

文章编号:1000-0615(2009)04-0590-07

锯缘青蟹凝集素的提取及单克隆抗体制备

郝珂^{1,2}, 钱冬², 刘问², 潘清清^{2,3}

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;

2. 浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001;

3. 浙江省三门县海洋与渔业局, 浙江 三门 317100)

摘要:凝集素是无脊椎动物非特异性免疫系统的重要组成成份,可凝集外来病原菌、进行非己识别、调理和介导血细胞吞噬。开展了锯缘青蟹血清凝集素的提取、单克隆抗体制备及凝集素定位研究,以N-乙酰基葡萄糖胺(N-Acetyl-D-glucosamine, GlcNac)为配基制备了Sephrose 4B亲和层析柱,可选择性结合青蟹血清凝集素;青蟹血清通过亲和层析柱后,以0.45 mol/L NaCl洗脱,得到有较高凝集活性的单一洗脱峰,该洗脱峰凝集素比活为血清凝集活性的32.6倍,SDS-PAGE显示存在87 ku和79 ku主要蛋白成分;以纯化青蟹凝集素免疫BALB/c小鼠,经细胞融合、单抗筛选获得BF8-2等7株可稳定分泌抗凝集素单抗的小鼠杂交瘤细胞株,单抗腹水的ELISA效价为 $1:10^4 \sim 1:10^5$;单抗可特异性抑制青蟹凝集素的血凝,血凝抑制效价为 $1:32 \sim 1:64$,亚型鉴定表明7株单抗均为IgG1型,免疫印迹表明单抗可特异性结合87 ku、79 ku蛋白;采用凝集素单抗间接免疫荧光法进行了青蟹血淋巴细胞染色,结果显示凝集素主要分布于颗粒细胞的细胞质颗粒和透明细胞的细胞膜上。

关键词:锯缘青蟹;凝集素;亲和层析;单克隆抗体;间接免疫荧光

中图分类号:S 917

文献标识码:A

凝集素(lectin)是一类对特定细胞多糖具有结合亲和力的、能选择性凝集脊椎动物血细胞和某些微生物细胞、多价构型的热敏蛋白或糖蛋白复合物^[1]。近年来研究发现,凝集素在无脊椎动物非特异性免疫系统中占有重要地位,可选择性凝集外来病原菌和复杂碳水化合物,对外来入侵物起进行非己识别,调理和介导血细胞吞噬外来物质,协同其他免疫因子抵御外来病原入侵^[2]。研究凝集素对阐释甲壳类免疫机理、指导病害防治有重要的意义。

目前对鲎(*Tachypleus tridentatus*)、白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*)凝集素的研究较为系统,已发现了不同结合特性的鲎凝集素,主要养殖对虾的凝集素基因也先后得到克隆或表达^[5];锯缘青蟹(*Scylla serrata*)凝集素提取已有相关报道^[6-7]。近年来青蟹养殖受到各种病害的威胁,凝集素作

为青蟹重要的非特异免疫因子,在青蟹抗感染免疫及免疫增强剂的研究中有重要作用。作者在前期工作的基础上^[8]用亲和层析法开展了青蟹凝集素的提取,并采用初步纯化凝集素制备了的小鼠单克隆抗体,以期对青蟹凝集素的进一步研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物 锯缘青蟹购于浙江省三门县青蟹市场,体重(150 ± 20) g;实验用BALB/c、ICR小鼠、新西兰兔购于浙江省实验动物中心。

实验药品与试剂 N-乙酰基葡萄糖胺(N-Acetyl-D-glucosamine, GlcNac),聚乙二醇(PEG),福氏完全佐剂,不完全佐剂为Sigma产品;CNBr活化Sephrose 4B为Pharmacia产品;

收稿日期:2008-08-17 修回日期:2008-11-03

资助项目:浙江省重大科技攻关项目(2005C12038);浙江省自然科学基金(Y307479)

通讯作者:钱冬, E-mail: qdomonas@163.com

HT, HAT, DMEM 培养基购自 Gibco; 亚型测定试剂盒 (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, PNPP) 为 Southern Biotech 产品; 羊抗鼠 IgG-AP, IgG-HRP, IgG-FITC, 邻苯二胺 (OPD), NBT/BCIP 显色试剂盒购自华美公司; 新生牛血清 (FCS) 购自杭州四季青公司; 其他药品均为国产分析纯; Alserver 氏液、Tris-HCl, PBS 等常用试剂等按文献[9]配制。

