

鲤疱疹病毒Ⅱ型(CyHV-2) ORF25 蛋白的原核表达 及单克隆抗体的制备

彭俊杰¹ 张琪¹ 贾路路¹ 林鑫¹
袁军法¹ 曾令兵² 周勇² 刘学芹¹

1. 华中农业大学水产学院/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070;
2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223

摘要 利用 PCR 方法扩增鲤疱疹病毒Ⅱ型(CyHV-2) ORF25 基因的部分基因序列, 并将扩增产物连接到原核表达载体 pGEX-KG, 成功构建了 CyHV-2-ORF25-KG 重组质粒。IPTG 将其诱导后, SDS-PAGE 分析表明: 目的蛋白得到表达, 分子质量大小为 42 ku, 且主要以包涵体形式存在; 用纯化的融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 多次免疫后通过细胞融合, 筛选出 1 株单抗 5C6; 经间接免疫荧光试验和 Western blot 试验验证, 这株单抗可以识别 CyHV-2 ORF25 蛋白。

关键词 鲤疱疹病毒Ⅱ型; ORF25 蛋白; 原核表达; 单克隆抗体

中图分类号 Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)02-0096-06

鲤疱疹病毒Ⅱ型(cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2) 是从鲤科鱼类分离的第 2 种疱疹病毒, 因此被国际病毒系统分类与命名委员会命名为鲤疱疹病毒Ⅱ型, 也被称为金鱼造血器官坏死病毒; CyHV-2 为线性双链 DNA 病毒, 基因组大小为 290 304 bp, 具有 154 个开放性阅读框^[1]; 其核衣壳外有囊膜包被, 呈椭圆形, 直径在 175~200 nm 之间, 其核衣壳为球形或六角形, 直径为 100~110 nm^[2]; 隶属于疱疹病毒目、异疱疹病毒科、鲤疱疹病毒属, 与鲤痘疱疹病毒(carp pox herpesvirus, cyprinid herpesvirus I, CyHV-1) 及鲤疱疹病毒Ⅲ型(koi herpesvirus, cyprinid herpesvirus III, CyHV-3) 均属疱疹病毒(Alloherpesviridae)^[3-4]。

1992 年春季, 日本学者首次从患病金鱼中分离到 CyHV-2, 该病毒能引起 EPC(epithelioma papillosum cyprini) 和 FHM(fathead minnow cells) 细胞产生病变^[5]。之后, Wang 等^[6]报道了 CyHV-2 感染养殖鲤, 并造成了我国异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) 的大规模死亡。2013 年, 武汉、广州、江苏等地也报道了该病的暴发, 自发病异育银鲫中检

测到 CyHV-2^[7]。CyHV-2 感染谱较小, 感染对象局限于鲫(*Carassius auratus*)^[8]、金鱼(*Carassius auratus*)^[9] 及鲤与金鱼杂交体^[10]。金鱼感染 CyHV-2 后, 初期表现为游动缓慢、食欲不振、精神沉郁、在池塘底部停留, 而后以眼球突出、皮肤苍白且有粘液、鳃出血坏死、鳃出血^[11] 等为主要临床症状。

早期的诊断对于有效防控 CyHV-2 感染引起的鲫造血器官坏死症尤为重要。传统的细胞分离培养技术是非常重要的检测方法, 但培养 CyHV-2 的敏感细胞系较难获得^[12], 且操作复杂、周期较长, 不适合快速检测及诊断; 电镜技术检测虽是最直接的方法, 但设备昂贵、操作繁琐, 不适合临床大规模检测; 分子生物学技术耗时且技术要求高。因此, 迫切需要研制并建立 ELISA 等免疫学快速检测方法, 为该病的临床诊断及检测提供有效方法。本研究通过克隆 CyHV-2 具有良好抗原特性的膜蛋白 ORF25^[13-14] 基因部分片段, 原核表达后免疫 BALB/c 小鼠, 筛选出 1 株特异性较高的单克隆抗体, 以期对 CyHV-2 的致病机制的研究及检测方法的建立奠定基础。

收稿日期: 2016-05-17

基金项目: 湖北省科技支撑计划项目(2015BBA234); 中央高校基本科研业务费专项(2013PY071)

