

抗大鲵虹彩病毒MCP COE蛋白单克隆抗体的 制备及初步应用

周小愿*, 张星朗, 贾秋红, 韩亚慧, 高宏伟

(中国水产科学研究院黄河水产研究所, 陕西 西安 710086)

摘要: 制备抗大鲵虹彩病毒(CGSIV)MCP COE蛋白的单克隆抗体, 并对其基本特性进行鉴定及开展初步应用。用纯化的重组CGSIV MCP COE蛋白免疫BALB/c小鼠, 取免疫小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合, 间接ELISA法检测阳性孔, 经有限稀释法亚克隆, 筛选单克隆杂交瘤细胞株。采用间接ELISA法、免疫印迹法和单克隆抗体亚型检测试剂盒等鉴定单抗的稳定性、特异性和亚型; 采用腹水诱生法制备单抗腹水, 饱和硫酸铵法纯化腹水单抗; 间接ELISA法分别测定单抗杂交瘤细胞上清液和腹水单抗的效价; 利用间接免疫荧光法观察CGSIV的增殖。结果显示, 细胞融合克隆率为98.68%, 阳性率为20.52%, 得到1株能够稳定分泌特异性抗体的阳性杂交瘤细胞, 命名为1M6。单克隆抗体的亚型属于IgG2b, κ 链; 免疫印迹法和间接ELISA法测定结果显示, 单抗具有很好的特异性; 杂交瘤细胞株培养上清液的效价为1:1600, 腹水单抗效价为1:2 \times 10⁶, 亲和常数为2 \times 10⁵。间接免疫荧光显示CGSIV感染EPC细胞24 h后在宿主细胞质中可以观察到成熟的病毒粒子形成的包涵体, 而且在宿主细胞核内也能发现病毒粒子。抗CGSIV MCP COE蛋白单克隆抗体的成功制备为CGSIV免疫学检测方法的建立和其他相关研究的开展奠定了基础。

关键词: 大鲵; 虹彩病毒; 主要衣壳蛋白; 单克隆抗体

中图分类号: Q 511; S 947.3

文献标志码: A

大鲵虹彩病毒(Chinese giant salamander iridovirus, CGSIV)是近年来发现的一种虹彩病毒科(Iridoviridae)蛙病毒属(*Ranavirus*)病毒, 可感染人工养殖的大鲵(*Andrias davidianus*), 感染后出现四肢尤其后肢肿大溃烂、头部肿大、口角溃疡、下颌及体表其他部分出血等典型外部症状^[1-3]。目前发现, 它可感染生长发育各阶段的养殖大鲵; 染病大鲵在出现症状后即会快速死亡, 而且死亡率达到90%以上。由于大鲵人工繁育的兴起和贸易频繁, CGSIV的传播呈现出范围大、速度快的特点。大鲵虹彩病毒病(Chinese giant salamander iridovirus disease, CGSIVD)的频繁发生已经给众多大鲵养殖场(户)造成重大经济损失。

CGSIV属于双链DNA病毒, 病毒颗粒呈二十面体, 直径约150 nm, 具囊膜, 对热、酸、碱及常见有机溶剂等敏感^[4-5]。主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)是虹彩病毒科病毒的主要结构蛋白, 占病毒粒子可溶性蛋白的90%^[6]。MCP蛋白的DNA序列在虹彩病毒科中高度保守, 已成为虹彩病毒分子进化和分类方面研究的主要目的基因序列^[7]; MCP蛋白在病毒的包装和感染过程中发挥非常重要的作用, 如Sample等^[8]研究发现, 通过反义RNA干扰技术沉默MCP基因的表达, 可导致超过80%的不具有感染性的异常病毒粒子产生。它也是病毒的抗原相关蛋白, 含有病毒主要抗原决定簇, 已成为设计和制备抗

收稿日期: 2016-01-20 修回日期: 2016-06-11

资助项目: 陕西省科学技术发展计划项目(2012K01-18; 2014k01-20-02)

