

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)红细胞单克隆抗体 与五种养殖鱼类血细胞的交叉反应*

邢 婧 战文斌¹⁾ 曾晓华 程顺峰
(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室 青岛 266003)

提要 以牙鲆血细胞为抗原免疫 Balb/c 小鼠,选用聚乙二醇(PEG)作为细胞融合剂,将免疫的小鼠脾细胞与 P3 X63 Ag8U1 骨髓瘤细胞融合,筛选、克隆出 3 株生产抗牙鲆红细胞单克隆抗体(Mabs)的杂交瘤细胞(1C7、2B6、3A1)。应用免疫荧光抗体法(IFAT)研究 3 株单抗与 5 种常见养殖鱼类(大菱鲆、花鲈、真鲷、许氏平 鰽、鲫鱼)红细胞的交叉反应,结果显示,3 株单抗与 5 种鱼类红细胞有不同程度的阳性反应;应用 Western blotting 法分析单抗识别的蛋白分子量,结果显示,单抗 1C7 与大菱鲆血细胞结合的蛋白分子量为 52kD、47kD、45kD、32kD、29kD、27kD,与花鲈、许氏平 鰽结合的蛋白分子量是 52kD、29kD,与真鲷结合的为 29kD,与鲫鱼结合的为 44kD、29kD、28kD;单抗 2B6 与大菱鲆、花鲈血细胞结合的蛋白带分子量是 30kD、28kD,与真鲷结合的为 30kD,与许氏平 鰽结合的为 29kD、28kD;单抗 3A1 没有 Western blotting 反应。结果表明,这 6 种鱼红细胞存在相同或相似的抗原决定簇,蛋白成分具有相似性。

关键词 牙鲆,血细胞,单克隆抗体,鱼类

中图分类号 Q789

血细胞在鱼类机体免疫防御中起重要作用,直接参与鱼类机体非特异性和特异性免疫反应,同时,对自身生理变化和外界刺激非常敏感,是反映鱼类健康状况和生活环境质量的重要指标。鱼类血细胞的研究始于 19 世纪末,研究方法主要是血细胞常规染色法以及组织化学方法,自 20 世纪 70 年代以来,应用电镜技术与现代生物技术,对鱼类血细胞分类和功能方面的研究报道不断增多(周玉等,2001;周永灿等,2003)。

单克隆抗体技术创立于 1975 年,由于其生物活性单一,与抗原结合的特异性强等优点,成为生物学和医学领域中一种非常重要的研究手段。单克隆抗体技术应用于鱼类血细胞的研究开展得较晚,De Luca 等(1983)利用抗 IgM 的单抗,将鲑鱼淋巴细胞分成两个亚类;Miller 等(1987)研制出了抗 T 细胞和 B 细胞的单抗;之后,抗粒细胞、单核

巨噬细胞的单抗也相继问世(Slierendrecht *et al*, 1995; Linda *et al*, 1997; Kollner *et al*, 2001)。这些单抗的应用,使得鱼类血细胞的研究在分子生物学领域有了重大突破。运用单克隆抗体技术研究鱼类血细胞,目前尚未见报道。

本文中通过研制抗牙鲆红细胞单克隆抗体,应用免疫荧光抗体法和 Western blotting 法研究牙鲆红细胞单抗与 5 种常见养殖鱼类红细胞的交叉反应,以期鱼类红细胞在分子生物学方面的研究提供有利工具,为研究鱼类血细胞积累资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

实验所用 6 种鱼(牙鲆 *Paralichthys olivaceus*, 大菱鲆 *Scophthalmus maximus*, 花鲈 *Lateolabrax japonicus*, 真鲷 *Pagrosomus major*, 许氏平 鰽 *Sebastes schlegelii*, 鲫鱼 *Carassius auratus*)均购自青岛南山水

* 国家自然科学基金项目,30271016 号;国家重点基础研究发展规划项目(973),G1999012002 号;海水养殖教育部重点实验室开放课题(200421)资助。邢 婧,博士,讲师, E-mail: xingjing@ouc.edu.cn

