

文章编号:1000 - 0615(2001)06 - 0532 - 06

## 欧洲鳗免疫球蛋白单克隆抗体的制备与特性

林天龙<sup>1</sup>, 陈 强<sup>2</sup>, 龚 晖<sup>1</sup>, 刘晓东<sup>1</sup>, 俞伏松<sup>1</sup>, 杨金先<sup>1</sup>, 董传甫<sup>3</sup>

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;

2. 福建省农业科学院地热农业利用研究所, 福建 福州 350003;

3. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:**应用杂交瘤单克隆抗体技术制备了 13 个分泌抗欧洲鳗免疫球蛋白的单克隆抗体细胞株, 并对这些单克隆抗体的特性进行了分析。经抗体级份和亚级份测定, 其中 IgM 有 3 株, IgG<sub>1</sub> 有 5 株, IgG<sub>2a</sub> 有 3 株, IgG<sub>2b</sub> 有 2 株; 所有的单克隆抗体与欧鳗免疫球蛋白均有 ELISA 反应特性, 抗体滴度  $10^4 \sim 10^7$ , 有七株单抗具有 WESTERN BLOT 反应特性, 能在变性条件下识别欧鳗免疫球蛋白的重链。进一步实验证实这些单抗能特异地识别欧洲鳗、日本鳗的免疫球蛋白, 而与鲫、淡水白鲳、罗非鱼、胡子鲶、美洲斑点叉尾鮰血清免疫球蛋白以及水产动物常见病原菌如气单胞菌、爱德华氏菌、弧菌、柱状屈挠杆菌、沙门氏菌及大肠杆菌等无任何交叉反应。单克隆抗体 9D7, 对纯化的欧洲鳗免疫球蛋白的检测灵敏度为 16ng。实验结果证明这些单抗具有高度特异、高度灵敏等特点, 可用于鳗鲡免疫球蛋白的结构分析、免疫应答水平监测和病原诊断, 具有广阔的应用前景。

**关键词:**欧洲鳗鲡; 单克隆抗体; 免疫球蛋白

**中图分类号:** S948      **文献标识码:** A

## Production and characterization of monoclonal antibodies against *Anguilla anguilla* IgM

LIN Tian-long<sup>1</sup>, CHEN Qiang<sup>2</sup>, GONG Hui<sup>1</sup>, LIU Xiao-dong<sup>1</sup>, YU Fu-song<sup>1</sup>,  
YANG Jin-xian<sup>1</sup>, DONG Chuan-fu<sup>3</sup>

(1. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. Geothermic Utilization Institute, Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

3. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** By using hybridoma-monoclonal antibody technology, thirteen hybridoma cell lines which secrete monoclonal antibodies (Mab) against the IgM of European eel (*Anguilla anguilla*) had been established. And the characteristics of these Mabs had been described. In isotyping analysis, the results showed that among these Mabs, three of them are IgM, five of them are IgG<sub>1</sub>, three of them are IgG<sub>2a</sub> and two of them belong to IgG<sub>2b</sub>; all of these Mabs have the ability to bind the eel IgM by ELISA and their titer ranged from  $10^4$  to  $10^7$ , seven out of thirteen Mabs are able to recognize the heavy chain of the IgM on western blot. Further experiments proved that all of them only specifically bound to Ig of European eel and Japanese eel, and did not have any cross reaction with the Ig of *Crucian carp*, *Colossoma brachypomum cuvier*, *Tilapia*, *Clarias fuscus*, *Ictalurus punctatus*,

收稿日期: 2001-05-22

资助项目: 福建省科委重点项目、回国留学人员 A 类资助项目 (97 - 2 - 139)

第一作者: 林天龙 (1955 - ), 男, 福建福州人, 研究员, 主要从事鱼类免疫学、病原学研究。Tel: 0591 - 7817514, E-mail: l lint @pub3.fz.fj.cn

and also did not react to the fish common bacterial pathogen, such as *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Vibrio*, *Flexibacter columnaris*, *Salmonella* and *Escherichia coli*. The measuring sensitivity of the Mab MaE9D7 to purified eel IgM was as low as 16ng. All of these results demonstrated that Mabs were highly specific and sensitive to the Ig of European eel, and had the great potential to be used for analyzing the structure of eel IgM, monitoring the immunity level of cultured eel, and pathogen diagnosis.