主要仪器 BioRad BioLogic LP 中低压层析系统; BioRad SmartSpec 3000 核酸蛋白测定仪; Bio-Rad model 550 酶标仪。垂直电泳和电转仪为 BioRad 产品; 荧光显微镜 XSZ-HS7 为重庆光学仪器厂产品。

1.2 锯缘青蟹血清的制备

用注射器在锯缘青蟹步足关节柔软处抽取血淋巴液, 4 °C 过夜析出血清, 8 000 r/min 离心 5 min, 吸取上层血清, -20 °C 保存备用。

1.3 青蟹凝集素的提取

以 1 mmol/L HCl 溶胀 CNBr 活化的 Sepharose 4B 粉末, 10 倍体积液体清洗凝胶后, 与 200 mmol/L N-乙酰基葡萄糖胺混合 4 °C 过夜。以 1 mol/L 二乙醇胺封闭 2 h, 以 0.05 mol/L Tris-HCl (含 1 mol/L NaCl pH 8.0) 和 0.05 mol/L 甘氨酸缓冲液 (含 1 mol/L NaCl, pH 3.5) 交替冲洗 8 次后装柱, 以 10 倍柱床体积 0.05 mol/L Tris-HCl (含 0.15 mol/L NaCl, pH 7.2) 冲洗凝胶。

亲和层析在 BioRad 低压层析系统中进行, 2 mL 锯缘青蟹血清上样后, 以 0.05 mol/L Tris-HCl, 流速 1.5 ~ 2 mL/min 洗脱杂蛋白, 至 A. U. 280 nm 小于 0.005, 以 0.05 mol/L Tris-HCl (含 0.45 mol/L NaCl, pH 8.0) 洗脱并收集洗脱峰, 测定各管洗脱峰蛋白浓度, 同时用小鼠血细胞检测各管血凝效价, 合并血凝效价较高的蛋白峰作为纯化凝集素保存备用。

1.4 小鼠免疫

以纯化凝集素加等体积弗氏完全佐剂充分乳化后, 腹腔、皮下多点注射免疫 BALB/c 小鼠, 剂量为每只 30 μg; 以后每隔两周以弗氏不完全佐剂乳化凝集素, 同上注射小鼠加强免疫, 免疫剂量分别为 50 μg、100 μg, 融合前 3 d 以每只 200 μg 腹腔注射加强免疫。

1.5 细胞融合与单抗筛选

断颈处死小鼠后无菌取小鼠脾脏, 制备细胞悬液, 与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 以 4:1 比例混合后, 37 °C 水浴中, 逐滴加入 1 mL 37 °C 预热的聚乙二醇 (PEG); 静置 30 s 后, 以 DMEM 稀释终止反应, 静置 10 min; 800 r/min 离心, 以含 HAT、20% FCS 的 DMEM 重悬, 加入铺有饲养细胞的培养板中, 37 °C, 5% CO₂ 培养。

以间接 ELISA 方法检测培养上清, 筛选阳性孔, 以有限稀释法对阳性孔杂交瘤细胞进行单克隆化培养, 筛选得到阳性单克隆细胞株, 并制备小鼠腹水。

1.6 间接 ELISA 试验

以 10 μg/mL 纯化凝集素包板, 每孔 100 μL, 4 °C 过夜; 以 200 μL 1% BSA 37 °C 封闭 1 h, PBST (0.05% Tween-20) 洗涤 3 次; 加入待检上清 100 μL, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗 3 次; 加入羊抗鼠 IgG-HRP 抗体 (1:1 000) 100 μL, 37 °C 反应 1 h 后 PBST 洗 3 次, 加入邻苯二胺 (OPD) 显色, 10 min 后以 2 mol/L H₂SO₄ 终止。测定各孔 OD_{490nm}。

1.7 单抗亚型的鉴定

采用 Southern Biotech 小鼠单抗亚型鉴定盒鉴定各单亚型, 方法简述如下: 纯化凝集素以 10 μg/mL 包板, 加入待测单抗腹水, 37 °C 孵育 1 h 后, 加入 Southern Biotech 羊抗鼠各亚型 (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM) 碱性磷酸酶标记抗体; 37 °C 孵育 1 h 后, 以 PNPP 为底物显色, 测定 OD_{405nm}。

