

草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 VP4 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

曾伟伟, 王庆, 王英英, 石存斌, 吴淑勤*

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部渔用药物创制重点实验室,
广东省免疫技术重点实验室,广东 广州 510380)

摘要: 为了建立针对草鱼呼肠孤病毒(GCRV)流行株的血清学检测方法,实验构建了能高效表达 GCRV HZ08 株主要衣壳蛋白 VP4 的重组表达载体 pET32a-S6,利用纯化的 VP4 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞融合,经过克隆和筛选,获得 3 株能稳定分泌抗 VP4 重组蛋白单克隆抗体(monoclonal antibody, MAb)的杂交瘤细胞,分别命名为 2C2、2F3 和 5E5。抗体经亚型鉴定均为 IgG1,轻链为 κ 链;间接 ELISA 试验证明,3 株杂交瘤细胞分泌的 MAb 可特异性识别 GCRV-HZ08,与 GSRV, ISKNV, IHNV 均无交叉反应。选择 2C2 作为腹水生产细胞株,免疫小鼠后腹水 ELISA 效价为 1:720 000;IFA 和 Western-blotting 结果显示,这株杂交瘤细胞分泌的 MAb 能够特异性识别 GCRV-HZ08 病毒粒子。本实验制备的 MAb 具有良好的生物学特性,为 GCRV 流行株血清学检测方法的建立及 VP4 蛋白相关功能研究奠定了基础。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒; VP4 蛋白; 单克隆抗体

中图分类号: Q 511; S 917.1

文献标志码: A

GCRV 隶属于水生呼肠孤病毒属,为呼肠孤病毒科一新成员,是中国大陆分离的第一株鱼类病毒^[1-2]。该病毒主要引起中国、越南、缅甸等亚洲国家淡水养殖中的草鱼(*Ctenoparyngodon idellus*)品种在鱼种阶段发生出血病,死亡率一般为 30%~50%,最高可达 60%~80%,而且还能感染青鱼、麦穗鱼等,使其发生出血病症状而死亡。该病毒流行广、危害大、死亡率高、发病季节长,严重影响了广大养殖者的积极性和我国淡水养殖业的健康发展^[1-3]。草鱼呼肠孤病毒具双层衣壳,病毒粒子平均直径为 60~70 nm,二十面体对称,无囊膜,基因组由 11 条分节段的双链 RNA 组成。目前已经报道了近 20 个分离株,包括 GCRV854、GCRV861、GCRV873、GCRV875、GCRV876、GCRV991、H962、ZV-8802、GCRV HZ08、JX09-01、GCRV-104、GD10 等,不同分离株在基因组序列、基因组带型、细胞病变、对草鱼的致病力等方面差异较大^[4-8]。

GCRV-HZ08 株为从浙江湖州分离到的一个新毒株,于 2009 年已完成全基因组测序^[6],并进行了较为系统的研究^[8-10]。初步的流行病学调查分析表明,目前导致草鱼出血病流行的草鱼呼肠孤病毒,在核苷酸序列和推导的氨基酸序列同源性上,多数和 HZ08 株比较相似^[11]。当前草鱼出血病的防治工作任务非常艰巨,主要是对疫情要早发现、早确诊、早控制、早防疫,而关键问题之一是早确诊,也就是草鱼出血病病毒的快速检测技术问题,只有建立快速、敏感、特异的草鱼出血病诊断技术并应用到实际防治工作中去,才能真正解决“一线”急需。

GCRV-HZ08 株 S6 基因编码的 VP4 蛋白可能为病毒的主要外衣壳蛋白,对 S6 编码蛋白的二级结构、亲水性、柔性区、抗原性进行预测显示,其抗原性区域和亲水性区域主要分布在两端,较大的柔性区也分布在两端,在 C 端有一个很显著的抗原区域。目前,对于 HZ08 株 S6 编码蛋白的功

