

大黄鱼病原哈维氏弧菌单克隆抗体的制备及其应用

郝贵杰 沈锦玉 徐洋 姚嘉赞 潘晓艺 尹文林

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

摘要:用甲醛灭活哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) GYC1108-1 制备免疫原免疫 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,利用淋巴细胞杂交瘤技术,用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)对杂交瘤进行筛选,阳性克隆经 2—3 次亚克隆后,共获得 5 株针对 GYC1108-1 的单克隆抗体。选取 1B7 制备小鼠腹水抗体,其细胞上清及腹水效价分别为 1:3200 和 1:32000。同样用灭活的哈维氏弧菌免疫新西兰大白兔,5 次免疫后颈动脉采血,离心取血清,并用饱和硫酸铵法进行纯化,制备了兔抗哈维氏弧菌多克隆抗体,其 ELISA 效价为 1:51200。利用 1B7 单克隆抗体和兔抗哈维氏弧菌多克隆抗体以及山羊抗小鼠 HRP 酶标二抗,建立了检测哈维氏弧菌的三抗体夹心酶联免疫吸附试验(TAS-ELISA)方法。该方法对哈维氏弧菌的最小检出浓度为 1×10^4 个/mL。用该 TAS-ELISA 方法检测大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)样品,54 尾患病大黄鱼中有 45 尾检出哈维氏弧菌,而 14 尾健康大黄鱼都没有检出哈维氏弧菌。由此可见,本试验建立的 TAS-ELISA 方法,可以用于患病大黄鱼哈维氏弧菌的快速诊断。

关键词:大黄鱼;哈维氏弧菌;单克隆抗体;三抗体夹心酶联免疫吸附试验

中图分类号:Q789 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2009)03-0413-05

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是中国近海特有的主要经济鱼类和当前最主要海水养殖鱼类之一,也是中国六大优势出口水产品之一。近年来,病害成为困扰中国大黄鱼养殖业的主要问题,其中哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是养殖大黄鱼最常见的病原菌之一,也能引起鱼、虾等多类海水养殖动物发病^[1-4],造成很大的危害。目前在中国台湾、印度、泰国、印度尼西亚、菲律宾、澳大利亚及中国大陆都有报道发病^[5-7]。目前,对病原弧菌所引起的养殖大黄鱼疾病的诊断主要靠临诊观察和细菌学检查,难以及时、准确地确定病原的种类,因此无法满足疾病防治的要求^[8]。

疾病的正确诊断是科学防治的基础,而免疫检测是病原快速检测的最有效技术之一。鄢庆枇等^[9]、王军等^[10]制备了溶藻弧菌和副溶血弧菌的兔抗血清用于大黄鱼疾病的快速诊断,并得到较好的效果,但是这些多克隆抗血清具有明显的异质性,特异性较差。单克隆抗体在这些方面大大优于多克隆抗血清。如果能够建立产生大黄鱼病原弧菌单克隆

抗体的杂交瘤细胞株并大量制备高特异性均质单克隆抗体,对于大黄鱼弧菌病的防治将具有重要的意义。正是由于单克隆抗体在细菌性鱼病的诊断中具有良好的应用前景,国内外学者都很重视鱼类病原菌单克隆抗体的研制。Austin^[11]制备了抗耶尔森氏菌和杀鲑气单胞菌的单克隆抗体,并把它们应用于鲑鳟鱼类红嘴病及疔疮病的快速诊断中。陈红燕等^[12]制备了嗜水气单胞菌的单克隆抗体并进行了特性研究;夏永娟等^[13]研制了抗鳗弧菌单克隆抗体;宋晓玲等^[14]制备了溶藻弧菌单克隆抗体,并进行初步应用。池信才等^[15]制备了副溶血弧菌单克隆抗体,并利用单抗和兔抗血清建立了三抗体夹心 ELISA 方法,克服了兔抗血清的弊端,取得了很好的效果。

作者以大黄鱼的病原菌哈维氏弧菌为免疫原,制备了哈维氏弧菌的单克隆抗体和兔抗血清,并建立了三抗体夹心 ELISA 检测方法,以期对养殖大黄鱼弧菌病的病原检测建立一种快速、敏感、特异性高的单抗检测方法。