彭俊杰, 硕士研究生。研究方向: 水产病毒致病机理与综合防控。E-mail: 150418543@qq.com

通信作者: 刘学芹, 博士, 副教授。研究方向: 水产病毒致病机理与综合防控。E-mail: xueqinliu@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

质粒 pGEX-KG、SP2/0 骨髓瘤细胞、CyHV-2 DNA 均为笔者所在实验室保存;所用鲫脑细胞(GiCB 细胞)与鲤疱疹病毒Ⅱ型(CyHV-2)由长江水产研究所曾令兵研究员提供;BALB/c 小鼠购自湖北省动物疫病预防控制中心;BL21 和 DH5 α 购于北京全式金生物技术有限公司。

DNA 分子质量标准 DL5000 购自东盛生物科技有限公司,PCR Mix、LA-Taq 酶、限制酶、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司,HRP 标记羊抗鼠 IgG 购于武汉博士德生物公司,淋巴细胞分离液购于天津灏洋生物公司,荧光二抗 IgG 购于 Invitrogen 生物公司,牛血清白蛋白、胰酶、佐剂、HT、HAT 培养基、融合试剂均购于 Sigma 生物公司。

1.2 引物的设计和目的基因的 PCR 扩增

根据 GenBank CyHV-2 ORF25 基因序列(NC_019495),选取其第 4~456 bp 核苷酸序列设计 1 对特异性引物,序列为 F: 5' CGGGATCCATGGGGTCCAACGGTG 3', R: 5' CGGAATCTTAGATCAGGTCAACG 3',该引物送往武汉擎科生物公司合成,划线处是 Bam H I /EcoR I 酶切位点。以 CyHV-2 DNA 为模板,按照以下体系进行 PCR

反应:2 \times PCR Mix 10 μ L,引物 F 与引物 R 各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L,ddH₂O 补至 20 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,35 个循环,之后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3 重组质粒的构建

将 ORF25 PCR 产物回收,并对其与 PGEX-KG 进行 Bam H I /EcoR I 双酶切,酶切产物回收后,用 T4 连接酶连接(22 $^{\circ}$ C,30 min),转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,接种于氨苄青霉素抗性 LB 平板;挑取单菌落,接种到 3 mL 含氨苄青霉素的 LB 中,置于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜;通过菌落 PCR 鉴定,并将菌液送往武汉擎科生物公司进行测序。

1.4 重组蛋白的原核表达

将上述构建成功的重组质粒转化感受态细胞 BL21 之后接种至 LB 液体培养基,通过 1 mmol/L IPTG 在 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h 之后,离心,并将菌液收集进行高压破碎,将上清与沉淀收集处理,通过 SDS-PAGE 分析其表达情况。

1.5 重组蛋白纯化及动物免疫

将上述高压破碎后收集的沉淀通过半透膜,进行透析之后浓缩,将所得蛋白免疫 4 周龄 BALB/c 小鼠,同时以未免疫的小鼠为空白对照,免疫剂量及时间如表 1 所示,于融合前 3 d 腹腔注射 200 μ g/只

表 1 小鼠免疫程序

Table 1 Immunization schedule of mice

免疫时间/d Time	免疫途径 Route	每只鼠免疫剂量/ μ g Dose	佐剂 Adjuvant
0	皮下多点注射 Hypodermic injection	100	完全福氏佐剂 Complete freud's adjuvant
14	皮下多点注射 Hypodermic injection	100	不完全福氏佐剂 Incomplete freud's adjuvant
28	皮下多点注射 Hypodermic injection	100	不完全福氏佐剂 Incomplete freud's adjuvant
42	皮下多点注射 Hypodermic injection	100	不完全福氏佐剂 Incomplete freud's adjuvant

进行加强免疫。

1.6 免疫后小鼠血清效价测定

用纯化的融合蛋白免疫小鼠 4 次后,尾静脉采血,ELISA 试验测定各小鼠血清效价。ELISA 步骤如下:用融合蛋白包被酶标板,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜之后,拍干包被液并用 PBST 洗涤干净,加入 100 μ L/孔封闭液于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,拍干包被液后 PBST 洗涤干净,每孔加入 100 μ L 稀释好的血清,即从 1:200 开始稀释至 1:25 600,空白小鼠血清作为阴性对照,置于 37 $^{\circ}$ C 1 h 后拍干洗涤干净,每孔加入 100 μ L HRP 标记羊抗鼠 IgG,于 37 $^{\circ}$ C 1 h 后拍干洗净,分别加入底物 A 与 B 于 37 $^{\circ}$ C 放置 10 min 后,加入终止液并测定 D_{630} 值。