**Key words:** *Anguilla anguilla*; monoclonal antibody; immunoglobulin

杂交瘤-单克隆抗体技术由 Köhler 和 Milstein<sup>[1]</sup>发明于 1975 年。80 年代初在世界各国兴起单克隆抗体研究热潮,现在每年都有近万篇有关单克隆抗体的研究报道,单克隆抗体已从初期的探索性研究进入大量开发、应用阶段<sup>[2-9]</sup>。此外,单抗技术与现代分子生物学技术相结合还可以用于基因定位、表达文库的筛选、基因表达产物的检测与提纯。尽管单克隆抗体已广泛应用于生命科学的方方面面,但应用单克隆抗体研究鱼类免疫球蛋白结构与功能,用于鱼类病原微生物研究、检测与快速诊断方面的报道却为数不多,A K Siwicki 等<sup>[10]</sup>制备了抗金鱼免疫球蛋白单克隆抗体并用于抗体分泌细胞定位和免疫水平监测,Lin 和 Harry<sup>[11]</sup>等应用单克隆抗体分析小瓜虫保护性抗原并进行了被动免疫实验,Autin<sup>[12]</sup>和 Cartwright 等<sup>[13]</sup>建立了以单抗为核心的水产病原快速检测方法。近几年,我国水产养殖发展迅猛,养殖品种日益增多,规模不断扩大,伴随大规模集约化养殖而来的是暴发性、毁灭性疾病的蔓延,与之相比水产动物病害防治几乎还停留在化学疗法时代,要从根本上改变这种面貌,必须加快鱼类基础免疫学的研究,促进鱼类病原学、诊断技术和疫苗学的发展,将免疫预防手段引入到水产养殖业。基于这种认识和生产上的需求,我们开展了欧洲鳗血清免疫球蛋白(IgM)单克隆抗体的研究,试图将单克隆抗体运用于鳗鳃 IgM 结构与功能的分析,鳗鳃体液免疫应答规律的研究,病原诊断和流行病学和血清学调查研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、细胞、菌株

欧洲鳗(*Anguilla anguilla*)、日本鳗(*Anguilla japonicus*):每尾 150~180 克,取自福建长乐鳗鲡养殖场;BALB/C 小鼠 6~8 周龄购自上海西浦尔必凯实验动物有限公司;SP2/O 小鼠骨髓瘤细胞购自北京病毒所;温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*),编号 HBM041005(本实验室分离鉴定)。

### 1.2 主要试剂

DMEM、HAT、HT 培养基,羊抗鼠 IgG(Fab<sub>2</sub>)碱性磷酸酶标记物、羊抗鼠亚级份、兔抗羊 IgG-HRP 标记物、融合剂 PEG/DMSO 均购自 Sigma 公司,新生牛血清由本室自备。

### 1.3 免疫原制备

欧洲鳗 IgM 提取纯化按林天龙等<sup>[14]</sup>的方法。欧洲鳗经温和气单胞菌 HBM 041005 免疫后,分离血清,用饱和硫酸铵分步沉析法结合 Sepharose-4B 柱层析提取纯化 IgM,测定蛋白浓度,-20℃ 备用。

### 1.4 BALB/C 小鼠免疫程序

以纯化的欧洲鳗 IgM 每 0.15mL 20μg 与等体积弗氏完全佐剂乳化后腹腔注射 BALB/C 小鼠,2 周后,用每 0.05mL 30μg 的浓度对欧洲鳗 IgM 进行脾内加强免疫,3d 后颈动脉纵采血,测定血清抗体效价,取脾细胞用于杂交融合。

### 1.5 细胞杂交融合与腹水抗体制备

在无菌条件下取免疫小鼠脾脏,捣碎制成细胞悬液,2 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5min,将细胞重悬后加 10mL 0.17mM NH<sub>4</sub>Cl,冰浴低渗处理 10min,同上离心,重悬于 10mL DMEM,免疫脾细胞与 SP2/O 骨髓瘤细胞混合比例为 4:1,2 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5min,加入 1mL PEG/DMSO 进行细胞融合。1min 后缓慢加入 DMEM 至 30mL,捻转 3~5min,同上离心,重悬杂交细胞于含 15% 牛血清的 HAT-DMEM,调节至每毫

