

牙鲆淋巴囊肿病毒纯化及不同来源病毒免疫特性比较

程顺峰^{1,2} 绳秀珍¹ 战文斌^{1*}

(¹中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室,青岛266003)

(²青岛农业大学动物科技学院,266109)

摘要 比较了3种不同的牙鲆淋巴囊肿病毒纯化方法,优化后的方法如下:剥离囊肿表面薄膜,收集内容物,匀浆后再用超声波细胞破碎仪破碎,反复冻融,650×g、1800×g差速离心,30%(W/W)蔗糖垫底超速离心(78500×g)浓缩病毒,最后蔗糖密度梯度超速离心(78500×g)纯化病毒。电镜观察发现,出现在47%~52%蔗糖密度区域的病毒带含有多量、纯净和结构一致的病毒粒子。此外,利用制备的兔抗血清对不同地区的病毒进行了免疫特性分析,Western blotting检测显示来自威海、青岛及秦皇岛3个地区的淋巴囊肿病毒反应结果是一致的,均有3条蛋白带发生反应,其分子量分别为125、66和55kDa。

关键词 淋巴囊肿病毒 超速离心 分离纯化 免疫特性比较

中图分类号 S948;S943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)03-0049-06

Purification and western blotting of three strains of lymphocystis disease virus

CHENG Shun-feng^{1,2} SHENG Xiu-zhen¹ ZHAN Wen-bin^{1*}

(¹ Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

(² Qingdao Agricultural University, 266109)

ABSTRACT The diseased Japanese flounders *Paralichthys olivaceus* were obtained from a culture farm near Qingdao. The lymphocystis nodules were cut down and washed with TNE buffer (50mmol/L Tris, 100mmol/L, 1mmol/L EDTA, pH 7.4), about 10 g of nodules were homogenized and suspended in 90 ml TNE buffer at 4 °C. The suspension was subjected to three rapid freeze/thaw cycles. Following ultrasonication, the virus-cell debris suspension was centrifuged at 650×g for 20 min at 4 °C. Then the supernatant was centrifuged again at 1800×g for 20 min at 4 °C, pooled and stored overnight at 4 °C, while the pellet was discarded. Virus particles were pelleted from the pooled supernatant by ultracentrifugation at 78500×g for 120 min at 4 °C and resuspended in TNE. The suspension was equally divided and loaded onto pre-formed gradients made up of 33%, 40%, 47%, 52%, 57% and 62% (w/w) sucrose, and ul-

国家自然科学基金项目(30771648)、国家863计划项目(2006AA100306)、山东省自然科学基金(Y2007D31)和青岛农业大学人才基金(630701)共同资助

* 通讯作者。E-mail:wbzhan@ouc.edu.cn, Tel:(0532)82032284

收稿日期:2008-04-22;接受日期:2008-05-20

作者简介:程顺峰(1978-),男,主要从事水生动物病害及免疫学研究。E-mail:chengshunfeng@gmail.com, Tel:13864805527

tracentrifuged at $78\ 500\times g$ for 120 min at $4\ ^\circ\text{C}$. Two prominent bands were obtained in sucrose gradients after ultracentrifugation. A diffuse band (B1) was located at about 37%~40% sucrose concentration, while a distinct band (B2) was located at about 47%~50% sucrose concentration. B1 contained few viral particles together with amorphous material, membranous structure and other cell debris when assessed by electron microscopy, while B2 from sucrose gradients contained viral particles and was apparently free of other material. In electron micrographs, the virions were intact, round polygon in shape, about 210~250 nm in diameter, some of the viral particles appeared with a more or less hexagonal profile.

In addition, for learning immunological characterization of LCDV purified from different zones, the rabbit antiserum was raised against the LCDV purified from Weihai region. Serum homology of LCDV isolates from Qin Huangdao, Qingdao and Weihai were checked by western blotting. Western blotting profile showed three main antigenic proteins with molecular weights of 125, 66 and 55kDa reacted with the antiserum. This experiment showed that the virus from different zones had the same linear epitopes.