1.7 细胞融合及亚克隆筛选

将 SP2/0 骨髓瘤细胞培养后收集并注射于小鼠皮下,10 d 左右实体瘤长大,在无菌操作台中将其取出,通过研磨、离心等步骤收集骨髓瘤细胞;选取血清效价最高的小鼠,以同样的方法收集脾脏细胞,同时收集 1 只空白小鼠的脾脏细胞作为饲养细胞;然后将免疫脾细胞与骨髓瘤细胞在融合剂的作用下,进行细胞融合,将融合后的细胞重悬后与饲养细胞混合,接于 96 孔细胞培养板,培养基为 HAT 培养基,将培养板放置于 37 $^{\circ}$ C 培养,注意全程无菌操作;待融合后杂交瘤细胞集落长约培养孔 1/4 大小时,通过 ELISA 检测其效价,选取效价较高的细胞进行亚克隆筛选,即将效价较高的阳性杂交瘤细

胞稀释成每孔 1 个细胞, 换为 HT 培养基, 加入饲养细胞继续培养, 通过 3 次亚克隆筛选出效价较高的阳性细胞, 并将其扩大培养后冻存。

1.8 单克隆抗体的大量制备

将扩大后的阳性杂交瘤细胞收集后, 腹腔注射小鼠, 细胞数量为 $10^5 \sim 10^6$ /只, 10 d 后收集小鼠腹水, 离心之后取上清并纯化、冻存。

1.9 单克隆抗体的 IFA 检测

用 CyHV-2 感染接种于 24 孔细胞板的鲫脑细胞, 培养至出现明显的病变时, 进行间接免疫荧光试验 (IFA), 即先用甲醛固定细胞, PBS 洗涤之后加入 PBSA 封闭 1 h, PBS 洗涤后加入制备的单克隆抗体反应 1 h 后, PBS 洗涤干净, 并加入绿色荧光二抗 (1 : 500 稀释) 反应 1 h, 洗涤干净后, 通过荧光显微镜观察并拍照保存, 同时设未感染的细胞作空白对照。

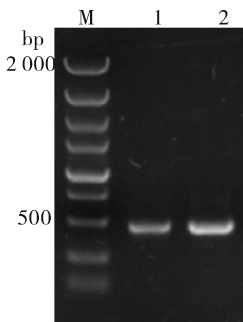
1.10 单克隆抗体 Western blot 检测

将上述病变的细胞收集并用细胞裂解液及 SDS 处理后, 进行 SDS-PAGE 试验, 转 PVDF 膜后, 封闭, 并以制备的单克隆抗体为一抗反应 1 h, TBST 洗涤后加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG 反应 1 h, TBST 洗涤后显色并拍照保存。

2 结果与分析

2.1 目的基因 PCR 扩增结果

以 CyHV-2 DNA 为模板, 扩增 ORF25 基因的部分片段, PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果显示在 459 bp 位置检测到特异性目的条带 (图 1), 与预期结果一致。



M: DL5000 marker; 1, 2: ORF25 PCR 产物 PCR amplification product of ORF25.

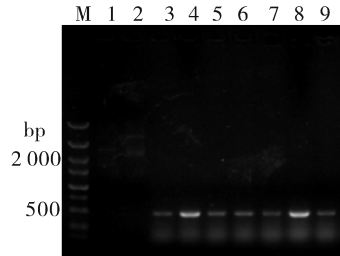
图 1 ORF25 PCR 产物

Fig.1 PCR product of ORF25

2.2 ORF25 菌落 PCR 检测

将上述 PCR 产物回收后, 与载体 pGEX-KG 经

*Bam*H I / *Eco*R I 双酶切、连接、转化 DH5 α 后, 菌落 PCR 鉴定, 目的基因大小为 459 bp (图 2); 阳性克隆经武汉生工测序公司测序, 结果与 GenBank 上 ORF25 序列一致, 表明质粒 CyHV-2-ORF25-KG 构建成功。



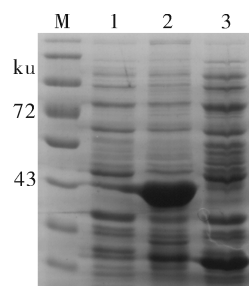
M: DL5000 marker; 1: 空白对照组 Control group; 2-9: ORF25 菌落 PCR 产物 Colony PCR.

