

三疣梭子蟹颗粒血细胞单克隆抗体的研制及 7 种甲壳类动物血细胞的交叉反应研究

王 颖, 王文琪, 程顺峰*

(青岛农业大学海洋科学与工程学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 为研究虾蟹类甲壳动物血细胞膜表面是否具有相同的抗原决定簇及共同抗原表位的生物学特征, 采用制备的抗三疣梭子蟹颗粒血细胞单克隆抗体, 通过激光共聚焦扫描显微镜 (laser scanning confocal microscopy, LSCM)、免疫印迹 (Western blot) 和流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 等多种方法, 测定了 7 种甲壳类动物 (凡纳滨对虾、中国明对虾、刀额新对虾、口虾蛄、中华绒螯蟹、日本板蟹及美洲黄道蟹) 颗粒血细胞及透明血细胞与三疣梭子蟹颗粒血细胞单克隆抗体发生特异性结合的抗原表位。LSCM 可观察到该株抗三疣梭子蟹颗粒血细胞单克隆抗体与中华绒螯蟹和日本板蟹血细胞交叉反应结果为阳性, 分析发现在中华绒螯蟹血淋巴中阳性颗粒血细胞在其颗粒血细胞总数中占 76.74%, 阳性透明血细胞在其透明血细胞总数中占 70.59%, 日本板蟹阳性颗粒血细胞在其颗粒血细胞总数中占 73.86%, 阳性透明血细胞在其透明血细胞总数中占 16.67%, 其余 5 种甲壳类动物均为阴性; Western blot 测试结果显示该株单克隆抗体仅与中华绒螯蟹血细胞反应, 且发生反应的抗原决定簇位于分子量为 30 ku 的蛋白带上; FCM 分析发现该株单克隆抗体与中华绒螯蟹透明血细胞和颗粒血细胞均可发生交叉反应, 阳性率分别为 57.72% 和 77.05%, 与日本板蟹透明血细胞阳性反应极少, 阳性率仅为 9.57%, 与颗粒血细胞发生阳性反应的阳性率为 82.59%。

关键词: 三疣梭子蟹; 单克隆抗体; 颗粒血细胞; 交叉反应

中图分类号: Q 178.1; S 917.4

文献标志码: A

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 隶属甲壳纲 (Crustacea), 因肉多味鲜、营养丰富, 长期受到广大养殖户和消费者的青睐, 已成为我国重要经济蟹类之一, 其养殖产业发展备受关注^[1-2]。免疫防御体系是虾蟹抗病力基础, 血细胞在虾蟹机体免疫防御过程中起重要作用, 虾蟹血细胞分为透明血细胞及颗粒血细胞两大类, 主要参与吞噬、包埋、结节形成及细胞凝块, 伤口修复等免疫反应^[3-5], 同时, 血细胞对外界刺激和自身生理变化非常敏感, 是反映甲壳类生活环境质量和健康状况的重要指标^[6-7]。交叉反应是指抗原 (或抗体) 除与其相应抗体 (或抗原) 发生特异性反应

外, 还与其他抗体 (或抗原) 发生反应, 其本质是抗体与抗原决定簇的特异性结合, 种属关系越近, 交叉反应越强^[8-9]。单克隆抗体具有生物活性单一, 稳定性好, 与抗原结合特异性强的优点^[10-11], 利用血细胞单克隆抗体可对水产无脊椎动物血细胞进行深入研究。目前已有将单克隆抗体应用于水产无脊椎动物血细胞的分型、分布、发生、数量变化、交叉反应等的研究报道^[12-18]。本研究以三疣梭子蟹颗粒血细胞单克隆抗体为基础, 采用激光共聚焦法 (LSCM)、免疫印迹 (Western blot) 和流式细胞术 (FCM) 研究与三疣梭子蟹颗粒血细胞单克隆抗体特异性结合的抗原决定簇在其他 7

收稿日期: 2015-01-02 修回日期: 2015-03-01

资助项目: 山东省“两区”建设专项; 山东省现代农业产业技术体系虾蟹类创新团队项目 (SDAIT-15-011-06)

通信作者: 程顺峰, E-mail: chengshunfeng@163.com

种常见甲壳类动物血细胞的分布情况,为蟹类血细胞的研究进一步积累资料,提供参考。

1 实验材料

1.1 实验材料及试剂

三疣梭子蟹、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)、日本板蟹 (*Petalomera japonica*)、美洲黄道蟹 (*Cancer magister*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*)、口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*)均购自山东青岛城阳水产批发市场。雌性6~8周龄 Balb/C 小鼠购自山东大学实验动物中心。

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 标记羊抗小鼠 IgG、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记羊抗小鼠 IgG、5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸 (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate, BCIP)、氯化硝基四氮唑蓝 (nitroterazolium blue chloride, NBT) 均购自 Sigma (Germany) 公司。

