

欧洲鳗黏膜免疫球蛋白单克隆抗体的制备及其特性分析

杨金先¹, 陈强¹, 林娟娟², 朱春华¹, 刘晓东¹, 林天龙¹

(1. 福建省农业科学院 生物技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 莆田学院环境与生命科学系, 福建 莆田 351100)

摘要: 应用杂交瘤单克隆抗体技术制备了8个分泌抗欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*) 黏膜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。结果显示, 8株单抗中 IgM 有2株, IgG₁ 和 IgG_{2a} 各有3株; 所有单抗均与欧洲鳗黏膜免疫球蛋白呈 ELISA 反应阳性, 腹水抗体滴度为在 $10^4 \sim 10^6$ 之间。进一步实验证实, 这些单抗与供试的10种水产动物常见病原菌均无交叉反应; 其中3株单抗与欧洲鳗血清 IgM 有不同程度的交叉反应; 4株单抗与黏膜免疫球蛋白有交叉反应, 其中2株单抗交叉反应较弱。以上结果提示, 欧洲鳗黏膜免疫球蛋白和血清 IgM 之间既有各自独特的抗原决定簇, 又有共同抗原位点, 证实欧洲鳗黏膜抗体在抗原性方面有别于血清 IgM。成功制备的这8株单抗可用于鳗黏膜免疫球蛋白的检测及其结构和功能分析, 为欧洲鳗黏膜免疫的进一步研究提供工具。[中国水产科学, 2008, 15(3): 511-515]

关键词: 欧洲鳗; 黏膜免疫球蛋白; 单克隆抗体; 特性分析

中图分类号: S965.223

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)03-0511-05

近20年来, 鱼类免疫学研究逐渐成为了鱼类学研究的热点, 并且取得了很大的进步。但多数研究都集中在系统免疫领域, 近年来在鱼类口服疫苗和浸泡疫苗研究的热潮带动下, 黏膜免疫系统研究得到深入地展开。黏膜免疫系统在鱼类抗病方面具有重要作用, 但目前缺乏有效的研究工具。单克隆抗体技术作为现代免疫学研究的重要工具之一, 已广泛应用于生命科学的各个领域, 在鱼类免疫方面, Siwicki 等^[1] 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; Van der^[2] 与林天龙等^[3] 分别制备了欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*) 血清 IgM 特异性单克隆抗体; 王凡等^[4] 制备了鳊血清 IgM 的单克隆抗体; Sánchez 等^[5] 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; Pettersen 等^[6] 研制出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。Rombout 等^[7] 分别制备了鲤的血清 Ig 和黏膜 Ig 的单抗, 并证实两者间存在一定的差异。为了开展欧洲鳗黏膜免疫球蛋白的结构

与功能的分析及其免疫应答规律的研究, 本实验制备了欧洲鳗黏膜免疫球蛋白的单克隆抗体。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、菌株

欧洲鳗体质量 250~300 g, 采自福建长乐鳗鲡养殖场; BALB/C 小鼠, 6~8 周龄, 购自中科院上海实验动物中心; SP2/O 小鼠骨髓瘤细胞 (本实验室保存); 嗜水气单胞菌 ZN1 (本实验室分离鉴定)。

1.2 主要试剂

CNBr-Sepharose-4B 购自 GE 公司, DMEM、HAT、HT 培养基; 羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶标记物, 羊抗鼠亚级份, 融合剂 PEG/DMSO 均购自 Sigma 公司; 新生牛血清购自杭州四季青公司。

1.3 免疫抗原制备

欧洲鳗血清 IgM 单抗 4B7 (经 ELISA 证实能与欧洲鳗黏膜 Ig 交叉反应, 未发表数据) 交联 CNBr-Sepharose-4B 制备亲和层析柱, 4℃保存备用。

采用饱和硫酸铵分步沉淀法结合亲和层析提取纯化欧洲鳗黏膜免疫球蛋白 (Ig)。欧洲鳗经嗜

收稿日期: 2007-04-02; 修订日期: 2007-11-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30471336)。

作者简介: 杨金先 (1971-), 男, 助理研究员, 主要从事水产动物病原与免疫研究。E-mail: yanggao1527@163.com

通讯作者: 林天龙。E-mail: lint05@163.com

水气单胞菌 ZN1 免疫后,收集体表黏液,黏膜 Ig 用 20% 和 50% 饱和硫酸铵二步沉淀后,过亲和层析柱得到高度纯化与浓缩,SDS-PAGE 电泳法估算免疫球蛋白浓度和纯度,分装后 -70°C 冻存备用。