收稿日期:2008-02-29;修订日期:2008-12-16

基金项目:浙江省科技厅重点项目(2005F12005)资助

作者简介:郝贵杰(1979—),女,安徽六安人;硕士,助理研究员;主要从事鱼类病害研究

通讯作者:郝贵杰,E-mail: melissa511@sina.com, Tel: 0572-2045132

1 材料与方法

1.1 抗原的制备 将哈维氏弧菌 GYC1108-1 接种于含 1.5% NaCl 的 TSA 培养基中, 30℃ 培养 24h, 加入 0.5% 甲醛, 4℃ 静置过夜灭活细菌。离心弃上清, 沉淀用灭菌生理盐水 (0.85% NaCl) 洗涤 3 次, 重悬于灭菌生理盐水中, 测定 OD₅₅₀, 根据公式计算浓度, 保存 -20℃ 中备用。

1.2 动物免疫 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠及 ICR 小鼠购自浙江大学医学院实验动物中心。将哈维氏弧菌 GYC1108-1 颗粒性抗原 (细菌浓度为 10⁹ CFU/mL), 与弗氏完全佐剂按 1:1 的比例混合乳化, 腹腔注射 BALB/c 小鼠, 0.1mL/次。初次免疫后两周, 抗原与弗氏不完全佐剂混合乳化, 同法免疫。以后免疫不再加佐剂, 分别在四周、六周后各加强免疫一次, 融合前 3d 腹腔及尾静脉再加强免疫一次。

1.3 细胞融合 细胞融合按文献 [16] 进行, 取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞混合于融合管内, 1000r/min, 离心 10min, 弃去上清, 轻振融合管底, 使沉淀细胞松散均匀, 置 37℃ 水浴中预热。然后在 45s 内缓慢滴加预热的 PEG4000 溶液 1mL, 边加边轻转搅拌, 然后在 90s 内缓慢加入不完全 DMEM 培养基, 终止融合。静置 10min 后, 1000r/min, 离心 10min, 弃上清, 加入 HAT 培养基, 使细胞悬浮并混匀。加入适量饲养细胞分装至 96 孔细胞培养板, 放于 6% CO₂ 培养箱内培养。第 4 至第 5 天各孔补加一滴 HAT 培养基, 第 9 至第 10 天用 HT 培养基换出全部 HAT 培养基, 并可开始检测筛选。

1.4 阳性克隆的筛选、建立及腹水制备 用间接 ELISA 法检测细胞上清中的抗体, 按常规方法进行。将阳性孔中的细胞扩大培养并及时冻存, 同时按有限稀释法进行亚克隆, 至阳性率为 100% 时, 即可定株。然后, 按 Golding 方法 [17] 进行腹水的制备。取 10—12 周龄 BALB/c 小鼠, 腹腔注射灭菌液体石蜡, 0.5mL/只。7—10d 后, 每只小鼠腹腔注射 0.5mL 1B7 细胞悬液, 约含 1—1.5 × 10⁶ 个细胞。接种后约 7—10d, 可见小鼠腹部明显隆起, 采集小鼠腹水, 3000r/min 离心 10min, 上清分装、标记, 测定效价后于 -20℃ 冻存。间隔 2—3d, 待腹水再生积聚后, 同法再取, 一只小鼠一般可抽取 2—3 次。

1.5 兔抗哈维氏弧菌多克隆抗血清的制备 取 2kg 左右的新西兰大白兔, 饲养一周后进行免疫, 通过耳缘静脉注射哈维氏弧菌甲醛灭活菌苗免疫实验兔。每隔 5—7d 注射 1 次, 总共注射 5 次, 第 1 次注

射 0.5mL, 以后每次 1mL。第 5 次注射后第 7 天从实验兔耳中央静脉抽血 1mL, 分离血清, 用间接 ELISA 法测定其效价, 如测得血清的效价 > 1:12800, 可以进行大量采血。

1.6 三抗体夹心 ELISA (TAS-ELISA) 检测哈维氏弧菌 采用三抗体夹心 ELISA 法 [18] 测定单克隆抗体对哈维氏弧菌的检测灵敏度, 并将其用于鱼体哈维氏弧菌检测。