收稿日期:2012-11-03 修回日期:2012-12-24

资助项目:国家科技支撑计划(2012BAD25B02);国家自然科学基金项目(31202026);公益性行业(农业)科研专项(200803013)

通信作者:吴淑勤, E-mail: wushuqin001@21cn.com

能仅仅是通过分析和推测得出,其实际功能还有待于进一步研究和验证。单克隆抗体只识别一种表位(抗原决定簇)的抗体,来自单个 B 淋巴细胞的克隆或一个杂交瘤细胞的克隆。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^[12-14],也被用于鱼类病毒的结构蛋白分析与定位^[15-16]。本实验对草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 S6 基因编码的 VP4 蛋白进行了原核表达、纯化、制备其单克隆抗体,并对制备的单克隆抗体部分特性进行了鉴定,为草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株型的快速、灵敏、特异的检测技术研制及 VP4 蛋白的相关功能的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞及血清

pET-32a、SP2/0 均为本实验室保存;ISKNV、IHNV 和 GCRV-HZ08 株由本实验室分离并保存;GSRV 购自 ATCC,CIK 细胞购自武汉大学细胞典藏中心;蛋白 GCRV-HZ08 VP4 阳性血清由本实验室制备;大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)感受态细胞购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG、FITC 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记羊抗鼠 IgG、HAT、HT、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂和 PEG3350 均购自 Sigma 公司;IgG 抗体亚类鉴定试剂盒购自 Southern Biotech 公司;胎牛血清、DMEM-20 完全培养基购自 Gibco 公司;预染蛋白质 Marker 购自 fermentas 公司。

1.3 实验动物

6 周龄 SPF 雌性 BALB/c 小鼠购自广东省实验动物中心。

1.4 重组蛋白的表达及纯化

将重组质粒 pET32a-S6 转化 *E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞,培养至菌体 A_{600} 值为 0.6 左右时,以终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 于 37 $^{\circ}$ C 条件下诱导表达。将重组菌大量诱导表达后,离心收集菌体,用含 8 mol/L 尿素的 PBS 将沉淀悬起,超声波破碎 30 min;破碎后的上清用 HisTrapTM 试剂盒(购自 Novagen 公司)纯化重组蛋白,按说明书操作。收集各步洗脱液进行 SDS-

PAGE 检测蛋白纯化效果。

1.5 间接 ELISA 方法的建立

用纯化的草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株作为检测抗原,按常规间接 ELISA 操作步骤^[17]采用方阵滴度法确定抗原最佳包被浓度,试验重复 3 次,建立用于抗 VP4 蛋白血清及单抗效价检测的间接 ELISA 方法。pH 9.6 的碳酸盐缓冲液倍比稀释抗原,TMB 底物显色。以 450 nm 单波长测定各孔 OD 值,以与阴性对照孔 OD 值的比值(P/N)大于 2.1 为限,作为判断为阳性或确定效价的临界点。

1.6 动物免疫

用纯化的 VP4 重组蛋白皮下多点免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠,每只小鼠免疫的蛋白量均为 100 μ g,共免疫 3 次,其中第一次加等量弗氏完全佐剂,后 2 次加等量弗氏不完全佐剂,第 3 次免疫 14 d 后尾静脉采血,分离血清,ELISA 方法测定效价,5 d 后加强免疫。

1.7 杂交瘤细胞株的克隆与筛选

将骨髓瘤细胞 SP2/0 与免疫小鼠脾细胞按 1:1 的比例混合,在 50% PEG 3350 的作用下按常规方法进行融合^[18],用含 HAT 的 DMEM-20 完全培养基进行筛选。待融合细胞生长至培养孔底面积的 1/4 ~ 1/3 时,采用间接 ELISA 方法进行检测,选择 ELISA 检测为阳性且效价较高的细胞进行克隆纯化。克隆纯化按有限稀释法进行,连续克隆 3 ~ 5 次,直至杂交瘤细胞孔抗体阳性率达到 100%。