通信作者: 周小愿, E-mail: zhouxy_2005@163.com

病毒药物和疫苗的关键靶标^[9-10]。

为有效防控CGSIV的流行,目前众多学者针对CGSIV建立多种诊断方法,如环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法、巢式PCR法等检测方法^[11-12]。但这些方法均是建立在PCR检测原理基础之上,或者易污染,结果假阳性率较高,或者需要的仪器设备较为昂贵,用时较长,现场使用不便利。实际生产和科研都亟需更为简便、快速的免疫学检测方法用于现场CGSIV的检测和筛查。此外,免疫荧光技术作为活体荧光标记观察的有力手段,在实验结果上和电镜观察结果互为佐证,能够迅速准确地观察到病毒蛋白质在宿主细胞内的表达、定位以及和宿主蛋白质之间的相互作用,为病毒检测、病毒蛋白的功能研究乃至病毒的形态发生提供更直观的研究结果^[13]。

为此,本实验室利用分离保存的大鲢虹彩病毒略阳株,通过PCR方法扩增MCP蛋白基因的抗原表位区(334~1092 bp),命名为MCP COE (759 bp);利用原核表达获得了能够表达该段基因编码蛋白的重组菌pET-21a-mcp COE/BL21。在此基础上,利用杂交瘤技术,建立了能够稳定分泌抗CGSIV MCP COE的杂交瘤细胞株,对其特性进行了鉴定,希望为建立特异、快速和便捷的CGSIV免疫学检测方法以及开展CGSIV形态发生等其他相关研究提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

重组菌pET-21a-mcp COE/BL21由本实验室构建保存;大鲢虹彩病毒略阳株(CGSI-V-LY)由本实验室分离并保存,草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)、传染性胰腺坏死病病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)、锦鲤疱疹病毒(Koi herpes virus, KHV)由本实验室保存。鲤上皮瘤细胞(EPC)由中国水产科学研究院长江水产研究所曾令兵研究员惠赠,鼠骨髓瘤细胞SP2/0由本实验室冻存;6~8周龄清洁级BALB/c雌性小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 主要试剂

RPMI-1640、新生牛胎血清购自GBICO公司;HAT培养基、HT培养基、PEG1450、弗氏完

全佐剂、弗氏不完全佐剂、Hoechst 33258、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG和异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗鼠IgG购自Sigma公司。单克隆抗体分型试剂盒购自Thermo Scientific公司。

1.3 抗原制备和免疫动物

将本实验室保存的pET-21a-MCP COE原核表达质粒按常规实验方法大量诱导表达,诱导表达的重组MCP COE蛋白经Ni²⁺亲和层析法纯化后冻存于-80℃备用。

以纯化的重组MCP COE蛋白为免疫原,加入等量弗氏完全佐剂乳化,经腹部和背部皮下注射BALB/c雌性小鼠,首免每只100 μg;用纯化的重组MCP COE蛋白加入等量弗氏不完全佐剂充分乳化后,每隔2周分别进行第2次和第3次免疫,剂量为每只小鼠50 μg;三免后每隔2周加强免疫2次,剂量同2免。第2次加强免疫3 d后脱颈处死小鼠,无菌条件下取小鼠脾细胞进行融合。

1.4 细胞融合与筛选

细胞融合实验参考张鸯等^[14]的方法进行。待细胞长至孔底面积1/10以上时吸出上清液,以纯化后重组的MCP COE蛋白为包被抗原,用常规间接ELISA方法筛选阳性孔。阳性克隆转至24孔板扩大培养,将经ELISA法检测仍为强阳性的克隆采用有限稀释法进行亚克隆,直至亚克隆杂交瘤细胞生长孔的上清液阳性率达到100%。

1.5 单抗稳定性、特异性和亚型测定

稳定性 将获得的阳性杂交瘤细胞株连续传代培养3个月,每隔1周取细胞培养上清液,用间接ELISA方法检测抗体效价,再将细胞冻存3个月后复苏,取培养3 d左右的细胞培养上清液以间接ELISA方法检测抗体效价。

特异性 Western blot法,收集CGSIV培养物和SP2/0细胞,分别参考万晴姣^[15]的方法进行裂解,采用常规方法将CGSIV培养物的裂解液、纯化重组的MCP COE蛋白和SP2/0裂解液进行SDS-PAGE电泳后转印到硝酸纤维素膜上,其中以SP2/0细胞裂解液为阴性对照。氨基黑染色5 min,甲醇褪去背景色。4℃,50 g/L脱脂奶粉封闭2 h;用PBST洗涤后,置于McAbs培养上清液(1:1000)中,室温孵育过夜;PBST洗涤后,加HRP标记的羊抗小鼠IgG(1:5000),室温孵育2 h;PBST洗涤3次,ECL法检测。