图 2 菌落 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of colony PCR amplification product of ORF25

2.3 融合蛋白的原核表达

将成功构建的重组质粒命名为 CyHV-2-ORF25-KG, 并转化大肠杆菌 BL21, 经 1.0 mmol/L IPTG 于 37 °C 诱导 4 h 后, 将菌液收集并高压破碎, 离心之后, 将上清与沉淀收集处理, 通过 SDS-PAGE 分析表明该融合蛋白主要以包涵体形式表达, 上清中也有少量表达, 蛋白大小为 42 ku (图 3), 与预期大小一致。



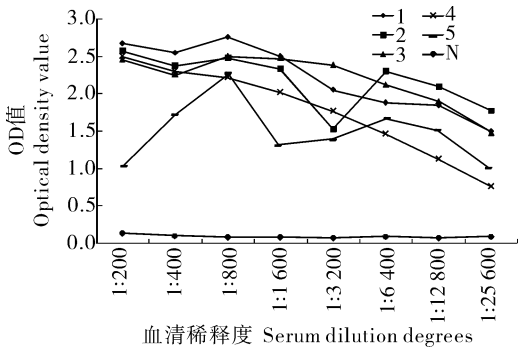
M: Protein marker; 1: IPTG 诱导上清 Supernate group induced by IPTG; 2: IPTG 诱导沉淀 Sediment group induced by IPTG; 3: pGEX-KG 空载体空白对照 Negative control pGEX-KG.

图 3 融合蛋白原核表达 SDS-PAGE 分析

Fig.3 The analysis of the expression of CyHV-2-ORF25-KG

2.4 小鼠免疫后血清效价测定

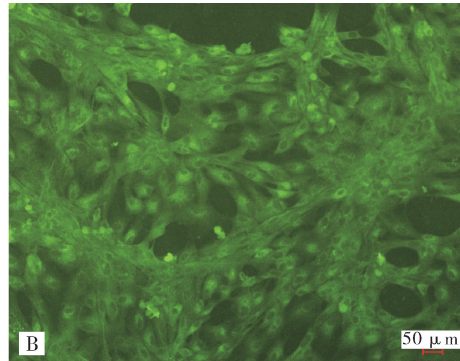
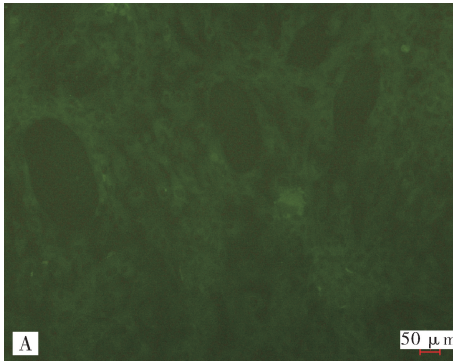
用纯化的融合蛋白免疫小鼠 4 次后, 尾静脉采血, ELISA 试验测定各小鼠血清效价, 1、2、3、4、5 号小鼠效价均较高, 血清在 1 : 12 800 稀释时, OD 值在 1.0 以上 (图 4); 选取 3 号小鼠加强免疫, 进行融合试验。



N:空白小鼠 Control mouse; 1~5:1~5 号小鼠 Marked 1-5 mice.

图 4 小鼠免疫后效价测定

Fig.4 Determination of serum titers of mice immunized by CyHV-2-ORF25-KG protein



A:未感染细胞组 Uninfected cells as control; B: CyHV-2 感染细胞荧光照片 Mab against CyHV-2 ORF25 protein.

图 5 间接免疫荧光检测单克隆抗体(100×)

Fig.5 Indirect immunofluorescence assay(IFA) of Mabs(100×)

ORF25 蛋白。

2.7 单克隆抗体的 Western blot 分析

用 CyHV-2 感染鲫脑细胞,待细胞出现明显病变时收集细胞,用细胞裂解液与 SDS 处理后,进行免疫印迹试验,以 5C6 收集的腹水作为一抗,羊抗鼠 IgG 为二抗,同时以未感染细胞作为阴性对照组。结果发现,感染病毒 CyHV-2 的细胞组出现明显的特异性条带,大小 60 ku 左右,与预期相符,而



1:未感染细胞组 Uninfected cells as control; 2: CyHV-2 感染细胞组 Mabs against CyHV-2 ORF25 protein.