1) 通讯作者:战文斌,教授,博士生导师, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

收稿日期:2004-01-16,收修改稿日期:2004-05-10

产品市场, 体重(500±50)g; Balb/c 小鼠购自山东医科大学实验动物中心; 骨髓瘤细胞为 P3 X63 Ag8U1 细胞株。

GIT 购自日本 Nihon Seiyaku 公司; HAT、聚乙二醇(PEG)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗小鼠 IgG、碱性磷酸酶标记羊抗小鼠 IgG、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(BCIP)均购自 Sigma 公司。

1.2 单克隆抗体的制备

单克隆抗体的制备参照战文斌等(2001)所报道的方法。

1.2.1 血细胞悬液、单层细胞的制备 用一次性注射器预先吸取与血液同体积的抗凝剂(蒋琼等, 2001), 从牙鲆尾动脉取血。将抽出的血液 200g, 4℃离心 10min, 抗凝剂重悬, 反复 3 次, 完全去除血浆, 将血细胞悬液浓度调整至 10^8 cells/ml, 以备免疫。

将上述血细胞悬液稀释 100 倍, 滴一滴于干净载玻片上, 湿盒中自然沉降 30min, 室温干燥, 丙酮固定 10min, -20℃冻存备用。

1.2.2 免疫 Balb/c 小鼠 以 0.3ml 血细胞悬液免疫 4 周龄 Balb/c 小鼠, 2 周后, 进行第二次免疫, 以后每隔一周加强免疫。第四次免疫后三天, 将小鼠脱颈椎处死, 取脾脏用于细胞融合。

1.2.3 细胞融合 在无菌条件下将免疫小鼠脾细胞与 P3 X63 Ag8U1 骨髓瘤细胞用 50% PEG 融合, 融合细胞(10^5 cells/ml)用 HAT-GIT 选择培养液重悬, 滴入加有营养细胞的 96 孔细胞培养板中, 每孔 0.2ml, 置于 37℃, CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中培养, 倒置相差显微镜观察杂交瘤细胞生长情况。大约两周后, 免疫荧光抗体法检测杂交瘤细胞上清液。

1.2.4 免疫荧光抗体实验 以杂交瘤细胞培养上清液为第一抗体加在单层细胞上, 37℃湿盒孵育 45min, PBS(0.01mol/L, pH7.4)浸洗 3 次, 每次 5min。加第二抗体(FITC 标记的羊抗小鼠 IgG, 1:256), 37℃避光湿盒孵育 45min, PBS 浸洗 3 次。甘油封片, 荧光显微镜观察。

1.2.5 克隆 采用有限稀释法克隆阳性杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞用 GIT 培养液重悬, 10 倍梯度稀释至 10^2 cells/ml, 取 1ml 细胞液加入 9ml 培养液, 混合均匀, 滴入加有营养细胞的 96 孔细胞培养板中, 每孔 0.1ml。选取只有一个杂交瘤细胞的培养孔。待杂交瘤细胞长满孔底 2/3 以上时,

取上清液用上述免疫荧光抗体法检测。每株杂交瘤细胞克隆 3 次。

1.3 单克隆抗体与 5 种鱼血细胞的交叉反应

1.3.1 血细胞悬液、单层细胞制备 取健康的大菱鲆、花鲈、真鲷、许氏平、鲫鱼, 按照 1.2.1 的方法制备血细胞悬液(10^8 cells/ml)和单层细胞。

1.3.2 免疫荧光抗体实验 分别在 5 种鱼血细胞单层细胞上加第一抗体(单克隆抗体), 其余步骤同 1.2.4。

1.3.3 Western blotting 法分析抗原决定簇分子量 分别将上述 6 种血细胞悬液(10^8 cells/ml)用超声波破碎 5min, 加入等量样品缓冲液, 于沸水中煮 5min。每个样品重复点样, 聚丙烯酰胺凝胶(浓缩胶 4%, 分离胶 10%)电泳(稳流状态下, 浓缩胶 30mA, 分离胶 60mA)完成后, 取出凝胶, 一份考马斯亮兰染色, 一份移到电泳转移槽, 稳流 200mA, 转移 5h。将转移后的硝酸纤维素膜(NC 膜)2% BAS-PBS, 37℃封闭 1h, PBS 浸洗 3 次, 加入第一抗体(单克隆抗体), 37℃孵育 45min, PBS 浸洗 3 次, 加入第二抗体(碱性磷酸酶标记羊抗小鼠 IgG, 1:30000), 37℃孵育 45min, PBS 浸洗 3 次。加 NBT/BCIP, 室温显色。

