

文章编号: 1000-0615(2016)03-0363-08

DOI: 10.11964/jfc.20150709974

鳊传染性脾肾坏死病毒主衣壳蛋白 单克隆抗体的制备及鉴定

付小哲^{1,2,3}, 李宁求^{1,2,3*}, 林强^{1,2,3}, 刘礼辉^{1,2,3}, 吴淑勤^{1,2,3}

(1. 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, 广东广州 510380;
2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东广州 510380;
3. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430070)

摘要: 为了建立鳊传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)疫苗抗原含量的ELISA检测方法, 制备了3株抗ISKNV主衣壳蛋白(MCP)的单克隆抗体, 鉴定了其生物学特性。将大肠杆菌表达的重组MCP纯化复性后, 连续3次免疫BALB/c小鼠, 然后将免疫小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合, 经过克隆、筛选, 获得3株能稳定分泌抗ISKNV MCP蛋白的单克隆抗体阳性细胞株, 分别命名为5F1、3D9和5B4, 均为IgG1亚型。间接ELISA实验表明, 3株单抗可特异性识别ISKNV, 与鳊弹状病毒、大鲵虹彩病毒等无交叉反应。将5F1株免疫小鼠后制备腹水, 以重组MCP和ISKNV细胞培养物上清液为检测抗原, ELISA检测腹水效价分别为1:51 200和1:400。间接免疫荧光(IFA)和Western Blotting鉴定结果显示, 5F1能够与ISKNV病毒发生特异性反应, 并初步确定5F1单抗株制备的腹水用于IFA的使用浓度为1:200、Western Blotting的使用浓度为1:1000。结果证实, 成功制备了抗ISKNV MCP的单克隆抗体, 可特异性识别ISKNV病毒粒子和MCP蛋白, 为建立ISKNV疫苗抗原含量检测方法奠定了基础。

关键词: 鳊; 传染性脾肾坏死病毒; 主衣壳蛋白; 单克隆抗体

中图分类号: Q 511; S 917

文献标志码: A

近十年来, 虹彩病毒科(Iridoviridae)肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)病毒引发的疾病已严重影响水产养殖业的健康发展^[1]。鳊(*Siniperca chuatsi*)传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV), 又名鳊虹彩病毒, 是虹彩病毒科肿大细胞病毒属的代表种^[2], 给我国鲈形目(Perciformes)鱼类及鲟鳇类养殖产业带来巨大的危害^[3-4]。免疫接种是预防病毒病的最有效方法之一。本实验室目前已研制出安全有效的ISKNV细胞培养灭活疫苗及重组主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)亚单位疫苗^[5-6], 但疫苗质量与其有效抗原含量密切相关, 因此建立疫苗有效抗原含量测定方法是疫苗质量控

制的关键技术之一。

单克隆抗体技术已被广泛应用于病原诊断、抗体药物、药残检测、蛋白纯化等多个研究领域, 在细菌、病毒等病原特异性诊断^[7-10]、蛋白分析与定位^[11-13]等方面应用尤为广泛。近年来, 单克隆抗体技术也被用于疫苗抗原含量测定、免疫原性检测等^[14-18]。对于鱼类肿大细胞属病毒, Nakajima等^[19]制备了真鲷虹彩病毒(red sea bream iridovirus, RSIV)单克隆抗体, 目前尚无ISKNV单克隆抗体的报道。

MCP是虹彩病毒的主要结构蛋白, 表达量占病毒总蛋白含量的40%~50%^[20], 同时也是ISKNV的主要免疫原性蛋白^[5-6, 21], 可作为

收稿日期: 2015-07-15 修回日期: 2015-11-21

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD25B02); 国家自然科学基金(31502201); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(A201501B12);

通信作者: 李宁求, E-mail: liningq@126.com

ISKNV细胞培养灭活疫苗及重组MCP亚单位疫苗等疫苗有效抗原含量的检测靶标。本研究将重组ISKNV MCP免疫小鼠(*Mus musculus*), 筛选获得3株单克隆抗体, 对制备的单克隆抗体部分特性进行了鉴定, 为建立ISKNV疫苗抗原含量ELISA检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞与病毒

重组菌pBVMCP/DH5 α 由本实验室构建保存; 鳃脑组织细胞系(CPB)由本实验室建立并保藏^[22]; 鼠骨髓瘤细胞株SP2/0由本实验室冻存; 鳃传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)QY株、大鲵虹彩病毒(SGIV)、鳃弹状病毒(SCRV)由本实验室分离保存。