1.6.1 TAS-ELISA 法的灵敏度 哈维氏弧菌经系列稀释制成不同浓度悬液。兔抗哈维氏弧菌多克隆抗体用 pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释 200 倍后取 100μL 于酶标板各孔, 4℃ 过夜包被, 用含 0.05% Tween20 的 0.01mol/mL PBST (pH 7.4) 洗涤液满孔洗涤 3 次, 每次 3min, 然后用含 10% 小牛血清的 PBS 于 37℃ 封闭 2h, 同上洗涤 3 次; 各孔加入不同稀释度的哈维氏弧菌悬液 100μL, 阴性对照加 PBS, 37℃ 孵育 1h, 同上洗涤 3 次; 然后各孔依次加入 100 倍稀释的小鼠腹水 100μL, 37℃ 温育 1h, 同上洗涤 3 次; 每孔加入 100μL 1000 倍稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 37℃ 温育 1h, 同上洗涤 3 次; 每孔加入 50μL 新鲜配制的 OPD-H₂O₂ 底物溶液, 于避光处反应 10min, 然后每孔加入 50μL 2mol/L 硫酸溶液中止反应, 应用酶联免疫阅读仪 (Bio-rad, 550 型) 读出 OD₄₉₀ 值, P/N > 2.1 者为阳性, P/N < 2.1 者判为阴性。同时结合本系统的重复实验经验及眼观颜色深浅判定。

1.6.2 样品的检测 用上述 TAS-ELISA 方法于不同时间分别测定了舟山佛度深水网箱养殖和台州大陈岛深水网箱养殖发病大黄鱼, 三批共测定了 54 尾具有典型哈维氏弧菌病症状的大黄鱼, 三批分别从不发病的象山网箱养殖场共选取了 14 尾健康的大黄鱼作为对照。将待测的健康和发病的大黄鱼肝组织分别在 5 倍体积的无菌生理盐水中研磨, 静置沉淀后吸取上清液备检。同 1.6.1 中方法, 以上清液代替哈维氏弧菌悬液, 检测鱼体中的哈维氏弧菌。应用酶联免疫阅读仪读出 OD₄₉₀ 值 (Bio-rad, 550 型)。P/N ≥ 2.1 者判为阳性, P/N < 2.1 者判为阴性 (P 代表 TAS-ELISA 所测待检样品肝组织上清液的 OD 值, N 代表所测健康的相应组织的 OD 值)。

1.7 分离细菌 为了进一步验证本实验所建立的 TAS-ELISA 的准确性, 在用 TAS-ELISA 检测样品的同时, 分别用弧菌选择性培养基 TCBS 平板对待检大黄鱼肝组织进行细菌分离。

2 结果

2.1 mAb 筛选及杂交瘤细胞系的建立

采用上述免疫和融合方法,用间接 ELISA 试验检测细胞培养上清,共获得了 5 株抗 GYC1108-1 mAb 的细胞株,分别命名为 1B7、1D7、2G8、3G6 和 3H7,杂交瘤细胞经 3 次亚克隆,100% 的检测孔保持了分泌抗哈维氏弧菌的能力,经连续传代培养后,依然能够稳定分泌抗体。

2.2 mAb 的生物学特性

5 株 mAb 的细胞培养上清 ELISA 效价及 1B7 mAb 腹水的 ELISA 效价结果(表 1)。

表 1 五株 mAb 的生物学特性

Tab. 1 Biological properties of the five monoclonal antibodies

Hybridoma	Subtype	Titer of ELISA (Supernatant Fluid)	Titer of ELISA (Ascites)
1B7	IgG1	1:3200	1:32000
1D7	IgG3	1:1600	
2G8	IgG1	1:3200	
3G6	IgG3	1:1600	
3H7	IgG2a	1:400	

2.3 1B7 单抗腹水的制备与处理

将三次采集的小鼠腹水离心合并,间接 ELISA 测得腹水抗体效价(表 1)。将其分装 -20℃ 保存备用。

2.4 兔抗血清的制备

实验兔经过 5 次免疫后,经颈动脉大量采血,共得到约 40mL 血清。将血清用饱和硫酸铵沉淀法进行粗提,并透析。所得多克隆抗体经间接 ELISA 方法测得效价为 1:51200。