间接ELISA法 用GCRV、IPNV、KHV和

CGSIV等病毒的细胞培养物作为包被抗原, 杂交瘤细胞培养上清液为一抗, 同时设SP2/0细胞培养上清液为阴性对照, 按间接ELISA方法进行测定, 测定各组样品的OD₄₅₀值。各组样品的OD₄₅₀值记为*P*, 阴性对照的OD₄₅₀值记为*N*, 计算*P/N*值, 若*P/N*值 ≥ 2.1 判为阳性, 反之判为阴性。

亚型测定 按照Thermo Scientific单抗分型试剂盒的使用说明书进行操作。

1.6 单抗的大量制备与纯化及效价测定

采用体内诱生腹水法制备单抗腹水, 辛酸—饱和硫酸铵法提纯腹水单抗, 用SDS-PAGE检测其纯度, 用紫外分光光度法测定纯化腹水中抗体的浓度; 按照间接ELISA检测方法, 以纯化的MCP COE重组蛋白为包被抗原, 同时设立骨髓瘤细胞SP2/0培养上清液为阴性对照, 以*P/N* ≥ 2.1 的抗体最大稀释度作为效价值, 分别测定单抗上清液和腹水中抗体效价, 单抗-80 °C保存备用。

1.7 单抗亲和常数的测定

分别用10 $\mu\text{g/mL}$ 和5 $\mu\text{g/mL}$ 的MCP COE蛋白包被酶标板, 将已知浓度抗体稀释为1:10²~1:10⁹共8个梯度的稀释液, 应用间接ELISA测定其OD₄₅₀值, 以OD₄₅₀值为纵坐标, 抗体不同稀释度的负常用对数(-lg α , 其中 α 为抗体稀释倍数)为横坐标, 绘制不同稀释度的包被抗原反应曲线, 以上部趋于平坦的OD₄₅₀值为100%, 找出OD₄₅₀为50%时单抗稀释度, 参照相关文献^[6], 计算抗体的亲和常数(K_{aff})。

1.8 应用间接免疫荧光法观察CGSIV增殖

将无菌盖玻片置于6孔板(Corning)中培养单层的EPC细胞, CGSIV接毒24 h后弃去培养液, 经4%多聚甲醛固定过夜, PBST洗涤, 3% BSA封闭2 h, 以McAbs培养上清液(1:1000)为一抗, 室温下孵育2 h。PBST洗涤后, 以FITC标记的羊抗小鼠IgG(1:2500)为二抗, 室温避光孵育2 h。PBST洗涤后用荧光染料Hoechst 33258进行染色。将盖玻片有细胞的一面朝下, 50%甘油封片置于载玻片上, 荧光显微镜(Olympus BX-51)下观察, 拍照。

2 结果

2.1 抗原的纯化

表达重组蛋白用Ni²⁺柱亲和层析法纯化后,

进行SDS-PAGE电泳。从电泳结果(图1)可看出, 仅在29 ku处出现1条条带, 与预期蛋白分子量大小一致, 说明获得了纯化的MCP COE蛋白。

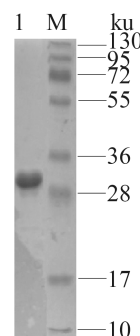


图1 纯化的重组MCP COE蛋白的SDS-PAGE电泳
M. 蛋白质分子量标准; 1. 纯化的重组MCP COE蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoretic profile of purified MCP COE protein

M. protein molecular weight marker; 1. purified products of MCP COE

2.2 杂交瘤细胞系的建立

在骨髓瘤细胞与脾细胞融合后第4 d出现小的克隆, 第10 d杂交瘤细胞铺满孔底80%, 用间接ELISA法筛选阳性孔, 克隆率为98.68%, 阳性率为20.52%。采用有限稀释法筛选得到1株阳性杂交瘤细胞, 命名为1M6。