KEY WORDS Lymphocystis disease virus (LCDV) Ultracentrifugation
Purification Immunological characterization

淋巴囊肿病(Lymphocystis disease, LCD)是鱼类常见的一种病毒病,该病的典型症状为患病鱼体表可见单个或聚集成团的皮肤瘤状或菜花状赘生物,其病原为淋巴囊肿病毒(Lymphocystis disease virus, LCDV)。该病广泛流行于世界各地的淡水、半咸水和海水鱼类中,现已知其可感染 42 科、125 种鱼(Plumb *et al.* 1993; Alonso *et al.* 2005)。目前该病在我国已感染了云纹石斑鱼、鲈鱼和牙鲆等十几种养殖经济鱼类,每年造成经济损失达百亿元之巨(徐洪涛等 2000;曲凌云等 1999;Sheng *et al.* 2007)。目前国内外关于 LCDV 的文献涉及到病毒纯化方法的较少,部分文献虽研究了病毒分离纯化的方法(刘允坤等 2002;宋晓玲等 2003;吕宏旭等 2003;王亮等 2004;Nishida *et al.* 1998;Iwamoto *et al.* 2002),但未能见到较理想的电镜照片。建立操作简便、提纯度高、收获量大的分离纯化方法,已成为 LCDV 病毒研究急需解决的问题。为此,本实验以患病牙鲆囊肿组织为材料,参考他人的分离纯化方法,对 LCDV 提取方法进行了优化,获得了大量纯净的 LCDV 病毒,为后续研究提供了材料基础。由于 LCDV 在我国分布范围较广,本文针对我国北方地区牙鲆 LCDV 免疫学特性进行了初步分析,该结果对于分析不同地区病毒株性状和抗原成分的差异,为疫苗的制备及应用等具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

患病牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 来自山东威海、青岛及河北秦皇岛的牙鲆养殖场,病鱼大小 25~30 cm,体表可见单个或聚集成团的乳头瘤状赘生物,尤其在唇部、背鳍及尾鳍较多。囊肿物大小不一,小的直径约 1 cm,大的直径有 2~3 cm,呈现乳黄色、灰白色及粉红色。肉眼可见囊肿物中数量众多的颗粒状囊肿细胞。70%酒精棉球消毒患病部位,灭菌手术刀片切下囊肿, $-80\ ^\circ\text{C}$ 备用。

纯系新西兰大白兔由青岛市药品检验所购得。弗氏完全佐剂及不完全佐剂、碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)和 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸(BCIP)均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 囊肿组织显微及超微切片

病鱼活体运回,切取头部、鱼鳍及体表等部位的囊肿,Davidson's AFA 固定液固定,常规方法制作石蜡切片,切片厚 5 μm ,苏木精-曙红(H-E)染色后进行组织学观察。另外切取囊肿组织样品,样品小于 0.5 cm^3 ,用 2.5%戊二醛(0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制)固定 2 h(4 $^{\circ}\text{C}$),1%锇酸(磷酸缓冲液配制)4 $^{\circ}\text{C}$ 固定后,梯度酒精脱水,Epon 包埋剂包埋,超薄切片机切片,醋酸铀-柠檬酸铅双染色法染色,透射电子显微镜观察并拍照。

1.2.2 囊肿组织处理

1.2.2.1 常规处理

(1)10 g 囊肿组织,加入 10 倍体积 TNE 缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl,0.001 mol/L EDTA,0.1 mol/L NaCl,pH(7.4),匀浆机 7 000 r/min 冰浴匀浆 10 ~ 20 s;(2)匀浆液冻融 3 次后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、650 \times g 离心 20 min,取上清液;(3)上清液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 800 \times g 离心 20 min,取上清液;(4)蔗糖和上清液配成 30%(W/W)蔗糖溶液,超速离心。

1.2.2.2 超声波处理

(1)10 g 囊肿组织,加入 10 倍体积 TNE 缓冲液,匀浆机 7 000 r/min 冰浴匀浆 10 ~ 20 s;(2)匀浆液再用超声波细胞破碎仪破碎,而后冻融 3 次;(3)处理后的匀浆液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、650 \times g 离心 20 min,取上清液;(4)上清液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 800 \times g 离心 20 min,取上清液;(5)蔗糖和上清液配成 30%(W/W)蔗糖溶液,超速离心。

1.2.2.3 剥离囊肿组织表面薄膜处理

(1)取 10 g 囊肿组织,冰浴条件剥离囊肿组织表面的薄膜,收集含有米粒样淋巴囊肿细胞的黏稠液体;(2)加入 10 倍体积 TNE 缓冲液,匀浆机 7 000 r/min 冰浴匀浆 10 ~ 20 s;(3)匀浆液再用超声波细胞破碎仪破碎,然后冻融 3 次;(4)将处理后的组织匀浆液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、650 \times g 离心 20 min,取上清液;(5)上清液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 800 \times g 离心 20 min,取上清液;(6)蔗糖和上清液配成 30%(W/W)蔗糖溶液,超速离心。