1.2 实验试剂

弗氏完全佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)、弗氏不完全佐剂(incomplete freund's adjuvant, IFA)、HAT、PEG3350、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠IgG、均购自Sigma公司; IgG抗体亚类鉴定试剂盒购自Sigma公司; 细胞培养基、胎牛血清(FBS)、胰酶等购自Gibco公司; 预染蛋白质Marker购自Fermentas公司。

1.3 实验动物

8周龄SPF雌性BALB/c小鼠购自广东省实验动物中心。

1.4 病毒培养

CPB细胞用含10%FBS的L-15培养基, 在28℃培养箱中进行培养, 待细胞长到80%左右, 弃去培养基, 用PBS洗细胞1次, 分别接种ISKNV、SGIV、SCRV病毒液, 放入28℃培养箱中吸附1 h后, 移走没有吸附的病毒, 加入含5%FBS的L-15培养基。28℃培养至完全病变, 细胞反复冻融2次, 离心收集其上清液, 存放于-80℃备用。

1.5 重组MCP蛋白的制备

参照Fu等^[5]报道的方法, 将含重组质粒的菌株pBVMCP/DH5 α 于Amp⁺LB培养基中30℃培养过

夜, 按1:50接种量扩大培养至OD₆₀₀为0.4~0.6, 立即升温至42℃, 诱导表达4 h, 离心收集菌体, 超声破碎后, 离心收集包涵体, 经2 mol/L 脲素洗涤3次, 用8 mol/L 脲素、50 mmol/tris-cl(pH 8.5)溶解, 在脲素、tris-cl、甘油缓冲液中透析复性; 将复性蛋白上清液加到10 ku浓缩管离心浓缩, 收集上清液, SDS-PAGE检测重组蛋白。

1.6 动物免疫

以浓缩的重组MCP蛋白作为免疫原, 按1:1比例(V/V)将抗原与弗氏完全佐剂混合, 乳化后腹腔注射BALB/c小鼠, 首免剂量为100 μ g/只; 采用弗氏不完全佐剂乳化后的抗原于首免后第14和28天分别进行二免和三免, 免疫剂量为50 μ g/只; 三免后14 d, 小鼠断尾采血检测其血清抗体效价; 效价达到融合要求后, 腹腔注射抗原进行加强免疫, 免疫剂量50 μ g/只; 4 d后进行细胞融合。融合前取免疫的BALB/c小鼠, 摘除眼球采血, 并分离血清作为抗体检测时的阳性对照。

1.7 细胞融合与杂交瘤细胞株的克隆筛选

将制备好的骨髓瘤细胞SP2/0(大约 6×10^7 个)和免疫鼠脾细胞悬液按细胞数量1:1的比例混合, 用50%PEG3350溶液按常规融合方法进行细胞融合, 用含HAT的完全培养基进行筛选。待96孔板中杂交瘤细胞长满孔底1/4面积时, 以重组MCP为检测抗原, 采用间接ELISA方法进行检测。同时采用间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)进一步筛选阳性细胞(接毒24 h进行IFA检测, 方法见1.10)。选择ELISA和IFA检测为阳性且效价较高的细胞, 采用有限稀释法连续亚克隆3~5次, 直到所有克隆细胞孔均为阳性。

1.8 单抗腹水制备及效价测定

将间接ELISA筛选出的效价最高的阳性杂交瘤细胞在细胞培养瓶中扩大培养, 用于腹水制备。取8周龄健康的雌性BALB/c小鼠, 每只腹腔注射灭菌液体石蜡0.5 mL, 7~10 d后注射杂交瘤细胞(约 $10^5 \sim 10^6$ /只), 10~15 d后收集腹水。将腹水4℃过夜, 然后5000 r/min离心5 min, 去除细胞成分及沉淀物, 收集上清液后间接ELISA测定抗体效价。

1.9 单抗亚类鉴定

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

1.10 抗体特异性鉴定

分别以ISKNV、SGIV、SCRV作为抗原包被酶标板, 间接ELISA法测定单抗与各抗原的交叉反应, 将SP2/0细胞培养上清液为阴性对照, P/N≥2.1 判为阳性反应。