2 实验方法

2.1 血细胞提取

三疣梭子蟹、中华绒螯蟹、日本板蟹和美洲黄道蟹血淋巴分别从其游泳足基部软膜处抽取,凡纳滨对虾、中国明对虾、刀额新对虾及口虾蛄血淋巴分别从其头胸甲后缘下方围心腔抽取;血淋巴与4℃预冷抗凝剂(蟹类:450 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L HEPES, pH 7.3; 虾类:336 mmol/L NaCl, 115 mmol/L glucose, 9 mmol/L EDTA, pH 7.4)按体积比1:2混匀;于4℃,1 500 × g,离心6 min;细胞沉淀用磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)重悬,制成单细胞悬液,调整其浓度为 $10^8 \sim 10^9$ cells/mL。

2.2 三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体的制备

三疣梭子蟹血细胞为抗原,免疫 Balb/C 小鼠4次后,无菌条件下采用 PEG 融合免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞。杂交瘤细胞37℃、CO₂浓度5%、HAT 选择性培养液培养。采用间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay, IFA)筛选阳性杂交瘤细胞株,采用有限稀释法克

隆3次,收集的单克隆阳性杂交瘤细胞培养上清即为单克隆抗体。

2.3 间接免疫荧光法(IFA)检测三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体

三疣梭子蟹全血细胞、颗粒血细胞和透明血细胞的血滴片上分别滴加单克隆抗体50 μL,37℃温育1 h, PBS洗3次,每次5 min;加 FITC 标记羊抗小鼠 IgG 100 μL(1:256),37℃温育1 h, PBS洗3次,每次5 min;封片,荧光显微镜观察。收集骨髓瘤细胞培养上清液为阴性对照。

2.4 激光共聚焦(LSCM)鉴定交叉反应

8种虾、蟹的血细胞悬液滴加到干净载玻片上,37℃烘干;PBS洗3次,每次5 min;含0.5% Triton-100的PBS透化10 min, PBS洗3次,每次5 min;加含10%山羊血清、0.5% Triton-100的PBS室温封闭45 min;加单克隆抗体50 μL,37℃温育1 h, PBS洗3次,每次5 min;加 FITC 标记羊抗小鼠 IgG 50 μL(1:256),37℃温育1 h, PBS洗3次,每次5 min;加 Hoechst,浸泡3 min;封片,激光共聚焦显微镜观察并统计分析发生阳性反应的比例。

2.5 免疫印迹法(Western blot)分析发生交叉反应的抗原决定簇分子量

电泳凝胶由浓度为12%分离胶和浓度为5%浓缩胶2部分组成,发生交叉反应的虾、蟹血细胞悬液与电泳样品缓冲液(0.5 mol/L Tris-HCl pH 6.8;1% SDS;1% 巯基乙醇;10%甘油;0.02% 溴酚蓝)等体积混合,煮沸,每孔加15 μL;电泳时浓缩胶部分恒流30 mA,分离胶部分恒流60 mA;得到2块凝胶中一块用考马斯亮蓝 R250 染液染色,另一块恒流200 mA,电转移5 h至硝酸纤维素膜(NC膜);然后NC膜用5% BSA 溶液封闭,4℃过夜;PBST(含0.05% Tween-20的PBS)洗3次,每次5 min;加单克隆抗体50 μL,37℃温育1 h, PBST洗3次,每次5 min;加 AP 标记羊抗小鼠 IgG 50 μL(1:256),37℃温育1 h, PBST洗3次,每次5 min;加 NBT/BCIP 室温显色。

2.6 流式细胞术(FCM)测定发生交叉反应的阳性率

取 LSCM 鉴定发生交叉反应的甲壳类动物的血细胞,利用 Percoll 介质不连续密度梯度离心后,调整其浓度至 $10^8 \sim 10^9$ cells/mL,加单克隆抗

体 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, PBS 离心洗 3 次; 加 FITC 标记羊抗小鼠 IgG 50 μL (1:256), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, PBS 离心洗 3 次后重悬浓度为 10^7 cells/mL; 设定流式细胞仪根据细胞颗粒度进行检测, 利用 CellQUEST Pro 软件分析结果。

3 结果

3.1 IFA 检测结果

经过 PEG 融合, 3 次亚克隆后, 筛选得到单克隆抗体 5 株, 但是仅有单克隆抗体 3F4 只与三疣梭子蟹颗粒血细胞发生荧光反应。光镜下可见吉姆萨染色的三疣梭子蟹颗粒血细胞的细胞质中有颗粒分布, 而透明细胞中则无 (图 1-a)。荧光显微镜下观察 IFA 检测结果显示: 阴性对照背景为黑色, 不显示绿色荧光信号 (图 1-b)。而与单克隆抗体 3F4 发生反应的三疣梭子蟹颗粒血细胞的细胞膜上出现明亮、清晰的绿色荧光信号 (图 1-c)。