2 结果

2.1 牙鲆血细胞单抗的制备

免疫荧光抗体法筛选出 21 株阳性杂交瘤细胞, 克隆了其中强阳性的 3 株: 1C7、2B6、3A1。免疫荧光结果显示: 3 株单抗均与红细胞呈阳性反应。单抗 1C7 与细胞质反应阳性, 荧光均匀明亮, 细胞核及细胞膜反应阴性(图 1a); 单抗 2B6 与细胞膜和细胞质均有阳性反应, 荧光面积大、着色亮, 细胞核反应阴性(图 1b); 单抗 3A1 只与细胞膜有阳性反应, 荧光呈点状、亮度高(图 1c)。

2.2 牙鲆血细胞单抗与 5 种鱼类血细胞的交叉反应

2.2.1 免疫荧光抗体法 3 株单抗与 5 种鱼类红细胞有不同程度的阳性反应(表 1)。单抗 1C7 与大菱鲆红细胞质反应为强阳性, 荧光呈高亮度的点状(图 2a); 与花鲈、真鲷、许氏平 红细胞质为阳性反应, 荧光呈不均匀片状, 细胞质周围一圈的荧光比中间亮(图 2b-d); 与鲫鱼红细胞的反应为弱阳性, 整个细胞都有模糊的荧光(图 2e)。单抗 2B6 与大菱鲆、花鲈、真鲷、许氏平 的红细胞有阳性反应, 荧光呈现细胞质的形态, 细胞核反

应阴性(图 2f—i);与鲫鱼红细胞反应阴性。单抗 3A1 在大菱鲆红细胞上的反应与牙鲆红细胞相同,荧光在细胞膜上呈高亮度的点状(图 2j);与花鲈红细胞的反应为弱阳性,表现为细胞质上的模糊荧光(图 2k),与真鲷、许氏平 鰽、鲫鱼红细胞反应阴性。

2.2.2 Western blotting 法 在电泳图谱上可以看出,6 种鱼类的血细胞蛋白质条带丰富,其中有多条蛋白质条带的分子量极为相近,尤其是 5 种海水养殖鱼类,血细胞蛋白主带的分子量基本相同(图 3)。Western blotting 结果显示:单抗 1C7 与

表 1 牙鲆红细胞单抗与 5 种鱼类红细胞的交叉反应
Tab. 1 Cross reactions of Mabs against flounder erythrocyte with 5 fish erythrocytes