1.11 间接免疫荧光实验

在48孔板中培养单层的CPB细胞, ISKNV-QY接毒72 h后, 洗出培养基, PBS洗涤2次, 用甲醇固定20 min, PBS洗涤2次, 每次5 min; 加入一抗(5F1腹水的使用量分别为1:200、1:500和1:1000, 稀释液为含2% BSA的PBS), 室温孵育60 min, PBST洗5次, 每次5 min; 然后加羊抗鼠IgG-FITC标记抗体(1:500, 稀释液为含2% BSA的PBS), 室温作用60 min; 吸出二抗, 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, 未接毒的CPB细胞作为阴性对照。

1.12 Western Blotting分析

将ISKNV-QY株细胞培养病毒上清液(TCID50=105.75, 10 μL)制样, 经SDS-PAGE电泳, 电转印于硝酸纤维素膜(NC)上, 将NC膜用5%的脱脂奶粉溶液4℃封闭过夜, 28℃分别与1:100、1:500和1:1000稀释的小鼠腹水孵育1 h, 再用PBST洗涤5次, 加入用PBST 1:5000稀释的HRP 标记的山羊抗小鼠IgG, 温和振荡结合1 h; PBST洗涤5次, 用DAB显色液室温显色。

2 结果

2.1 抗原的纯化

表达产物经超声破碎、收集包涵体、透析复

性后, 进行SDS-PAGE电泳, 仅在50 ku处出现一条目的条带, 与ISKNV-MCP蛋白预计分子量大小一致, 获得纯化的ISKNV-MCP蛋白(图1)。

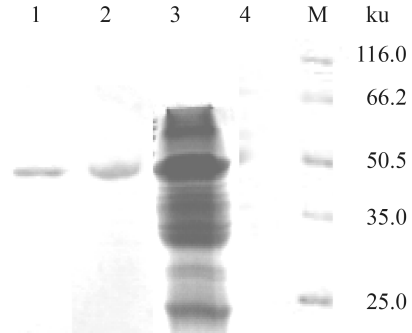


图1 ISKNV重组MCP蛋白的SDS-PAGE分析

1. 复性的重组MCP蛋白; 2. 纯化的重组MCP蛋白; 3. 诱导4 h的重组菌(DH5α/pBV220); 4. 诱导4 h的培养基上清液; M. 蛋白质分子质量标准蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant MCP protein of ISKNV

1. renatured recombinant MCP protein; 2. purified recombinant MCP protein; 3. recombinant DH5α (pBV220) 4 h post induction; 4. culture supernatant; M. protein molecular weight marker

2.2 杂交瘤细胞系构建及抗体效价测定

融合细胞经连续3次亚克隆及间接ELISA筛选, 得到3株可高效、稳定分泌抗ISKNV MCP的单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为3D9、5B4和5F1。以重组MCP包板, 间接ELISA测定3株杂交瘤细胞分泌的抗体效价分别为1:6400、1:6400和1:12 800。IFA结果显示, 3株杂交瘤细胞分泌的抗体均能识别ISKNV(图2)。选择5F1株制备腹水, 分别以重组MCP和ISKNV细胞培养上清液为检测抗原, 间接ELISA测定其腹水效价分别为1:51 200和1:400。

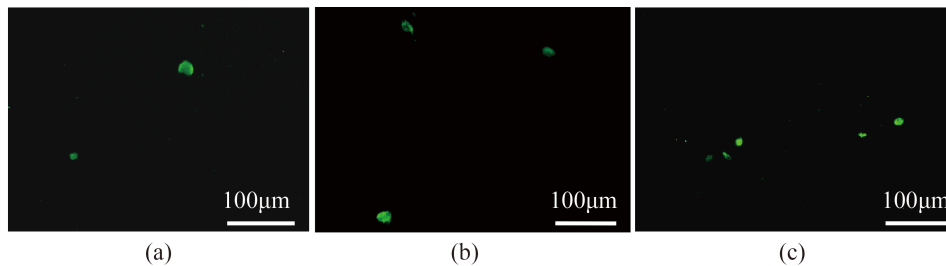


图2 3株杂交瘤细胞上清液与感染ISKNV的CPB细胞的间接免疫荧光染色结果

(a) 3D9; (b) 5B4; (c) 5F1

Fig. 2 IFA result of CPB cells inoculated with ISKNV recognized by supernatant of 3 hybridoma cell strains

2.3 单克隆抗体亚类

经抗体亚类试剂盒鉴定, 5F1、5B4和3D9株杂交瘤细胞所产生抗体均为IgG1型(表1)。

表1 抗ISKNV重组MCP单克隆抗体亚型鉴定(OD₄₉₀)