1.8 单抗的 Western-blotting

参考文献[9]的方法制备 0.75 mm 不连续 SDS-PAGE 胶, 浓缩胶 4%, 分离胶 12%; 分别进行还原条件与非还原条件 (上样缓冲液中不含巯基乙醇等强还原剂, 不煮沸) 下的 SDS-PAGE 电泳, 恒压 90 V 电泳。电泳后 20 V 半干转印至醋酸纤维膜上。以 10% 脱脂奶封闭过夜, 以制备单克隆抗体为一抗, IgG-AP 为二抗, NBT/BCIP 显色^[10]。

1.9 单抗的凝集抑制实验

单抗腹水用 TBS (0.05 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.2) 作 2 倍梯度稀释, 锯缘青蟹血清以 TBS 稀释至 4 个凝集单位, 37 °C 温

育1 h,加入2%(V/V)小鼠血细胞,观察记录血球凝集效价^[11]。

1.10 血淋巴细胞的间接免疫荧光染色

Alserver 氏液抗凝抽取青蟹血淋巴液后,3 000 r/min 离心 5 min 得到血淋巴细胞,生理盐水离心清洗 3 次后涂片干燥,冰甲醇固定 10 min 后,按文献^[12]间接免疫荧光染色。

2 结果

2.1 血清凝集素的提取

利用 GlcNAc 连接 Sepharose 4B 亲和层析柱吸附结合锯缘青蟹血清凝集素,采用 0.05 mol/L Tris-HCl(含 0.45 mol/L NaCl,pH 8.0)洗脱并收集洗脱峰,可见洗脱曲线呈单一峰(图 1)。比较各洗脱峰的血凝效价,结果表明 0.45 mol/L NaCl 洗脱峰的凝集比活达 4 173.9 U/mg 蛋白,为青蟹

血清的 32.6 倍(表 1)。对洗脱产物进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯蓝 R-250 染色,用 BandScan 软件计算分子量。由图 2 可见,洗脱峰在非还原条件下 SDSP-AGE 电泳结果显示 150 ku、87 ku 和 79 ku 3 条带,巯基乙醇处理后还原条件下显示 87 ku、82 ku、79 ku、和 75 ku 4 条带。

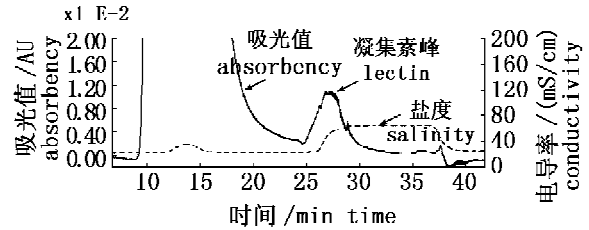


图 1 锯缘青蟹血清凝集素洗脱曲线
Fig.1 Elution curve of hemolymph lectin of *S. serrata*

表 1 锯缘青蟹血清凝集素提取结果
Tab.1 Purification of hemolymph lectin of *S. serrata*

	总蛋白(mg) total protein	体积(mL) volume	凝集活力(U) hemagglutinating activity	总活力(U) total activity	比活力(U/mg) specific activity	浓缩倍数 purification fold
血清 serum	80	0.5	512	10 240	128	—
洗脱产物 eluted products	0.23	3	8	960	4 173.9	32.6

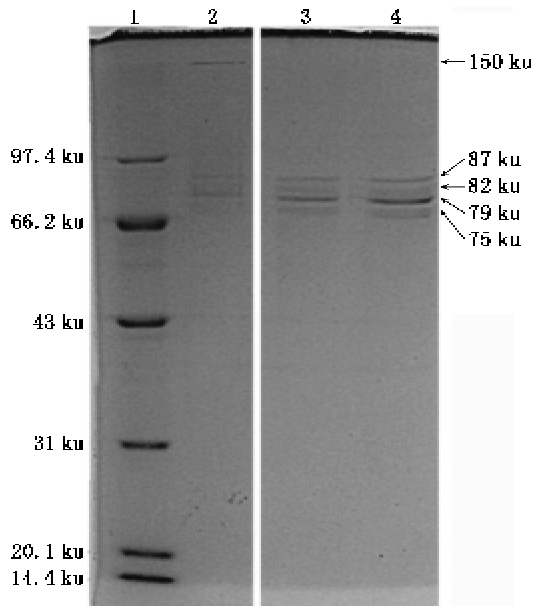


图 2 锯缘青蟹血清凝集素 SDS-PAGE 电泳
1. 蛋白质 Makers;2. 非还原条件下;3,4. 还原条件下
Fig.2 SDS-PAGE of hemolymph lectin of *S. serrata*
Lane 1. protein markers; Lane 2. non-reducing condition; Lane 3, 4. reducing condition