单抗	大菱鲆	花鲈	真鲷	许氏平	鲫鱼
Mab 1C7	++	+	+	+	±
Mab 2B6	+	+	+	+	-
Mab 3A1	+	±	-	-	-

注:++ 强阳性;+ 阳性;±弱阳性;- 阴性

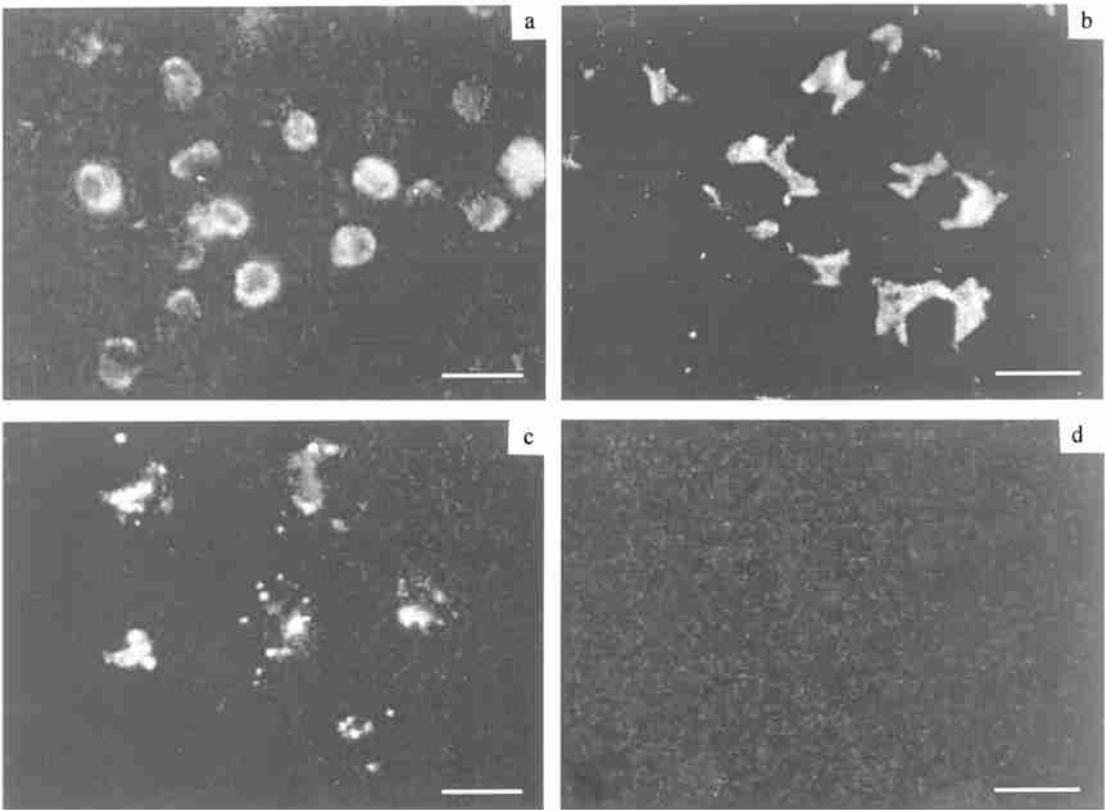


图 1 3 株牙鲆红细胞单抗的免疫荧光抗体实验结果
Fig. 1 Reactions of 3 Mabs with flounder erythrocyte by indirect immunofluorescence assay test
a. 单抗 1C7; b. 单抗 2B6; c. 单抗 3A1; d. 阴性对照。比例尺 = 20μm

牙鲆血细胞没有结合的蛋白带; 与大菱鲆血细胞结合的蛋白带有 6 条, 分子量分别是 52kD、47kD、45kD、32kD、29kD、27kD; 与花鲈、许氏平 血细胞的结合蛋白带有两条, 分子量分别是 52kD、29kD; 与真鲷血细胞的结合蛋白只有 1 条, 分子量为 29kD; 与鲫鱼血细胞的结合蛋白带有 3 条, 分子量为 44kD、29kD、28kD(图 4a) 。单抗 2B6 与牙鲆和

鲫鱼血细胞没有结合蛋白带; 与大菱鲆、花鲈血细胞结合的蛋白带有两条, 分子量分别是 30kD、28kD; 与真鲷血细胞结合的蛋白只有 1 条, 分子量为 30kD; 与许氏平 血细胞结合的蛋白带有 2 条, 分子量分别是 29kD、28kD(图 4b) 。单抗 3A1 没有 Western blotting 反应。