1.4 BALB/C小鼠免疫

将纯化的欧洲鳗黏膜 Ig $50\text{ }\mu\text{g}/(0.15\text{ mL})$ 与等体积弗氏完全佐剂乳化,腹腔注射 BALB/C 小鼠进行首次免疫,2 周后,用黏膜 Ig $50\text{ }\mu\text{g}/(0.15\text{ mL})$ 加等体积弗氏不完全佐剂乳化后进行二次免疫,间隔 2 周,用 $20\text{ }\mu\text{g}/(0.15\text{ mL})$ 进行脾内注射加强免疫,4 d 后颈动脉丛采血,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

免疫小鼠脾细胞与 SP2/O 骨髓瘤细胞按 3:1 混合,以 PEG/DMSO 为融合剂,按每孔 5×10^4 个 SP2/O 细胞的密度加入 96 孔细胞培养板,用含 HAT 的细胞选择培养基进行杂交融合。杂交瘤细胞融合按常规方法进行,融合细胞用含 12% 牛血清的 HAT-DMEM 重悬至 $5\times 10^5\text{ cell/mL}$,分装到 96 孔细胞培养板 (BD Falcon),每孔 0.1 mL,置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,第 4~5 天补充 0.1 mL 含 12% 牛血清的 HAT-DMEM,每天观察杂交瘤生长情况 1 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,筛选单克隆细胞,扩大培养后冻存于液氮中。杂交瘤细胞株经冻存、复苏后取 5×10^6 个对数生长期细胞腹腔接种 12 周龄 BALB/C 小鼠,10~14 d 后采集腹水,10 000 r/min 于 4°C 离心 5 min,收集腹水上清 -20°C 冻存备用。

1.6 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

1.6.1 间接 ELISA 法筛选单克隆抗体 嗜水气单胞菌 ZN1 用 0.01 mol/L PBS 重悬至 $2\times 10^8\text{ cfu/mL}$,超声波破碎后,每孔 $50\text{ }\mu\text{L}$ 包被于 96 孔酶标板, 4°C 过夜。次日每孔滴加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBST 封闭 1 h, PBST 洗 3 次后加入 1:5 稀释的经硫酸铵沉淀的欧洲鳗免疫黏膜,室温反应 1 h; 同上洗涤后加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 杂交瘤细胞培养上清,室温反应 1 h, PBST 洗 3 次,滴加羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体 (1:5 000),室温反应 1 h, 同上洗涤后加新鲜配制的 OPD (Sigma),避光显色 15~30 min。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 1:1 000 为阳性对照。

1.6.2 夹心 ELISA 检测黏膜免疫球蛋白单抗

硫酸铵分步沉淀法纯化的兔抗欧洲鳗血清 IgM 免疫血清抗体 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 于 4°C 包被过夜,其余步骤同 1.6.1。设 BALB/C 小鼠免疫血清 1:1 000、血清 IgM 单抗 4B7 作为阳性对照。

1.6.3 单抗腹水效价测定 ELISA 检测方法同 1.6.1,包被抗原为纯化的黏膜 Ig $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ ($1\text{ }\mu\text{g}/\text{孔}$),一抗为 10 倍比系列稀释的待检测的黏膜 Ig 单抗腹水抗体,室温反应 1 h,酶标二抗及显色反应同上。设欧洲鳗血清 IgM 单抗 4B7、7E2、9D7、12G8 作为对照 (血清 IgM 包被方法同黏膜,血清 IgM 单抗源自林天龙等^[3])。

1.6.4 单抗灵敏度测定 纯化欧洲鳗黏膜 Ig 起始浓度为 $80\text{ }\mu\text{g/mL}$ 溶于 PBS,进行 2 倍比稀释至 156 ng/mL , 4°C 包被过夜,封闭后滴加黏膜 Ig 的单抗腹水抗体 (工作浓度 1:1 000),其余步骤同上。设欧洲鳗血清 IgM 单抗 4B7、7E2、9D7、12G8 作为对照 (血清 IgM 包被方法同黏膜 Ig)。

1.6.5 单抗特异性测定 应用纯化的欧洲鳗血清 IgM,以及水产动物常见病原菌:杀鲑气单胞菌、嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌、鳗弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌、迟钝爱德华氏菌以及金黄色葡萄球菌、大肠杆菌共 10 株。欧洲鳗血清 IgM、黏膜 Ig 以 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的浓度包被于酶标板;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, 4°C 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。设欧洲鳗血清 IgM 单抗 4B7、7E2、9D7、12G8 作为对照。