1.8 单抗亚类鉴定

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

1.9 单抗腹水制备及效价测定

按常规方法进行单克隆抗体的腹水的制备^[18]。以建立的间接 ELISA 方法分别检测杂交瘤细胞上清和小鼠腹水单克隆抗体效价。

1.10 抗体特异性鉴定和纯度检测

分别以 GCRV-HZ08、GSRV、ISKNV、IHNV 包被酶标板,间接 ELISA 法对 3 株单抗的特异性进行检测,将 SP2/0 细胞培养上清作为阴性对照,P/N \geq 2.1 判为阳性反应。

以硫酸铵沉淀和凝胶过滤层析法对其中 1 株杂交瘤细胞(2C2)制备的腹水进行纯化,参照文献^[18]的方法进行。

1.11 Western-blotting 分析

将表达的重组蛋白和纯化的 GCRV HZ08 株病毒制样进行 SDS-PAGE 后,电转印于硝酸纤维素膜(NC)上,用 5% 的脱脂奶粉溶液将 NC 膜 4 °C 封闭过夜,37 °C 下与 1:100 稀释的小鼠腹水单克隆抗体孵育 1 h,再用 PBST 洗涤 3 次,加入用 PBST 1:1 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(购自 SIGMA 公司),温和振荡结合 1 h;PBST 洗涤 3 次,加入 DAB 显色液显色 5 min 后转入 PBST 缓冲液终止显色。

1.12 间接免疫荧光试验

在 48 孔板中培养单层的 CIK 细胞,GCRV-HZ08 接毒 96 h 后,以 0.01 mol/L PBST 洗涤 2 次,用预冷的甲醇固定 20 min,PBS 洗涤 2 次,每次 5 min;加入一抗(小鼠腹水单克隆抗体),37 °C 孵育 60 min,PBST 洗 3 次,每次 5 min;然后加羊抗鼠 IgG-FITC 标记抗体(1:1 000,稀释液为含 2% BSA 的 PBS),37 °C 作用 60 min,PBST 洗 3 次;以 50% 甘油-PBS 封片镜检,荧光倒置显微镜(Nikon,Eclipse Ti-S)观察结果,阴性抗原对照为正常 CIK 细胞。

2 结果

2.1 重组蛋白的表达与纯化

将阳性重组质粒 pET32a-S6 转化大肠杆菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导,SDS-PAGE 电泳结果显示,在约 51 ku 处有一条特异的蛋白条带,与预期的蛋白分子质量大小一致,目的蛋白的表达量占细菌总蛋白主要部分,而且目的蛋白主要在沉淀中,即目的蛋白主要以包涵体的形式存在(图 1)。重组菌大量诱导表达后,离心收集菌体,超声波破碎 30 min,离心收集沉淀、用含 8 mol/L 尿素的 PBS 将沉淀悬起对包涵体形式的蛋白进行变性处理后离心,上清用 HisTrapTM 试剂盒纯化重组蛋白,纯化后的目的蛋白条带单一无明显杂带,纯度很高,SDS-PAGE 电泳仅显示单一的目条带(图 1)。

2.2 间接 ELISA 检测方法的建立

经方阵滴定法,确定 VP4 蛋白的最佳包被质量浓度为 2 μg/μL,最佳封闭条件 37 °C 封闭 2 h,杂交瘤细胞培养上清、腹水/单克隆抗体的作用时间为 1.5 h,HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 工作滴度为 1:5 000,工作时间为 30 min,TMB 底物显色时间约为 15~30 min(表 1)。

2.3 杂交瘤细胞株的建立

骨髓瘤细胞 SP2/0 与免疫鼠脾细胞融合后经 HAT 进行筛选,共筛选出 3 株可高效、稳定分泌抗 VP4 抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 2C2、2F3 和 5E5,其中 2C2 株杂交瘤细胞分泌的抗体效价较高,用纯化蛋白免疫 BALB/c 小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,HAT 选择性培养液筛选。用建立的间接 ELISA 方法筛检,阳性孔经 4 次克隆纯化,最终获得 3 株能够稳定分泌 MAb 的杂交瘤细胞株。