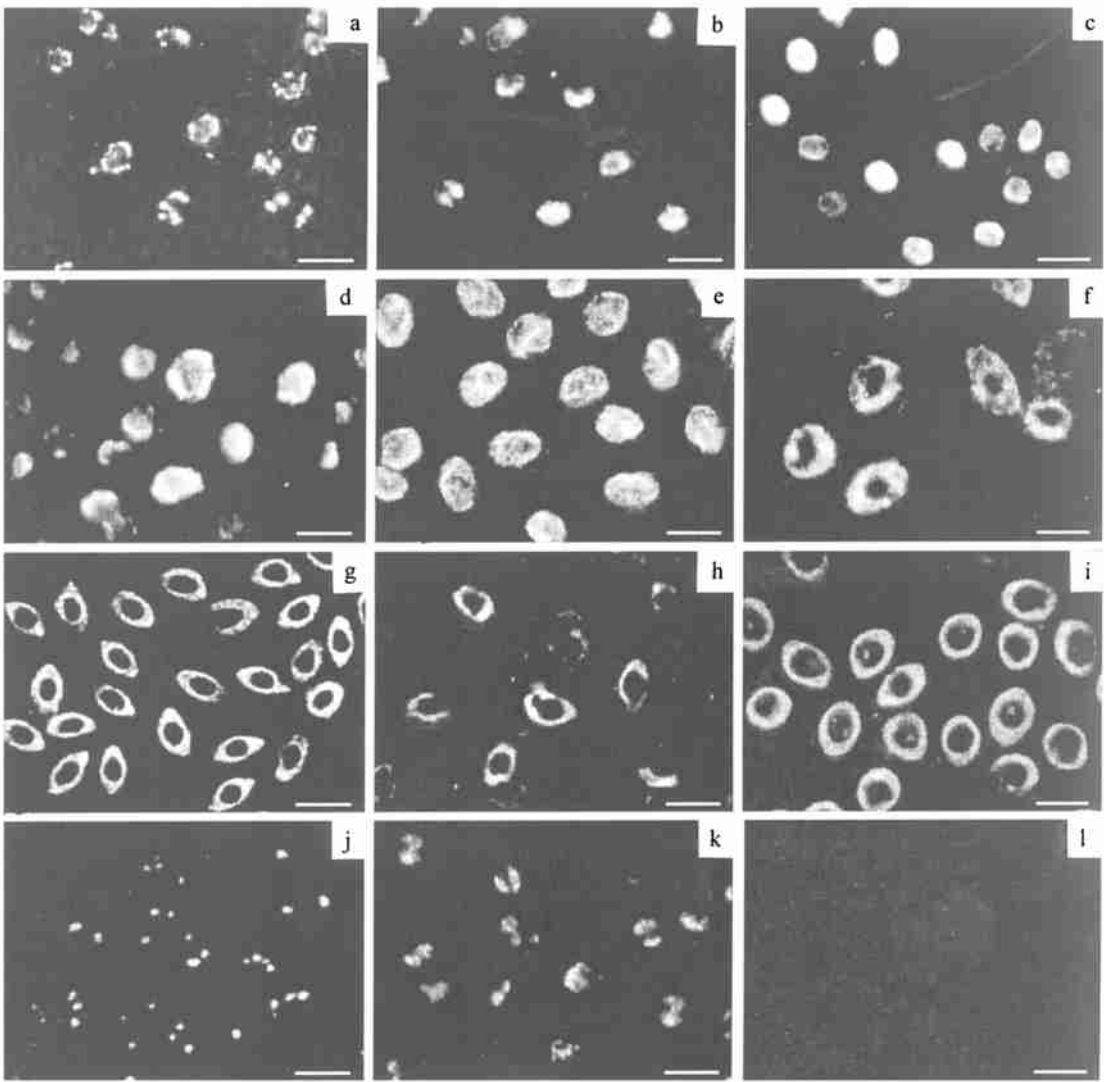


图 2 免疫荧光法分析牙鲆红细胞单抗与 5 种鱼红细胞的交叉反应

Fig. 2 Cross reactions of Mabs against flounder erythrocyte with 5 fish erythrocytes

a. 1C7 与大菱鲆; b. 1C7 与花鲈; c. 1C7 与真鲷; d. 1C7 与许氏平 ; e. 1C7 与鲫鱼;
f. 2B6 与大菱鲆; g. 2B6 与花鲈; h. 2B6 与真鲷; i. 2B6 与许氏平 ; j. 3A1 与大菱鲆;
k. 3A1 与花鲈; l. 阴性对照。比例尺= 20 μ m

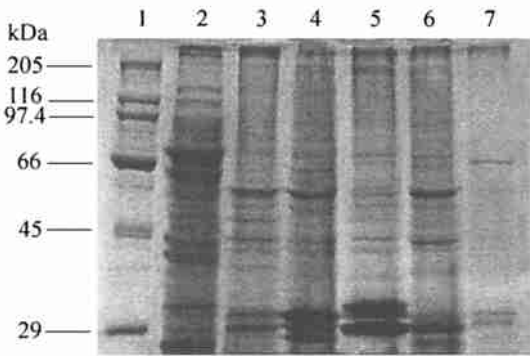


图 3 6 种鱼血细胞电泳图

Fig. 3 Blood cells of 6 fish species by SDS-PAGE
1. Marker; 2. 牙鲆; 3. 大菱鲆; 4. 花鲈; 5. 真鲷;
6. 许氏平 ; 7. 鲫鱼

