

吳郭魚周邊血液單核球衍生之巨噬細胞單株抗體的建立與應用

洪紹文^{1,4,5} 謝育錚² 張鎮璿² 涂青宇³ 林育興⁴ 鄭清福² 陳明輝² 許添桓²
林荀龍² 王渭賢^{2*}

¹ 國立陽明大學醫學院腦科學研究所

² 國立中興大學獸醫學院獸醫學系

³ 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所殘毒管制組

⁴ 元培科技大學護理學系

⁵ 財團法人農業科技研究院動物科技研究所動物醫學組

(收稿日期: 2013.12.19, 接受日期: 2014.4.30)

摘 要

本實驗的目的在於製備抗吳郭魚周邊血液來源巨噬細胞的單株抗體。將培養後的貼附性吳郭魚周邊血液來源巨噬細胞免疫 BALB/c 小鼠，以融合瘤技術將小鼠骨髓瘤細胞 (NS-1 cells) 與經過免疫之小鼠脾細胞融合成融合瘤細胞，再經三次極限稀釋，並以間接酵素連結免疫分析法 (indirect ELISA) 篩選出具有分泌抗體的融合瘤細胞，共得到八株單株抗體，分別命名為 mAbM1-mAbM8。之後經抗體力價測試後發現 mAbM1、mAbM2、mAbM6 及 mAbM7 呈現高抗體力價。這四株單株抗體 (mAbM1、mAbM2、mAbM6 及 mAbM7) 之後則進行抗體特性研究。先以免疫螢光染色法與流式細胞儀分析這四株單株抗體與週邊血液單核球來源、頭腎來源及脾臟來源之巨噬細胞的結合能力，發現 mAbM1、mAbM2、mAbM6 及 mAbM7 對週邊血液單核球來源巨噬細胞和頭腎來源巨噬細胞有很高的陽性細胞率 (最高可達 80%)，與陰性對照組比較皆有顯著性差異 ($p < 0.05$)，尤其以 mAbM6 和 mAbM7 具有極顯著性差異 ($p < 0.01$)，但是對脾臟來源巨噬細胞的陽性細胞率與陰性對照組皆無極顯著的差異 ($p > 0.05$)。因此，再選取 mAbM6 和 mAbM7 這兩株單株抗體檢測與不同物種 (日本鰻、鯉魚、小鼠、紐西蘭大白兔、雞、綿羊、狗及人類) 之週邊血液巨噬細胞之結合能力，結果顯示日本鰻、小鼠、雞及羊的陽性細胞率與陰性對照組有極顯著差異 ($p < 0.01$) (可達 40-60%)。此外，以間接螢光免疫染色法配合雷射共軛焦掃描顯微鏡分析，結果發現 mAbM6 與 mAbM7 所辨識的抗原皆分布在細胞膜上，抗體與抗原接合位置呈現帽狀或環狀。同時發現利用 mAbM6 與 mAbM7 間接免疫螢光染色法將新鮮的吳郭魚周邊血液白血球進行染色，再配合流式細胞儀細胞分選功能，成功地從周邊血液白血球區別出巨噬細胞。本實驗成功開發吳郭魚巨噬細胞之單株抗體，期望此抗體能作為分類不同魚類血球族群及未來魚類免疫學研究上之工具。

關鍵詞：巨噬細胞、單株抗體、分選、吳郭魚

緒 言

吳郭魚的全球養殖產量已由 1984 年的 18 萬噸增加至 2007 年的 2,500 萬噸，其養殖產量暴增了 140 倍，讓吳郭魚養殖產量列居全球第三 (Fitzsimmons, 2008)，因此吳郭魚的免疫系統及疾病研究越來越受重視，也為本研究選用吳郭魚作為實驗對象的主因。

魚類具有類似無脊椎動物的非特異性免疫，同時也具有特異性免疫的動物 (Magnadottir, 2006)。然而非特異性防禦機制，卻是魚類之主要的免疫反應，其中又以吞噬細胞的吞噬作用為最

重要的防禦機制，魚類的吞噬細胞可分為顆粒性細胞 (特別是嗜中性球)、單核球及巨噬細胞 (Magnadottir, 2006)，在早期炎症發生時，這些吞噬細胞會快速地參與防禦，以提供魚體炎症反應初期之保護作用 (Magnadottir, 2006)。Antonio 和 Hedrick (1994) 與 Klesius 和 Sealey (1995) 指出單靠特異性免疫產生的抗體與病原的免疫反應，往往不能有效地保護魚體免受感染。因此，魚類的非特異性防禦系統也就顯得特別重要。

目前魚類免疫學研究學者，不再只專注於疫苗發展與疾病治療，而逐漸重視其免疫系統分類的演化以及功能探討等各種基礎研究上

* 通信作者：王渭賢 (Way-Shyan Wang)；FAX：886-4-22840894 ext 518；E-mail：wswang@dragon.nchu.edu.tw

(Magnadottir, 2006)。而自從融合瘤技術建立之後 (Kohler and Milstein, 1975)，此法即被廣泛應用於許多研究。其中像是人類白血球表面的 CD 標誌 (cluster differentiation markers) 便是利用此技術所發現的，繼而依賴抗不同的 CD 表面抗原之單株抗體又將血球細胞分為不同的次族群，繼而探討其分化、功能與活性。之後再配合流式細胞儀 (flow cytometry)，便可大量且快速分析該細胞的屬性，並將不同的細胞亞群分選出來，以利後續實驗使用。因此，利用流式細胞儀評估免疫細胞的族群與功能已廣泛地應用在免疫學的基礎研究 (Melamed *et al.*, 1990)。然而，魚類免疫細胞機制與功能比起哺乳動物所知甚少，主要原因在於缺乏可準確標定白血球次族群的表面抗原的抗體 (Fischer *et al.*, 2006)。因此，本實驗目的在於開發吳郭魚巨噬細胞之單株抗體，期望此抗體能作為分類不同魚類血球族群及未來魚類免疫學研究上之工具。

材料與方法

實驗動物

雜交種吳郭魚 (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*) (購自台南市學甲區某繁殖場)，體重介於 500-600 g，飼養於 2.6 m × 2.1 m × 0.5 m (長 × 寬 × 深) 之魚池中。日本鰻 (*Anguilla japonica*) 與鯉魚 (*Cyprinus carpio* L.) 亦皆購自此繁殖場，分開飼養於另兩個 2.6 m × 2.1 m × 0.5 m (長 × 寬 × 深) 之魚池。以紫外燈 (Sankyo Denki, Tokyo, Japan) 殺菌後之地下水為飼養水，並採流水式飼養。每分鐘進水量與出水量各為 5 L，總水量為 2.73 噸，水溫維持在 25-28°C。定期檢測魚池水質與魚隻健康，魚隻每日餵飼 2 次市售吳郭魚浮水飼料與鰻魚飼料 (福壽，台中，台灣)。

7 週齡雄性 BALB/c 小鼠購自國家實驗動物中心 (台北，台灣)，飼養於獨立空調與 12 小時自動明暗控制之動物房 (獸醫系，國立中興大學，台中，台灣)，並將動物房溫度控制於 24-27°C、濕度維持在 60-70%。小鼠飼養皆符合國立中興大學實驗動物照護及使用委員會 (The Institutional Animal Care and Use Committee of National Chung Hsing University) 之規範，動物實驗核准編號為 96-23。

