]、酶联免疫吸附实验^[4]、实时荧光定量 RT-PCR 法^[5-6]、逆转录环介导法^[7]等。

IPNV 属双链 RNA 病毒, 呈二十面体, 直径约为 57~74 nm, 无囊膜, 对热和酸稳定, 对脂溶剂不敏感^[8]。结构蛋白是传染性胰腺坏死病毒的主要免疫原性抗原。在 IPNV 基因编码的 5 种蛋白中结构蛋白有 2 种: VP2 和 VP3; 它们的分子量为 54 和 31 ku。IPNV 基因组的 A 片段编码的蛋白前体 pVP2-VP4-VP3 被非结构蛋白裂解形成了成熟的结构蛋白 VP2 和 VP3, 结构蛋白形成后, 三聚体 VP2 形成外衣壳蛋白, VP3 形成内衣壳蛋白, 装配成病毒粒子^[9-10]。VP2 蛋白 (50 ku) 是 IPNV 的外衣壳蛋白, 含有病毒主要抗原决定簇, 其诱导的中和抗体能被动地保护宿主不受 IPNV 的感染, 是 IPNV 的保护性抗原^[11-12]。因

收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-04-18

资助项目: 国家科技支撑计划 (2012BAD25B02); 黑龙江省教育厅科技项目 (11541019)

通信作者: 刘敏, E-mail: liumin-707@163.com; 李一经, E-mail: yijingli@163.com

此,VP2 基因及编码蛋白是 IPNV 诊断学候选基因。从本实验室分离到的中国株扩增到结构蛋白 VP2 的抗原表位区基因(554 ~ 1 170 bp),命名为 VP2 COE(616 bp)。

本实验利用杂交瘤技术建立了能稳定分泌抗 IPNV VP2 COE 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,为研究特异、快速的传染性胰腺坏死病诊断方法奠定了物质基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

重组菌 pCold TF-VP2 COE/BL21 由本实验室构建保存;传染性胰腺坏死病毒(IPNV)SP 株购自美国细胞菌种库(ATCC VR-1318)。鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 由本实验室冻存;鲤上皮瘤细胞(EPC)由深圳出入境检验检疫局刘荻教授惠赠;6~8 周龄雌性 BALB/c 雌鼠,购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗鼠 IgG,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。HAT 选择性培养基、PEG3350、M199 培养基、抗体亚类试剂盒,购自 SIGMA 公司。弗氏佐剂(FA)购自 Sigma 公司。秋水仙素购自北京中山生物技术有限公司。双抗(青霉素、链霉素)购自哈尔滨制药六厂。

1.2 抗原制备及动物免疫

将实验室前期构建表达的重组菌 pCold TF-VP2 COE/BL21 大量诱导, Ni²⁺亲和层析予以纯化(方法参照 Ni²⁺亲和层析柱说明书),以纯化的重组 VP2 蛋白作为免疫原,冻存于 -80 °C 备用。按 1:1 比例将抗原与弗氏完全佐剂混合,乳化后腹腔注射 BALB/c 小鼠,首免 50 μg/只;在第 14 天将抗原与弗氏不完全佐剂混合乳化,进行二免。二免后第 7 天,小鼠断尾采血检测其血清抗体效价,并建立间接 ELISA 检测方法;在第 28 天进行腹腔注射抗原加强免疫,剂量同前,3 d 后进行融合。

1.3 细胞融合与筛选

从免疫的 BALB/c 鼠眼球采血,分离血清,该血清作为抗体检测时的阳性对照血清。将制备好的骨髓瘤细胞和免疫鼠脾细胞悬液按细胞数量 1:8 的比例混合,用 50% PEG3350 溶液按常规融合方法进行细胞融合。待 96 孔板中杂交瘤细胞

长满孔底 1/4 ~ 1/3 面积时,取细胞培养上清液 100 μL,间接 ELISA 方法以检测抗原和 IPNV 病毒同时为包被抗原进行筛选,同时用 SP2/0 细胞培养上清液作阴性对照,并设阳、阴性鼠血清对照,选择 P/N > 2.0,阳性孔采用有限稀释法进行细胞亚克隆。