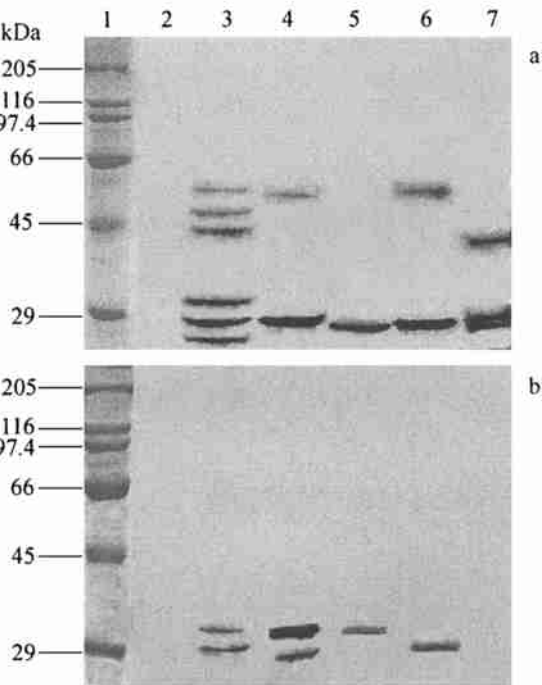


图 4 单抗与 6 种鱼血细胞的 Western blotting 结果
Fig. 4 Western blotting analysis on blood cells of
6 fish species
a. 单抗 1C7 的 Western blotting 结果;
b. 单抗 2B6 的 Western blotting 结果
1. Marker; 2. 牙鲆; 3. 大菱鲆; 4. 花鲈; 5. 真鲷;
6. 许氏平 ; 7. 鲫鱼

3 讨论

作者以牙鲆血细胞为抗原, 运用单克隆抗体

技术, 筛选、克隆出 3 株产生抗牙鲆红细胞单克隆抗体的杂交瘤细胞(1C7、2B6、3A1)。应用免疫荧光抗体法和 Western blotting 法研究抗牙鲆红细胞单抗与 5 种常见养殖鱼类血细胞的交叉反应, 显示 3 株单抗与 5 种鱼类血细胞有不同程度的交叉。

本文中检测阳性杂交瘤细胞的方法采用免疫荧光抗体法, 反应灵敏, 并且避免了酶联免疫吸附法和免疫酶法等由于细胞和组织内存在内源酶而出现的假阳性。杂交瘤细胞含有小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞两种细胞成分, 其中以小鼠脾细胞分泌的抗体为检测目标。为排除骨髓瘤细胞分泌物对检测的影响, 阴性对照的第一抗体选用融合前骨髓瘤细胞的培养上清液, 保证了检出的阳性抗体为抗血细胞的抗体。与多抗相比, 单抗的优势在于抗体是单克隆细胞株分泌的, 理化生物活性稳定, 特异性强。本实验中作者共进行了 3 次有限稀释克隆, 最后一次克隆阳性孔率为 100%, 保证细胞株为单克隆。

作者采用了两种方法研究牙鲆红细胞单克隆抗体与常见养殖鱼类血细胞交叉反应, 各有所长: 应用免疫荧光抗体法, 能看出交叉反应的强弱, 定位抗原决定簇, 并能分辨出血细胞的类型; 应用 Western blotting 法, 能进一步找出与单抗结合的蛋白质的分子量。

免疫荧光法的交叉反应结果说明了以下几个问题: (1) 鱼类红细胞上存在着相同的抗原决定簇。单抗 1C7 与 5 种鱼类红细胞均有交叉反应, 说明单抗 1C7 的抗原决定簇存在于 6 种鱼红细胞上; 同理, 单抗 2B6 的抗原决定簇存在于除鲫鱼以外 5 种鱼的红细胞上。(2) 不同鱼红细胞上的抗原决定簇有差别。免疫荧光抗体法显示 3 株单抗与大菱鲆红细胞的交叉反应最强, 荧光状态与在牙鲆红细胞上的反应最为接近, 说明大菱鲆与牙鲆红细胞具有较为接近的抗原决定簇; 单抗 1C7 与鲫鱼红细胞免疫荧光抗体反应弱、特异性不强, 单抗 2B6 和单抗 3A1 与鲫鱼红细胞为阴性反应, 说明在鲫鱼红细胞上的抗原决定簇数量少, 或者在鲫鱼红细胞上的抗原决定簇与牙鲆红细胞上的差异较大。(3) 根据以上两点, 推断出鲫鱼与牙鲆亲缘关系较远, 大菱鲆与牙鲆亲缘关系较近。