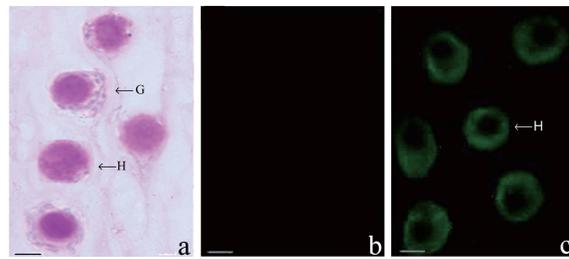


图 1 间接免疫荧光法检测阳性杂交瘤细胞株 (bar = 10 μm)

(a) 吉姆萨染色; (b) 阴性对照; (c) 阳性结果
G. 颗粒细胞; H. 透明细胞

Fig. 1 The result of positive hybridoma by IFA (bar = 10 μm)

(a) Giemsa; (b) negative control; (c) positive result
G. granulocyte; H. hyalinocyte

3.2 LSCM 鉴定交叉反应结果

LSCM 鉴定发现中华绒螯蟹、日本板蟹可与单克隆抗体 3F4 发生交叉反应。激光共聚焦显微镜下发现经 Hoechst 染色的三疣梭子蟹 (图 2-a)、

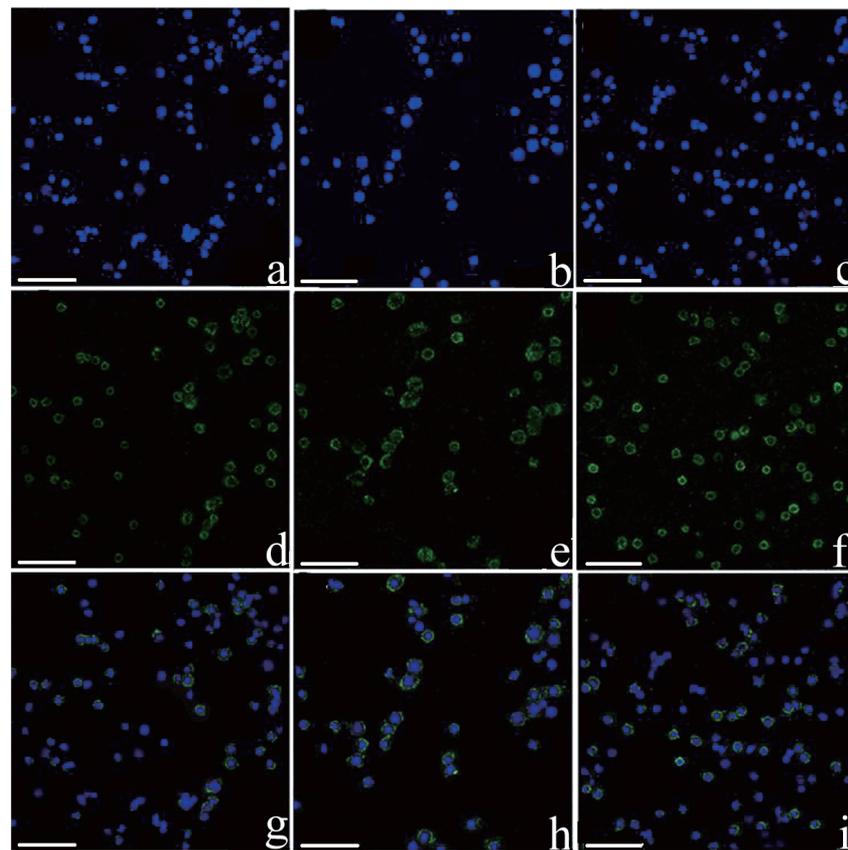


图 2 单克隆抗体 3F4 分别与三种蟹血细胞反应 (标尺 = 50 μm)

(a), (d), (g) 三疣梭子蟹; (b), (e), (h) 中华绒螯蟹; (c), (f), (i) 日本板蟹; (a), (b), (c) Hoechst 染色; (d), (e), (f) FITC 染色; (g), (h), (i) Hoechst 染色与 FITC 染色结果

Fig. 2 MAb 3F4 reacting with three crabs haemocytes (bar = 50 μm)

(a), (d), (g) *Portunus trituberculatus*; (b), (e), (h) *Eriocheir sinensis*; (c), (f), (i) *Petalomena japonica*; (a), (b), (c) Hoechst staining; (d), (e), (f) fluorescein isothiocyanate staining; (g), (h), (i) merge the result of Hoechst staining and FITC staining