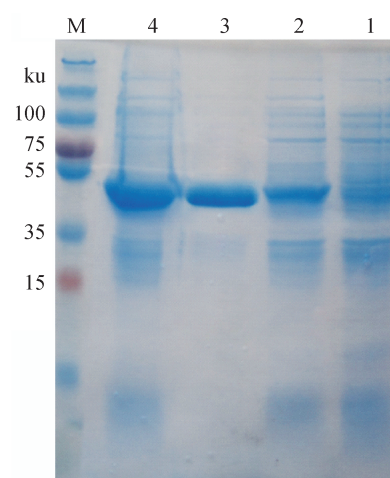


图 1 VP4 重组蛋白表达与纯化结果

1. 上清中的总蛋白; 2. 沉淀中的总蛋白; 3. 纯化后的蛋白; 4. 菌体总蛋白; M. 低分子量蛋白 Marker。

Fig. 1 The result of VP4 protein expression and purification

1. total protein in the supernatant; 2. total fusion protein; 3. the purified protein; 4. total bacterial protein; M. low molecular weight marker.

表 1 杂交瘤细胞上清及腹水的抗体效价 OD₄₅₀
Tab. 1 The antibody titer of the hybridoma cells supernatant and ascites (OD₄₅₀)

杂交瘤细胞株 hybridoma cells	ELISA 效价 titers of ELISA	
	细胞上清 cells supernatant	腹水 ascites
2C2	1:5 120	1:51 200
2F3	1:1 280	1:25 600
5E5	1:2 560	1:25 600

2.4 单克隆抗体亚型鉴定

抗体亚类鉴定结果表明,所获得的 3 株 MAb 均为 IgG1 亚类,轻链为 kappa 链(表 2)。

表 2 单克隆抗体亚型鉴定结果 (OD₄₅₀)Tab.2 The result of subtype identification of monoclonal antibody against GCRV-HZ08 (OD₄₅₀)

杂交瘤细胞株 hybridoma cells	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA	Kappa	Lamda
2C2	1.637	0.047	0.046	0.042	0.047	0.046	1.381	0.045
2F3	1.290	0.043	0.049	0.080	0.057	0.048	0.628	0.055
5E5	0.808	0.051	0.050	0.050	0.060	0.056	0.618	0.049

2.5 单克隆抗体特异性鉴定

间接 ELISA 法测定结果显示,3 株杂交瘤细胞分泌的单抗均可与 GCRV-HZ08 结合,而与

GSRV、ISKNV 和 IHNV 均未发生交叉反应,表明其具有良好的特异性(表 3)。

表 3 单克隆抗体的特异性检测结果 (OD₄₅₀)Tab.3 Specificity of monoclonal antibodies against the GCRV-HZ08 (OD₄₅₀)

杂交瘤细胞株 hybridoma cells	GCRV-HZ08	GSRV	ISKNV	IHNV	阴性对照 negative control
2C2	2.875	0.271	0.213	0.217	0.142
2F3	3.123	0.281	0.246	0.186	0.135
5E5	3.034	0.283	0.208	0.201	0.164

2.6 单克隆抗体的纯化

经辛酸-饱和硫酸铵法纯化的单抗经 SDS-PAGE 电泳后,在约 55 ku 和 26 ku 处可见 2 条清晰条带,与预期的 IgG 重链、轻链条带大小相符(图 2)。