1.2.3 LCDV 蔗糖密度梯度离心

病毒粗提液与蔗糖配成 30%(W/W)蔗糖溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、78 500 \times g 离心 120 min,沉淀用 TNE 缓冲液重悬,将该重悬液加入事先配制的蔗糖密度梯度离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、78 500 \times g 离心 120 min,收集病毒带,TNE 缓冲液 5 倍稀释,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、78 500 \times g 离心 30 min 除去蔗糖,沉淀用适量 TNE 缓冲液悬浮,即为纯化的病毒液。蔗糖密度梯度溶液配制方法如下:TNE 配制 33%、40%、47%、52%、57%和 62%(W/W)蔗糖溶液。在 10 ml 的离心管中加 33%蔗糖 700 μl ,40%蔗糖 1 400 μl ,47%蔗糖 1 400 μl ,52%蔗糖 1 800 μl ,57%蔗糖 1 400 μl ,62%蔗糖 1 000 μl ,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。

1.2.4 负染与电镜观察

取病毒悬液 10 μl 滴加于覆盖有 Formvar 膜的铜网上,吸附 3~4 min,吸去多余液体,滴加 2%的磷钨酸(pH 6.9),染色 5 min,吸去多余染液,室温晾干,透射电镜观察,拍照。

1.2.5 LCDV 蛋白含量测定

以 25%(W/W)蔗糖溶液(TNE 缓冲液配制)配制牛血清白蛋白系列浓度梯度 0.05、0.10、0.15、0.20 和 0.25 g/L 各 0.1 ml,分别加入 Bradford 工作液 0.9 ml,振荡混匀,室温静置 2 min,以 25%蔗糖溶液调零,分光光度计分别测定各梯度的 D_{595} 值,制成标准曲线。然后吸取纯化病毒液 0.01ml,依次加入 25%蔗糖溶液 0.09 ml 和 Bradford 工作液 0.9 ml,振荡混匀,室温静置 2min,测定其 D_{595} 值,即可得出纯化病毒液的蛋白含量。

1.2.6 兔抗血清制备

以威海地区患病牙鲆囊肿组织纯化的病毒为抗原制备抗血清,调整病毒的蛋白浓度为 1 mg/ml,免疫纯系新西兰大白兔,共免疫 4 次,具体免疫程序如下:基础免疫,将病毒液与弗氏完全佐剂等比混匀,采用皮下 6 点免疫,每点注射 0.2 ml;14 d 后加强免疫,将病毒液与弗氏不完全佐剂等比混匀,方法与基础免疫相同;7 d 后再加强免疫 1 次,采用耳缘静脉直接注射方法,注射剂量为 0.5 ml,无佐剂;7 d 后再加强免疫第 2 次;第 4 次免疫后的第 7 天,从心脏一次性采血,室温放置 1 h,转入 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;次日,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 g 离心 15 min 分离抗血清。采用辛酸-硫酸铵法从血清中纯化 IgG。对于非特异性抗体的吸收参照 Sambrook 等(1989)的方法,处理后的

抗体即为抗血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.7 Western blotting 分析不同地区病毒的免疫特性

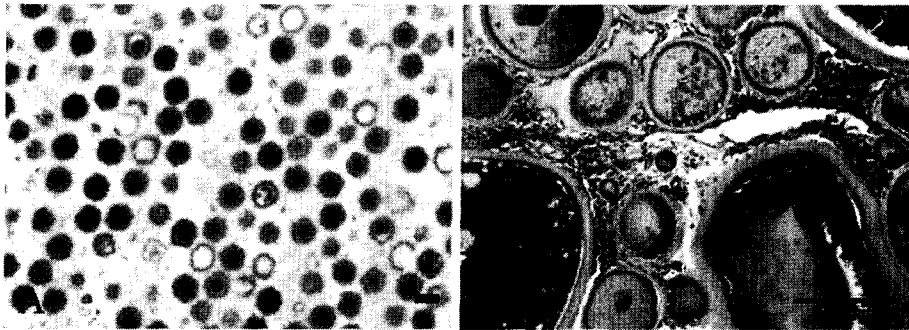
电泳凝胶由浓度为 12% 分离胶和 5% 浓缩胶两部分组成; 纯化的病毒液与电泳样品缓冲液 (0.5 mol/L Tris-HCl pH 6.8; 1% SDS; 1% 巯基乙醇; 10% 甘油; 0.02% 溴酚蓝) 等体积混合, 加热煮沸 3 min; 采用 Tris 甘氨酸 (Gly) 电泳缓冲液 (0.025 mol/L Tris; 0.25 mol/L Gly; 0.1% SDS; pH 8.3), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件电泳; 完成后, 1 份考马斯亮兰染色, 1 份移到电泳转移槽, 稳流 200 mA, 转移 5 h; 转移后的硝酸纤维素膜 (NC 膜) 用 2% 牛血清白蛋白 (BSA) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 1h, PBS-T 浸洗 3 次, 每次 5 min; 加入第 1 抗体 (LCDV 兔抗血清), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min, PBS-T 浸洗 3 次, 每次 5 min, 正常兔血清代替第 1 抗体, 作为阴性对照; 加入第 2 抗体 (碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG, 1:30 000), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min, PBS-T 浸洗 3 次, 每次 5 min; 加 NBT/BCIP, 室温显色。