1.7 亚级份测定

包被菌体抗原、滴加欧洲鳗免疫黏液、滴加制备的单克隆抗体同 1.6.1 中所述,再分别加入 6 种羊抗鼠亚级份抗体,工作浓度为 1:1 000,室温反应 1 h,洗涤后滴加兔抗羊 IgG-HRP 标记物 (1:5 000),室温反应 45 min,同上洗涤后加底物 OPD, 37°C 显色 15~30 min 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 法进行,在波长 595 nm 处测定 OD 值,参照标准曲线得出蛋白的浓度。

2 结果与分析

2.1 黏膜Ig、血清IgM的纯化与鉴定

欧洲鳗的黏膜 Ig 与血清 IgM 经过饱和硫酸铵沉淀后分别用亲和层析柱进一步纯化。每泳道

上样 20 μg 蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 达到较高的纯度, 可以用于单抗的制备与分析检测。

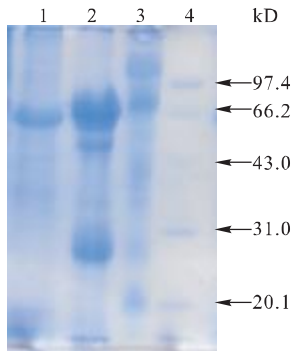


图 1 欧洲鳗黏膜 Ig 与血清 IgM 的纯度鉴定
1. 纯化的黏膜 Ig; 2. 亲和纯化血清 IgM; 3. 硫酸铵初纯的血清 IgM; 4. 小分子标准蛋白。
Fig.1 Purification of mucus Ig and serum IgM of *A. anguilla*
1. Purified mucus Ig; 2. Serum IgM purified by affinity chromatography; 3. IgM Precipitated by ammonium sulfate; 4. Low molecular standard protein.

2.2 细胞杂交融合试验

细胞杂交融合阳性率达到 100%, 经过夹心 ELISA 初筛并用抗原介导的 ELISA 验证, 获得 8 株能稳定分泌抗欧洲鳗黏膜 Ig 抗体的杂交瘤细胞, 分别命名为 2D1、3A6、3H2、4B11、4D3、7A5、7D6、7H10。

2.3 单抗效价及特性分析

得到的 8 株单抗中, IgG₁ 和 IgG_{2a} 各有 3 株、IgM 有 2 株; 单抗腹水抗体的 ELISA 效价在 10⁴~10⁶; 单抗 2D1、3A6、4B11、7A5 和 7H10 能检出 625 ng/mL 的黏膜 Ig, 而单抗 4D3 的检测灵敏度达 156 ng/mL (表 1)。

此外, 制备的单抗与 10 株水产病原细菌无阳性反应。单抗 3H2、7A5 与欧洲鳗血清 IgM 有弱交叉阳性, 而单抗 4D3 与血清 IgM 呈强阳性; 血清 IgM 单抗 9D7、12G8 与黏膜 Ig 也无交叉反应。

表 1 欧洲鳗免疫球蛋白单克隆抗体的部分特性分析								
Tab. 1 Partial characterization of monoclonal antibodies against mucus immunoglobulin of <i>A. anguilla</i>								
单抗 Monoclonal anti body	Ig 亚类	免疫学反应特性 Immunological property						
		间接 ELISA (Dired)		夹心 Sandwich ELISA	灵敏度 / (μg•mL ⁻¹) Sensitivity	效价 Titre	水产病原 细菌 Pathogen	
		黏膜 Ig	血清 IgM					
黏膜 Ig 单抗	2D1	IgG _{2a}	++	—	++	0.625	1:10 ⁶	—
	3A6	IgG _{2a}	++	—	++	0.625	1:10 ⁴	—
	3H2	IgG ₁	++	+	+	0.3125	1:10 ⁵	—
	4B11	IgG ₁	++	—	++	0.625	1:10 ⁶	—
	4D3	IgM	++	++	++	0.15625	1:10 ⁶	—
	7D6	IgG ₁	++	—	+	1.25	1:10 ⁵	—
	7A5	IgM	++	+	+	0.625	1:10 ⁵	—
	7H10	IgG _{2a}	++	—	++	0.625	1:10 ⁶	—
血清 IgM 单 抗	4B7	IgG _{2b}	+-	++	++	0.625	1:10 ⁴	—
	7E2	IgM	+-	++	ND	0.15625	1:10 ⁵	—
	9D7	IgM	—	++	ND	0.3125	1:10 ⁵	—
	12G8	IgG _{2b}	—	++	ND	0.15625	1:10 ⁴	—
注: “++”代表强阳性,“+”代表中等强度阳性,“+-”代表弱阳性,“—”代表阴性。 Note: “++” strongly positive; “+” midiantly positive; “+-” slightly positive; “—” negtive.								