升  $5 \times 10^5$  个细胞,再滴加到 96 孔细胞培养板(Nunc) ,每周 0.1mL ,置 37<sup>o</sup> ,5 %CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,第 4~5 天滴加 0.1mL 含 15 %牛血清的 HAT - DMEM ,每天观察杂交瘤生长情况一次。以间接 ELISA 检测杂交瘤细胞上清,取抗体阳性孔细胞经有限稀释法克隆,制备单克隆细胞,扩大培养,冻存液氮中。杂交瘤细胞株经冻存、复苏后取  $5 \times 10^6$  对数生长期细胞腹腔接种 12 周龄 BALB/C 小鼠,10~14d 后采集腹水,10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5min,收集上清 - 20<sup>o</sup> 备用。

## 1.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)

### 1.6.1 筛选单克隆抗体

温和气单胞菌 HBM 041005 用 0.01mol L<sup>-1</sup> PBS 重悬至 OD<sub>600</sub> 0.25,超声波破碎后,包被于 96 孔酶标板(厦门茂源塑料厂),50 $\mu$ L·well<sup>-1</sup>,4<sup>o</sup> 过夜。次日每孔滴加 100 $\mu$ L 含 2 %牛血清白蛋白(BSA)的 PBST 封闭 1h,PBST 洗三次后加入 1:150 稀释的欧洲鳗免疫血清,室温反应 2h;同上洗涤后加入 50 $\mu$ L 杂交瘤细胞培养上清,室温反应 1h,PBST 洗三次,滴加羊抗鼠 IgG 碱性磷酸酶标记抗体(1:30 000),室温反应 1h,同上洗涤后加 PNPP(Bio - Rad),37<sup>o</sup> 显色 30~60min。实验设 SP2/O 骨髓瘤细胞培养上清为阴性对照,BALB/C 小鼠免疫血清为阳性对照。

### 1.6.2 单抗腹水效价测定

以 2.5 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 纯化欧洲鳗 IgM 包被 96 孔酶标板,每孔 50 $\mu$ L,4<sup>o</sup> 过夜,同上封闭洗涤后,加入 10 进系列稀释的腹水抗体,室温反应 2h,标记抗体与显色反应同上。

### 1.6.3 单抗灵敏度测定

纯化欧洲鳗 IgM 起始浓度为 5 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 开始,倍比稀释至 39ng·mL<sup>-1</sup>,每孔 50 $\mu$ L,4<sup>o</sup> 包被过夜,封闭后滴加腹水抗体[工作浓度 1:500~8 000],每孔 50 $\mu$ L,其余步骤同上。

### 1.6.4 单抗特异性测定

收集罗非鱼、白鲢、胡子鲶、斑点叉尾鮰和日本鳗血清,以及水产动物常见病原菌:气单胞菌 15 株、弧菌 3 株、爱德华氏菌 2 株、柱状屈挠杆菌 2 株、沙门氏菌 2 株和大肠杆菌 2 株共 26 株。待检鱼血清 1 000 倍稀释后包被于酶标板;待检病原菌处理同 1.6.1 中所述,超声波破碎后包被于酶标板;50 $\mu$ L·well<sup>-1</sup>,4<sup>o</sup> 包被过夜,封闭、洗涤后滴加杂交瘤细胞培养上清,其余步骤同上。用 ELISA - READER (Bio - Rad model 550 型)记录结果。

## 1.7 亚级份测定

包被、滴加欧洲鳗免疫血清、滴加各种单克隆抗体同 1.6.1 中所述,再分别加入 6 种羊抗鼠亚级份,工作浓度为 1:1 000,每孔 50 $\mu$ L,室温反应 1h,洗涤后滴加兔抗羊 IgG - HP 标记物(1:5 000),每孔 50 $\mu$ L,室温反应 45min,同上洗涤后加底物 OPD (Sigma),37<sup>o</sup> 显色 15~30min 后判定结果。

## 1.8 蛋白浓度测定

用 DU Series 7000 分光光度计(BECKMAN)按 Bradford 法<sup>[15]</sup>进行,在波长 595nm 处测定 OD 值,参照标准曲线得出蛋白的浓度。

## 1.9 Western-blot 分析

SDS-PAGE 按文献<sup>[15]</sup>方法。聚丙烯酰胺凝胶(Sigma)用一孔梳制成浓缩胶浓度 4 %,分离胶浓度 10 %,30 $\mu$ g/200 $\mu$ L 纯化的欧洲鳗 IgM 加等体积 Laemmli 样品缓冲液,100<sup>o</sup> 煮沸 3min,点样后,20mA 电泳 20min,调电流至 30mA 继续电泳 50min;Western - blot,蛋白经电泳分离后,将凝胶移到电泳转移槽(Bio - Rad),恒压 100V,冰浴转移 70min,将蛋白转至硝酸纤维素膜(0.45 $\mu$ m,MSI 公司),用 2 %BSA - PBST 封闭后,切割成 3mm 宽的小条,每一小条分别与一种杂交瘤细胞培养上清感作,室温反应 1h,洗涤后滴加羊抗鼠 IgG(Fab) 碱性磷酸酶标记抗体(1:30 000),室温反应 1h,底物为 NBT 与 BCIP(Promega),室温显色 1h,水洗终止反应。