Tab. 1 The subtype identification of monoclonal antibody against ISKNV (OD₄₉₀)

杂交瘤细胞株 hybridoma cells	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
5F1	1.144	0.036	0.043	0.046	0.045	0.042
5B4	1.167	0.04	0.042	0.033	0.047	0.035
3D9	1.290	0.051	0.047	0.035	0.051	0.055

2.4 单克隆抗体的特异性

5F1、5B4和3D9单抗与ISKNV反应的OD₄₉₀值明显高于与SGIV和SCRV反应的值, 且3株单抗与ISKNV反应的P/N值均大于2.1, 而与SGIV和SCRV反应的P/N值小于2.1, 说明制备获得的3株单抗与SGIV和SCRV不发生交叉反应, 对ISKNV具有较强的特异性(表2)。

表2 抗ISKNV重组MCP单抗特异性鉴定结果

Tab. 2 The specialization test of McAbs of ISKNV MCP

杂交瘤细胞株 hybridoma cells	ISKNV	SGIV	SCRV	阴性对照 negative control
5F1	0.425	0.099	0.066	0.062
5B4	0.285	0.109	0.071	0.076
3D9	0.295	0.105	0.089	0.083

2.5 间接免疫荧光实验

接种ISKNV的CPB细胞分别与3种稀释度的5F1腹水进行间接免疫荧光检测, 结果显示加入3种稀释度的腹水作用的细胞发出不同程度的绿色荧光, 其中稀释度1:200的腹水能够完整、细致、明亮地与感染细胞发生反应; 稀释度1:500的腹水荧光强度稍弱, 部分感染细胞不能清晰地显示荧光; 稀释度1:1000的腹水与大部分感染细胞都不能显示荧光(图3)。因此, 5F1株制备腹水的IFA使用浓度为1:200。

2.6 免疫印迹分析

以1:500和1:1000 2种不同稀释度的5F1腹水与病毒培养上清液进行Western Blot检测, 结果显示, 2种稀释度腹水均能与病毒上清液发生

特异性反应, 目的条带约为50 ku。将病毒上清液浓缩50倍后与1:1000单抗进行Western Blot反应, 条带清晰可见(图4)。

3 讨论

以鳃传染性脾肾坏死病毒为代表的鱼类肿大细胞病毒属病毒是一类重要的水生动物病毒, 致死率高达90%以上, 其流行范围广, 遍及澳大利亚、日本、韩国、中国以及东南亚等多国^[23], 给世界水产养殖业带来了巨大的经济损失, 疫苗免疫是解决该病的重要手段。抗原含量检测是疫苗质量检测的重要指标。目前主要有病毒滴度、ELISA、定量PCR等检测方法。其中相对于病毒滴度及定量PCR检测方法, ELISA由于具有快速、简便、准确等优势而被广泛接受。

MCP是ISKNV的主衣壳蛋白, Dong等^[24]用ISKNV兔多抗与纯化ISKNV病毒免疫印记分析显示, MCP是多抗识别的最主要蛋白。本研究将纯化的ISKNV重组MCP蛋白作为免疫原免疫小鼠, 经过细胞融合和亚克隆, 筛选获得3株杂交瘤细胞株, 分别命名为5F1、5B4和3D9。获得的3株抗体均能与ISKNV发生特异性反应, 而不与SCRV、STIV发生交叉反应, 表明所获得的单抗具有良好的特异性。间接免疫荧光和Western Blotting显示5F1腹水能与ISKNV发生特异性反应, 并初步确定了5F1株制备腹水的使用浓度。

大量的、高纯度的免疫原是制备单克隆抗体的前提, 杂蛋白去除效率是抗原纯度的重要影响因素。本研究选择纯化的重组MCP蛋白作为免疫原, 克服了纯化病毒获得量较小、提纯难度大等问题。在杂交瘤细胞筛选过程中, 同时采用大肠杆菌作为抗原进行包板, 淘汰假阳性克隆株, 减少由于重组抗原含有大肠杆菌杂蛋白造成假阳性的问题。IFA实验证实获得的3株抗体均能与ISKNV病毒粒子反应, 其中5F1株通过间接免疫荧光和Western Blotting实验证实既能与ISKNV病毒粒子反应也能与变性的ISKNV蛋白发生反应, 说明5F1株识别的抗原表位为MCP线性表位。