1.4 单克隆抗体的制备

将间接 ELISA 筛选出的阳性杂交瘤细胞在细胞培养瓶中扩大培养,待细胞长满时收集培养上清液,检测上清抗体效价;取 8 周龄健康 BALB/c 雌鼠,用液体石蜡腹腔注射致敏小鼠(0.5 mL/只),8~10 d 后注射杂交瘤细胞(约 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /只),10~15 d 后从腹腔活体采集腹水,取少量腹水检测抗体效价,抗体 -80 °C 保存备用。

1.5 单克隆抗体的生物学鉴定

单抗亚类鉴定 采用 Sigma 公司的单抗亚类鉴定试剂盒鉴定亚型,方法按操作说明书进行。

杂交瘤细胞染色体数及其分泌抗体的稳定性鉴定 采用秋水仙素法^[13],进行杂交瘤细胞染色体数鉴定。将获得的阳性杂交瘤细胞株连续传代培养 3 个月,每隔 1 周取细胞培养上清液,用间接 ELISA 方法检测抗体效价,再将细胞株冻存 3 个月后复苏,取培养 3 d 左右的细胞培养上清液以间接 ELISA 方法检测抗体效价,以评价其分泌抗体的稳定性。

Western-blotting 分析鉴定 将 IPNV 和 EPC 细胞与病毒沉降液(终浓度为 10% 的 PEG8000)1:1 混合,4 °C 过夜,离心弃上清液,将沉淀与 2 × SDS 按 1:1 比例混匀后 100 °C 煮沸 10 min 后,经 SDS-PAGE 电泳,转印至 NC 膜上,用 5% 的脱脂乳 4 °C 过夜封闭,PBST 洗涤,以阳性杂交瘤细胞培养上清液为一抗,室温作用 2 h,PBST 洗涤,再以 HRP 标记羊抗鼠 IgG(1:2 000)为二抗,室温作用 2 h,PBST 洗涤,用 DAB 显色液室温显色。

间接免疫荧光法鉴定 将长满单层 EPC 细胞接种 IPNV,培养 24 h 后弃去培养上清液,用多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 洗涤;用 1% 的 BSA 37 °C 封闭 1 h,PBS 洗涤;加入杂交瘤细胞培养上清液和 SP2/0 细胞培养上清液,37 °C 作用 1 h,PBS 洗涤;加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG,37 °C 作用 1 h,PBS 洗涤;倒置荧光显微镜观察结果。

同时设置正常 EPC 细胞作为阴性对照。

单克隆抗体的特异性鉴定 使用 IHNV、VHSV、SVCV、HRV 细胞培养物代替 IPNV 作为包被抗原,同时设 IPNV 阳性对照,SP2/0 细胞培养上清液作为阴性对照。间接 ELISA 检测各株杂交瘤细胞培养上清液与相关病毒的反应性。

单克隆抗体抗原识别位点初步分析 用相加 ELISA 实验进行抗原位点初步分析,步骤参照文献[14]。

1.6 应用间接免疫荧光方法检测临床样品

将确定患有 IPN 的虹鳟肝组织在洁净的载玻片上轻轻做个压迹制成触片,待干固定,进行间接免疫荧光(IFA)实验。具体方法如下:用多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次;3% 的 BSA 于 4 °C 封闭过夜, PBS 洗涤 3 次;用 5G10 和 5F3 两株单抗作为一抗,于 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次;加入用 3% 的 BSA 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (1:200),于 37 °C 孵育 1 h; PBS 洗涤 3 次;在荧光显微镜下观察,同时设 SP2/0 上清液和确定未患 IPN 虹鳟肝组织为阴性对照。

2 结果

2.1 抗原的纯化

表达蛋白经 Ni^{2+} 亲和层析纯化后,进行 SDS-PAGE, IPNV-VP2 COE 蛋白分子质量大小为 78 ku,结果仅在 78 ku 处出现一条目的条带,获得纯化的 IPNV-VP2 COE 蛋白(图 1)。

2.2 杂交瘤细胞系的建立及抗体效价

用间接 ELISA 筛选方法进行筛选,经过多次克隆和筛选获得 2 株能稳定分泌抗 IPNV VP2 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 5G10 和 5F3。将这 2 株单抗分别制备腹水,间接