魚類周邊血液單核球衍生之巨噬細胞純化和培

養

本法係參考 Hung 等 (2007) 的方法並稍加修改後施行。首先將雜交種吳郭魚、日本鰻及鯉魚置於 1L 水中，之後加入 5 mL benzocaine stock solution (25g Ethyl p-amion benzoate in 200 mL 95% ethanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 浸浴麻醉。以無菌 3 mL (23 G) 針筒於脊椎下靜脈抽血 2 mL，並注入內含 EDTA 的 4°C 真空抗凝瓶 (Becton Dickinson, Louis, MO, USA) 中，均勻搖晃使血液完全抗凝。將抗凝全血以 RPMI-1640 medium (Hyclone, Logan, UT, USA) 做 3 倍稀釋後，取 3 mL 稀釋血液加到 4 mL Ficoll-Paque[®] Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 之上，而後以 800 × g 於 4°C 離心 60 分鐘。之後將中層介面之白血球層吸出後以不含胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Gibco Invitrogen Co., NY, USA) 之 RPMI-1640 medium 清洗 1 次，接著以 RPMI-1640 medium [(含 10% FBS 與 1% 抗生素 PSA (penicillin-streptomycin amphotericin B solution, Biological industries, USA; 10,000 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 0.025 mg/mL amphotericin B)] 於 18°C 進行培養。之後每隔兩天換液一次，將懸浮細胞移除，培養 5 天後收取貼附細胞，以 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich) 進行細胞活性染色與細胞計數。

雜交種吳郭魚頭腎與脾臟來源之巨噬細胞培養與純化

本法亦參照 Hung 等 (2007) 的方法並稍加修改後施行。首先將雜交種吳郭魚置於 1 L 水中，之後加入 10 mL benzocaine stock solution 進行安樂死後，馬上以無菌外科手術取下頭腎與脾臟並置於 10 mL RPMI-1640 medium (含 1% PSA) 中。之後以細胞研磨器 (Sigma-Aldrich) 使之成為單細胞懸浮液，然後分別再將頭腎與脾臟單細胞懸浮液小心地加在 46% Percoll[®] (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 之上，並於 4°C 下以 800 × g 離心 30 分鐘以分離白血球。離心後可見白血球層位於中層介面，以無菌吸取器將白血球層吸出，以 RPMI-1640 medium 清洗 2 次，之後頭腎與脾臟巨噬細胞純化與培養方法如同材料方法中魚類周邊血液單核球衍生之巨噬細胞純化和培養。

其他動物周邊血液單核球衍生之巨噬細胞純化和培養

將 BALB/c 小鼠血、兔血、雞血、狗血、羊血及人血分別以 EDTA 進行抗凝，將抗凝全血以不含 FBS 之 RPMI-1640 medium 做 2 倍稀釋，之後取 3 mL 稀釋抗凝血液加到 4 mL Ficoll-Paque® Plus 之上，再於 $800 \times g$ 於 4°C 離心 40 分鐘。之後將中層介面之白血球層吸出後，再以 RPMI-1640 medium 清洗 2 次，接著以 RPMI-1640 medium (含 10%FBS 與 1% PSA) 進行培養。培養兩小時後，移除懸浮培養液，再加新的培養液繼續培養兩天後，收集貼附於底盤的細胞，以供後續實驗使用。

免疫原製備

本實驗使用兩種免疫原，分別為吳郭魚周邊血液單核球衍生之巨噬細胞懸浮液，另一則是以吳郭魚周邊血液單核球衍生之巨噬細胞懸浮液混合 Freund's 佐劑 (比例為 1:1)。

小鼠免疫

首先，將周邊血液單核球衍生之巨噬細胞懸浮液 ($100 \mu\text{L}$, 1×10^7 cells/mL) 與等體積的 Freund's 完全佐劑混合均勻，以腹腔注射 $200 \mu\text{L}$ 混合液於 BALB/c 小鼠，之後每兩週再次進行補強免疫，並將 Freund's 完全佐劑更改為 Freund's 不完全佐劑。另一方面，不含佐劑之周邊血液單核球衍生之巨噬細胞懸浮液 ($100 \mu\text{L}$, 1×10^7 cells/mL)，以腹腔注射 $200 \mu\text{L}$ 於 BALB/c 小鼠，於注射後一週檢測血清中抗體力價，待抗體力價上升至 214 倍時，以腹腔注射 $200 \mu\text{L}$ 周邊血液單核球衍生之巨噬細胞懸浮液進行最終免疫，之後 3-5 天內進行細胞融合瘤實驗。

間接型酵素連結免疫吸附分析法

本法係參考 Jansson 等 (2003) 之方法並稍加修改後施行。先以 0.1% paraformaldehyde 固定雜交種吳郭魚周邊血液單核球衍生之巨噬細胞 (1×10^7 cells/mL)，並於 96 孔微量培養盤 (Cell culture Clusters, Corning Inc., New York, NY, USA) 中每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 固定後的細胞液，之後以 $300 \times g$ 於 4°C 離心 10 分鐘並去除上清液，爾後於每孔加入 $150 \mu\text{L}$ blocking solution [1% bovine serum albumin (BSA) 溶於 phosphate buffer solution (PBS) 中]，並於室溫下反應 30 分鐘，最後以 PBS 連續清洗 3 次，風乾備用或置於 -20°C 保存。測試時首先將待測之樣品 (小鼠血清或融合瘤上清液) 以 PBS 稀釋後，取 $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 於 37°C 反應

1 小時後以 PBST (PBS + 0.5% Tween 20) 清洗 3 次。隨後每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 稀釋 2,000 倍之 goat anti-mouse IgG-HRP polyclonal antibody (Sigma-Aldrich)，於 37°C 反應 1 小時後，再以 PBST 清洗 3 次。最後，每孔加入 $100 \mu\text{L}$ TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich)，於 37°C 避光反應 10 分鐘後加入 $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 終止液 (0.5M H_2SO_4 , Sigma-Aldrich)，並以 ELISA reader (MRX Microplate Reader, Dynex Technologies, Inc., Chantilly, VA, USA) 波長 450 nm 判讀 OD 值。

單株融合瘤細胞的製備

本法係參考 Kollner 等 (2001) 之方法施行。以無菌手術取出高抗體力價的 BALB/c 小鼠脾臟，並以不含血清之 RPMI-1640 medium 清洗 2 次，之後將脾臟內細胞沖洗出來並以不含血清之 RPMI-1640 medium 再清洗 2 次，之後將脾臟細胞與骨髓瘤細胞 NS-1 (P3/NSI/1-Ag4-1，國立中興大學獸醫所李龍湖教授與沈瑞鴻教授分讓) 均勻混合後，加入 1 mL polyethylene glycol 1500 (PEG, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 進行細胞融合，之後再加入 49 mL 不含血清之 RPMI-1640 medium，並以 $400 \times g$ 離心 5 分鐘去除上清液。接著將細胞懸浮於含有 20% FBS (Defined, Hyclone, Logan, UT, USA) 之 RPMI-1640 medium，並培養於 96 孔微量培養盤 (Sigma-Aldrich) 中。隔天加入含有 HAT (hypoxanthine/aminopterin/thymidine, Hyclone, Logan, UT, USA) 的培養液 ($100 \mu\text{L}/\text{well}$)，並置於含 5% CO_2 之 37°C 培養箱培養 5-7 天。之後進行換液，每次更換 50-70 % 的上清液並加入新的 HAT-RPMI 1640 medium/FBS 培養液。

將融合瘤細胞上清液取出，以間接型 ELISA 檢測抗體產生情形，實驗中以 NS-1 細胞培養液當作陰性對照組，高抗體力價的小鼠血清為陽性對照組。檢測後將產生高抗體之融合瘤細胞放大培養，並持續取其上清液檢測抗體反應。將高抗體反應之融合瘤細胞以極限稀釋法 (limit dilution) 進行單株化。首先，將 96 孔細胞培養盤之在每一行每個孔洞加入 $100 \mu\text{L}$ 含有 HT (hypoxanthine/thymidine, Hyclone) 及 15% FBS 之 RPMI-1640 medium，將所篩選之陽性融合瘤細胞株取其細胞液 $100 \mu\text{L}$ 滴入第一個孔洞中，混合均勻後，由左至右依序進行 2 倍稀釋，之後再吸取 $50 \mu\text{L}$ 由上至下進行 2 倍稀釋，最後每孔再加入 $100 \mu\text{L}$ 空白小鼠脾細胞作為餵飼細胞