在本实验中以病毒培养物上清液包板, 采用ELISA方法检测5F1株腹水抗体效价, 效价相对较低, 但间接免疫荧光和免疫印迹实验均有较好的实验效果, 推测病毒的包板条件如病毒包板

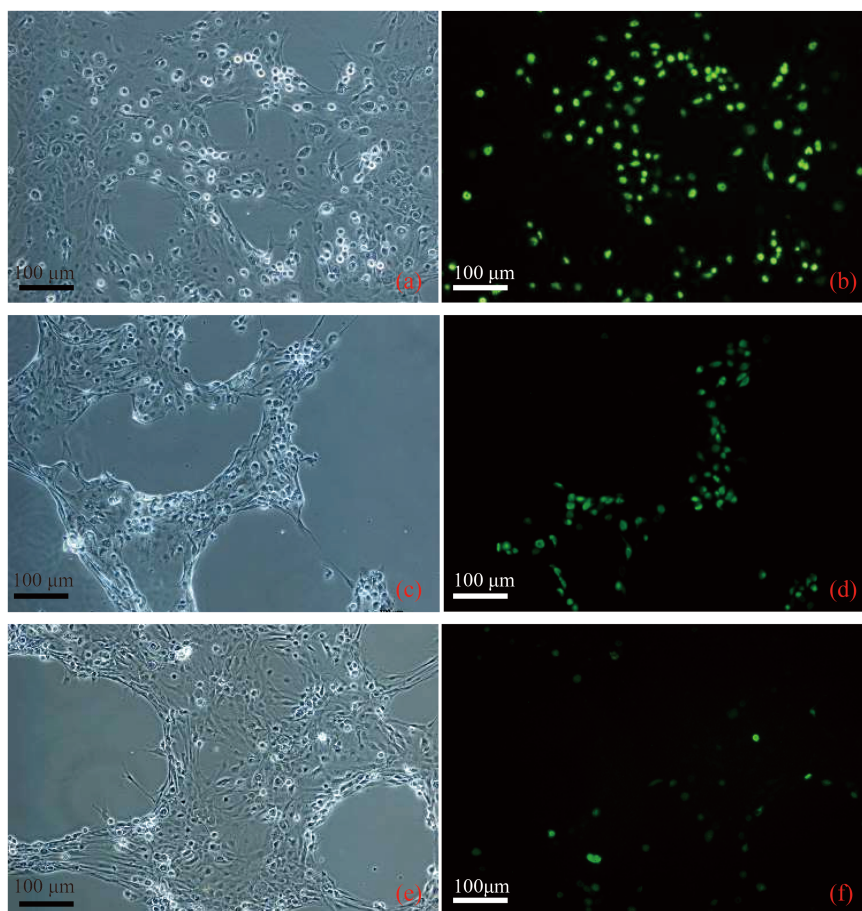


图 3 不同稀释度5F1腹水与感染ISKNV的CPB细胞的间接免疫荧光结果

(a) 1:200稀释, 明场; (b) 1:200稀释, 荧光; (c) 1:500稀释, 明场; (d) 1:500稀释, 荧光; (e) 1:1000稀释, 明场; (f) 1:1000稀释, 荧光

Fig. 3 IFA result of CPB cells inoculated with ISKNV recognized by 5F1 ascites at different dilution

(a) at a dilution of 1: 200, phase contrast; (b) at a dilution of 1: 200, FITC; (c) at a dilution of 1: 500, phase contrast; (d) at a dilution of 1: 500, FITC; (e) at a dilution of 1: 1000, phase contrast; (f) at a dilution of 1: 1000, FITC

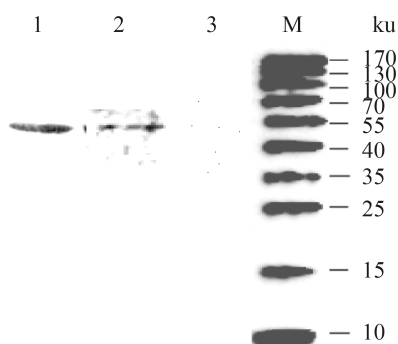


图 4 不同稀释度5F1腹水与ISKNV免疫印迹结果

1. ISKNV病毒培养液浓缩50倍, 1:1000稀释的5F1腹水; 2. ISKNV病毒培养上清液, 1:500稀释的5F1腹水; 3. ISKNV病毒培养上清液, 1:1000的5F1腹水; M. 预染蛋白marker

Fig. 4 Western-blotting identification of 5F1 ascites reacting with ISKNV at different dilution