ELISA 检测方法测定其腹水效价,以 IPNV 病毒培养物为检测抗原,同时设立 SP2/0 细胞阴性对照,以 $\text{P/N} \geq 2.0$ 的抗体最大稀释倍数作为效价值,杂交瘤细胞培养上清液的效价分别为 $1:10^5$ 、 $1:10^2$,腹水效价分别为 $1:10^8$ 、 $1:10^4$,腹水效价明显高于上清效价。

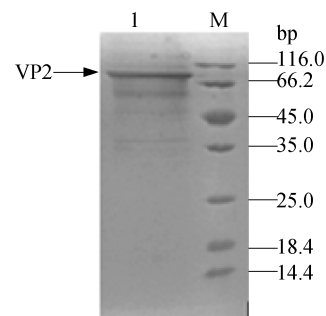


图 1 VP2 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白质分子质量标准; 1. 纯化后的 IPNV VP2 COE 重组蛋白。

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant VP2 protein

M. Protein molecular weight Marker; 1. Purified recombinant VP2 COE Protein.

2.3 单克隆抗体亚类

经抗体亚类试剂盒鉴定,5G10、5F3 两株杂交瘤细胞所产生抗体均为 IgG1 型。

2.4 杂交瘤细胞染色体数

采用秋水仙素法对 2 株杂交瘤细胞和 SP2/0 细胞进行染色体鉴定,SP2/0 骨髓瘤细胞的平均染色体数为 55 ~ 70,杂交瘤细胞的平均染色体数为 75 ~ 120,而正常 BALB/c 小鼠脾细胞染色体数是 40,由此可见,杂交瘤细胞是骨髓瘤细胞和正常小鼠脾细胞的杂合体(图 2)。

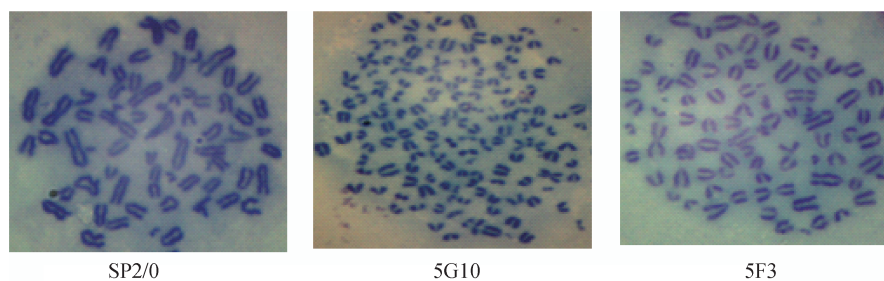


图 2 SP2/0、5G10 和 5F3 细胞染色体计数

Fig. 2 The number of SP2/0, 5G10, 5F3 cell's chromosomes

2.5 单克隆抗体稳定性分析

将 2 株分泌单抗的杂交瘤细胞连续传代 3 个月,利用间接 ELISA 方法检测单抗细胞上清原液和冻存复苏后上清液,以 IPNV 病毒培养物为检测抗原,结果见表 1,测得的 OD_{490} 值均明显高于 SP2/0 值,且冻存前后 OD_{490} 值相差不大,说明这 2 株杂交瘤细胞能够稳定分泌特异性单克隆抗体。

表 1 杂交瘤分泌抗体稳定性鉴定结果

Tab.1 The result of stability of hybridoma that secreted antibody

杂交瘤细胞 hybridoma cell	5G10	5F3	SP2/0
冻存前 (OD_{490}) before freezing	3.049	0.572	0.085
冻存后 (OD_{490}) after freezing	3.027	0.546	0.086

2.6 免疫印迹鉴定单克隆抗体的反应性结果

以两株杂交瘤细胞培养上清液作为一抗进行 Western-blotting 检测,其培养上清液与经病毒沉降液处理的 IPNV 病毒培养物只在转印膜 78 ku 处出现了明显的特异性条带,说明此 2 株单抗都具有良好的反应原性(图 3)。