2.5 TAS-ELISA 的灵敏度

结果显示 TAS-ELISA 能够灵敏地检测哈维氏弧菌,其最低检出浓度为 1×10^4 个/mL。

表 2 TAS-ELISA 对不同浓度哈维氏弧菌的检测结果

Tab. 2 The result of different concentrations of *V. harveyi* detected by TAS-ELISA

哈维氏弧菌浓度(个/mL)	检测结果
Concentrations of <i>V. harveyi</i> (Cell/mL)	The result of detection
1×10^7	+
1×10^6	+
1×10^5	+
1×10^4	+
1×10^3	-
1×10^2	-
1×10^1	-

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性

Note: “+” means positive, “-” means negative

2.6 TAS-ELISA 对大黄鱼样品的检测

用 TAS-ELISA 方法共检测了三批 54 尾患病大黄鱼和 14 尾健康大黄鱼的样品,结果 45 尾患病大黄鱼检出哈维氏弧菌,每批检出率均在 80% 及以上,而 14 尾健康大黄鱼都没有检出哈维氏弧菌(表 3)。

表 3 三抗体夹心 ELISA 方法对大黄鱼样品的检测结果

Tab. 3 The result of TAS-ELISA on *Pseudosciaena crocea* specimen

大黄鱼样品 <i>P. crocea</i> specimen	样品编号 No. of specimen	TAS-ELISA 检测结果 The result of TAS-ELISA	检出率 The rate of detection
第一批发病鱼	1—17	+	85%
	18—20	-	
第一批健康鱼	1—4	-	
第二批发病鱼	21—36	+	84%
	37—39	-	
第二批健康鱼	5—10	-	
第三批发病鱼	40—51	+	80%
	52—54	-	
第三批健康鱼	11—14	-	

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性

Note: “+” means positive, “-” means negative

2.7 细菌分离结果

用 TCBS 平板检测 54 尾患病大黄鱼的肝组织,大部分都长出大量比较纯的金黄色菌落,而用 TAS-ELISA 方法检测为阴性的样品,其在 TCBS 平板上所长出的菌落也较少。同样用 TCBS 平板检测 14 尾健康大黄鱼的肝组织,基本无菌落生长。

3 讨论

本试验以哈维氏弧菌甲醛灭活疫苗为抗原,运用单克隆抗体技术,筛选、克隆到 5 株能够分泌抗哈维氏弧菌单克隆抗体的杂交瘤细胞。其中选取较好的一株 1B7 制备了小鼠腹水,并利用 1B7 腹水单抗和兔抗血清建立了三抗体夹心 ELISA 方法用于检测患病大黄鱼哈维氏弧菌。其与常规抗原包被间接 ELISA 方法相比有明显的优势:细菌的包被通常采用 60℃ 烘干或 4℃ 冰箱过夜,包被过程耗时数小时,而双抗体夹心 ELISA 的包被是在准备工作中完成,可以缩短样品检测时间。本方法的检测时间可以控制在 4h 之内,可以满足疾病快速诊断的要求。另外,鱼体样品的研磨上清液中含有许多组织碎片,烘干包被时这些组织碎片也包被到酶标板上,影响检测效果。如果离心去除组织碎片容易导致细菌也随

之沉淀,容易引起漏检。而双抗体夹心 ELISA 能够克服这些问题,提高检测灵敏度。

实验结果显示,本试验所建立的 TAS-ELISA 方法对哈维氏弧菌的最小检出浓度为 1×10^4 个/mL,具有较高的早期快速诊断价值。在大黄鱼样品检测中,选取病鱼肝脏作为待检样品,因为肝脏通常是感染细菌最多的内脏,同时又是最好取的部位,适合大量并快速检测的需要。在第三批共 54 尾患弧菌病的大黄鱼样品中共有 45 尾检出哈维氏弧菌,平均检出率为 83%,14 尾健康大黄鱼都没有检出哈维氏弧菌,这说明本试验用自制的单抗所建立的 TAS-ELISA 方法在检测实际样品哈维氏弧菌的假阳性很低,灵敏度较高。用 TCBS 平板检测 54 尾患病大黄鱼,基本上都长出大量金黄色菌落,而且用 TAS-ELISA 方法检测为阴性的样品,在 TCBS 平板上长出的菌落也相应较少,这进一步验证了检测结果的可信度。每批患病大黄鱼都是分别于同一时间取自同一养殖渔排,其病原很可能都是哈维氏弧菌,但每批都有不同尾数的病鱼没有检出哈维氏弧菌,从表 3 可以看出,样品数越多,阳性率越高,这说明在实际样品检测中要尽可能多检测一些样品,以免出现漏检。