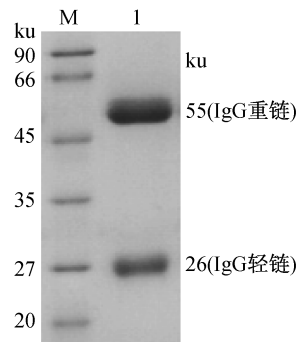


图 2 纯化 2C2 单抗的 SDS-PAGE 分析

M. 预染蛋白 Marker; 1. 纯化的单抗。

Fig 2 The purification 2C2 antibodies were analysed by SDS-PAGE

M. Protein marker; 1. purified MAb.

2.7 Western-blotting 分析

采用纯化的 GCRV-HZ08 进行 SDS-PAGE 后转印至硝酸纤维素膜上,以纯化的抗 VP4 蛋白 MAb 为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗。结果显示,纯化的病毒能够与 MAb 发生反应,目的条带约为 68 ku,与病毒编码的 VP4 蛋白大小相符;而

SP2/0 上清不能与病毒发生反应,表明该 MAb 可以与 GCRV-HZ08 发生特异性反应(图 3)。

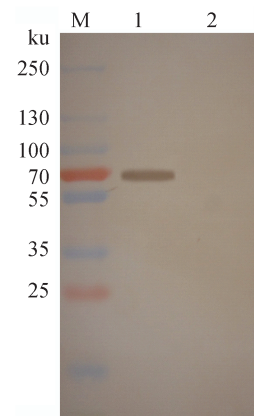


图 3 GCRV-HZ08 与 MAb 的 Western-blotting 鉴定

M. 预染蛋白 marker; 1. 纯化的 MAb; 2. SP2/0 上清。

Fig.3 Specific identification of the MAb with GCRV-HZ08

M. protein marker; 1. ascites MAb; 2. SP2/0 cell supernatant.

2.8 间接免疫荧光试验结果

VP4 蛋白 MAb 能对病毒感染的细胞产生特异性的荧光染色,在尚未感染的区域呈现阴性反应,且单抗上清与正常 CIK 细胞都没有反应,表明 GCRV HZ08 VP4 单抗具备良好的特异性。同时,该单抗对病毒感染的细胞都只能在细胞质中观察到绿色的荧光信号(图 4)。

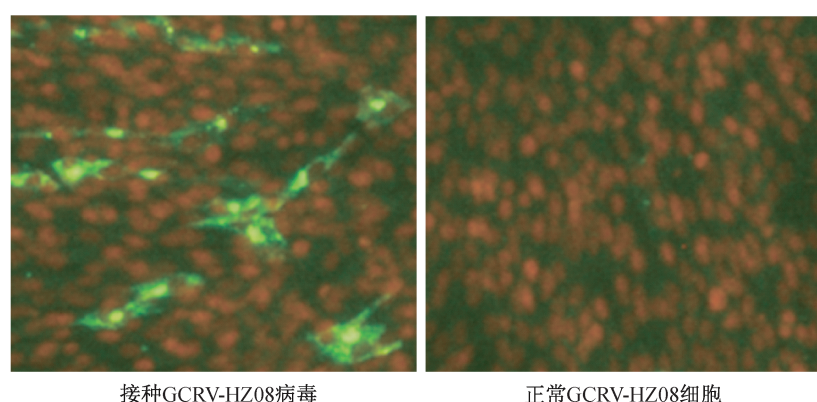


图4 MAb的IFA鉴定

Fig. 4 Identification of MAb by IFA

3 讨论

单克隆抗体是病原微生物研究、疫病快速诊断和治疗以及病原结构蛋白结构与功能分析极为重要的工具,单抗抗体技术已经在生命科学各个领域得到了广泛应用,尤其是在病原学领域的应用尤为显著^[19]。单克隆抗体技术在水生动物病原学上的应用已经有二十多年的历史,在鱼类病原学方面的研究应用比较早的有 Chinchar 等^[20]研制出的虹彩病毒(FV3)和 Austin^[21]把抗耶尔森氏菌和杀鲑气单胞菌的单克隆抗体用于鲑鳟鱼类红嘴病及疔疮病的诊断。目前,多种鱼类的细菌、病毒和寄生虫抗体已经得到研制和应用^[22]。草鱼呼肠孤病毒单克隆抗体的研制与应用也有报道,贺路等^[23]和杨倩等^[24]分别针对 873 株和 GDV004 株草鱼呼肠孤病毒制备了相应的单克隆抗体,并利用制备的单克隆抗体建立了免疫学检测方法。但由于草鱼呼肠孤病毒变异较快,毒株类型众多,各毒株之间差异较大,针对不同的毒株都应当建立其相应的快速检测方法和对其病原学分别进行研究。GCRV-HZ08 是新分离的到一个新毒株,目前的初步研究表明,HZ08 株为当前主要的流行毒株^[11],而且该毒株和其它毒株在基因组序列、毒力、细胞培养特性等各方面均存在较大差异^[6,8-10],因此,研制针对 GCRV-HZ08 株的单克隆抗体非常有必要。