3 讨论

鱼类作为低等的水生脊椎动物, 皮肤、鳃和消化道是病原入侵的门户, 也是抵御病原微生物感染

的第一道防线, 在其上皮组织中存在淋巴细胞、巨噬细胞和各类粒细胞, 具有独立完成局部免疫应答的功能^[8]。当鱼体受到抗原刺激时, 巨噬细胞可以对抗原进行处理和呈递, 抗体分泌细胞胞 (Antibody

secreting cell, ASC) 会分泌特异性抗体,与黏液中溶菌酶和补体等非特异性的保护物质一道组成相对独立的黏膜免疫系统 (Mucosal immune system)。

利用多克隆抗体研究鱼类 Ig 是最常用的方法之一。然而,鱼类黏膜成分复杂,免疫球蛋白含量稀少,提取纯化技术难度大,残留的杂质也将影响多抗的特异性结合,难以排除多克隆抗体产生非特异性阳性反应,从而制约了人们对鱼类黏膜免疫球蛋白的深入了解。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,可用于鱼类抗体提取纯化和结构分析;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,因此利用单抗研究鱼类 Ig,比多抗更准确、更方便。基于上述原因本实验制备了欧洲鳗黏膜免疫球蛋白的单克隆抗体。通过杂交融合获得 8 株能够稳定分泌抗欧洲鳗黏膜 Ig 的杂交瘤细胞株,并对这些单抗的生物学特性和免疫学特性进行了分析。

本实验的 8 株抗欧洲鳗黏膜 Ig 单抗中,有 1 株与欧洲鳗血清 IgM 呈强阳性交叉反应,2 株有微弱交叉反应;同时供试的 4 株抗欧洲鳗血清 IgM 的单抗中,9D7、12G8 两株单抗不与黏膜 Ig 发生反应,4B7、7E2 两株单抗能与欧洲鳗黏膜 Ig 产生弱交叉反应。这些结果说明欧洲鳗血清和黏膜之间既存在各自独特的抗原决定簇,也存在共同抗原位点。亲和纯化的欧洲鳗血清 IgM 免疫新西兰兔制备的多克隆抗体能在 Western-blot 反应中识别欧洲鳗黏膜 Ig 的重链,从而进一步证实了欧洲鳗血清和黏膜 Ig 存在共同抗原位点(未发表数据)。Rombout 等^[7]研究发现,鲤的黏膜 Ig 与血清 Ig 存在差异,因为血清 Ig 的单抗能同时识别血清和黏液 Ig,而黏液 Ig 的单抗不能识别血清 Ig。Cain 等^[9]通过 SDS-PAGE 电泳分析也证实虹鳟黏液 Ig 与血清 Ig 并不完全一致,除了具有血清 Ig 的 H、L 链(72 kD 和 28 kD)外,还存在 68 kD 和 43 kD 的条带。这些研究结果都说明鱼类存在相对独立的黏膜免疫系统,具备分泌免疫球蛋白、完成局部免疫应答的能力。但鱼类黏膜免疫球蛋白的结构和抗原性有别于血清 IgM,其功能还有待于进一步的研究。

随着鱼类疫苗学研究的发展,人们逐渐认识到鱼类免疫预防技术有其自身的特点。常规的注射免疫方法存在很大局限性,不仅操作难度高、工作量大,而且易导致免疫鱼的应激反应。比较理想的免疫接种方法是口服或浸泡法。由口服或浸泡途径进行疫苗接种除了在疫苗吸收和呈递方面有特殊要求外,在免疫应答水平分析方面涉及系统免疫和黏膜免疫两个方面。尤其是黏膜免疫应答水平的分析,在评价疫苗的免疫效果,抗体动态变化规律和制定有效的免疫程序方面都具有重要的意义。这就要求必须拥有检测黏膜 Ig 的高度灵敏的试剂和方法。Esteve-Gassent 等^[10]利用兔抗欧洲鳗血清 IgM 多抗,建立了斑点酶技术('in situ' dot blot immunoassay) 定量分析了创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*) 浸泡免疫引起的欧洲鳗体表局部黏膜抗体动态变化规律,结果显示:黏膜相关淋巴组织在口服或浸泡免疫后直接产生免疫应答反应,黏膜抗体出现高峰的时间为强强免疫后 3~4 d,早于循环抗体的 7 d;而且具有相应的攻毒保护作用。揭示欧洲鳗黏膜免疫系统具有相对的独立性,但是无法排除血清循环抗体对检测结果的干扰。