## 2 结果

### 2.1 细胞杂交融合试验

免疫脾细胞/骨髓瘤细胞按4:1混合,以PEG/DMSO为融合剂,每孔接种量为 $5 \times 10^4$ 的条件下进行杂交融合,其融合阳性率达到100%,分泌抗体阳性率为5.3%,获得能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞13株,分别命名为MaE4B7、MaE9A6、MaE12A11、MaE9B11、MaE3D11、MaE9D7、MaE6G10、MaE12G8、MaE8H1、MaE2D9、MaE9D12、MaE3E3、MaE7E2。

### 2.2 单抗效价及特性分析

单克隆抗体细胞株经两次克隆后取培养上清进行Western-blot和单抗亚级份测定,并制备了腹水抗体,测定了腹水抗体的ELISA效价及其对欧洲鳗IgM的检测灵敏度。特性分析见表1,Western-blot图谱见图1。

表1 单抗效价及特性分析

Tab.1 The characterization of monoclonal antibodies

单抗	Ig亚类	免疫学反应特性		
		ELISA		Western-blot
		效价	灵敏度(ng)	
MaE 4B7	IgG <sub>2b</sub>	10 <sup>6</sup>	62	+
MaE 9A6	IgG <sub>1</sub>	10 <sup>6</sup>	125	-
MaE 12A11	IgG <sub>2a</sub>	10 <sup>6</sup>	62	+
MaE 9B11	IgG <sub>1</sub>	10 <sup>7</sup>	62	+
MaE 3D11	IgG <sub>2a</sub>	10 <sup>6</sup>	62	+
MaE 9D7	IgM	10 <sup>6</sup>	16	+
MaE 6G10	IgG <sub>1</sub>	10 <sup>6</sup>	62	-
MaE 12G8	IgG <sub>2b</sub>	10 <sup>7</sup>	62	-
MaE 8H1	IgG <sub>2a</sub>	10 <sup>6</sup>	62	+
MaE 2D9	IgM	10 <sup>6</sup>	62	+
MaE 9D12	IgG <sub>1</sub>	10 <sup>6</sup>	62	+
MaE 3E3	IgG <sub>1</sub>	10 <sup>6</sup>	62	ND
MaE 7E2	IgM	10 <sup>4</sup>	62	ND

注: +表示阳性反应; -表示阴性反应;ND表示未测定

从表1中可看出13株单抗中,IgG<sub>1</sub>有5株、IgG<sub>2a</sub>有3株、IgG<sub>2b</sub>有2株、IgM有3株,未得到IgG<sub>3</sub>和IgA类型的单抗;单抗腹水效价 $10^4 \sim 10^7$ ;灵敏度测定结果表明大多数单抗能检出62ng的IgM,而单抗MaE9D7则能检出16ng的IgM。

从图1中可以看出,所选11株单抗中有8株能与转印后的IgM发生反应,其中7株单抗识别鳗鲡IgM的重链区,1株单抗(MaE2D9)的染色呈弥散型;有3株单抗(MaE9A6、MaE6G10、MaE12G8)无Western-blot反应特性。

### 2.3 单克隆抗体特异性测定

用欧洲鳗IgM单克隆抗体分别与不同种类鱼血清及26株水产动物常见病原菌进行ELISA反应,试验表明所选10株单克隆抗体仅识别欧洲鳗和日本鳗的Ig,与另外5种鱼的Ig无交叉反应(见表2),与被检的26株病原菌也无交叉反应。

表 2 单克隆抗体特异性

Tab. 2 The specificity of monoclonal antibodies

	MaE4B7	MaE9A6	MaE3D11	MaE12A11	MaE9D7	MaE12G8	MaE8H1	MaE2D9	MaE9D12	MaE3E3
鲫鱼	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
罗非鱼	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
白鲟	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
胡子鲶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
斑点叉尾鮰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
日本鳊	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+
欧洲鳊	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+