(feeder cell) 以形成微環境 (micro-environment) 來刺激單一細胞生長，約 5-7 天後添加新鮮培養液，直到有單一細胞聚落產生，重複三次單株化後，取其上清液冷藏於 4°C 待測，並將細胞冷凍保存於液態氮中。

單株抗體亞型測定

使用 mouse monoAb ID kit (ZYMED Lab. Inc., San Francisco, CA, USA) 來檢測融合瘤細胞所分泌的單株抗體與輕鏈之型別。

利用流式細胞儀檢測抗體結合能力

本法係參考 Sung 等 (1999) 之方法並加以修改後施行。以流式細胞儀檢測抗體與雜交種吳郭魚周邊血液、頭腎及脾臟來源巨噬細胞之結合能力。另外，也檢測抗體與不同物種 (BALB/c 小鼠、兔、雞、狗、羊及人) 以及不同魚種 (日本鰻與鯉魚) 之周邊血液單核球衍生巨噬細胞之結合能力。首先，取得待測樣品細胞 1 mL (1×10^7 cells/mL) 至流式細胞儀專用試管，4°C 離心 5 分鐘 ($400 \times g$) 以去除上清液，之後加入 200 μ L 融合瘤上清液 (10 ng/mL)，於 4°C 作用 1 小時，之後以含有 0.1% BSA 之 PBS 清洗 2 次後，再加入稀釋 1,000 倍之 goat anti-mouse IgG-FITC polyclonal antibody (Sigma-Aldrich)，於 4°C 避光作用 1 小時後，再以 PBS 清洗 3 次。將上述細胞以流式細胞儀 (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, Inc., San Jose, CA, USA) 進行檢測分析。以 FL-1 參數作為 FITC 螢光強度指標，先以陰性對照組調整背景參數，再將免疫螢光染色後的細胞進行檢測，以陰性對照組作為標準量，大於此標準為陽性。再利用 EXPO32 ACD 軟體 (Beckman Coulter, Inc., San Jose, CA, USA) 分析，計算各樣品陽性細胞百分比。並以 Student's t-test 進行統計分析當兩組之間 $p < 0.05$ 時，則判定兩組間具有顯著差異。

免疫螢光染色法

本法係參考 Sung 等 (1999) 之方法並稍加修改後施行。先將玻片浸潤於 0.1% poly-L-lysine 五分鐘後烘乾備用。之後將周邊血液單核球衍生之巨噬細胞 (1×10^7 cells/mL) 做成細胞抹片，取融合瘤上清液覆蓋其上，並置於 4°C 作用 1 小時。之後以含有 0.1% BSA 之 PBS 清洗 3 次後，再加入稀釋 1,000 倍 goat anti-mouse IgG-FITC polyclonal antibody (Sigma-Aldrich)，置於 4°C 避

光作用 1 小時，再以 PBS 清洗 3 次，最後於螢光顯微鏡 (Olympus BX51; Olympus America Inc., Melville, NY, USA) 下觀察。另外，搭配雷射共軛焦掃描顯微鏡影像分析儀 (laser confocal microscopy, Carl Zeiss LSM510, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Sachsen, Germany)，觀察螢光分佈的情形，再以軟體 (LSM5 Image Browser, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Sachsen, Germany) 分析螢光強度。

利用單株抗體與流式細胞儀分選出巨噬細胞

本法係參考 Hamdani 等 (1998) 之方法並稍加修改後施行。將新鮮的周邊血液白血球，經過單株抗體間接免疫螢光染色，再搭配流式細胞儀 (BD FACSaria Cell-Sorting System, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 分選細胞 (cell sorting)，將陽性細胞收集下來，並以 Wright's eosin methylene blue (Merck, Inc., Darmstadt, Germany) 進行染色，並觀察其細胞型態。

統計分析

實驗中之結果以 Student's t-test 進行分析，當 $p < 0.05$ 與 $p < 0.01$ 各代表顯著性與極顯著性差異。

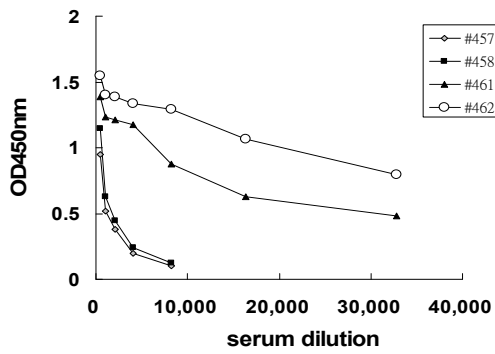
結 果

小鼠對抗原的免疫反應

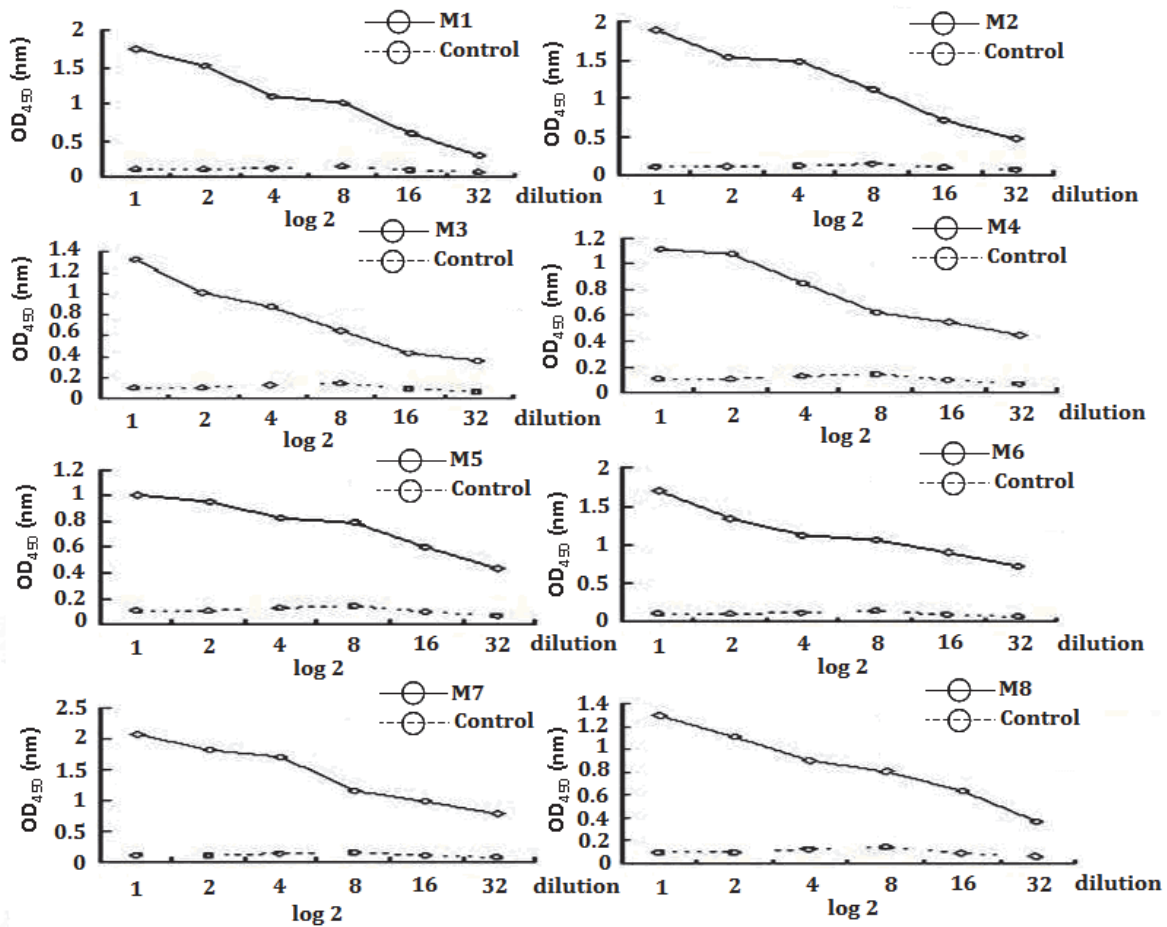
首先，將吳郭魚之抗凝全血以 Ficoll-Paque[®] Plus 做梯度離心，分離出周邊血液白血球，待培養五天後收集貼附於底盤的細胞，以流式細胞儀 FSC (linear) 和 SSC (linear) 雙參數圖來評估周邊血液單核球衍生之巨噬細胞的純度 (85.9%)。此外，本實驗抗原為周邊血液單核球衍生之巨噬細胞，搭配佐劑有無，以腹腔注射方式進行免疫 BALB/c 小鼠：小鼠編號 461 及 462 為抗原混合佐劑組；小鼠編號 457 及 458 為抗原組 (無佐劑)。免疫後第 3 週測定小鼠抗體力價，結果顯示抗原混合佐劑組的小鼠力價已可達 5,000 倍，然而抗原組的力價仍未有上升的趨勢 (Fig. 1)。因此，之後本研究之抗原免疫均採用吳郭魚周邊血液單核球衍生巨噬細胞與佐劑混合的方式進行，經過五次免疫後，結果顯示小鼠血清之抗體力價均可達 2^{14} 倍以上。