图 6 单克隆抗体的 Western blot 分析

Fig.6 Specificity of monoclonal antibodies against ORF25 protein analyzed by Western blot

2.5 融合后阳性杂交瘤细胞的筛选和扩大培养

细胞融合后,取细胞上清用 ELISA 方法检测,即用融合蛋白包被酶标板,同时用空载蛋白包被作为阴性对照,筛选出 3 株效价较高的细胞,经过 3 次亚克隆,筛选出 1 株效价较高的细胞,命名为 5C6,将其扩大培养后冻存于液氮备用。

2.6 单克隆抗体的 IFA 分析

用 CyHV-2 感染鲫脑细胞(GiCB 细胞),待细胞出现明显病变时,进行间接免疫荧光试验,以 5C6 收集的腹水作为一抗,羊抗鼠荧光 IgG 为二抗,同时以未感染细胞作为阴性对照组,结果表明,感染病毒 CyHV-2 的细胞出现明显的绿色荧光,而对照组无荧光出现(图5),证明该单抗能识别并结合 CyHV-2

对照组无任何条带(图 6),证明该单抗能识别并结合 CyHV-2 ORF25 蛋白。

3 讨论

鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)可引起金鱼病毒性造血器官坏死病,对鲫也有很高致病性,致死率可达 80% 以上,对我国鲫及其变种的养殖和金鱼的养殖造成严重的威胁,经济损失巨大。因此,对此病早期的诊断尤为重要。

本研究针对 CyHV-2 具有良好免疫原性的囊膜蛋白 ORF25^[13-14] 设计特异性引物,通过 PCR 扩增出目的片段,将其连接至原核表达载体 PGEX-KG 上,经 IPTG 诱导表达后,SDS 分析发现其主要以包涵体形式表达,进一步将该融合蛋白纯化,作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠,免疫剂量尤为重要,免疫剂量过低或过高都会引起不良效果^[15]。4 次免疫后,对小鼠断尾取血,通过 ELISA 检测血清效价,并

对效价最高的小鼠加强免疫后,通过细胞融合和 ELISA 试验筛选出 5 株效价较高的阳性细胞株,而经过 3 次亚克隆试验,最终筛选出 1 株命名为 5C6 的阳性细胞株;将其扩大培养,并收集该细胞注入小鼠腹腔,10 d 左右收集腹水冻存。细胞融合及细胞培养过程操作复杂繁琐,且周期较长,细胞被污染概率大,因此,严格无菌操作和及时冻存细胞尤为必要^[16-17]。细胞融合与亚克隆筛选时,需以空载体 GST 蛋白为空白对照,因为细胞融合后的杂交瘤细胞中也有抗 GST 蛋白的细胞株,只有这样才能保证筛选出的细胞株仅抗 ORF25 蛋白^[18]。

本试验从 5 株阳性细胞株中最终只筛选出 1 株效价较高的阳性细胞株,可能是由于在筛选过程中杂交瘤细胞分泌抗体不稳定,最终导致其效价降低甚至消失。传统的方法所制备的单抗是鼠源性的,制备成本高、周期长,且在人体中会被免疫系统识别并清除,不能激活补体等应答系统,所以在应用于人类疾病的治疗时,会存在诸多问题。近年来,随着分子生物学的发展,出现了一些单抗制备的新技术,如嵌合单克隆抗体、核糖体展示技术、噬菌体展示技术,克服了传统单抗制备方法中出现的问题,为单克隆抗体制备的技术和发展奠定了基础^[18]。