制备的欧洲鳗黏膜 Ig 单克隆抗体大多数能检出 625 ng/mL 的欧洲鳗黏膜 Ig,单抗 4D3 的检测灵敏度达到 156 ng/mL,具有较高的灵敏度,能够用于分析接种疫苗后的欧洲鳗黏膜抗体的动态消长状况。此外,利用黏膜 Ig 单克隆抗体亲和层析高度纯化欧洲鳗黏膜 Ig 免疫新西兰白兔,有望制备出特异性强、灵敏度更高的兔抗血清。林娟娟等^[11]制备的兔抗欧洲鳗血清 IgM 的多克隆抗体,当 1:2 000 稀释时 ELISA 检测对血清 IgM 的灵敏度达到 7.8 ng/mL,而单抗的检测灵敏度仅为 156 ng/mL。单抗及特异性多抗的制备,将为进一步深入研究欧洲鳗黏膜 Ig 的结构与功能提供有力的工具。

参考文献:

- [1] Siwicki A, Vergnet C, Charlemagne J. 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.

- [2] van der M H T, Rooijackers J B M A, Booms G H R, et al., Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to European eel (*Anguilla anguilla* L.1758) immunoglobulin[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1995 (45): 151-164.
- [3] 林天龙, 陈强, 龚晖, 等. 欧洲鳗免疫球蛋白单克隆抗体的制备与特性 [J]. 水产学报, 2001, 25(6): 532-537.
- [4] 王凡, 林天龙, 潘厚军, 等. 鳗免疫球蛋白单克隆抗体的制备及特性 [J]. 水产学报, 2006, 30(2): 285-288.
- [5] Sánchez C, Lopez-Fierro P, Zapata A. Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulin[J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3 (4): 237-251.
- [6] Pettersen F E, Fyllingen I, Kavlie A. Monoclonal antibodies reactive with serum IgM and leukocytes from Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 1995, 5 (4): 275-287.
- [7] H R J, T N, T A van de Kamp M. Differences in mucus and serum immunoglobulin of Carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17(4): 309-317.
- [8] Cleton P, Troutaud D, Descjaix P. The chemiluminescence response of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol, 1998 (8): 73-73.
- [9] Cain K D, Jones D R, Raison R L. Characterisation of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance[J]. Fish Shellfish Immunol, 2000 (10): 651-666.
- [10] Esteve-Gassent M D, Nielsen M E, Amaro C A. The kinetics of antibody production in mucus and serum of European eel (*Anguilla anguilla* L.) after vaccination against *Vibrio vulnificus*: development of a new method for antibody quantification in skin mucus[J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15: 51-61.
- [11] 林娟娟, 杨金先, 陈强, 等. 欧洲鳗鳃血清免疫球蛋白纯化及其结构分析 [J]. 水产学报, 2006, 30(6): 806-811.

Production and Characterization of monoclonal antibodies against mucus immunoglobulin of *Anguilla anguilla*

YANG Jin-xian¹, CHEN Qiang¹, LIN Juan-juan², ZHU Chun-hua¹, LIU Xiao-dong¹, LIN Tian-long¹

(1. Bio-technology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 2. Environment and Life Sciences Department, Putian College, Putian 351100, China)

Abstract: By using hybridoma-monoclonal antibody technology, eight hybridoma cell lines which secrete monoclonal antibodies (McAb) against the mucus immunoglobulin (Ig) of European eel (*Anguilla anguilla*) were established. And the characteristics of these McAbs were analyzed. The results showed that among these McAbs, two of them are IgM, three are IgG₁, and the other three are IgG_{2a}. All of these McAbs had the ability to bind to the eel mucosal Ig by antigen-directed ELISA and Sandwich-ELISA coated with rabbit anti-eel serum IgM. In the ELISA assay, their titer ranged from 10⁴ to 10⁶. Further experiments proved that five of them only specifically bound to mucosal Ig of European eel, and three of them had cross reaction with the serum IgM, non of the McAbs reacted with the fish common bacterial pathogen, such as *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. Sobria*, *A. caviae*, *Vibrio anguilla*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Edwardsiella ictaluri*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Two McAbs against the serum IgM had low level cross reaction with the mucus Ig. All of these results demonstrated that both the mucus Ig and serum IgM had unique epitopes despite sharing common ones. And the mucus Ig which differed from serum IgM exists in the European eel. These McAbs will be served as useful tools for further research on eel's mucosal immunity. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (3): 511-515]

Key word: *Anguilla anguilla*; mucus immunoglobulin; monoclonal antibody; structure analysis

Corresponding author: LIN Tian-long. E-mail: lint05@163.com