2.3 单抗的稳定性、特异性和亚型

稳定性 将1M6杂交瘤细胞连续传代3个月, 利用间接ELISA方法检测细胞上清液和冻存复苏后的细胞上清液效价, 均一值保持在1:1600以上, 表明杂交瘤细胞株具有稳定分泌抗体的能力。

特异性 Western-blot检测结果(图2)显示, 1M6杂交瘤细胞上清液中的单抗不仅可与纯化的MCP COE蛋白发生特异性反应, 而且也能够和CGSIV在50 ku处出现特异性条带, 即发生特异性反应, 说明制备的1M6单抗具有良好的反应性, 可以识别CGSIV。

间接ELISA的检测结果表明, 单抗1M6与CGSIV呈明显的阳性反应(*P/N*>2.1), 而与其他几种病毒为阴性反应, 说明制备的1M6单抗具有较强的特异性。

亚型鉴定 采用间接ELISA法测定单抗1M6的抗体亚类, 结果表明, 单克隆抗体1M6属于IgG2b, κ 链。

2.4 单抗腹水的纯度及效价

已知亚型为IgG2b型的单克隆抗体, 其分子

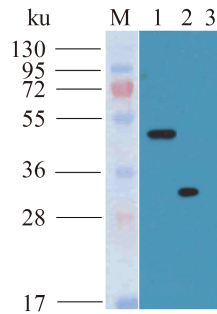


图2 单抗的Western blot鉴定

M. 蛋白分子量标准; 1. CGSIV病毒; 2. 纯化重组MCP COE蛋白
3. 阴性对照

Fig. 2 Identification of McAb with Western blot assay

M. protein molecular weight marker; 1. CGSIV; 2. purified MCP COE protein; 3. negative control

表1 单抗特异性鉴定结果

Tab. 1 Specialization test of the McAb against CGSIV MCP COE protein by ELISA

病毒的细胞培养物 virus	GCRV	IPNV	KHV	CGSIV
1M6 OD ₄₅₀ (P)	0.189	0.175	0.168	2.589
SP2/0 OD ₄₅₀ (N)	0.125	0.125	0.125	0.125
P/N	1.512	1.400	1.344	20.71

量约为160 ku, 有1条55 ku的重链和1条25 ku的轻链。腹水纯化后的单抗在SDS-PAGE凝胶电泳中只有2条蛋白条带, 其分子量分别约为55 ku和25 ku(图3), 证明纯化后的抗体纯度较高。ELISA测定结果表明, 杂交瘤细胞株培养上清液的效价为1:1600, 腹水单抗的效价为1:2×10⁶。

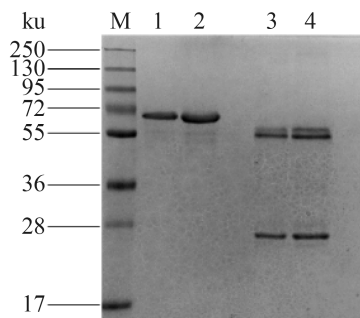


图3 纯化的单克隆抗体SDS-PAGE鉴定

M. 蛋白质分子量标准; 1. BSA(3 μg); 2. BSA(5 μg); 3. 单抗(3 μg);
4. 单抗(5 μg)

Fig. 3 Identification of purified McAb with SDS-PAGE assay

M. protein molecular weight marker; 1. BSA (3 μg); 2. BSA (5 μg); 3. McAb (3 μg); 4. McAb (5 μg)

2.5 腹水单抗亲和常数的测定

单抗的100% OD₄₅₀值为1.216, 由此推出50% OD₄₅₀值应为0.608, 此时单抗的稀释度为1:10⁶, 由公式计算得出1M6分泌的单克隆抗体的亲和常数为2×10⁵(图4)。