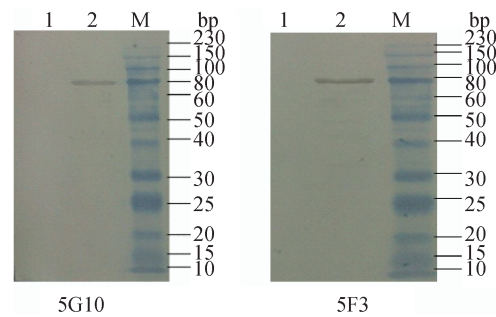


图 3 Western-blotting 检测单克隆抗体

M. 蛋白质分子质量标准; 1. EPC 对照; 2. IPNV。

Fig.3 Detection of monoclonal antibody by Western-blotting

M. Protein molecular weight Marker; 1. EPC control; 2. IPNV.

2.7 间接免疫荧光检测结果

接种 IPNV 的 EPC 细胞分别与 2 株杂交瘤细胞培养上清液和 SP2/0 细胞上清液作用,间接免疫荧光检测结果显示加入杂交瘤细胞上清液作用的细胞发出不同程度的绿色闪亮荧光,而加入 SP2/0 细胞上清液作用的细胞未发出荧光,表明 2 株单抗均与 IPNV 发生特异性反应(图 4)。

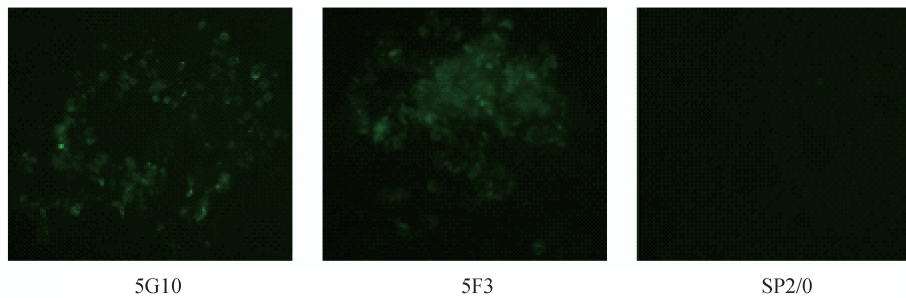


图 4 3 种上清液与感染 IPNV 的 EPC 细胞相互作用的间接免疫荧光染色结果

Fig.4 IFA result of interaction between EPC cells inoculated by IPNV and 3 types of supernatant

2.8 单克隆抗体的特异性鉴定结果

间接 ELISA 结果表明,2 株单抗与 IPNV 反应的 OD_{490} 值明显高于 IHNV、VHSV、SVCV、HRV。2 株单抗与 IPNV 反应的 P/N 值均大于 2,

而与其它几种病毒反应的 P/N 值在 1 左右(表 2)。上述结果说明,制备获得的 2 株单抗与 IHNV、VHSV、SVCV、HRV 不发生交叉反应,对 IPNV 具有较强的特异性。

表 2 单抗特异性鉴定结果

Tab.2 The specialization test of McAbs

病毒的细胞培养物 virus	IPNV	HRV	SVCV	VHSV	IHNV
5G10 细胞培养上清液 5G10 cell supernatant	0.611	0.175	0.074	0.205	0.171
5F3 细胞培养上清液 5F3 cell supernatant	0.603	0.146	0.067	0.201	0.198
SP2/0 细胞培养上清液 SP2/0 cell supernatant	0.105	0.081	0.061	0.116	0.097

2.9 单克隆抗体抗原识别位点初步分析结果

根据细胞培养上清效价将上清液稀释至饱和浓度,ELISA 结果显示,5G10 与 5F3 相加指数(AI 值)为 64.5%,大于 50%。因此,5G10 与 5F3 该 2 株单克隆抗体抗针对不同的抗原表位。

2.10 应用间接免疫荧光方法检测临床样品

IFA 结果显示,本实验制备的 2 株单抗与已患 IPNV 的虹鳟肝组织发生特异性的反应,出现明显的绿色荧光病灶,SP2/0 细胞上清液阴性对照未出现荧光(图 5)。

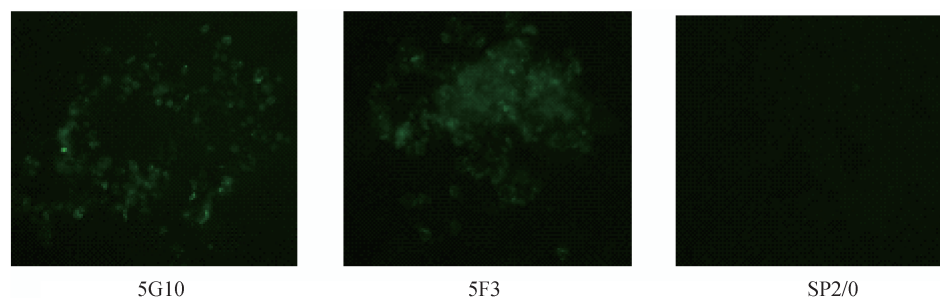


图 5 3 种上清液与感染 IPNV 虹鳟肝组织相互作用的间接免疫荧光染色结果

Fig. 5 IFA result of interaction between the liver tissues infected by IPNV and 3 types of supernatant