注: - 为阴性, + 为阳性, ++ 为强阳性。

### 3 讨论

要成功地把免疫预防手段运用于鱼类养殖业,首先必须对鱼类的免疫系统进行深入的研究,探索鱼类免疫球蛋白特性与功能,了解其免疫应答规律和免疫保护机理,为鱼类疫苗学积累科学数据。利用多克隆抗体研究鱼类 Ig 是最常用的方法之一,但鱼类是低等的脊椎动物,其 Ig 分子中的糖基具有强免疫原性,能刺激受免疫动物产生大量抗糖基抗体,导致多克隆抗体产生非特异性反应。另外制备高度纯化的免疫原技术难度大,残留的杂质也将影响二抗的特异性。运用杂交瘤-单克隆抗体技术制备抗鱼类免疫球蛋白抗体具备诸多优势,首先单抗具有单一特异性,其次不同的单抗识别不同的位点可用于鱼类抗体结构分析、提取纯化,此外,多种单抗有选择地组合可以制成高度特异、高度灵敏的鱼类 Ig 检测试剂,具有多抗不可替代的优点。杂交瘤细胞

能永久传代并能稳定分泌抗体,确保试剂的同质与可靠性,因此利用单抗研究免疫球蛋白,比多抗更准确、更方便。C. Sánchez 等<sup>[16]</sup>用虹鳟 Ig 作免疫原,得到 14 株分别抗重链和轻链的单抗,并证实了虹鳟 Ig 有 2 种不同分子量的轻链;Fausa E. Pettersen 等<sup>[17]</sup>制得了 2 株抗大麻哈鱼 Ig 的单抗,它们分别识别 Ig 的蛋白质一级结构和糖基都证实了上述观点。我们以欧洲鳊 IgM 为抗原,采用常规注射和脾内注射方法免疫 Balb/C 小鼠,经融合、筛选,获得 13 株单抗,实验证明脾内注射方法可以节省时间,而且免疫应答优于常规方法。这 13 株单抗高度特异,与不同种类的血清 IgM 无交叉反应,也不与水产动物常见病原菌发生反应,但欧鳊 IgM 单克隆抗体与日本鳊 IgM 发生同等强度的反应,这证实了欧洲鳊和日本鳊之间有很近的亲缘关系,同时也提示我们可以利用欧洲鳊 Ig 的单抗对日本鳊 Ig 进行相关研究。Western-blot 分析结果表明有 3 株单抗呈阴性反应,它们可能是构象依赖性抗体,不能识别变性后的欧洲鳊 IgM,有 8 株单抗呈阳性反应,其中 7 株是针对 IgM 的重链区,在 western-blot 反应中没有获得抗轻链的单抗,这与林天龙<sup>[14]</sup>报道的兔抗欧洲鳊 IgM 的 Western-blot 反应结果相一致,进一步说明了欧洲鳊 IgM 轻链的弱免疫原性;另 1 株单抗 (MaE2D9) 表现为弥散性染色,这种反应类型多与单抗识别糖基位点有关,有待采用糖蛋白酶消化方法加以证实。

从单抗的敏感性试验中可看出,单抗 MaE9D7 稀释度为 1 8 000 对纯化的欧洲鳊 IgM 的检测灵敏度为 16ng,若优化反应条件,可望进一步提高检测灵敏度,这在血清学调查和病原诊断方面将有重要的用



图 1 单抗的 Western-blot 图谱

Fig. 1 Weserrn-blot of monoclonal antibodies

1. MaE4B7; 2. MaE9A6; 3. MaE12A11; 4. MaE9B11;
5. MaE3D11; 6. MaE9D7; 7. MaE6G10; 8. MaE12G8;
9. MaE8H1; 10. MaE2D9; 11. MaE9D12; 12. 鼠阳性血清;
13. 鼠阴性血清; 14. 蛋白标准