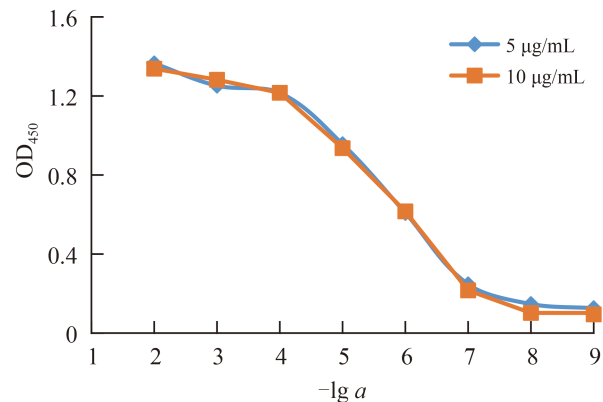


图4 1M6单克隆抗体亲和常数的测定

Fig. 4 Determined results of 1M6 McAb's affinity constant

2.6 应用间接免疫荧光法观察CGSIV的增殖

感染CGSIV(24 h)的EPC细胞在荧光显微镜下观察时, 可见明显的绿色荧光(图5-e), 其实质是CGSIV感染宿主细胞后形成的病毒包涵体。而宿主细胞核能被核酸荧光染料(Hoechst 33258)染色, 在荧光显微镜下发出蓝色荧光信号, 由于CGSIV属于DNA病毒, 所以其也能够被Hoechst 33258染料染色, 发出蓝色荧光(图5-d)。当图5-d和5-e两张图利用数字技术合成一张图时(图5-f), 就可以得知CGSIV感染宿主细胞后病毒增殖的状况及增殖病毒位于细胞质中; 但从图中也可以看出, 有部分增殖病毒似乎位于宿主细胞核中(图5-d、5-e及5-f中最下面的箭头所指)。而在对照组(0 h)细胞的荧光显微照片中, 只能看到发出蓝色荧光信号的宿主细胞核, 没有绿色荧光信号, 说明EPC细胞没有受到CGSIV病毒感染。

3 讨论

具有高滴度和良好特异性的抗体是建立免疫学检测方法和开展其他相关研究的基础。Liu等^[17]利用重组MCP蛋白为免疫原制备了高特异性的石斑鱼虹彩病毒(grouper iridovirus, GIV)和

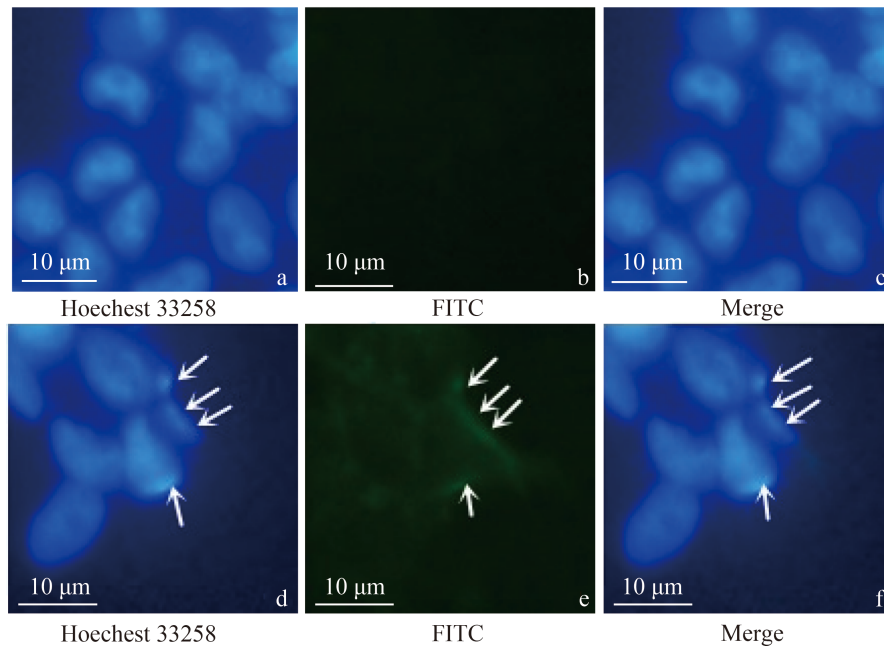


图5 1M6单克隆抗体亲和常数的测定

图中a~c为EPC细胞感染CGSIV 0 h后的荧光照片; d~f为EPC细胞感染CGSIV 24 h后的荧光照片; 图中箭头为CGSIV病灶发出的荧光信号

Fig. 5 Determined results of 1M6 McAb's affinity constant

Fluorescence microscopy images of a-c and d-f indicate that EPC cells were infected with CGSIV after zero hour and 24 hours respectively; arrows indicate the fluorescence signals detected with FITC antibody and Hoechst 33258