2.2 单克隆抗体效价及亚型鉴定

阳性克隆经两次单克隆化培养后,制备单抗小鼠腹水,以间接 ELISA 方法检测小鼠腹水抗体对凝集素的效价,各单抗腹水 ELISA 效价基本在 1:10⁴ ~ 1:10⁵ (表 2)。用 Southern Biotech 小鼠单抗亚型鉴定盒鉴定各单亚型均为 IgG1。

表 2 单克隆抗体效价及亚型
Tab.2 The titers of ELISA and the subtypes of mAbs

单抗 mAbs	ELISA 效价 titers of ELISA	亚型 isotype
BF8-2	1:10 ⁴	Ig G1
BE8-2	1:10 ⁵	Ig G1
BF8-2-3	1:10 ⁵	Ig G1
EG4-4	1:10 ⁵	Ig G1
EG7-1	1:10 ⁵	Ig G1
GD4-2	1:10 ⁴	Ig G1
GD4-1	1:10 ⁴	Ig G1

2.3 单克隆抗体 Western-blotting 结果

青蟹纯化凝集素在还原和非还原条件下进行电泳,经单抗结合的 Western-blotting 结果见图

3, 由图可见, 还原或非还原条件下, 单克隆抗体均可结合 87 ku 和 79 ku 两条带, 但对非还原条件下的 150 ku 和还原条件下的 82 ku、79 ku 条带无结合能力, 用阴性对照血清代替单抗进行 Western-blotting, 未发现免疫印迹条带, 表明反应有良好的特异性。

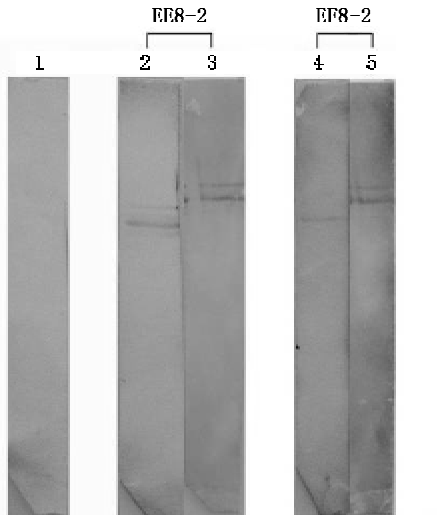


图3 抗凝集素单克隆抗体 Western-blotting 结果
1. 阴性血清对照; 2. 还原条件下 EE8-2; 3. 非还原条件下 EE8-2; 4. 还原条件下 BF8-2; 5. 非还原条件下 BF8-2

Fig. 3 Western-blotting of mAbs against lectin of *S. serrata*

1. negative serum control; 2. EE8-2 under reducing condition; 3. EE8-2 under non-reducing condition; 4. BF8-2 under reducing condition; 5. BF8-2 under non-reducing condition

2.4 单抗的凝集抑制作用

挑选效价较高的 3 株单抗进行凝集抑制实验, 结果见表 3, 由表可见: 单抗腹水 BF8-2、BF8-2-3、EG4-4 均有明显的凝集抑制效果, 其中 BF8-2-3、EG4-4 的凝集抑制效价为 1:64; 正常小鼠血清在 1:2 时可产生微弱的非特异性凝集抑制, TBS 本身不存在对青蟹血清的凝集抑制现象。结果表明本文制备抗凝集素单抗可结合凝集素活性位点, 产生对青蟹凝集素的凝集活性抑制作用。

表 3 单抗抑制实验结果

Tab. 3 Monoclonal antibody inhibition of *S. serrata*

单抗 mAbs	稀释倍数 dilution						
	2	4	8	16	32	64	128
TBS	+	+	+	+	+	+	+
阴性血清 negative control	-	+	+	+	+	+	+
BF8-2	-	-	-	-	-	+	+
EG4-4	-	-	-	-	-	-	+
BF8-2-3	-	-	-	-	-	-	+