單株抗體與吳郭魚巨噬細胞的結合能力

收取融合瘤細胞培養液，並利用間接酵素連



圖一、以吳郭魚周邊血液巨噬細胞 +/- 佐劑免疫 BALB/c 小鼠之血清中抗體力價變化。#457 與 #458 表示以吳郭魚巨噬細胞不含完全佐劑免疫小鼠。#461 與 #462 表示以吳郭魚巨噬細胞混合完全佐劑免疫小鼠。
Figure 1. The serum antibody titers of BALB/c mice immunized with tilapia peripheral blood macrophage with or with adjuvant. #457 and #458 were indicated mice immunized with tilapia macrophage suspension (1×10^7 cells/mL). #461 and #462 were indicated mice immunized with tilapia macrophage suspension and the complete Freund's adjuvant.



圖二、利用間接 ELISA 分析 mAbM1-mAbM8 與吳郭魚周邊血液巨噬細胞的結合能力。

Figure 2. The binding abilities of monoclonal antibodies (mAbM1-mAbM8) for tilapia peripheral blood macrophage by indirect ELISA assay.

結免疫吸附法 (indirect ELISA) 來測定融合瘤細胞之分泌抗體能力, 挑選吸光值 (OD_{450} value) 大於 1 之細胞進行極限稀釋, 經過三次的極限稀釋篩選, 最後共篩選出 8 株單株化融合瘤細胞, 分別命名為 mAbM1-mAbM8 (Fig. 2)。將融合瘤上清液以等比稀釋法進行 ELISA 測其力價, 結果顯示 mAbM1、mAbM2、mAbM6 及 mAbM7 在稀釋十倍以上, OD_{450} value 仍大於 1 (Fig. 2)。因

此, 選擇 mAbM1、mAbM2、mAbM6 及 mAbM7 細胞株進行單株抗體之特性測定與評估抗體-抗原的結合能力。

將所篩選得之單株融合瘤細胞產生的抗體, 以 mouse MonoAb ID kit 進行單株抗體亞型分析, 結果顯示 mAbM1-mAbM8 所產生之抗體均屬於 IgG1, 並且輕鏈為 κ 鏈 (Table 1)。以流式細胞儀檢測抗體與吳郭魚周邊血液單核球衍生之巨噬

細胞間結合能力，結果顯示單株抗體 mAbM1、mAbM2、mAbM6 及 mAbM7 標定巨噬細胞分別約為 11.69%、13.87%、82.65% 及 67.72% (Fig. 3)，mAbM6 與 mAbM7 對於吳郭魚周邊血液單核球衍生之巨噬細胞有較高的結合能力。此外，檢測此 4 株單株抗體與不同組織來源的巨噬細胞之結合能力，結果顯示在吳郭魚周邊血液巨噬細胞之陽性細胞比率，mAbM1 與 mAbM2 與陰性對照組有顯著差異 ($p < 0.05$)，mAbM6 與 mAbM7 與陰性對照組有極顯著差異 ($p < 0.01$)，其陽性細胞比率可達 80% 與 60% 以上，顯示 mAbM6 對於吳郭魚周邊血液巨噬細胞結合能力最高，mAbM7 次之，mAbM1 與 mAbM2 最低 (Fig. 4)。

此外，此四株單株抗體對吳郭魚頭腎巨噬細胞之陽性細胞比率，與陰性對照組比較後皆有極顯著差異 ($p < 0.01$)，尤其是 mAbM6 的陽性細胞比率可達 60% 以上，且顯著高於其他 3 株抗體，而 mAbM2 陽性細胞率顯著低於其他 3 株 (Fig. 4)。對吳郭魚脾臟巨噬細胞之陽性細胞比率，此四株單株抗體與陰性對照組比較後皆無顯著差異 ($p > 0.05$)，四株抗體間相互比較，亦無明顯差異，顯示此四株單株抗體對於脾臟巨噬細胞結合能力不佳 (Fig. 4)。就以上結果顯示單株抗體 mAbM6 和 mAbM7 對於周邊血液與頭腎來源巨噬細胞親和性最高，因此選擇此兩株單株抗體作更進一步的研究。

單株抗體與日本鰻與鯉魚周邊血液巨噬細胞的結合能力

檢測單株抗體 mAbM6 和 mAbM7 與不同魚種 (吳郭魚、日本鰻、鯉魚) 之周邊血液單核球衍生之巨噬細胞的結合能力。結果顯示吳郭魚、日本鰻、鯉魚的 mAbM6⁺ 和 mAbM7⁺ 細胞比率與陰性對照組比較後皆有顯著性差異 ($p < 0.05$)，尤其吳郭魚和日本鰻的 mAbM6⁺ 和 mAbM7⁺ 細胞比率與陰性對照組比較後皆有極顯著性差異 ($p < 0.01$)。吳郭魚的 mAbM6⁺ 和 mAbM7⁺ 細胞比率皆顯著高於日本鰻與鯉魚。此外，mAbM6 對於吳郭魚與日本鰻的結合比率顯著高於 mAbM7，然而在鯉魚中則無顯著差異 (Table 2)。

單株抗體與雞、小鼠、紐西蘭大白兔、狗、羊及人周邊血液巨噬細胞的結合能力

比較六個不同的物種 (雞、小鼠、紐西蘭大白兔、狗、羊及人) 之 mAbM6⁺ 和 mAbM7⁺ 細胞比率，結果顯示人的陽性細胞比例與陰性對照組

表一、八種單株抗體之亞型表現與輕鏈型態。

Table 1. The immunoglobulin (Ig) subtype and light chain type of the eight monoclonal antibodies (mAbM1-mAbM8).

mAb	Ig subtype	light chain
mAbM1	IgG1	k
mAbM2	IgG1	k
mAbM3	IgG1	k
mAbM4	IgG1	k
mAbM5	IgG1	k
mAbM6	IgG1	k
mAbM7	IgG1	k
mAbM8	IgG1	k

表二、利用流式細胞儀分析 mAbM6 與 mAbM7 對吳郭魚、日本鰻與鯉魚周邊血液巨噬細胞的結合能力。

Table 2. The binding ability of mAbM6 and mAbM7 for peripheral blood macrophage of tilapia, eel, and carp by flow cytometric assay.

host	mean ± SD %		
	control	mAbM6	mAbM7
Tilapia (n = 3)	4.9 ± 0.3	81.9 ± 2.7 ^{**#}	67.5 ± 1.2 ^{**}
eel (n = 3)	3.8 ± 0.5	68.5 ± 1.2 ^{**#}	51.7 ± 1.6 ^{**}
carp (n = 3)	4.9 ± 0.7	18.1 ± 0.8 [*]	19.8 ± 0.5 [*]

* indicated significant difference compared with negative control ($p < 0.05$).