1. ISKNV concentrated by 50 times, ascites at a dilution of 1: 1000; 2. ISKNV supernant, ascites at a dilution of 1: 500; 3. ISKNV supernant, ascites at a dilution of 1: 1000; M. protein marker

pH、病毒包板量、病毒裂解条件等尚待优化^[25]。另外, 本课题组也制备了重组MCP的鼠多抗和兔多抗, 鼠多抗效价低于兔多抗效价, 可能由于不同种动物对各种疾病的易感性不同, 不同品系动物的免疫反应存在明显差异^[26], 导致以小鼠为实验动物制备的重组MCP抗体效价低。

综上所述, 本实验制备了重组MCP的单克隆抗体, 为建立ISKNV疫苗抗原含量ELISA检测方法、深入研究ISKNV致病机理奠定物质基础。

参考文献:

- [1] Kurita J, Nakajima K. Megalocytiviruses [J]. *Viruses*, 2012, 4(4): 521-538.
- [2] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, *et al.* *Virus taxonomy: VIIIth report of the international committee on taxonomy of viruses* [M]. New York: Academic Press,

- 2005: 145–162.
- [3] Wang Y Q, Lü L, Weng S P, *et al.* Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus [J]. Archives of Virology, 2007, 152(4): 763–773.
- [4] Fu X Z, Li N Q, Liu L H, *et al.* Genotype and host range analysis of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) [J]. Virus Genes, 2011, 42(1): 97–109.
- [5] Fu X Z, Li N Q, Lai Y T, *et al.* Protective immunity against iridovirus disease in mandarin fish, induced by recombinant major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(4): 880–885.
- [6] Fu X Z, Li N Q, Lin Q, *et al.* Protective immunity against infectious spleen and kidney necrosis virus induced by immunization with DNA plasmid containing *mcp* gene in Chinese perch *Siniperca chuatsi* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(1): 259–266.
- [7] 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.
- [8] 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.
- Xu X L, Sheng X Z, Zhan W B. Development and application of an antibody chip in on-spot detection of aquatic animal viruses [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(5): 698–706 (in Chinese).
- [9] 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.
- Hao G J, Shen J Y, Xu Y, *et al.* Preparation of monoclonal antibodies against WSSV and application to test the virus in redclaw crayfish [J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2009, 14(2): 120–125 (in Chinese).
- [10] 连科迅, 赵丽丽, 张琳琳, 等. 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[J]. 水产学报, 2013, 37(8): 1229–1235.
- Lian K X, Zhao L L, Zhang L L, *et al.* Preparation and preliminary application of monoclonal antibodies against VP2 COE protein of infectious pancreatic necrosis virus [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(8): 1229–1235 (in Chinese).
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 姜有声, 战文斌, 程顶峰, 等. 对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白VP19的单克隆抗体制备及其定位[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 69–74.
- Jiang Y S, Zhan W B, Cheng S F, *et al.* Production of monoclonal antibody against WSSV VP 19 and VP 19 location [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(1): 69–74 (in Chinese).
- [14] 周志军, 孙文, 施金荣, 等. 检测狂犬病疫苗抗原含量的竞争ELISA的建立及初步应用[J]. 微生物学免疫学进展, 2007, 35(4): 28–31.
- Zhou Z J, Sun W, Shi J R, *et al.* Establishment and application of competitive-ELISA to screening virus antigen content in rabies vaccine production [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2007, 35(4): 28–31 (in Chinese).
- [15] 朱蓉, 徐葛林, 孙文, 等. 双抗体夹心ELISA与NIH法在狂犬病疫苗抗原检测中的比较[J]. 中国病毒学, 2005, 20(6): 623–625.
- Zhu R, Xu G L, Sun W, *et al.* Comparison on antigen detection of rabies vaccine by sandwich ELISA and NIH assay [J]. Virologica Sinica, 2005, 20(6): 623–625 (in Chinese).
- [16] Thraenhart O, Ramakishnan K. Standardization of an enzyme immunoassay for the *in vitro* potency assay of inactivated tissue culture rabies vaccines: determination of the rabies virus glycoprotein with polyclonal antisera [J]. Journal of Biological Standardization, 1989, 17(4): 291–309.
- [17] Perrin P, Morgeaux S, Sureau P. *In vitro* rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody [J]. Biologicals, 1990, 18(4): 321–330.