台湾石斑鱼虹彩病毒(grouper iridovirus of Taiwan, TGIV)两种多克隆抗体, 结果表明这两种抗体不存在交叉反应。Kim等^[18]以MCP蛋白为靶抗原研制的胶体金免疫试纸盒灵敏度达到 10^1 TCID₅₀/mL, 能够检测蛙病毒属的FV-3(frog virus 3)和KRV-1 (Korean Ranavirus), 甚至于同一种病毒的不同流行株。考虑到MCP全长较难表达^[10], 本研究选择编码氨基酸的101~353位, 即具有较强亲水性的MCP片段, 利用高效表达的pET原核表达系统进行表达, 并纯化出高纯度的重组蛋白。以该重组蛋白为免疫原免疫小鼠, 利用杂交瘤技术获得了能够稳定分泌抗CGSIV MCP单抗的杂交瘤细胞株。为验证分泌单抗的特异性, 本研究不仅将其与重组MCP COE蛋白和CGSIV进行免疫杂交, 而且也进行了不同水产动物病毒的ELISA检测和间接免疫荧光试验, 结果均证实该细胞株分泌的单抗具有良好的特异性, 可以识别和结合CGSIV。ELISA检测结果显示, 单抗具有较高的滴度, 腹水单抗的效价高达 $1:2 \times 10^6$ 。

研究结果显示, 除CGSIV贵州株在氨基酸的320位点和国内其他流行株不同以外, 国内CGSIV不同流行株MCP的氨基酸在101~353位基

本一致^[19]。因此本研究制备的单抗能够识别国内的所有CGSIV流行株, 但可能无法像上述研究制备的抗体那样, 具备识别国内不同CGSIV流行株的特异性。由于掌握的实验材料所限, 本研究在验证单抗特异性时, 没有包括蛙病毒属其他病毒, 尤其是国内已有的病毒, 如虎纹蛙病毒(TFV)和中华鳖病毒(STV)等。但氨基酸同源性分析结果显示, CGSIV和这两种病毒的MCP分别在编码氨基酸的116、118、170、235、238、278、290、330这8个位点存在变异^[19], 因此, 本研究制备的单抗应该可以特异性地区分CGSIV和这两种蛙病毒属病毒。具体的检测结果还有待于进一步验证, 如单抗的识别表位分析实验。

MCP单抗的成功制备有助于在CGSIV形态发生方面开展更加深入的研究。编码MCP基因属于晚期基因, 通常认为在虹彩病毒感染宿主的晚期, 即病毒粒子包装成熟时, 在宿主细胞质中方能检测到^[6]。Lin等^[20]利用制备的MCP单克隆抗体进行的免疫荧光研究结果却揭示, 不仅在GIV感染晚期的宿主细胞质中检测到GIV MCP, 而且在宿主细胞核内也检测到了GIV MCP。这说明此时在宿主细胞核内也存在成熟病毒粒子。

而此结果和本团队CGSIV形态发生研究中电镜观察到的现象基本一致,即在被感染的宿主细胞核内也观察到大量呈晶格状排列的成熟CGSIV病毒粒子^[5]。本次实验中,在感染CGSIV 24 h后的EPC细胞的免疫荧光照片中似乎也看到有部分成熟的病毒存在于宿主的细胞核中。不过,以往的观点认为此观察结果是一种假象,是由于病毒感染后期宿主细胞核核膜破裂导致成熟病毒粒子进入细胞核内或不同的观察角度所形成^[6]。但是, Lin等^[20]和本研究认为荧光显微照片观察的结果属于病毒感染24 h后细胞活体的荧光标记结果,而从有关CGSIV病毒增殖曲线^[4]来看,此时CGSIV病毒增殖还不至于造成宿主细胞核核膜的破裂。具体机制还有待于利用制备的单抗在CGSIV的形态发生方面进行更加深入的研究。