2.5 血淋巴细胞间接免疫荧光染色

用抗凝集素单抗对青蟹血淋巴细胞进行免疫荧光染色, 结合血淋巴细胞的常规染色, 确定不同类型血淋巴细胞的凝集素情况, 结果表明: 青蟹颗粒细胞表明及胞内均有强烈的荧光, 大、小颗粒细胞基本相同; 透明细胞的细胞膜表面有较强荧光, 细胞内部无荧光。表明青蟹凝集素存在于颗粒细胞的细胞膜、细胞质及细胞颗粒中, 而青蟹透明细胞的凝集素主要分布胞膜表面(图 4)。

3 讨论

近年来, 随着对甲壳动物非特异免疫机理研究的深入, 甲壳类凝集素愈来愈受到研究者的关注。目前已经从甲壳类中成功提取了多种凝集素, 已经报道的有中国对虾 (*Penaeus chinensis*)、中国明对虾 (*Farmeropenaeus chinensis*)、白滨对虾凝集素的提纯和特性^[4, 13-14], 蟹的凝集素也是研究得比较系统的, Kawabata 等^[5]报道从蟹提纯得到 5 种不同结合特性的凝集素。对于蟹类凝集素研究相对较少, 锯缘青蟹凝集素先后有分子量为 55 ku 凝集素的分离^[6]以及分子量 70 ku 的青蟹凝集素^[7]。其他蟹类未见凝集素提取纯化的相关报道。目前凝集素纯化方法有凝胶层析、离子交换、亲和层析等^[15], 近年来根据凝集素的结合特性, 较多采用亲和层析的方法。

作者前期研究结果发现锯缘青蟹血清凝集素对小鼠血细胞有较强凝集活性, 且凝集能为 N-乙酰基葡萄糖胺 (GlcNac) 阻断^[8], 表明 GlcNac 可与青蟹凝集素特异性结合。采用 GlcNac 为配基, 与 CNBr 活化的 Sepharose 4B 凝胶交联建立了青蟹凝集素亲和层析提纯方法。结果表明, GlcNac 交联的凝胶对青蟹凝集素有良好的特异性结合力; 亲和层析, 使用 0.4 ~ 0.5 mol/L NaCl Tris-HCl 进行洗脱, 呈单一洗脱峰, 且洗脱峰有较高凝集活性, 每毫克蛋白的凝集比活力为青蟹血清的 32.6 倍, 表明该方法可较好地应用于青蟹凝集素的提取。在凝集素提取基础上, 作者以纯化凝集素为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 通过细胞融合成功制备了 7 株小鼠抗凝集素单克隆抗体, ELISA 效价为 1:10⁴ ~ 1:10⁵, Western-blotting 结果表明单抗可与 87 ku、79 ku 两个蛋白结合; 单抗可有效抑制青蟹凝集素的血凝作用, 表明单抗与凝集素存在结合, 通过空间位阻效应或直接结合活性中心,