参考文献:

- [1] Mao Z J, Liu G Y, Chen C F. Isolation and identification of pathogenic bacteria causing ulcerosis in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2002, **29**(2): 178—181 [毛芝娟,刘国勇,陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定. 安徽农业大学学报, 2002, **29**(2): 178—181]
- [2] Chen X G, Wu S Q, Shi C B, et al. Isolation and identification of pathogenic *Vibrio harveyi* from estuary cod *Epinephelus coioides* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, **11**(4): 314—317 [陈献稿,吴淑勤,石存斌,等. 斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定. 中国水产科学, 2004, **11**(4): 314—317]
- [3] Chen Y Z, Zhong S L, Zhou C. Prevention and treatment of luminous disease of adult prawns [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (Natural Science), 2000, **39**(suppl.): 218—223 [陈月忠,钟硕良,周宸. 成虾发光病病原体的分离鉴定及防治技术研究. 中山大学学报(自然科学版), 2000, **39**(增刊): 218—223]
- [4] Shi C B, Hu X F, Chen X G, et al. Characteristics of the extracellular products of two pathogenic *Vibrio harveyi* strains [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(1): 83—87 [石存斌,胡雪峰,陈献稿,等. 两株致病性哈维氏弧菌胞外产物的特性分析. 水生生物学报, 2007, **31**(1): 83—87]
- [5] Pasharawipas T, Thaikua S, Sriuirairatan S. Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand [J]. *Virus Research*, 2005, **114**(3): 63—69
- [6] Wu H B, Pan J P. The characteristics of the exotoxin Vm-Pm produced by *Vibrio mimicus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(4): 409—412 [吴后波,潘金培. 海水养殖真鲷细菌病原菌外毒素的理化特性. 水生生物学报, 2004, **28**(4): 409—412]
- [7] Wang B K, Yu J H, Li Y, et al. Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*) from sea perch, *Lateolabrax japonicus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, **9**(1): 52—55 [王保坤,余俊红,李筠,等. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定. 中国水产科学, 2002, **9**(1): 52—55]
- [8] Wu H B, Pan J P. Virulence mechanisms of pathogenic vibrio [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(4): 422—426 [吴后波,潘金培. 病原弧菌的致病机理. 水生生物学报, 2003, **27**(4): 422—426]
- [9] Yan Q P, Wang J, Su Y Q, et al. Studies on ELISA method for detecting *Vibrio alginolyticus*, the pathogenic bacteria of *Pseudosciaena crocea* [J]. *Marine Sciences*, 2001, **25**(9): 47—50 [鄢庆枇,王军,苏永全,等. 大黄鱼病原菌——溶藻弧菌的 ELISA 快速检测研究. 海洋科学, 2001, **25**(9): 47—50]
- [10] Wang J, Yan Q P, Su Y Q, et al. Study on indirect ELISA method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in cultured *Pseudosciaena crocea* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2001, **20**(3): 346—351 [王军,鄢庆枇,苏永全,等. 养殖大黄鱼副溶血弧菌的酶联免疫吸附法研究. 台湾海峡, 2001, **20**(3): 346—351]
- [11] Austin B. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth furunculosis in fish farms [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1986, **9**: 469—474
- [12] Chen H Y, Lin T L, Chen R S, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, **10**(2): 121—125 [陈红燕,林天龙,陈日升,等. 嗜水气单胞菌单克隆抗体的制备及特性分析. 中国水产科学, 2003, **10**(2): 121—125]
- [13] Xia Y J, Huang W Q, Li Y, et al. Development and characterization of monoclonal antibody against *Vibrio anguillarum* [J]. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2000, **16**(1): 81—85 [夏永娟,黄威权,李元,等. 抗鳃弧菌单克隆抗体的研制及鉴定. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, **16**(1): 81—85]
- [14] Song X L, Huang J, Shi C Y. Production and application of monoclonal antibodies of *Vibrio alginolyticus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, **25**(6): 521—527 [宋晓玲,黄健,史成银. 溶藻弧菌单克隆抗体的制备及应用. 水产学报, 2001, **25**(6): 521—527]
- [15] Chi X C, Wang J, Yan Q P, et al. Preparation and applications of monoclonal antibody against the pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from *Pseudosciaena crocea* [J]. *Marine Sciences*, 2007, **31**(8): 1—5 [池信才,王军,鄢庆枇,等. 大黄鱼病原副溶