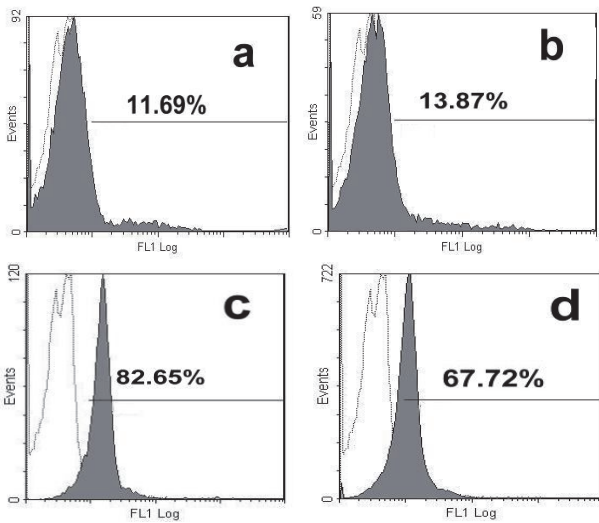
** indicated significant difference compared with negative control ($p < 0.01$).

indicated significant advancement compared mAbM6 and mAbM7 ($p < 0.05$).

比較後有顯著差異 ($p < 0.05$)，雞、小鼠及羊與陰性對照組比較後有極顯著差異 ($p < 0.01$)。兔子和狗的陽性細胞比例與陰性對照組比較後則無顯著性差異 ($p > 0.05$)。依抗體結合能力高低排序，分別為雞、小鼠、羊和人。另外，小鼠和羊的 mAbM6⁺ 細胞比率顯著低於 mAbM7⁺ 細胞 (Table 3)。

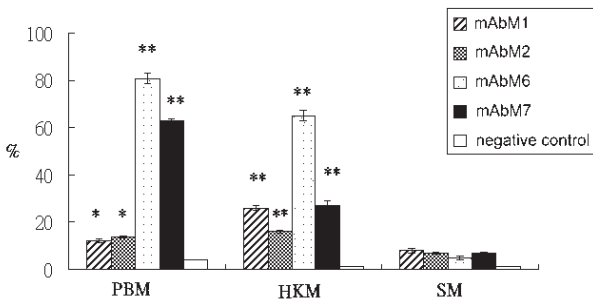
單株抗體應用於吳郭魚周邊血液單核球衍生之巨噬細胞免疫螢光染色

將周邊血液巨噬細胞做成血球抹片，以 mAbM6 和 mAbM7 作間接免疫螢光染色，於 1,000 倍視野下觀察。結果顯示相較於對照組，mAbM6⁺ 和 mAbM7⁺ 細胞其細胞型態大多呈現與巨噬細胞型態類似 (Fig. 5)。再以雷射共軛焦掃描顯微鏡影像分析儀觀察並分析其螢光強度，發現其抗體結合位置皆分布於細胞周圍，呈現帽狀或環狀。同時分析其螢光分佈，紅色箭頭代表分析螢光的走向，發現在細胞表面的螢光強度較



圖三、利用流式細胞儀分析 mAbM1、mAbM2、mAbM6 與 mAbM7 與吳郭魚周邊血液巨噬細胞的結合能力。(a) mAbM1 (b) mAbM2 (c) mAbM6 (d) mAbM7。虛線代表陰性對照組。

Figure 3. The binding ability of mAbM1, mAbM2, mAbM6, and mAbM7 for tilapia peripheral blood macrophage by flow cytometric assay. (a) mAbM1; (b) mAbM2; (c) mAbM6; (d) mAbM7. The dotted line indicated as the negative control.



圖四、mAbM1、mAbM2、mAbM6 與 mAbM7 對吳郭魚周邊血液、頭腎及脾臟來源之巨噬細胞的結合能力評估。符號*代表與陰性對照組比較後呈現顯著差異($p < 0.05$)。符號**代表與陰性對照組比較後呈現極顯著差異($p < 0.01$)。

Figure 4. The binding ability of mAbM1, mAbM2, mAbM6, and mAbM7 to tilapia macrophages from peripheral blood (PBM), head kidney (HKM), and spleen (SM), respectively.

The single star symbol indicated significant difference ($p < 0.05$) compared with negative control. The double star symbols indicated significant difference ($p < 0.01$) compared with negative control.

高，而細胞內的螢光強度較低 (Fig. 5)。由以上結果推斷 mAbM6 和 mAbM7 其抗原接合位置

表三、利用流式細胞儀分析 mAbM6 與 mAbM7 對雞、小鼠、紐西蘭大白兔、狗、羊及人周邊血液巨噬細胞結合能力。

Table 3. The binding ability of mAbM6 and mAbM7 for peripheral blood macrophage of chicken, mouse, rabbit, sheep, dog, and human by flow cytometric assay.

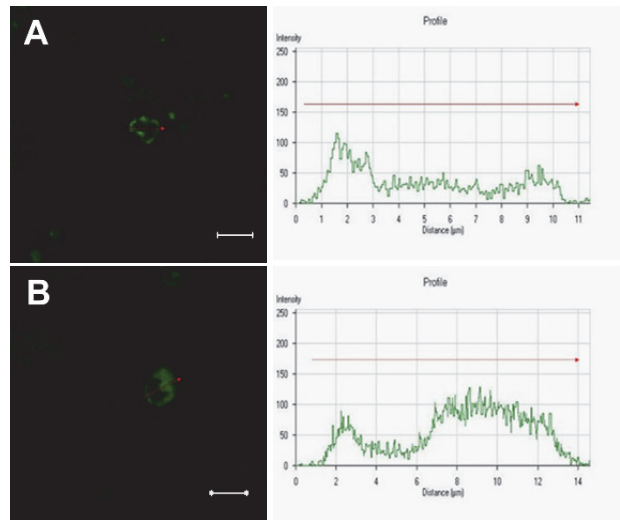
host	mean \pm SD %		
	control	mAbM6	mAbM7
chicken (n = 3)	4.6 \pm 1.4	69.4 \pm 0.3**	68.3 \pm 0.1**
mouse (n = 3)	4.1 \pm 1.2	44.4 \pm 2.1**	55.7 \pm 2.4**#
rabbit (n = 3)	4.3 \pm 1.5	5.8 \pm 0.2	5.6 \pm 0.3
sheep (n = 3)	3.2 \pm 0.8	35.8 \pm 1.3**	40.4 \pm 0.6**#
dog (n = 3)	4.5 \pm 1.2	7.7 \pm 0.6	5.9 \pm 0.2
human (n = 3)	3.1 \pm 0.6	11.9 \pm 0.2*	13.3 \pm 0.4*

The different superscript letters indicated there were significant differences among these species by student's t-test ($p < 0.05$).

* indicated significant difference compared with negative control ($p < 0.05$).

** indicated significant difference compared with negative control ($p < 0.01$).

indicated significant advancement compared mAbM6 and mAbM7 ($p < 0.05$).