影响凝集素与糖基的结合,抑制凝集素对红细胞的凝集作用。本文成功制备了首个针对青蟹凝集

素单抗,对今后青蟹凝集素的系统研究提供了重要的基础。

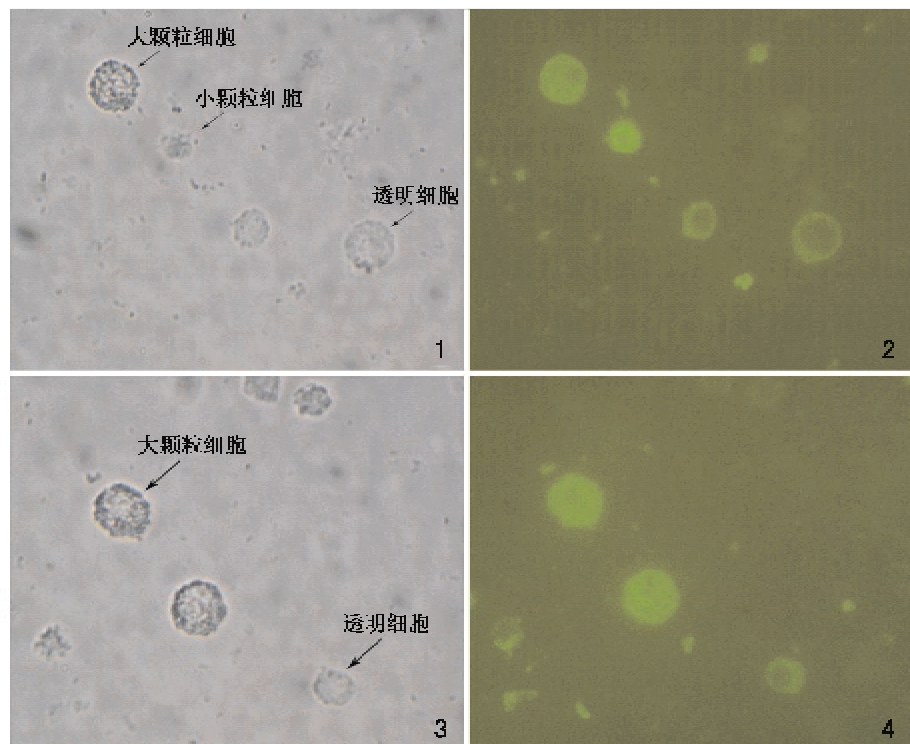


图4 锯缘青蟹血淋巴细胞免疫荧光染色

1,3 为明视场下锯缘青蟹血淋巴细胞;2,4 紫外激发下对应锯缘青蟹血淋巴细胞

Fig. 4 The indirect immunofluorescence of haemocytes of *S. serrate*

1, 3. haemocytes of *S. serrate* in bright-field; 2, 4. corresponding haemocytes in UV activated

关于锯缘青蟹凝集素的分子特性,不同作者报道结果上存在较大差异,推测可能与采用方法不同有关。Mercy 等^[6]报道青蟹凝集素分子由为 55 ku,由 30 ku、25 ku 两个亚基组成,对 N-乙酰神经氨酸有特异性结合;Kongtawelert^[7]采用牛下额蛋白(BSM)亲和层析,以甘氨酸洗脱得到分子量为 70 ku 的凝集素。笔者以 N-乙酰葡萄糖胺为配基,经亲和层析、0.5 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 洗脱得到有很高凝集比活的单一洗脱峰。参照 SDS-PAGE 电泳方式^[6],将洗脱产物在添加巯基乙醇下煮沸,还原条件下 SDS-PAGE 电泳后得到 4 个条带:87 ku、82 ku、79 ku、75 ku,且 87 ku、79 ku 为主要蛋白组分;在未经巯基乙醇处理的非还原条件下 SDS-PAGE 得到 150 ku、87 ku、79 ku 3 个条带;免疫印迹结果显示,单抗能同时与 87 ku 和 79 ku 两条带结合,说明这两种蛋白存在相同的抗原决定簇;同时单抗抑制凝集实验的结果也

显示,单抗能特异性的抑制青蟹血清对小鼠血细胞的凝集,故可以认为 87 ku 和 79 ku 的蛋白在血清中起到凝集作用,为锯缘青蟹血清凝集素的主要成分。此两个凝集素蛋白是具有相同结构特性但活性不同的凝集素,或者为凝集素的存在前体和活性两种形态,还有待进一步研究。电泳结果也提示,150 ku 的蛋白由多亚基组成。由于非还原状态下 SDS-PAGE 中,不含强还原剂,蛋白质未完全变性,蛋白质空间结构的差异会一定程度上影响电泳迁移率,作者只能对蛋白质分子量作大概的计算。150 ku 的亚基组成和各亚基分子量需要通过层析等方法分离后采用质谱等手段进行进一步的研究阐明。

作者采用凝集素单抗间接免疫荧光染色对锯缘青蟹血淋巴细胞进行了凝集素的分布分析,结果表明:大颗粒细胞、小颗粒细胞透明细胞的凝集素分布不同;大颗粒和小颗粒细胞内部颗粒呈强