- [18] 孙建滨, 曾令兵, 张辉, 等. 大鲵虹彩病毒 β -丙内酯灭活方法的研究[J]. 淡水渔业, 2013, 43(3): 66–71.
Sun J B, Zeng L B, Zhang H, *et al.* Studies on the method of inactivating giant salamander iridovirus with β -propiolactone [J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(3): 66–71 (in Chinese).
- [19] Nakajima K, Sorimachi M. Production of monoclonal antibodies against red sea bream iridovirus [J]. Fish Pathology, 1995, 30(1): 47–52.
- [20] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, *et al.* Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution [J]. Virus Genes, 1998, 16(1): 59–66.
- [21] Xiong X P, Dong C F, Weng S P, *et al.* Antigenic identification of virion structural proteins from infectious spleen and kidney necrosis virus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(6): 919–924.
- [22] Fu X Z, Li N Q, Lai Y T, *et al.* A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization [J]. Journal of Fish Biology, 2015, 86(1): 32–45.
- [23] Song J Y, Kitamura S I, Jung S J, *et al.* Genetic variation and geographic distribution of megalocytiviruses [J]. The Journal of Microbiology, 2008, 46(1): 29–33.
- [24] Dong C F, Xiong X P, Shuang F, *et al.* Global landscape of structural proteins of infectious spleen and kidney necrosis virus [J]. Journal of Virology, 2011, 85(6): 2869–2877.
- [25] 李雪平, 邓国华, 高玉伟, 等. 检测流感病毒H5亚型抗体竞争ELISA方法的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(9): 716–720.
Li X P, Deng G H, Gao Y W, *et al.* Establishment of a rapid competitive ELISA for detecting antibodies against influenza A virus H5 subtype [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 30(9): 716–720 (in Chinese).
- [26] 北京实验动物学会, 北京实验动物研究中心, 北京市实验动物管理办公室. 实验动物科学[M]. 北京: 实验动物科学编辑部, 2007.
Beijing Association for Laboratory Animal Science, Beijing Laboratory Animal Research Center, Beijing Administration Office of Laboratory Animal. Laboratory Animal Science and Administration [M]. Beijing: Beijing Laboratory Animal Editorial Department, 2007 (in Chinese).

Development and identification of monoclonal antibody against recombinant major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus from *Siniperca chuatsi*

FU Xiaozhe^{1,2,3}, LI Ningqiu^{1,2,3*}, LIN Qiang^{1,2,3}, LIU Lihui^{1,2,3}, WU Shuqin^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Provinces, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

3. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

Abstract: Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) causes a disease with high mortality, resulting in significant economic loss to *Siniperca chuatsi* culture industry in China. To establish ELISA assay to determine virus antigen content of ISKNV vaccine and investigate the pathogenic mechanism of ISKNV major capsid protein (MCP), the monoclonal antibody (MAb) against recombinant MCP protein was developed and the properties were identified. The purified recombinant MCP was injected into BALB/c mice through subcutaneous route for three times. Then myeloma cells SP2/0 were fused with the spleen cells of the immunized BALB/c mice. Three hybridoma cell lines against ISKNV MCP were screened using indirect ELISA and were identified to be IgG1 subtype, designated as 5F1, 3D9 and 5B4, respectively. The three McAbs had no reaction with SCR and STIV except ISKNV by the indirect ELISA. The hybridoma cell line 5F1 was selected for ascites preparation. When the recombinant MCP and ISKNV supernatant was used as detective antigen respectively, the titer of ascites was 1 : 51 200 and 1 : 400 respectively. Indirect immunofluorescence and Western-blot analysis showed that the McAb 5F1 could recognize authentic MCP protein of ISKNV and working concentration of McAb 5F1 was confirmed. From above, the MAb against MCP of ISKNV was successfully prepared, which laid a foundation for further study.

Key words: *Siniperca chuatsi*; infectious spleen and kidney necrosis virus; major capsid protein; monoclonal antibody

Corresponding author: LI Ningqiu. E-mail:liningq@126.com

Funding projects: National Key Technology R&D Program (2012BAD25B02); National Natural Science Fund (31502201); Special Funds for the Science and Industry Development from the Administration of Ocean and Fisheries of Guangdong Province (A201501B12)