中华绒螯蟹(图 2-b)和日本板蟹(图 2-c)血细胞的细胞核为蓝色,采用单克隆抗体 3F4 的 IFA 结果发现三疣梭子蟹(图 2-d)、中华绒螯蟹(图 2-e)和日本板蟹(图 2-f)血细胞均出现阳性绿色荧光信号,将采用 Hoechst 染色及 IFA 结果进行合并,发现在三疣梭子蟹(图 2-g)、中华绒螯蟹(图 2-h)和日本板蟹(图 2-i)血细胞的细胞膜上出现绿色荧光信号,表明单克隆抗体 3F4 结合的抗原决定簇在中华绒螯蟹、日本板蟹血细胞的细胞膜上;单克隆抗体 3F4 与其他 5 种虾、蟹血细胞反应结果为阴性,表明在美洲黄道蟹、凡纳滨对虾、中国明对虾、刀额新对虾、口虾蛄等 5 种其他甲壳类动物血细胞上没有与单克隆抗体 3F4 结合的抗原决定簇。

对中华绒螯蟹、日本板蟹分别取 20 个共聚焦视野进行计数统计,统计其颗粒血细胞和透明血细胞个数,以及阳性颗粒血细胞和阳性透明血细胞个数,计算每个样品平均值。结果显示,中华绒螯蟹颗粒血细胞和透明血细胞平均个数分别为 43 及 17 cells,在中华绒螯蟹血淋巴中颗粒血细胞所占比例为 72%,透明细胞为 28%,其中阳性颗粒血细胞占颗粒血细胞的 76.74%,阳性透明血细胞占透明血细胞的 70.59%;日本板蟹颗粒血细胞和透明血细胞平均个数分别为 88 及 42 cells,在日本板蟹血淋巴中颗粒血细胞所占比例为 68%,透明细胞为 32%,其中阳性颗粒血细胞在其颗粒血细胞中占 73.86%,阳性透明血细胞在其透明血细胞中占 16.67%(图 3)。

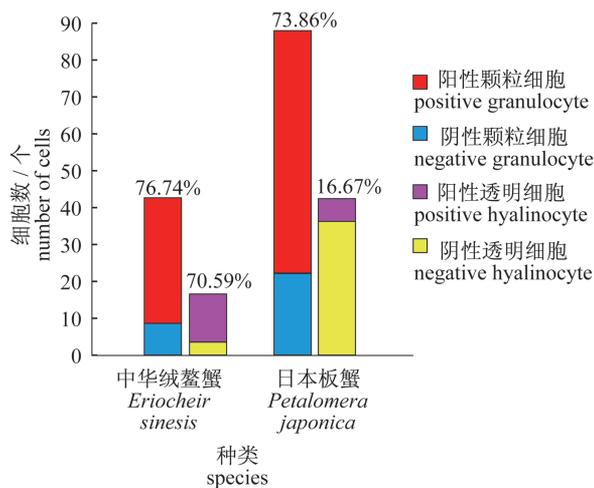


图 3 共聚焦视野计数 2 种蟹血细胞柱状图

Fig. 3 The histogram of confocal vision count two crabs haemocytes

3.3 Western blot 分析发生交叉反应的抗原决定簇分子量结果

单克隆抗体 3F4 与 LSCM 结果为阳性的中华绒螯蟹和日本板蟹血细胞进行 Western blot 反应。由 SDS-PAGE 图可知中华绒螯蟹蛋白条带较多(图 4-a),Western blot 结果显示,中华绒螯蟹血细胞与单克隆抗体 3F4 反应的抗原决定簇分子量为 30 ku,而日本板蟹没有相关条带(图 4-b)。

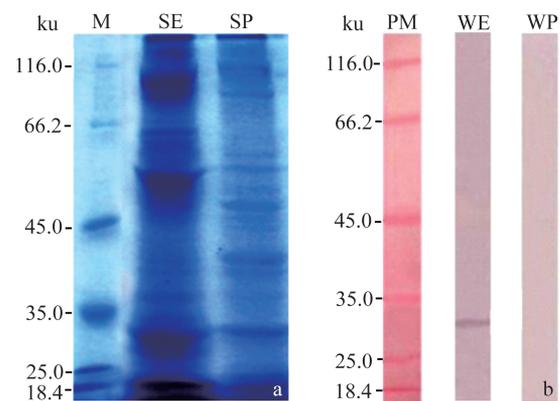


图 4 电泳和免疫印迹分析交叉反应结果

(a) 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳图; (b) 免疫印迹图

M. 标准蛋白分子量; PM. 标准蛋白分子量丽春红染色图; SE. 中华绒螯蟹电泳图谱; WE. 中华绒螯蟹免疫印迹; SP. 日本板蟹电泳图谱; WP. 日本板蟹免疫印迹

Fig. 4 Analysis of MAb 3F4 of haemocytes by SDS-PAGE and Western blot

(a) SDS-PAGE; (b) Western blot

M. marker; PM. Ponceau S staining marker; SE. SDS-PAGE of *Eriocheir sinensis*; WE. Western blot of *Eriocheir sinensis*; SP. SDS-PAGE of *Petalomena japonica*; WP. Western blot of *Petalomena japonica*