烈荧光,而透明细胞荧光主要集中在细胞膜表面。不同类型血淋巴细胞的凝集素分布差别可能与淋巴细胞的免疫功能有关,透明细胞主要参与凝集和吞噬等功能^[16],膜表面凝集素在免疫过程中起非己识别作用,有利于凝集和吞噬进行;颗粒细胞的大量颗粒主要为对外来入侵物刺激下,将颗粒中凝集素等防御因子释放到血淋巴液中,增强青蟹对外界病原入侵的抵抗能力。不同类型细胞的凝集素分布差异,为认识不同血淋巴细胞在青蟹抗感染免疫中作用提供了重要启示。

参考文献:

- [1] 孙册,朱政,莫汉庆.凝集素[M].北京:科学出版社,1986:1-5.
- [2] Iwanaga S, Lee B L. Recent Advances in the innate immunity of invertebrate animals [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 33(2): 128-150.
- [3] Kawabata S, Iwanaga S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23: 391-400.
- [4] Alpuche J, Pereyra A, Agundis C, et al. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea, decapoda) hemolymph [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1724: 86-93.
- [5] Sun J, Wang L, Wang B, et al. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2007, 23(2): 292-299.
- [6] Mercy S P D, Ravindranath M H. Purification and characterization of N-glycolylneuraminic-acid-specific lectin from *Scylla serrata* [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 215: 697-704.
- [7] Kongtawelert P. Isolation and characterization of lectin from Thai marine crab (*Scylla serrata*) with binding specificity to sialoglycoconjugates and its application [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998, 7(4): 280-286.
- [8] 郝珂,钱冬,刘问,等.锯缘青蟹血清凝集素的特性和盐析提取研究[J]. *淡水渔业*, 2008, 38(4): 7-11.
- [9] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 360-364.
- [10] 哈洛 E, 莱恩 D. 抗体技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 177-185.
- [11] 戴华生. 新实验病毒学[M]. 北京: 中国学术出版社, 1983: 723-769.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1006-1007.
- [13] 彭其胜, 郭文场, 杨振国. 中国对虾血淋巴液中的凝集素[J]. *中国水产科学*, 2001, 7(4): 14-18.
- [14] 孙杰, 王雷, 王宝杰, 等. 中国明对虾乙酰基专一性凝集素分离纯化方法的研究[J]. *高技术通讯*, 2007, 17: 83-87.
- [15] 孙杰, 安利国, 王雷, 等. 甲壳纲动物凝集素的结构特征和分离纯化方法[J]. *海洋科学*, 2006, 30(6): 73-76.
- [16] 姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能[J]. *动物学研究*, 2006, 27(5): 549-557.

Isolation and preparations of monoclonal antibodies against lectin from mud crab, *Scylla serrata*

HAO Ke^{1,2}, QIAN Dong², LIU Wen², PAN Qing-qing^{2,3}

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China;

3. Sanmen Bureau of Ocean and Fisheries, Sanmen 317100, China)

Abstract: Lectin plays an important role in non-specific immunity of invertebrates by including bacterial agglutination, nonself-recognition, as opsonin and enhancing cell phagocytosis. In this paper, the author reported the purification and monoclonal antibodies (mAbs) preparation of lectin from mud crab, *Scylla serrata*, as well as the application of mAbs for lectin location by indirect immunofluorescence. Lectin was isolated from hemolymph of mud crab by affinity chromatography using Sepharose 4B coupled with N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNac) which could specifically bind to mud crab lectin. The serum of *S. serrata* was applied to the column and the lectin binding to the column could be eluted by 0.45 mol/L NaCl Tris-HCl buffer with a single peak. The agglutinating specific activity of elution peak was equated 32.6 times of original serum, and SDS-PAGE showed the two main components of lectin with 87 ku and 79 ku. Seven hybridoma cell lines named BF8-2 etc., secreting antibodies against mud crab lectin, were prepared by hybridoma technique. Ascitic fluids of mAbs were 1:10⁴ – 1:10⁵ titers of indirect-ELISA by coated purified lectin. The mAbs could inhibit the hemagglutination of mud crab lectin with 1:32 – 1:64 titers. The Ig isotype for all seven mAbs were IgG1. The Western blots displayed that the mAbs specifically binded to the bands of 87 ku and 79 ku. Haemocytes of *S. serrata* were used for location of lectin by using indirect immunofluorescence technology; the results suggested that lectin is mainly distributed in the granules of granule hemocyte and the membrane of hyaline hemocyte.

Key words: *Scylla serrata*; lectin; affinity chromatography; monoclonal antibody; indirect immunofluorescence