圖五、以雷射共軛焦掃描顯微鏡影像分析儀分析 mAbM6 與 mAbM7 標定新鮮吳郭魚周邊血液巨噬細胞並分析結合密度分布。(A) 以 mAbM6 染色之新鮮吳郭魚周邊血液巨噬細胞 (B) 以 mAbM7 染色之新鮮吳郭魚周邊血液巨噬細胞。

Figure 5. The laser scanning images of (A) mAbM6⁺ and (B) mAbM7⁺ PBM cells were observed by the confocal laser scanning microscope. The distribution of binding intensity was showed as the right side of the image. Bar = 10 μ m.

(epitopes) 可能位於巨噬細胞表面。

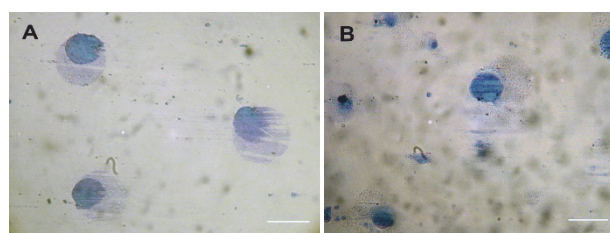
利用單株抗體分選出吳郭魚周邊血液單核球衍生之巨噬細胞

利用 Ficoll-Paque[®] Plus 進行梯度離心分離吳郭魚周邊血液白血球，經單株抗體 mAbM6 與 mAbM7 間接免疫染色，並利用流式細胞儀分選細胞功能，將陽性細胞收集下來，再以光學顯微鏡觀察。可見 mAbM6⁺細胞大多類似單核球型態，型態圓且大，細胞大小介於 8-12 μm (Fig. 6A)。mAbM7⁺細胞大小較不一致，表面較不規則狀，核質比小，大小介於 10-15 μm ，類似巨噬細胞型態 (Fig. 6B)。

討論

魚類的非特異性防禦機制主要是由腎臟、脾臟及血液中之巨噬細胞來執行吞噬作用，因為魚類巨噬細胞具有良好的吞噬作用，所以在病原剛入侵或早期炎症發生時，巨噬細胞能快速地參與防禦作用，提供魚體在初期炎症反應時之保護作用 (Sakamoto *et al.*, 1981)。同時，巨噬細胞表面的接受體又可被抗體或補體與病原形成之複合體活化，而分泌某些特殊殺菌蛋白，進而將入侵病原消滅 (Sakamoto *et al.*, 1981)。因此，巨噬細胞在魚類的免疫系統中扮演很重要的角色。但是因相關研究不多，故其真正的分類及特性尚未完全了解，所以發展抗巨噬細胞之單株抗體，可提供未來魚類免疫學研究中的一項工具。

Passantino 等 (2003) 依據血球抹片染色與組織切片觀察比較人類與虹鱒的單核球/巨噬細胞型態，結果顯示單核球/巨噬細胞約佔虹鱒周邊血液白血球的 1-3%，而典型的單核球與巨噬細胞型態其細胞質明顯大於細胞核，細胞內具許多空胞，細胞膜呈現透明不規則狀且有類似偽足伸出，以酸性磷酸酶試驗為陽性，其型態特性皆與人類的相似。目前已知魚類巨噬細胞株的只有來自金魚腎臟造血組織的巨噬細胞株 (GMCL) (Wang *et al.*, 1995) 與虹鱒巨噬細胞株 (RTS11) (Dewitte-Orr *et al.*, 2007) 兩種，其型態與特性與哺乳動物的巨噬細胞相似。至於其他魚類之巨噬細胞株多為初代培養，在適宜條件下只可存活 2-3 周 (Shaala *et al.*, 1979)。Belosevic 等 (2006) 曾以初代培養金魚頭腎來源巨噬細胞，並比較培養不同天數的細胞型態變化，結果顯示培養前細胞直徑約 6-10 μm ，核質比高，推測為前驅細胞；培養第三天後逐漸分化成核質比低且直徑約為 12-15 μm 的單核球細胞，與核質比低、細胞型態



圖六、分選細胞以 Wright's stain 染色並觀察細胞型態。(A) 以 mAbM6 所分選出之新鮮吳郭魚周邊血液巨噬細胞 (B) 以 mAbM7 所分選出之新鮮吳郭魚周邊血液巨噬細胞。

Figure 6. Morphology of mAbM6- and mAbM7-sorted macrophage-like staining with Wright's stain was observed by optical microscopy. (A) mAbM6-sorted fresh tilapia peripheral blood macrophage. (B) mAbM7-sorted fresh tilapia peripheral blood macrophage. Bar = 10 μm .

呈不規則、直徑約為 12-20 μm 的巨噬細胞。在培養第六天後，大部分的前驅細胞已全分化為單核球與巨噬細胞 (Belosevic *et al.*, 2006)。因此，本實驗先以梯度離心分離吳郭魚之週邊血液白血球後再加以培養，利用巨噬細胞的貼附特性，利用每天換液方式將非貼附性的細胞移除，培養五天後的貼附性巨噬細胞，以流式細胞儀進行分析，結果發現培養後之細胞型態大小一致，近似成熟巨噬細胞型態，單核球比例亦較 Belosevic 等 (2006) 之結果為低。因此以培養方式得到巨噬細胞是可行的，但因至少須培養五天，同時必須以換液的方式純化巨噬細胞，所以較耗費時間及金錢，如能藉由單株抗體之專一結合性來篩選出巨噬細胞，即可省去此缺點。

巨噬細胞的主要來源為造血器官，頭腎是魚類主要的造血組織也是魚體內巨噬細胞的主要來源。血液中之巨噬細胞在頭腎製造後，其功能並未完全成熟，需經一段時間演變方能成熟 (Shaala *et al.*, 1979)。因此，新鮮的血液來源之巨噬細胞需要一段時間的培養，才能使其功能趨於成熟。Xing 等 (2002) 以電子顯微鏡觀察巨噬細胞與塑料間的型態變化，證明在培養條件下巨噬細胞對塑料或玻璃表面具有極強的粘附性。因此，本實驗便是利用此一特性分離巨噬細胞與非粘附性細胞。

根據文獻以血球細胞作為抗原的免疫方式，可區分成兩種：直接免疫細胞懸浮液 (Sung *et al.*, 1999) 與混合佐劑 1:1 的方式 (Winotaphan *et al.*, 2005)。本實驗嘗試比較此兩種免疫方法，同時進行免疫後之第三週測定小鼠抗體力價，結果顯示