3.4 FCM 测定发生交叉反应的阳性率结果

FCM 结果显示,其中黑线代表每组的阴性对照,即该组血细胞未与单克隆抗体 3F4 反应,紫线代表该组中的颗粒血细胞,蓝线代表该组中的透明血细胞;G 和 H 分别表示颗粒血细胞和透明血细胞;单克隆抗体 3F4 与中华绒螯蟹颗粒血细胞和透明血细胞均有不同程度交叉反应,阳性率分别为 77.05% 和 57.72%(图 5-a,图 5-b);单克隆抗体 3F4 绝大多数与其颗粒血细胞发生阳性反应,而与日本板蟹透明血细胞阳性反应极少,阳性率分别为 82.59% 和 9.57%(图 5-c,图 5-d)。

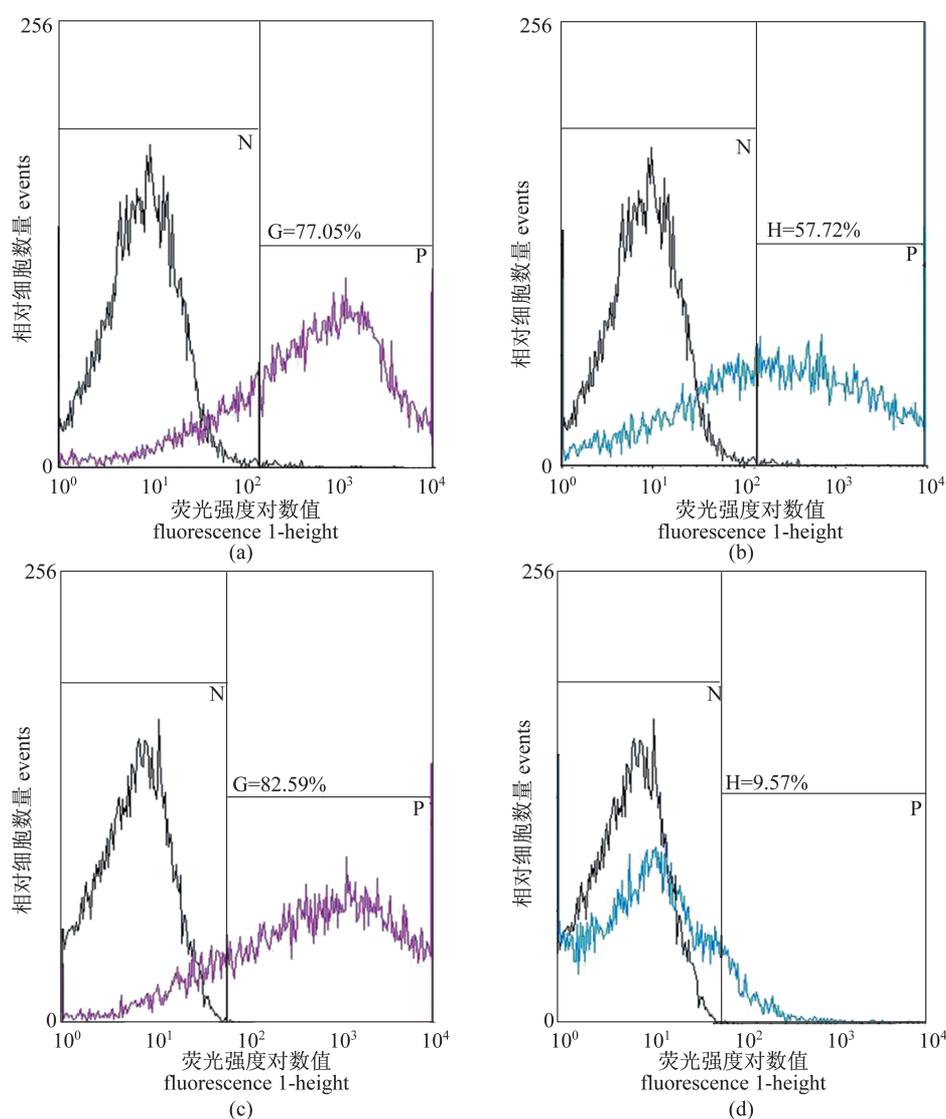


图5 FCM检测单克隆抗体3F4与中华绒螯蟹和日本板蟹血细胞荧光强度直方图

(a) 中华绒螯蟹颗粒细胞; (b) 中华绒螯蟹透明细胞; (c) 日本板蟹颗粒细胞; (d) 日本板蟹透明细胞

N. 代表阴性; P. 代表阳性; 黑线代表每组的阴性对照, 即该组血细胞未与单克隆抗体3F4反应; 紫线代表组中的颗粒血细胞; 蓝线代表组中的透明血细胞; G. 颗粒血细胞; H. 透明血细胞

Fig. 5 MAb 3F4 reacted with *Eriocheir sinensis* and *Petalomera japonica* hemocytes

(a) granulocyte of *Eriocheir sinensis*; (b) hyalinocyte of *Eriocheir sinensis*; (c) granulocyte of *Petalomera japonica*; (d) hyalinocyte of *Petalomera japonica*