Western blotting 法与免疫荧光法的结果基本相符: 凡是与单抗 1C7 和单抗 2B6 出现交叉的血细胞, 均有条带出现, 交叉反应强的细胞, 条带相

对较多。单抗 3A1 没有 Western blotting 反应活性,说明单抗 3A1 识别的抗原决定簇为三级结构,或者识别位点极少,显不出肉眼能够分辨的条带,这与免疫荧光抗体法的结果也是一致的。

一般来说,单抗只与某一特定的抗原决定簇有特异性的结合,但在某些情况下,尤其是以细胞作为抗原时,由于抗原决定簇的多态性,往往得到与多个位点结合的单抗。本实验中有 Western blotting 活性的单抗 1C7 和单抗 2B6 即出现了这种情况,尤其是单抗 1C7 与大菱鲆血细胞的结合带有 6 条之多。类似情况也出现在鱼类白细胞单抗的研究中(Linda *et al.*, 1997; Kollner *et al.*, 2001),分析其原因,一是多个蛋白具有一段相同或相似的氨基酸序列,二是多个蛋白携带的一个共同的糖类基团为抗原决定簇,或者小分子量的反应蛋白本就是大分子量反应蛋白的一部分。

本文中研制的牙鲆红细胞单克隆抗体,特异地与 6 种鱼红细胞结合,反应稳定,不受红细胞形态和发育阶段影响,克服了组织切片染色方法以形态为观察依据的缺陷,是研究鱼类红细胞发生分化的有利工具。另外,红细胞单抗在对通过血液传播的疾病的研究上,尤其是在感染血细胞的病毒病的研究上,也有广泛的应用前景(张志栋等, 2002)。

参 考 文 献

吴洪喜, 柴雪良, 吴建波等, 2002. 乐清湾泥蚶血细胞周期和 DNA 含量. 海洋科学, 26(3): 47—49 [Wu H X, Chai X L, Wu J B *et al.*, 2002. The blood cell cycles and DNA content of *Tegillarca granosa* in Yueqing bay. Marine Sciences, 26(3): 47—49]

张志栋, 战文斌, 薛艳红等, 2002. 2 种对虾血细胞单克隆抗体的交叉反应. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 32(123): 189—192 [Zhang Z D, Zhan W B, Xue Y H *et al.*, 2002. Cross reaction of monoclonal antibodies against the two species of shrimps haemocytes. Journal of Ocean University of Qingdao, 32(123): 189—192]

周 玉, 郭文场, 杨振国, 2001. 鱼类血细胞的研究进展.

动物学杂志, 36(6): 55—57 [Zhou Y, Guo W C, Yang Z G, 2001. The progress of studies on fish blood cells. Chinese Journal of Zoology, 36(6): 55—57]

周永灿, 邢玉娜, 冯全英, 2003. 鱼类血细胞研究进展. 海南大学学报(自然科学版), 21(2): 171—176 [Zhou Y C, Xing Y N, Feng Q Y, 2003. Research advance in the haemocytes of fishes. Natural Science Journal of Hainan University, 21(2): 171—176]

战文斌, 张利峰, 张志栋, 2001. 中国对虾血细胞单克隆抗体的研制及对虾血细胞类型的鉴别. 高技术通讯, 11(126): 19—22 [Zhan W B, Zhang L F, Zhang Z D, 2001. Production of monoclonal antibodies against hemocyte of shrimp (*Penaeus chinensis*) and using them to analysis the hemocyte types. High Technology Letters, 11(126): 19—22]

蒋 琼, 王 雷, 罗日祥, 2001. 中国对虾血淋巴抗凝剂的筛选. 水产学报, 25(4): 359—362 [Jiang Q, Wang L, Luo R X, 2001. Selection of anticoagulant to the hemolymph of *Penaeus chinensis*. Journal of Fisheries of China, 25(4): 359—362]