有加佐劑組的小鼠抗體力價已可達 5,000 倍，而只免疫抗原細胞組的力價仍未有上升的趨勢，因此決定採用混合佐劑免疫方式，可有效提高抗體力價且縮短免疫時間。

直到目前為止，硬骨魚類白血球次族群的單株抗體研究並不多，同時又針對巨噬細胞的研究更是少見。Romano 等 (1998) 以鯉魚白血球細胞株 (CLC) 做為抗原，此細胞株特性類似巨噬細胞，具有貼附性及吞噬功能，接著製備抗此細胞株之單株抗體 (WCL15)，結果此單株抗體可高度專一結合於鯉魚的巨噬細胞上，但對於其他魚種是否可以適用，目前尚未明瞭。此外，利用 WCL15 進行免疫組織化學染色，發現第二天受精卵之卵囊上層可見巨噬細胞分佈，此處為頭腎組織形成來源；而在受精一週後才開始分佈於胸腺、腸道及脾臟等處，因此推論頭腎為最早產生巨噬細胞的器官 (Romano *et al.*, 1998)。Pettersen 等 (2000) 直接以虹鱒之周邊血液白血球作為抗原，進行免疫小鼠，最後篩選出四種單株抗體，發現只有一種對於嗜中性球具有高度的專一性，其餘對單核球及多核球皆有交互反應，專一性不高。Kuroda 等 (2000) 以大西洋鮭魚各組織來源白血球作為抗原，最後只得一株單株抗體 (mAb 45) 可辨識較多的白血球，但其專一性也不佳。而本實驗結果篩選出的單株抗體 mAbM6 和 mAbM7，對巨噬細胞具有很高的專一性，原因在於已先利用細胞培養的方式來提高巨噬細胞的純度，以提升免疫的專一性。因此，所篩選出之單株抗體，對於巨噬細胞具有較高的結合活性。Mulero 等 (2001) 同樣以培養的方式，純化金頭鯛頭腎來源巨噬細胞作為免疫原，結果得一單株抗體 (anti-aggregatin)，其特性可快速聚合白血球與抑制白血球活化，利用此抗體與不同組織來源白血球的結合能力，結果顯示 anti-aggregatin 與周邊血液來源吞噬細胞結合能力顯著高於頭腎及脾臟來源，而頭腎與脾臟來源吞噬細胞之間結果並無顯著差異。與本實驗結果比較，mAbM1、mAbM2、mAbM6 及 mAbM7 對不同組織來源之巨噬細胞的結合能力來看，與周邊血液來源之巨噬細胞結合百分比相當的高，其次為頭腎來源，與脾臟來源之巨噬細胞結合能力並不顯著，因此推論巨噬細胞大多分布在周邊血液，其次為頭腎及脾臟。

比較單株抗體在不同物種間的交互作用，可節省抗體的製備時間，並可探討其表面抗原是否具有演化上的保留性。Passantino 等 (2003) 以抗

人類 CD68 單株抗體免疫染色虹鱒的頭腎與脾臟的組織切片，結果無法染上魚類的免疫器官切片，因此推論虹鱒的巨噬細胞上無類似 CD68 的表面抗原，無法與抗人類的 CD68 單株抗體交互使用。Fischer 等 (2006) 嘗試將已知 377 種抗人類或常見哺乳動物之 CD 抗原之單株抗體與鯉魚及虹鱒的周邊血液白血球做交叉反應，最後只有三株可以對鯉魚血球反應，對虹鱒有四株具有反應，所佔比例非常的低。此結果與本實驗之結果相似，mAbM6 與 mAbM7 對於人類的周邊血液巨噬細胞也無很高的活性，可能原因為魚類與人類在分類學上相差太遠，所以抗人類 CD 抗原之單株抗體對於魚類細胞作用不大。此外，Fischer 等 (2006) 這個實驗結果中，較值得注意的是其結果顯示抗人類 CD14 單株抗體，可對虹鱒周邊血液白血球 0-20% 的結合率，其陽性細胞型態為大且顆粒性低，為典型單核球及巨噬細胞型態，且已知 CD14 是哺乳動物單核球及巨噬細胞表面的 LPS (lipopolysaccharides) 接受器，因此此一抗體在虹鱒及人類的結合特性是相符的，但在鯉魚卻無明顯表現。而本實驗中所製備的抗吳郭魚巨噬細胞之單株抗體 mAbM6 與 mAbM7，對於鯉魚、兔、狗及人的巨噬細胞無明顯辨識的作用，但對日本鰻、小鼠、雞和羊這幾個物種的周邊血液巨噬細胞有很高的辨識活性，因此 mAbM6 與 mAbM7 未來也可應用於日本鰻、小鼠、雞和羊這幾個物種的細胞標定，以及探討其抗體間的交互作用、分析抗原決定位置，以及單株抗體與周邊血液白血球結合情形等更深入的研究。

抗白血球的單株抗體除了以酵素連結免疫分析法與免疫螢光染色分析其抗體特性之外，另外也可利用組織免疫染色、凝集與不活化試驗 (aggregation and deactivation)、西方點墨法 (Western blot) 等試驗更深入探討所製備出的單株抗體的性質。Jing 與 Wenbin (2005) 製備出四株扇貝血淋巴球的單株抗體 (1E7、1E2、2H5 及 2C6)，其中以單株抗體 2C6 較專一結合顆粒球，經由西方點墨法分析，結果顯示不同的單株抗體結合不同分子量的表面抗原。Kollner 等 (2004) 成功製作出虹鱒凝血細胞 (thrombocytes) 單株抗體，以免疫染色搭配電子顯微鏡觀察，發現抗體結合於細胞表面，並利用單株抗體分離出高純度 (>95%) 的凝血細胞，再萃取其總 RNA 與不同免疫相關分子 (MHC I、MHC II、TCR 及 IL-1 等) 的引子進行 RT-PCR 反應，測其 mRNA 表現量，探討凝血細胞與不同免疫分子的相互關係。

傳統的白血球次族群分類方法是使用顯微鏡直接觀察細胞型態，但是如果需要進行細胞計數，便相當花費時間與人力 (Eill, 1977)。配合單株抗體對於細胞表面的抗原、受體或膜糖蛋白的結合專一性，Nakayasu 等 (2005) 與 Sung (1999) 以磁珠分離細胞系統，先將單株抗體結合磁珠，再以抗體專一結合特定細胞，藉此分離細胞族群，但因磁珠分離過程需要緩慢的震盪，使細胞與磁珠吸附，因此若欲進行活血球分離，需致力加長白血球於活體外存活的時間。而現在許多學者利用流式細胞儀快速、敏銳及即時等特性，著手於不同物種的白血球進行分類，另外搭配單株抗體的運用，可更專一性的分離目標細胞 (Goedken *et al.*, 2004)，另外有些機型的流式細胞儀具有細胞分選 (cell sorting) 的功能，能夠根據細胞上的特殊的標記物將特定細胞自細胞族群中分選出來，以進行更進一步的研究或分析 (Melamed *et al.*, 1990)。因此，將本實驗所製備的單株抗體 mAbM6 和 mAbM7，配合流式細胞儀分選細胞的功能，將所分離出的細胞染色後型態，依據 Ellis (1977) 與 Belosevic 等 (2006) 對魚類白血球次族群細胞型態標準，推斷 mAbM6⁺細胞為單核球，大小介於 8-12 μm ；而 mAbM7⁺細胞大小介於 10-15 μm ，較類似巨噬細胞型態，會有此差異推論在週邊白血球培養的過程中，仍有少部分的單核球存在，而無法完全純化。Belosevic 等 (2006) 證明可藉由一些生長因子或催化因子 (M-CSF、GM-CSF 及 IL-3 等) 誘發單核球分化成巨噬細胞。因此，可嘗試在培養液加入上述因子，以提高巨噬細胞的純度。

此外，本研究以單株抗體 mAbM6 和 mAbM7 與周邊血液白血球的結合百分比約為 13-17%，此比例與 Passantino 等 (2003) 敘述單核球/巨噬細胞約佔周邊血液白血球的 3% 有所出入，可能因為單株抗體 mAbM6 和 mAbM7 其抗原決定位置與單核球之前驅細胞、單核球及巨噬細胞皆有相似之處，因此結合比例較高，此推論須由未來更深入的研究加以證明。

本實驗所製備的單株抗體 mAbM6 和 mAbM7 可專一結合吳郭魚單核球/巨噬細胞，可提供白血球細胞表面標誌研究的工具，未來可配合組織免疫染色，探討巨噬細胞在不同組織的分布，或者可利用此抗體分離出單核球/巨噬細胞，搭配分生技術及流式細胞儀，研究巨噬細胞的免疫反應與吞噬作用或者細胞凋亡等體外試驗，期望對於魚類免疫學研究以及病理診斷上，有所助益。

誌 謝

本研究承蒙行政院農業委員會動植物疾病防疫檢疫局之經費支持(98AS-9.2.4-BQ-B1(21) and 99AS-9.2.2-BQ-B1(28))，特為致謝。