N. negative; P. positive; the black line indicate negative control, which means MAb 3F4 do not react with the crab's haemocytes; purple line indicate the granulocyte; blue line indicate the hyalinocyte; G. granulocyte; H. hyalinocyte

4 讨论

制备5株三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体中, 仅单克隆抗体3F4只与三疣梭子蟹颗粒血细胞发生反应。Zhang等^[19]利用抗凡纳滨对虾血细胞单克隆抗体进行交叉反应研究发现该单抗除了与中国明对虾和日本囊对虾(*Marsupenaeus*

japonicus)血细胞反应外, 还与三疣梭子蟹血细胞反应, 结果显示在甲壳类动物中存在共同的抗原决定簇。为验证制备的单抗所针对的抗原表位是否在其他甲壳类动物中存在, 选用7种甲壳类动物(凡纳滨对虾、中国明对虾、刀额新对虾、口虾蛄、中华绒螯蟹、日本板蟹、美洲黄道蟹), 且其中部分品种如凡纳滨对虾、中国明对虾及中华绒螯蟹

等为我国主要养殖品种,具有较高的经济价值^[20]。LSCM结果证实中华绒螯蟹和日本板蟹血细胞膜上有与单克隆抗体3F4发生特异性结合的抗原决定簇;Western blot分析结果显示中华绒螯蟹血细胞上分子量为30 ku的抗原决定簇与该单抗发生特异性结合,而日本板蟹无反应条带;FCM分析进一步说明单克隆抗体3F4与中华绒螯蟹透明血细胞和颗粒血细胞发生交叉反应的阳性率分别为57.72%和77.05%;与日本板蟹透明血细胞和颗粒血细胞发生交叉反应的阳性率分别为9.57%和82.59%。

LSCM技术快速灵敏,结果真实可靠,可以检测抗原抗体的特异性反应,定位抗原决定簇,在显微镜下可直接观察有无反应^[21]。本实验中三疣梭子蟹、中华绒螯蟹、日本板蟹血细胞膜上都出现绿色荧光信号,说明其抗原决定簇均位于细胞膜上;Western blot结果发现与单克隆抗体3F4发生特异性结合的中华绒螯蟹血细胞抗原决定簇的分子量为30 ku,而日本板蟹无条带显示。Western blot与LSCM结果差异的原因:一,日本板蟹上与单克隆抗体3F4发生特异性结合反应的抗原决定簇为构象型抗原决定簇,而Western blot实验过程中引起了蛋白质变性,即日本板蟹抗原决定簇空间构象被破坏,不能与抗体发生特异性结合反应;二,此抗原是相应细胞裂解物的一小部分,需纯化才能发挥其抗原性^[22];FCM不仅可以定性检测与单克隆抗体3F4发生交叉反应的2种蟹血细胞类型,还可以定量测阳性比率,且避免酶学法等由于细胞和组织中内源酶存在而出现的假阳性现象,以及人为等一些主观因素造成的不确定性和实验假象^[23]。FCM结果显示单克隆抗体3F4与中华绒螯蟹透明血细胞和颗粒血细胞反应阳性率分别是57.72%和77.05%;与日本板蟹透明血细胞和颗粒血细胞反应阳性率分别为9.57%和82.59%,与LSCM实验中计算阳性荧光比例存在一定差异,原因在于观察过程中对于某些细胞分辨不精确。

近年来,利用单克隆抗体进行免疫交叉反应的报道中,Lopez等^[24]研究发现抗长牡蛎(*Dstrea gigas*)血细胞单克隆抗体能与多种蛤仔血细胞发生交叉反应,与紫贻贝(*Mytilus edulis*)血细胞不发生交叉反应;Zhang等^[19]研究发现抗凡纳滨对虾血细胞单克隆抗体与三疣梭子蟹、中国明对虾和日本对虾血细胞发生不同程度交叉反应;邢婧

等^[25]发现牙鲆红细胞单克隆抗体与花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、许氏平鲷(*Sebastes schousboei*)、真鲷(*Pagrosomus major*)和鲫(*Carassius auratus*)的血细胞存在不同程度交叉反应^[25]。分析此类现象原因可能是:一,多个蛋白质具有一段相同或相似氨基酸序列,它们携带共同抗原决定簇;二,一个抗原决定簇中的小分子量反应蛋白本身是另一个抗原决定簇的大分子量反应蛋白的一部分^[26]。

本研究发现三疣梭子蟹颗粒血细胞单克隆抗体与中华绒螯蟹和日本板蟹血细胞发生交叉反应,说明三疣梭子蟹、中华绒螯蟹和日本板蟹血细胞上存在相同的抗原决定簇,为蟹类血细胞发生与分化的研究提供实验依据,为研究蟹类血细胞及其免疫功能积累资料。

参考文献:

- [1] Qiao Z G. The sea crab production safety technical guide [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012: 131 - 137. [乔振国. 海水蟹类安全生产技术指南. 北京: 中国农业出版社, 2012: 131 - 137.]
- [2] Cheng G B, Shi H L, Lou B, et al. Biological characteristics and artificial propagation, culture technique for *Portunus trituberculatus* [J]. Hebei Fisheries, 2012(4): 59 - 61. [程国宝, 史会来, 楼宝, 等. 三疣梭子蟹生物学特性及繁养殖现状. 河北渔业, 2012(4): 59 - 61.]
- [3] Yao C L, Wang Z Y, Xiang J H. Crustacean haemocytes and their function in immune responses [J]. Zoological Research, 2006, 27(5): 549 - 557. [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. 动物学研究, 2006, 27(5): 549 - 557.]
- [4] Zhao Q S, Qin F J, Li C H, et al. Preliminary study on the activities of enzymes in haemolymph of three species of marine crabs [J]. Journal of Ningbo University: Natural Science & Engineering, 2009, 22(1): 33 - 38. [赵青松, 秦方锦, 李长红, 等. 3种海产蟹类血淋巴酶活性的初步研究. 宁波大学学报: 理工版, 2009, 22(1): 33 - 38.]
- [5] Zhou Y, Mu Z K, Yang Z G. Haemocyte morphology, classification and differential count of swimming crab, *Portunus trituberculatus*. [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2001, 10(3): 279 - 281. [周玉, 穆占昆, 杨振国. 三疣梭子蟹血淋巴细胞的形态、分类及计数. 上海水产大学

- 学报,2001,10(3):279-281.]
- [6] Lin X H, Söderhäll I. Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines [J]. *Blood*, 2011, 117 (24): 6417-6424.
- [7] Qi R R, Li Q, Yu Y, *et al.* Application of monoclonal antibodies in research on blood lymphocytes of aquatic invertebrates [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2012 (1): 146-151. [戚瑞荣,李强,于毅,等.单克隆抗体在水产无脊椎动物血淋巴细胞研究中的应用.中国农业科技导报,2012(1):146-151.]
- [8] Wang X X, Sheng X Z, Zhan W B. Preliminary study on reduction of cross-reaction of antibody microarray for detection of pathogenic bacteria in fish [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2013(1):23-28. [王欣欣,绳秀珍,战文斌.降低交叉反应的鱼类病原菌检测抗体芯片初步研究.海洋湖沼通报,2013(1):23-28.]
- [9] Chen L, Zhang X H. *Medical immunology and Pathogenic Biology* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2013:8-9. [陈路,张新红.医学免疫学与病原生物学.北京:化学工业出版社,2013:8-9.]
- [10] Huang H, Du T S, Li Q, *et al.* Application of monoclonal antibodies in detecting pathogenic microorganisms in aquaculture [J]. *Journal of Agricultural Science and Technol*, 2012, 14 (2): 145-150. [黄华,杜天舒,李强,等.单克隆抗体在水产病原微生物检测中的应用.中国农业科技导报,2012,14(2):145-150.]
- [11] Ren J. Hybridoma technology and monoclonal antibody [J]. *Xinjiang Animal Husbandry*, 2014(4): 26-27. [任娟.杂交瘤技术与单克隆抗体.新疆畜牧业,2014(4):26-27.]
- [12] Zhan W B, Zhang L F, Zhang Z D, *et al.* Production of monoclonal antibodies against hemocyte of shrimp (*Penaeus Chinensis*) and using them to analysis the hemocyte types [J]. *Chinese High Technology Letters*, 2001(6):19-22. [战文斌,张利峰,张志栋,等.中国对虾血细胞单克隆抗体研制及对虾血细胞类型的鉴别.高技术通讯,2001(6):19-22.]
- [13] Xue Y H. White Spot Syndrome Virus infecting to haemocytes of shrimp and ontogenesis of the haemocytes [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004. [薛艳红.对虾白斑综合症病毒对血细胞的感染及血细胞的发生研究.青岛:中国海洋大学,2004.]
- [14] Ni Y Q, Xing J, Lin T T, *et al.* Localization and distribution of haemocytes in umbolarvae of scallop (*Chlamys farreri*) by immune observation [J]. *Periodical of Ocean University of China; Natural Science*, 2012(6):72-76. [倪永庆,邢婧,林听听,等.栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)壳顶幼虫血细胞分布的免疫学观察.中国海洋大学学报:自然科学版,2012(6):72-76.]
- [15] Li Z N. Research on the ontogenesis of haemocytes in larval development of scallop *Chlamys farreri* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010. [李子牛.栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)幼虫发育期血细胞的发生研究.青岛:中国海洋大学,2010.]
- [16] Lin T T, Xing J, Jiang J W, *et al.* A relationship between haemocyte count and growth of scallop *Chlamys farreri* [J]. *Periodical of Ocean University of China; Natural Science*, 2011(Z2):54-59. [林听听,邢婧,蒋经纬,等.栉孔扇贝血细胞数量变化与生长的关系.中国海洋大学学报:自然科学版,2011(Z2):54-59.]
- [17] Ni Y Q. Research on the ontogenesis of granulocytes in developing larvae and cross-reactivity with haemocytes of other five bivalve species by monoclonal antibody against granulocytes of scallop (*Chlamys farreri*) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012. [倪永庆.栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)颗粒血细胞发生及其单克隆抗体与五种双壳贝类细胞交叉反应的研究.青岛:中国海洋大学,2012.]
- [18] Tang X Q. Study on the WSSV receptors in haemocytes of *Fennropenaeus chinensis* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010. [唐小千.中国对虾白斑症病毒(WSSV)血细胞受体蛋白的研究.青岛:中国海洋大学,2010.]
- [19] Zhang Z D, Zhan W B, Xue Y H, *et al.* Antigenic cross-reactivity of crustacean haemocytes using monoclonal antibodies produced against haemocytes of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16:71-73.
- [20] Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. 2013 China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013:28-30. [农业部渔业局.2013中国渔业统计年鉴.北京:中国农业出版社,2013:28-30.]
- [21] Susanto A, Herrmann T, von Lieres E, *et al.* Investigation of pore diffusion hindrance of monoclonal antibody in hydrophobic interaction chromatography using confocal laser scanning microscopy [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1149:178-188.
- [22] Xing J, Zhan W B. Characterisation of monoclonal