将制备的单克隆抗体进行 IFA 与 Western blot 试验验证,证明该单克隆抗体能够识别并结合 CyHV-2 ORF25 蛋白;本试验制备了 CyHV-2 病毒囊膜蛋白 ORF25 单克隆抗体,为 CyHV-2 的致病机制的研究及检测方法的建立奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Q Y, GUI J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 156-169.
- [2] GROFF J M, LAPATRA S E, MUNN R J, et al. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpes virus etiology[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1998, 10(4): 375-378.
- [3] HANSON L, DISHON A, KOTLER M. Herpesviruses that infect fish[J]. *Viruses*, 2011, 3(11): 2160-2191.
- [4] DAVISON A J, EBERLE R, EHLERS B, et al. The order *Herpesvirales* [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(1): 171-177.
- [5] JUNG S J, MIYAZAKI T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.) [J]. *J Fish Dis*, 1995, 18(3): 211-220.
- [6] WANG L, HE J, LIANG L G, et al. Mass mortality caused by cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China [J]. *Fish pathology*, 2012, 32(5): 164-173.
- [7] 李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鱼疱疹病毒 II 型的分子诊断 [J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(1): 92-96.
- [8] ANDOR D, MARIA B, GYOERGY C, et al. Introduction of the family Alloherpesviridae: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary [J]. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 2011, 13(3): 174-181.
- [9] JEFFREY K R, BATEMAN K, BAYLEY A, et al. Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK [J]. *J Fish Dis*, 2007, 30(11): 649-656.
- [10] HEDRICK R P, WALTZEK T B, MCDOWELL T S. Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish, and goldfish × common carp hybrids to cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3 [J]. *J Aquat Anim Health*, 2006, 18(1): 26-34.
- [11] GOODWIN A E, MERRY G E, SADLER J. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (cyprinid herpesvirus 2) in moribund and healthy goldfish: validation of a quantitative PCR diagnostic method [J]. *Dis Aquat Org*, 2006, 69(2/3): 137-143.
- [12] 田飞焱, 何俊强, 王璐, 等. 金鱼疱疹病毒性造血器官坏死病研究进展 [J]. *中国动物检疫*, 2012, 29(4): 78-80.
- [13] ZHOU Y, JIANG N, MA J, et al. Protective immunity in gibel carp, *Carassius gibelio* of the truncated proteins of cyprinid herpesvirus 2 expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2015, 47(2): 1024-1031.
- [14] 周井祥, 李新伟, 朱霞, 等. 鲤疱疹病毒 CJ 株 ORF25 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. *中国兽药杂志*, 2012, 46(3): 1-4.
- [15] 王传武, 赵德明. 用实验动物制备多克隆抗体-免疫方案的优化 [J]. *实验动物科学与管理*, 2002, 19(4): 40-43.
- [16] WU B, ZHU B, LUO Y, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against channel catfish virus [J]. *Hybridoma*, 2011, 30: 555-558.
- [17] RUAN X, HUANG S, SHAO L, et al. Monoclonal antibodies against NS4B protein of Japanese encephalitis virus [J]. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2013, 32(6): 382-385.
- [18] CHEN Z, SHAO L, YE J, et al. Monoclonal antibodies against NS3 and NS5 proteins of Japanese encephalitis virus [J]. *Hybridoma*, 2012, 31: 137-141.
- [19] 孔君, 刘箐, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景 [J]. *免疫学杂志*, 2012, 27(2): 170-173.

Prokaryotic expression and preparation of monoclonal antibody against ORF25 protein of cyprinid herpesvirus II

PENG Junjie¹ ZHANG Qi¹ JIA Lulu¹ LIN Li¹
YUAN Junfa¹ ZENG Lingbing² ZHOU Yong² LIU Xueqin¹

1.College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Freshwater Aquaculture Collaborative
Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;

2.Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,
Wuhan 430223, China

Abstract The cyprinid herpesvirus II (CyHV-2) ORF25 gene mainly encode membrane proteins, which show good antigenicity by antigen epitope prediction. In this study, ORF25 gene segment was amplified by PCR and cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-KG. The CyHV-2-ORF25-KG fusion protein (42 ku) was expressed highly under induction of IPTG in the *E. coli* BL21, and this fusion protein was mainly expressed in the insoluble composition. One monoclonal antibody (McAb 5C6) against ORF25 protein were generated by fusion of mouse myeloma cell line SP2/0 and spleen lymphocytes from immunized mice. The McAb 5C6 was further characterized by IFA (indirect immunofluorescent assay) and Western blot assay. This study laid a foundation for the research of the pathogenesis and the detection method of CyHV-2.

Keywords cyprinid herpesvirus II; ORF25 protein; prokaryotic expression; monoclonal antibody

(责任编辑:边书京)