參考文獻

- Antonio DB and Hedrick RP. 1994. Effects of the corticosteroid kenalog on carrier state of juvenile channel catfish exposed to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Aquat. Anim. Health.* 6: 44-52.
- Belosevic M, Hanington PC and Barreda DR. 2006. Development of goldfish macrophages in vitro. *Fish Shellfish Immunol.* 20: 152-171.
- Dewitte-Orr SJ, Hsu HC and Bols NC. 2007. Induction of homotypic aggregation in the rainbow trout macrophage-like cell line, RTS11. *Fish Shellfish Immunol.* 22: 487-497.
- Ellis AE. 1977. The leucocytes of fish. *J. Fish Biol.* 11:453-491.
- Fischer U, Utke K, Somamoto T, Kollner B, Ototake M and Nakanishi T. 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 20: 209-226.
- Fitzsimmons K. 2008. Tilapia production, innovation, and markets. Eighth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Cairo International Conference Center. p1-40.
- Goedken M and Guise SD. 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.* 16: 539-552.
- Hamdani SH, McMillan DN, Pettersen EF, Wergeland H, Endresen C, Ellis AE and Secombes CJ. 1998. Isolation of rainbow trout neutrophils with an anti-granulocyte mono-clonal antibody. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63: 369-380.
- Hung SW, Tu CY and Wang WS. 2007. *In vivo* effects of adding singular or combined anti-oxidative vitamins and/or minerals to diets on the immune system of tilapia (*Oreochromis hybrids*) peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-derived macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115: 87-99.
- Jansson E, Gronvik KO, Johannisson A, Naslund K,

- Westergren E and Pilstrom L. 2003. Monoclonal antibodies to lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). Fish Shellfish Immunol. 14: 239-257.
- Jing X and Wenbin Z. 2005. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*). Fish Shellfish Immunol. 19: 17-25.
- Klesius PH and Sealey WM. 1995. Characteristics of serum antibody in enteric septicemia of catfish. J Aquat. Anim. Health. 7: 205-210.
- Kohler G and Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256: 495-497.
- Kollner B, Blohm U, Kotterba G and Fischer U. 2001. A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. Fish Shellfish Immunol. 11: 127-142.
- Kollner B, Fischer U, Rombout JH, Taverne-Thiele JJ and Hansen JD. 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. Dev. Comp. Immunol. 28: 1049-1062.
- Kuroda A, Okamoto N and Fukuda H. 2000. Characterization of monoclonal antibodies against antigens shared with neutrophils and macrophages rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathol. 35: 205-213.
- Magnadottir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immunol. 20: 137-151.
- Melamed MR, Lindmo T and Mendelsohn ML. 1990. Flow cytometry and sorting, 2nd ed. Wiley-Liss Inc., New York.
- Mulero V, Pelegrín P, Sepulcre MP, Muñoz J and Meseguer J. 2001. A fish cell surface receptor defined by a mAb mediates leukocyte aggregation and deactivation. Dev. Comp. Immunol. 25: 619-627.
- Nakayasu C, Somamoto T, Hasegawa S, Yoshitomi T and Okamoto N. 2005. Differential spontaneous killing of human and murine tumour cell lines by leucocyte subpopulations from carp peripheral blood leucocytes. Fish Shellfish Immunol. 19: 115-126.
- Passantino L, Patruno R, Cianciotta A, Passantino G, Tafaro A, Gadaleta C and Ranieri G. 2003. A phylogenetic comparison between acute monocytic leukemia cells and monocytes-macrophages in lower vertebrates. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 25: 87-99.
- Pettersen EF, Bjerknes R and Wergeland HI. 2000. Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohisto-chemistry and flow cytometry. Fish Shellfish Immunol. 10: 695-710.
- Romano N, Picchiatti S, Taverne-Thiele JJ, Taverne N, Abelli L, Mastrolia L, Verburg-van Kemenade BM and Rombout JH. 1998. Distribution of macrophages during fish development: an immunohistochemical study in carp (*Cyprinus carpio*, L.). Anat. Embryol. (Berl) 198: 31-41.
- Sakamoto M, Kobayashi S, Katoo K and Shimazono NJ. 1981. The effect of vitamin C deficiency on complement system and complement components. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 27: 367-378.
- Shaala AY, Dhaliwal HS, Bishop S and Ling NR. 1979. Ingestion of dyed-opsonised yeasts as a simple way of detecting phagocytes in lymphocyte preparations. Cytophilic binding of immunoglobulins by ingesting cells. J. Immunol. Methods. 27: 175-87.
- Sung, HH, Wu PY and Song YL. 1999. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte subpopulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*): immunochemical differentiation of tree major haemocyte types. Fish Shellfish Immunol. 9: 167-179.
- Wang R and Belosevic M. 1995. The *in vitro* effects of estradiol and cortisol on the function of a long-term goldfish macrophage cell line. Dev. Comp. Immunol. 19: 327-336.
- Winotaphan P, Sithigorngul P, Muenpol O, Longyant S, Rukpratanporn S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul W, Petsom A and Menasveta P. 2005. Monoclonal antibodies specific to haemocytes of black tiger prawn *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 18: 189-198.
- Xing S, Waddell JE and Boynton EL. 2002. Changes in macrophage morphology and prolonged cell viability following exposure to polyethylene particulate *in vitro*. Microsc. Res. Tech. 57: 523-529.

Development and Application of Monoclonal Antibodies to Peripheral Blood Monocyte Derived Macrophages of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*)

Shao-Wen Hung^{1,4,5}, Yu-Cheng Hsieh², Chen-Hsuan Chang², Ching-Yu Tu³, Yu-Hsing Lin⁴
Chin-Fu Cheng², Ming-Hui Chen², Tien-Huan Hsu², Shiun-Long Lin², Way-Shyan Wang^{2*}

¹ Institute of Brain Science, College of Medicine, National Yang-Ming University
Taipei, Taiwan

² Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University
Taichung, Taiwan

³ Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan
Taichung, Taiwan

⁴ Nursing Department of Yuanpei University
Hsinchu, Taiwan

⁵ Division of Animal Medicine, Animal Technology Laboratories, Agricultural Technology Research Institute
Hsinchu, Taiwan

(Received: 19 December 2013, accepted: 30 April 2014)

ABSTRACT

The aim of this study is to develop and apply the monoclonal antibodies (mAbs) against the hybrid tilapia macrophage (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*). There are a limited number of mAbs against fish leukocytes have been described until today. Our study results showed that eight mAbs, mAbM1-mAbM8, produced from BALB/c mice immunized with hybrid tilapia peripheral blood monocyte derived macrophages (PBM) with adjuvant. Those mAbs have been screened from a lot of hybridoma clones by indirect ELISA. Reveal of that the antibody titers of mAbM1, mAbM2, mAbM6, and mAbM7 are higher than the others. These four mAbs reacted with PBM, HKM (head kidney macrophages), and SM (spleen macrophages) were used to be analyzed their characterizations by the indirect immunofluorescence assay test and flow cytometry. The results suggest these four mAbs have very high binding abilities with PBM and HKM, especially mAbM6 and mAbM7. Furthermore, mAbM6 and mAbM7 are chosen for testing the cross-reactivity with peripheral blood monocyte derived macrophages from different species including eel, carp, mice, rabbit, chicken, sheep, dog, and human. The results indicate that both mAbM6 and mAbM7 have significantly higher binding abilities with PBM from eel, mice, sheep and chicken. Interestingly, the capping or ring forms of the mAbM6⁺ and mAbM7⁺ cells are recognized and found by the confocal microscope. Therefore, we presume that both mAbs binding epitopes are on the cell surface of the macrophages. Finally, we find that our developed mAbM6 and mAbM7 mAbs could be sorted the macrophages from peripheral blood leukocytes successfully. Indeed, our mAbs could serve as a useful tool to identify fish macrophages for further studies.

Key words: macrophage, monoclonal antibodies, sorting, tilapia