De Luca D, Wilson M, War G W, 1983. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. Eur J Immunol, 13: 546—551

Kollner B, Blohm Ulrike, Kotterba G *et al.*, 2001. A monoclonal antibody recognizing a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. Fish & Shellfish Immunol, 11(2): 127—142

Linda A Bowden, G Edward Rainger, Jason W Holland *et al.*, 1997. Generation and characterization of monoclonal antibodies against rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, leucocytes. Comp Biochem and Physiol, 117(3): 291—298

Miller N W, Bly J E, van Ginkel F *et al.*, 1987. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. Develop & Comp Immunol, 11: 739—747

Slierendrecht W J, Lorenzen N, Glamann J Koch C *et al.*, 1995. Immunocytochemical analysis of a monoclonal antibody specific for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes. Vet Immunol Immunopathol, 46: 349—360

CROSS REACTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST FLOUNDER *PARALICHTHYS OLIVACEUS* WITH BLOOD CELLS OF OTHER FIVE FISH SPECIES

XING Jing, ZHAN Wen Bin, ZENG Xiao Hua, CHENG Shun Feng

(Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, Laboratory of Mariculture Ministry of Education of China (LMMEC), Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract Monoclonal antibodies (Mabs) have proven to be powerful tools in the characterization of mammalian blood cells in terms of their ontogeny, interrelationships, and functions. Therefore, it is natural that workers with non-mammalian such as fish blood cells have attempted to use similar approaches in the development of much needed methods for the characterization of these cells.

In order to study the molecular mechanism of immunology on fish blood cells, monoclonal antibodies were raised. Four-week old Balb/c mice were immunized 4 times within 4 weeks with blood cell of healthy flounder, *Paralichthys olivaceus*. Three days after the last immunization, spleens of the immunized mice were dissected into cells and then fused with P3-X63-Ag8U1 myeloma cell line using 50% polyethylene glycol (PEG) as fusogen. The fused cells were cultured in HAT-GIT selecting medium for about 2 weeks. The survival cells (hybridoma cells) were cultured in GIT. Mediums of hybridoma cells were detected by indirect immunofluorescence assay test (IFAT). Many positive hybridomas were found and 3 of them were cloned because of secreting high titer antibodies. As they were cloned 3 times continuously, it could be verified that the antibodies raised by these hybridoma cell lines were monoclonal. Then the monoclonal antibodies were used to cross-react with the blood cells from other 5 fish species (*Scophthalmus maximus*, *Lateolabrax japonicus*, *Pagrosomus major*, *Sebastes schlegeli*, *Carassius auratus*) by indirect immunofluorescence assay test and using Western blotting.

Results of this treatment yielded 3 stains of hybridoma cell lines (1C7, 2B6, 3A1) able to secrete monoclonal antibodies against flounder erythrocyte. The cross reaction showed that these monoclonal antibodies reacted with other 5 fish erythrocytes in different degrees: Mab 1C7 reacted with all of the 5 fish erythrocytes. Mab 2B6 reacted with erythrocytes of *S. maximus*, *L. japonicus*, *P. major* and *S. schlegeli*. Mab 3A1 reacted with erythrocytes of *S. maximus* and *L. japonicus*. Further experiments by Western blotting showed Mab 1C7 was able to recognize the protein of *S. maximus* blood cell whose molecule weight were 52, 47, 45, 3, 29 and 27kD; the protein of *L. japonicus* and *S. schlegeli* blood cell of 52 and 29kD; the protein of *P. major* blood cell of 29kD; the protein of *C. auratus* blood cell of 44, 29 and 28kD. Mab 2B6 recognized the protein of *S. maximus* and *L. japonicus* blood cell whose molecule weight were 30 and 28kD; the protein of *P. major* blood cell of 30kD; the protein of *S. schlegeli* blood cell of 29 and 28kD. Mab 3A1 could not recognize the protein by Western blotting.

These experiments indicate the presence of the same epitopes on the blood cells of these species of fish. The monoclonal antibodies are ready for use in ontogeny research of fish erythrocyte.

Key words *Paralichthys olivaceus*, Blood cell, Monoclonal antibody, Fish