- antibodies to haemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 19: 17 - 25.
- [23] Jia Y R. Flow Cytometry [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009: 127 - 157. [贾永蕊. 流式细胞术. 北京: 化学工业出版社, 2009: 127 - 157.]
- [24] Lopez C, Carballal M J, Azevedo C, et al. Enzyme characterization of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussates* (*Mollusca bivalvia*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1997, 7 (8): 595 - 608.
- [25] Xing J, Zhan W B, Zeng X H, et al. Cross reaction of monoclonal antibodies against flounder *Paralichthys olivaceus* with blood cells of other five fish species [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36 (2): 123 - 129. [邢婧, 战文斌, 曾晓华, 等. 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 红细胞单克隆抗体与五种养殖鱼类血细胞的交叉反应. 海洋与湖沼, 2005, 36 (2): 123 - 129.]
- [26] Xing J, Zhan W B. Comparison of antigenicity among haemocytes of seven bivalve species by monoclonal antibodies against haemocytes of scallop (*Chlamys farreri*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(4): 528 - 535.

Antigenic cross-reactivity of crustacean haemocytes using monoclonal antibodies produced against granulocyte of the swimming crab (*Portunus trituberculatus*)

WANG Ying, WANG Wenqi, CHENG Shunfeng*

(College of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Using the monoclonal antibodies (Mab) 3F4 against granulocyte of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) to research the cross reaction of other seven species of crustaceans (*Penaeus vannamei*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Metapenaeus ensis*, *Oratosquilla oratoria*, *Eriocheir sinensis*, *Petalomera japonica*, *Cancer magister*). In this paper, laser scanning confocal microscopy (LSCM), Western blot and Flow Cytometry (FCM) were employed to detect the relationship between these seven species. Balb/C mice were immunized by haemocytes of *Portunus trituberculatus*. Spleens were dissected from the immunized Balb/c mice and the cells were fused with SP2/0 myeloma cell line using polyethylene glycol as fusogen. Hybridoma culture mediums of hybridoma cells were selected using Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) screening methods. One positive hybridoma was found which secreted high titer antibody, followed by single-cell cloning and subcloning by limiting dilution method and tested again for their specificity by IFA at the appropriate stage of growth. Single-cell cloning was repeated at least twice so as to prove the monoclonality of the hybridoma culture supernatant. We got the MAb 3F4 specific against granulocyte of swimming crab (*Portunus trituberculatus*). MAb 3F4 showed strong immunofluorescent reaction with granulocytes, but no reaction with hyalinocytes. In cross-reactivity, LSCM showed the MAb 3F4 could also react with haemocytes of *Eriocheir sinensis* and *Petalomera japonica*. Sorted by FCM, MAb 3F4 was positive to the two types of haemocytes of *Eriocheir sinensis* (hyalinocyte and granulocyte), and the percentage of positive rate were 57.72% and 77.05% respectively. Reacting with haemocyte of *Petalomera japonica* was mainly positive to granulocyte, whose positive rate was 82.59%, but that to the hyalinocyte was only 9.57%. Analyzed by Western blot, MAb 3F4 was recognized as one haemocyte protein of *Eriocheir sinensis*, whose molecule weight was 30 ku, but there was no protein band on nitrocellulose membrane of *Petalomera japonica*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; monoclonal antibody; granulocyte; cross reaction

Corresponding author: CHENG Shunfeng. E-mail: chengshunfeng@163.com