途。

鱼类除了血清中有 Ig 外,在皮肤粘液、肠粘液以及鳃粘液中也有特异性 Ig 的存在,它们构成抵御病原微生物侵袭的第一道免疫保护屏障。但是对粘液 Ig 的发生、来源与免疫调控,及其在免疫应答过程中的消长规律和介导免疫保护的机理,人们尚未取得一致观点。St Louis - Cormier 提出了鱼类存在着分泌性免疫系统的假说,他指出虽然血清 Ig 与粘液 Ig 的免疫原性有相似之处,但是粘液 Ig 并非血清 Ig 渗出,而是鱼类的皮肤中存在的局部淋巴组织分泌性 Ig,在结构上与血清中的 Ig 有一定的区别<sup>[18]</sup>;但是也有不少学者认为皮肤粘液 Ig 和血清 Ig 在多方面是一致的,如 Lobb 等发现鳗鱼皮肤粘液和血清 Ig 二者之间分子量及各自的重轻链完全一致,并且免疫原性也相同<sup>[19]</sup>。而鳗鱼血清 Ig 和粘液 Ig 的结构、特性,免疫应答的消长规律及两者之间的相互关系,还远未被人们所揭示,利用鳗鱼 IgM 单克隆抗体高度特异性将有可能对鳗鱼粘液 Ig 和血清 Ig 进行分析比较阐明两者之间的异同点,对粘液 Ig 的产生细胞进行定位,从而说明粘液 Ig 的发生与来源。综上所述,鳗鱼 IgM 单克隆抗体可以广泛应用于鳗鱼免疫球蛋白结构与功能的分析,血清学流行病学调查,以及鳗鱼免疫应答水平监测和疫苗免疫效果的评价,单抗的应用将有助于鳗鱼免疫学深层次研究的开展。

### 参考文献:

- [1] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975,256:495 - 497.
- [2] 刘秀梵.单克隆抗体在农业上的应用[M].合肥:安徽科学技术出版社,1994.
- [3] 万遂如,刘振润,章金钢,等.中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第八次学术研讨会论文集[C].湖北:襄樊中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会,1999.
- [4] 邱玉华,季玉红,郭玲,等.鼠抗人 B7 - 1 分子功能性单克隆抗体的制备及生物学特性[J].中国免疫学杂志,2000,16:589 - 593.
- [5] 刘秀梵,周维松,张如宽,等.抗大肠埃希氏菌(*E. coli*)粘着素 K88 的特异单克隆抗体的产生及其特性测定[J].江苏农学院学报,1985,6(1):1 - 6.
- [6] 王志亮,焦新安,张如宽,等.沙门氏菌属特异单克隆抗体检测试剂的研制及初步鉴定[J].江苏农学院学报,1993,14(2):69 - 72.
- [7] 董桂林,郭景荣,陈永莹.蜜蜂螺原体单克隆抗体的制备及其基本性状研究[J].南京农业大学学报,1990,13(1):43 - 47.
- [8] 程鹏,王锡德,静国忠,等.单克隆抗体-研究蛋白质折叠的新探针[J].中国科学,1998,8:302 - 307.
- [9] 徐步.禽多杀性巴氏杆菌(*P. m.*)病的研究[D].南京:南京农业大学,1994,5 - 48.
- [10] Siwicki A K, Vergnet C, Charlemagne J, et al. Monoclonal antibodies against goldfish (*Carassius auratus*) immunoglobulin: application to the quantification of immunoglobulin and antibody-secreting cells by ELISPOT and seric immunoglobulin and antibody levels by ELISA in carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Vet Res, 1994,25:458 - 467.
- [11] Lin T L, Dickerson H W. Purification and Partial Characterization of Immobilization Antigen from Ichthyophthirius multifiliis [J]. J Protozool, 1992,39(4):457 - 463.
- [12] Austin B. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric red-mouth furunculosis in fish farms [J]. J Fish Dis, 1986, (9):469 - 474.
- [13] Cartwright G A, Chen D, Hanna P J, et al. Immunodiagnosis of virulent strains of associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) using a monoclonal antibody [J]. J Fish Dis, 1994,17:123 - 133.
- [14] 林天龙,陈强,俞伏松,等.欧洲鳗血清免疫球蛋白纯化及部分特性分析[J].水产学报,2001,25(1):52 - 57.
- [15] Frederick M A, Roger B, Robert E k, et al. Current protocols in molecular biology (vol. 2) [M]. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987,10.1.1 - 10.2.1.
- [16] Sánchez C, Lopez-Fierro P, Zapata A, et al. Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulin [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1993,3(4):237 - 251.
- [17] Pettersen F E, Fyllingen I, Kavlie A, et al. Monoclonal antibodies reactive with serum IgM and leukocytes from Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1995,5(4):275 - 287.
- [18] St E A. Louis-Cormier, Osterland C K, Anderson P D, et al. Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout [J]. Dev Comp Immunol, 1984,8:71 - 80.
- [19] Lobb C J. Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization [J]. Dev Comp Immunol, 1987,11:727 - 738.