本实验采用纯化的 GCRV-HZ08 VP4 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠,采用纯化的 GCRV-HZ08 病毒作为抗原包被反应板,利用建立的间接 ELISA 方法检测,筛选出 3 株稳定分泌抗 GCRV-

HZ08 单抗的杂交瘤细胞株,抗体亚类鉴定结果显示,3 株单抗均为 IgG1,收集腹水经辛酸-饱和硫酸铵法纯化后获得高纯度的抗体。抗体亚类鉴定结果显示,3 株单抗均为 IgG1,轻链均为 κ 链。特异性鉴定结果显示,本试验获得的 3 株单抗均可与 GCRV-HZ08 结合,而与 GSRV、ISKNV、IHNV 无交叉反应,这表明所获得的单抗具有良好的特异性。Western-blotting 和 IFA 结果表明,获得的 MAb 与纯化 GCRV 能够发生特异性反应,说明该单克隆抗体可识别 GCRV-HZ08 毒株结构蛋白 VP4 蛋白上的某一抗原表位,而该抗原表位的具体特征则有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 王方华,李安兴.草鱼病毒性出血病研究进展[J].南方水产,2006,2(3):66-71.
- [2] 马贵华,陈道印,刘六英,等.草鱼出血病的免疫学研究进展[J].渔业现代化,2008,35(1):45-49.
- [3] Zhang Q Y, Ruan H M, Li Z Q, *et al.* Detection of grass carp hemorrhage virus (GCHV) from vietnam and comparison with GCHV strain from China [J]. High Technology Letters, 2003, 9(2): 7-13.
- [4] 方勤,肖调义,李旅等.草鱼呼肠孤病毒新分离株(GCRV₉₉₁)的病毒学特性分析[J].中国病毒学,2002,17(2):178-181.
- [5] 徐洋,郝贵杰,沈锦玉,等.两株草鱼呼肠孤病毒江西株的分离与鉴定[J].淡水渔业,2010,40(3):44-49.
- [6] 张超.草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离鉴定与全基因组分子特征分析[D].上海:上海海洋大学,2010.
- [7] 曾伟伟,王庆,刘永奎,等.一株草鱼呼肠孤病毒弱