蛙病毒属病毒主要感染两栖类动物,目前已成为全球范围内养殖或野生两栖类大量死亡甚至灭绝的主要病原,严重威胁着全球生物多样性^[21-22]。CGSIV属于蛙病毒属病毒,同样对我国大鲵养殖产业的持续发展和野生大鲵物种资源的有效保护构成了严重威胁。所以应当利用制备的单抗,尽快建立CGSIV快速检测方法和研制相应的检测试剂盒,并开展其他相关研究,以有效应对目前较为严峻的CGSIV疾病发展情势。

参考文献:

- [1] Dong W Z, Zhang X M, Yang C M, *et al.* Iridovirus infection in Chinese giant salamanders, China, 2010[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(12): 2388-2389.
- [2] 江育林, 张旻, 景宏丽, 等. 患病中国大鲵中分离到一株虹彩病毒及其特性的研究[J]. *病毒学报*, 2011, 27(3): 274-282.
- Jiang Y L, Zhang M, Jing H L, *et al.* Isolation and characterization of an iridovirus from sick giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2011, 27(3): 274-282 (in Chinese).
- [3] 周小愿, 贾秋红, 吉红, 等. 大鲵肺肾囊肿的病原学研究[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(10): 47-51.
- Zhou X Y, Jia Q H, Ji H, *et al.* Pathogeny of disease characterized by the cysts of lung and kidney of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(10): 47-51 (in Chinese).
- [4] 高正勇, 曾令兵, 肖汉兵, 等. 大鲵虹彩病毒理化及生物学特性研究[J]. *淡水渔业*, 2012, 42(5): 17-21, 26.
- Gao Z Y, Zeng L B, Xiao H B, *et al.* Studies on the physical, chemical and biological characteristics of giant salamander iridovirus[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(5): 17-21, 26 (in Chinese).
- [5] 周小愿, 张星朗, 吉红, 等. 大鲵虹彩病毒的形态结构及其包涵体特征[J]. *淡水渔业*, 2015, 45(1): 62-66.
- Zhou X Y, Zhang X L, Ji H, *et al.* Morphology of *Andrias davidianus* iridovirus and characterization of its inclusion bodies[J]. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(1): 62-66 (in Chinese).
- [6] Chinchar V G, Yu K H, Jancovich J K. The molecular biology of frog virus 3 and other iridoviruses infecting cold-blooded vertebrates[J]. *Viruses*, 2011, 3(10): 1959-1985.
- [7] 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.
- [8] Sample R, Bryan L, Long S, *et al.* Inhibition of iridovirus protein synthesis and virus replication by antisense morpholino oligonucleotides targeted to the major capsid protein, the 18 kDa immediate-early protein, and a viral homolog of RNA polymerase II[J]. *Virology*, 2007, 358(2): 311-320.
- [9] Qin Q W, Shi C Y, Gin K Y H, *et al.* Antigenic characterization of a marine fish iridovirus from grouper, *Epinephelus* spp[J]. *Journal of Virological Methods*, 2002, 106 (1): 89-96.
- [10] Zhou Y, Fan Y D, LaPatra S E, *et al.* Protective immunity of a *Pichia pastoris* expressed recombinant iridovirus major capsid protein in the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*[J]. *Vaccine*, 2015, 33(42): 5662-5669.
- [11] 刘星星, 耿毅, 周赵英, 等. 大鲵蛙病毒巢氏PCR检测方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(3): 406-410.
- Liu X X, Geng Y, Zhou Z Y, *et al.* Development of a nested PCR detection method for Chinese giant salamanders ranavirus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(3): 406-410 (in Chinese).
- [12] Meng Y, Zhang H, Liang H W, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of iridovirus in the Chinese giant salamander[J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 194(1-2): 211-216.