3 讨论

传染性胰腺坏死病是一种重要的水生动物病毒性疾病,死亡率极高,其流行范围遍及世界多国,给水产养殖业带来了巨大的经济损失。VP2 蛋白是 IPNV 的主要衣壳蛋白,由 150 个氨基酸多肽构成,还携带决定病毒毒力的因子和适应细胞培养的因子^[15]。

本实验首先将纯化的 IPNV VP2 COE 蛋白作为免疫原,对小鼠进行 3 次腹腔免疫,经过细胞融合和亚克隆,并用 IPNV VP2 COE 重组蛋白和 IPNV 细胞培养物分别作为检测抗原进行筛选,最终获得 2 株杂交瘤细胞,分别命名为 5G10 和 5F3,其亚类鉴定均为 IgG1 型。单克隆抗体稳定性分析结果显示其具有很好的稳定性,可长期保存用于后续实验。Western-blotting 显示的唯一特异性条带和间接免疫荧光方法明显的绿色荧光充分证明了 2 株杂交瘤细胞能与 IPNV 发生特异性反应。在单克隆抗体特异性实验中,2 株单抗不与 IHNV、VHSV、SVCV、HRV 发生交叉反应,仅与 IPNV 反应。在本实验中显示 5G10 细胞株其细胞培养上清液中分泌的抗体和腹水的抗体均明显高于 5F3 细胞株,可见在组装 IPNV 的 ELISA 抗体检测试剂盒时,5G10 细胞株将是优先选择抗体。单克隆抗体抗原识别位点初步分析显示 5G10 和 5F3 分别针对不同的抗原表位,但 2 者亲和力的具体差异有待求证,此结果表明在建立 IPNV 胶体金检测方法时可以选取这 2 株单抗进

行相应的检测方法研究。鉴于所制备 2 株单抗的良好特性,应用间接免疫荧光实验检测了已确定患有 IPNV 的虹鳟鱼的肝脏组织,结果直观地证明了所制备单克隆抗体的初步实用性,可应用于后期实验。

在单克隆抗体的制备过程中,免疫原的制备是基本前提,而污染的预防则是重要保障。本实验选择用重组蛋白作为免疫原,克服了天然免疫原获得量较小和提纯较难等问题,通过利用 Ni-NTA 亲和层析纯化了免疫原,解决了其纯度难题。预防污染是细胞培养的关键因素,常用抗生素和在动物体内接种杂交瘤细胞再进行培养,可以有效避免细胞污染。

近年来国内外学者已经建立了一些检测 IPNV 的新方法,如生物素标记寡核苷酸 DNA 探针法、实时荧光定量 RT-PCR 法以及逆转录环介导法等,这些方法虽然灵敏度很高,但对于检测的仪器设备要求却很高,存在变异性,用于检测临床样本稳定性较低。相对比较之下,单克隆抗体具有均质性好、纯度高、特异性强、亲和力不变和易于标准化生产等优点,已成为生物领域基础性或应用性研究的一种重要的工具。间接免疫荧光实验具有很高的敏感性,能够充分体现出抗原抗体结合的特异性,并能利用定量技术测定含量,可用于检测多种病原,所以作者选择应用该方法来检测证明 2 株单克隆抗体可用于后续研究。为了提高检测率和准确性,在选取病料时,选择了虹鳟鱼的肝脏组织。

综上所述,本实验旨在制备出有良好特性的单克隆抗体并进行初步检测,为了更深入研究 IPNV 而奠定基础,进而探索检测 IPNV 双抗体夹心 ELISA 法试剂盒的组装以及 IPNV 胶体金试纸条的制备等相关研究内容。

参考文献:

- [1] 王旭,颜其贵,雷燕. 鱼类传染性胰腺坏死病的病毒学特征、诊断及防治研究[J]. 水产科学,2010,29(9):559-562.
- [2] Wolf K, Snieszko S F, Dunbar C E, *et al.* Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,1960,104(1):105-108.
- [3] 周建玲,童裳亮,宫云浩. 用生物素标记寡核苷酸 DNA 探针快速检测鱼传染性胰脏坏死病病毒 IPNV[J]. 水产学报,1995,19(4):310-314.
- [4] 江育林,于平,李正秋. 用酶联免疫吸附试验快速检测虹鳟的传染性胰脏坏死病病毒[J]. 水生生物学报,1990,14(3):276-279.
- [5] 徐晔,段宏安,周毅,等. 实时荧光定量 RT-PCR 检测鱼类传染性胰脏坏死病病毒方法的建立[J]. 安徽农业科学,2011,39(31):19224-19226.
- [6] Calleja F, Godoy M G, Cárcamo J G, *et al.* Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction(real time RT-PCR) assays with Universal Probe Library (UPL) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in Chile [J]. Journal of Virological Methods,2012,183(1):80-85.
- [7] Suebsing R, Kim J H, Kim S R, *et al.* Detection of viruses in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Korea by RT-LAMP assay [J]. The Journal of Microbiology,2011,49(5):741-746.
- [8] 赵丽丽,刘敏,哈卓,等. 传染性胰腺坏死病毒 VP3 蛋白的原核表达及抗原性分析[J]. 水产学报,2010,34(4):604-610.
- [9] Duncan R, Nagy E, Krell P J, *et al.* Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions [J]. Journal of Virology, 1987, 61 (12): 3655 - 3664.
- [10] Böttcher B, Kiselev N A, Stel' Mashchuk V Y, *et al.* Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy [J]. Journal of Virology,1997,71(1):325-330.
- [11] Frost P, Havarstein L S, Lygren B, *et al.* Mapping of neutralization epitopes on infectious pancreatic necrosis virus [J]. Journal of General Virology, 1995,76(Pt 5):1165-1172.
- [12] Heppell J, Tarrab E, Lecomte J, *et al.* Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus [J]. Virology, 1995, 214 (1):40-49.
- [13] 乔薪媛,李桂伟,张冠群,等. 抗猪传染性胃肠炎 M 蛋白单克隆抗体的制备及部分特性鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2007,29(11):874-878.
- [14] 龙云凤,周晓黎,杨俊兴,等. 小反刍兽疫病毒核蛋白单克隆抗体的制备与初步应用[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(4):588-595.
- [15] Hong J R, Gong H Y, Wu J L. IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates mcl-1 and viral protein expression [J]. Virology, 2002,295:217-229.

Preparation and preliminary application of monoclonal antibodies against VP2 COE protein of infectious pancreatic necrosis virus

LIAN Kexun¹, ZHAO Lili¹, ZHANG Linlin², JIA Peng³, TANG Lijie¹,
GE Junwei¹, LI Yijing^{1*}, LIU Min^{2*}

(1. Animal Medical College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

3. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)

Abstract: The recombinant protein IPNV VP2 was used as immunogen after purification by Ni-NTA. The 8-week-old BALB/c mice were intraperitoneally immunized with the VP2 protein for three times, then myeloma cells SP2/0 were fused with the spleen cells of the immunized BALB/c mice. Two hybridoma cell lines against the VP2 protein were obtained by screening with the indirect ELISA and limiting dilution assay, which were identified to be IgG1 subtype and named 5G10, 5F3. The numbers of chromosomes of the two hybridomas were in the range of 75 to 120. Their antibody titers of cells culture supernatant were $1:10^5$, $1:10^2$ respectively. Their titers of ascites were $1:10^8$, $1:10^4$ respectively. Western-blot analysis and indirect immunofluorescence showed that the two McAbs could react with IPNV specificity. The 2 McAbs had no reactive capability with IHNV, VHSV, SVCV and HRV by the indirect ELISA. Antibodies additivity assay demonstrated that 5G10 and 5F3 recognized the different epitopes of IPNV VP2 nucleoprotein. We detected the clinical suffering from IPN rainbow trout liver tissue material, and the results confirmed that the 2 McAbs can be used for follow-up testing.

Key words: infectious pancreatic necrosis virus; recombinant VP2 COE protein; monoclonal antibody

Corresponding author: LIU Min. E-mail: liumin-707@163.com; LI Yijing. E-mail: yijingli@163.com