- 毒株的分离、鉴定及免疫原性初步分析[J]. 水生生物学报,2011,35(5):790-795.
- [8] Zhang C, Wang Q, Shi C B, *et al.* Molecular analysis of grass carp reovirus HZ08 genome segments 1-3 and 5-6[J]. *Virus Genes*,2010,41(1):102-104.
- [9] 曾伟伟,王庆,张超,等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 S4 全基因序列分析[J]. 生物学杂志,2012,29(2):12-17.
- [10] 曾伟伟,王庆,张乐生,等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 VP4 蛋白的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备[J]. 中国生物制品学杂志,2011,24(12):1482-1485.
- [11] 曾伟伟,王庆,王英英,等. 草鱼呼肠孤病毒三重 RT-PCR 检测方法的建立及其初步应用[C]. 中国畜牧兽医学学会兽医公共卫生学分会第三次学术研讨会. 广州;2012,436-442.
- [12] Kumar B K, Raghunath P, Devegowda D, *et al.* Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145 (1): 244-249.
- [13] 徐晓丽,绳秀珍,战文斌. 一种水产动物病毒现场检测免疫芯片的制备与应用[J]. 海洋与湖沼,2010,41(5):698-706.
- [14] 郝贵杰,沈锦玉,徐洋,等. WSSV 单抗的制备及其在红螯螯虾病毒病检测中的应用[J]. 集美大学学报:自然科学版,2009,14(2):120-125.
- [15] Shieh J R, Chi S C. Production of monoclonal antibodies against grouper nervous necrosis virus (GNNV) and development of an antigen capture ELISA[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*,2005,63(1):53-60.
- [16] Zhou G Z, Li Z Q, Zhang Q Y. Characterization and application of monoclonal antibodies against turbot (*Scophthalmus maximus*) Rhabdovirus [J]. *Viral Immunology*,2006,19(4):637-645.
- [17] 曹琛福,叶奕优,宗卉,等. 非洲马瘟间接 ELISA 方法的建立及初步应用[J]. 动物医学进展,2012,33(3):6-9.
- [18] 曹雪涛(译). 精编免疫学实验指南[M]. 北京:科学出版社,2009:18-25.
- [19] 刘萍,陈苗苗,刘学荣,等. 单克隆抗体研究进展[J]. 生物技术,2012,39(1):67-70.
- [20] Chinchar V G, Metzger D W, Granoff A, *et al.* Location of frog virus 3 proteins using monoclonal antibodies[J]. *Virology*,1984,137(1):211-216.
- [21] Austin B, Bishou I, Gray C, *et al.* Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth furunculosis in fish farms[J]. *Journal of Fish Diseases*,1986,9(5):469-474.
- [22] 汪开毓,黄艺丹,黄小丽,等. 单克隆抗体 (*Monoclonal antibodies*) 技术在水生动物疾病上的研究进展[J]. 现代渔业信息,2008,23(9):3-8.
- [23] 贺路,杜先林,左文功,等. 鱼呼肠孤病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及鉴定[J]. 淡水渔业,1990(5):3-5.
- [24] 杨倩,曹海鹏,和永杏,等. 一株草鱼呼肠孤病毒检测用单克隆抗体的制备及其特性[J]. 中国免疫学杂志,2012,28(3):240-241.

Preparation and identification of monoclonal antibody against VP4 protein of grass carp reovirus HZ08 strain

ZENG Weiwei, WANG Qing, WANG Yingying, SHI Cunbin, WU Shuqin *

(*Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China*)

Abstract: Grass carp reovirus (GCRV) has been considered as the most pathogenic agent and poses a significant threat to grass carp culture. A virulent reovirus strain, HZ08, was isolated from diseased grass carp in Zhejiang Province, and has been proven to be epidemic strain in China. To development serological methods for detecting prevalent GCRV, the gene encoded for major outer capsid VP4 was selected clone to plasmid pET32a(+) and the purified recombinant VP4 protein was injected into BALB/c mice through subcutaneous route. The spleen cells from immuned BALB/c mice were fused with SP2/0 myeloma cells, and three hybridoma cell lines, designated as 2C2, 2F3 and 5E5 respectively, were screened out to be able to secrete monoclonal antibody (MAb) against VP4 protein using indirect ELISA. All the MAb were IgG1 subtype with κ light chain and could not react with GSRV, ISKNV, IHNV except GCRV-HZ08. The hybridoma cell line 2C2 was selected for MAb preparation, and the titers in cell culture medium of the ascetic fluids were up to 1:720 000. The results of Western-blotting and IFA showed that the MAb could recognize the authentic VP4 protein of GCRV HZ08 particles. In present study, the MAb against VP4 of GCRV HZ08 was successfully prepared, which laid a foundation of developing a rapid determination method for GCRV and further study of structures and functions of VP4 protein.

Key words: grass carp reovirus virus; VP4 protein; monoclonal antibody

Corresponding author: WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com