- [13] 陈中元, 朱蓉, 张奇亚. 水生动物病毒的电镜和荧光显微镜观察[J]. 电子显微学报, 2012, 31(2): 190-193.
Chen Z Y, Zhu R, Zhang Q Y. Observations of aquatic animal viruses by electron microscopy and fluorescence microscopy[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2012, 31(2): 190-193 (in Chinese).
- [14] 张鸯, 陶明亮, 路保通, 等. 抗Zhangfei蛋白单克隆抗体的制备[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(3): 27-32, 38.
Zhang Y, Tao M L, Lu B T, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibodies against Zhangfei fusion protein[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2013, 41(3): 27-32, 38 (in Chinese).
- [15] 万晴姣. 石斑鱼虹彩病毒(SGIV) 囊膜蛋白组学及两个新结构蛋白基因的鉴定和功能初步研究[D]. 广州: 中山大学, 2009.
Wan Q J. Proteomics of Singapore grouper iridovirus (SGIV) envelope proteins and identification of SGIV two novel structural proteins[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2009 (in Chinese).
- [16] 杨靖亚, 陆晓帆, 张建, 等. 副溶血弧菌TDH单克隆抗体的研制与性质鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(3): 235-239.
Yang J Y, Lu X F, Zhang J, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibody against TDH produced by vibrio parahaemolyticus[J]. Chinese Journal of Immunology, 2012, 28(3): 235-239 (in Chinese).
- [17] Liu H I, Chiou P P, Gong H Y, *et al.* Cloning of the major capsid protein (MCP) of grouper iridovirus of Taiwan (TGIV) and preliminary evaluation of a recombinant MCP vaccine against TGIV[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(12): 28647-28656.
- [18] Kim Y R, Park S B, Fagutao F F, *et al.* Development of an immunochromatography assay kit for rapid detection of ranavirus[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 223: 33-39.
- [19] 周小愿, 张星朗, 韩亚慧, 等. 大鲵虹彩病毒-LY株主要衣壳蛋白基因克隆和分子特征研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(5): 45-54.
Zhou X Y, Zhang X L, Han Y H, *et al.* Gene cloning and molecular characteristics of major capsid protein from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) iridovirus-LY isolate[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(5): 45-54 (in Chinese).
- [20] Lin H Y, Liou C J, Cheng Y H, *et al.* Development and application of a monoclonal antibody against grouper iridovirus (GIV) major capsid protein[J]. Journal of Virological Methods, 2014, 205: 31-37.
- [21] Kolby J E, Smith K M, Ramirez S D, *et al.* Rapid response to evaluate the presence of amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and ranavirus in wild amphibian populations in Madagascar[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0125330.
- [22] Sim R R, Allender M C, Crawford L K, *et al.* Ranavirus epizootic in captive eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*) with concurrent herpesvirus and mycoplasma infection: management and monitoring[J]. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 2016, 47(1): 256-270.

Preparation and preliminary application of a monoclonal antibody against MCP COE protein of *Andrias davidianus* iridovirus

ZHOU Xiaoyuan^{*}, ZHANG Xinglang, JIA Qihong, HAN Yahui, GAO Hongwei

(Yellow River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Xi'an 710086, China)

Abstract: This work was to prepare and characterize a monoclonal antibody against MCP COE protein of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) iridovirus (CGSIV), so as to provide a valuable tool for CGSIV diagnosis and further researches on CGSIV pathogenesis. After being purified by nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) agarose resin, the recombinant MCP COE of CGSIV was used to immunize the BALB/c mice. Three days after the last immunization, spleen cells were removed and fused with myeloma cells. One hybridoma cell strain against the recombinant protein of MCP COE was obtained by screening with the indirect ELISA and limiting dilution assays, which was named 1M6. The McAb of 1M6 was identified to be IgG2b isotype with κ light chain and showed specific reactivity with CGSIV and the recombinant protein of MCP COE. The McAb was largely produced in mouse ascites and then depurated with saturated ammonium sulfate. Indirect ELISA assay showed that the valences of the McAbs in the cells culture supernatant and in mouse ascites were 1 : 1600 and 1 : 2×10^6 respectively. Affinity constant of the McAb of 1M6 was 2×10^5 . By immunofluorescence assay, the presence of CGSIV was observed in not only the cytoplasm but also the nucleus of CGSIV infected EPC cells. In conclusion, the prepared McAb has high titer and good specificity, which will lay the foundation for further studies on the control of CGSIV.

Key words: *Andrias davidianus*; iridovirus; major capsid protein; monoclonal antibody

Corresponding author: ZHOU Xiaoyuan. E-mail: zhouxu_2005@163.com

Funding projects: Shaanxi Province Science and Technology Development Program (2012K01-18; 2014k01-20-02)