- 血弧菌单克隆抗体制备及其应用. 水产科学, 2007, 31(8): 1—5]
- [16] Liu X F. Application of monoclonal antibodies in agriculture [M]. Hefei: Anhui Scientific and Technical Press. 1994, 56—89 [刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用. 安徽科学技术出版社. 1994, 56—89]
- [17] Golding J W. Monoclonal antibodies: principle and practice [M]. New York: Academic Press. 1983, 131—135
- [18] Zhu Z M, Liu H. Concise technology of immunology [M]. Beijing: Science Press. 2002, 163—165 [朱正美, 刘辉. 简明免疫学技术. 北京: 科学出版社. 2002, 163—165]

PREPARATION AND APPLICATIONS OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST THE PATHOGENIC *HARVEYI* FROM *PSEUDOSCIAENA CROCEA*

HAO Gui-Jie, SHEN Jin-Yu, XU Yang, YAO Jia-Yun, PAN Xiao-Yi and YIN Wen-Lin

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

Abstract: *Vibrio harveyi* is a kind of important pathogenic bacteria for seawater animals, such as prawn, crab, clam and ormer. Along with the development of seawater fish cage-culture in China, *Vibrio harveyi* also becomes a main cause of disease of cage-culture fish, including *Lutianus erythropterus*, *Seriola dumerili*, *Epinephelus coioides* and *Pseudosciaena crocea*. One pathogenic *V. harveyi* strain, GYC1108-1, which was isolated from diseased *Pseudosciaena crocea* in Zhejiang Province, 2003, was identified after morphological observation, biochemical characteristic analysis, 16sRNA and *HSP60* gene sequence detection.

V. harveyi GYC1108-1 was inactivated by formaldehyde to prepare antigen for the immunizing of 8-week-old female BALB/c mice. Spleen cells collected from immunized mice after the fifth immunization were fused with SP2/0-Ag-14 myeloma cells. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to screen hybridoma cells and limited dilution method was performed to subclone the positive clones. After three cycles of subcloning, five McAbs against the GYC1108-1 were selected and designated as 1B7, 1D7, 2G8, 3G6 and 3H7 respectively. The five McAbs in culture liquid were proved to have high ELISA titers between 1:400—1:3200. By using the immunoglobulin subtypes kit, 1B7 and 2G8 were identified to be IgG1; 1D7 and 3G6 to be IgG3; 3H7 to be IgG2a, respectively.

The 1B7 was chose to prepare ascites and the ELISA titers of 1B7 in culture liquid and ascites were 1:3200 and 1:32000, respectively. One rabbit was immunized with *V. harveyi* GYC1108-1. The immune sera of rabbit were collected after five immunizations. Antibodies (IgG) obtained from the immune sera were purified by ammonium sulfate fractionation. The ELISA titer of the multi-clone antibody was 1:51200. A triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (TAS-ELISA) was developed with the plates pre-coated with rabbit polyclonal antibodies against *V. harveyi* for bacteria capturing, followed by samples incubation, McAb(1B7) and goat-anti-mouse-IgG antibodies labeled with HRP. The lowest detectable concentration of *V. harveyi* detected by the TAS-ELISA was 1×10^4 cells/mL. The TAS-ELISA was used for detecting *V. harveyi* in *Pseudosciaena crocea*, *V. harveyi* was detected from 45 fish among 54 diseased *P. crocea*, and no *V. harveyi* was detected from 14 healthy *P. crocea*. The results indicated that the TAS-ELISA specially against *V. harveyi* could be used for the rapid diagnosis of diseased *P. crocea*.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; *Vibrio harveyi*; Monoclonal antibody; TAS-ELISA