2 结果

2.1 组织切片观察

光镜观察发现, 病变囊肿细胞的细胞膜外有一厚层均质的透明囊壁, 囊肿细胞的细胞质被苏木精染成紫红色, 细胞质内的包涵体一般位于细胞质边缘, 呈块状或链圈状 (图 1B)。

超薄切片电镜观察可见囊肿细胞的细胞质内含有大量的成熟或不成熟的病毒粒子及空的核衣壳, 均匀分布, 病毒粒子呈五角形或六角形, 直径 200~220 nm, 具有一个直径 120~140 nm 的核心 (图 1A)。



A: 淋巴囊肿肿瘤组织超微观察, B: 淋巴囊肿细胞的 H-E 染色 (箭头所示为包涵体)

(A) The virus particles evenly distributed in the cytoplasm (bar = 200 nm). (B) H-E staining of lymphocystis cells

图 1 淋巴囊肿肿瘤组织观察

Fig. 1 Histopathological characteristics of lymphocystis of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

2.2 病毒纯化结果

通过对常规冻融、超声波处理及剥离囊肿组织表面薄膜 3 种处理方法多次实验结果比较, 发现剥离囊肿组织表面薄膜后, 再匀浆破碎囊肿细胞, 随后采取低速及超速离心法的结果较好, 能达到病毒纯化的目的。实验中将囊肿组织外面的薄膜用手术刀和镊子轻轻剥离掉后, 可见米粒样肿大细胞, 直径多在 0.5~1 mm 间, 其中最大的直径可达 2 mm。病毒粗提液经蔗糖密度梯度离心后在离心管中形成两条乳白色的条带, 位置分别在 37%~40% 和 47%~52% 蔗糖密度区域。电镜观察发现, 37%~40% 病毒带中病毒粒子极少, 杂质量较多; 47%~52% 病毒带中病毒纯度高, 病毒粒子密度大, 背景清晰, 基本没有杂质 (图 2), 提纯效果较理想。将纯化病毒负染后电镜观察, 发现病毒粒子呈近似于圆形的多角形, 大小较为一致, 直径约为 210~250 nm, 结构完整, 病毒粒子中央有一致密核,

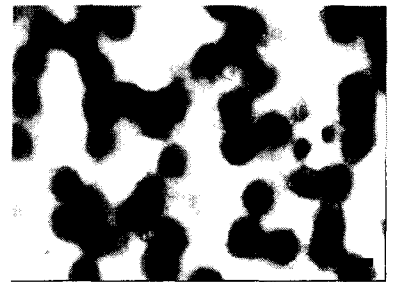


图 2 纯化淋巴囊肿病毒的负染观察
Fig. 2 Negative staining of purified LCDV (bar = 200 nm)

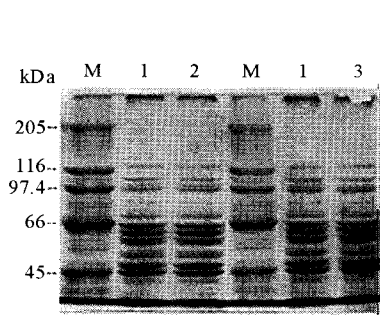
核心和衣壳之间有部分空隙,衣壳类似松散的圆环围在核髓的周围,核髓还可见保持一定的六角形的形状。

2.3 病毒蛋白含量

以牛血清白蛋白梯度制备得到的标准曲线,其相关系数为 0.987,说明在本实验制备的标准曲线内,蛋白浓度梯度与 D_{595} 值存在较好的线性关系。取纯化病毒样品进行测定,蛋白含量为 1.12 g/L。

2.4 Western blotting 分析结果

利用 Western blotting 法分析了来自青岛、威海和秦皇岛 3 个地区牙鲆淋巴囊肿病毒的免疫学特性。SDS-PAGE 结果显示,来自青岛、威海和秦皇岛 3 个地区的病毒的结构蛋白基本相同(图 3);Western blotting 结果显示,以威海分离的 LCDV 病毒为抗原制备的兔抗血清可与来自青岛、秦皇岛两个地区的 LCDV 病毒发生特异性免疫反应,且反应结果一致,即均有 3 条蛋白带发生反应,分子量分别为 125、66 和 55 kDa(图 4)。

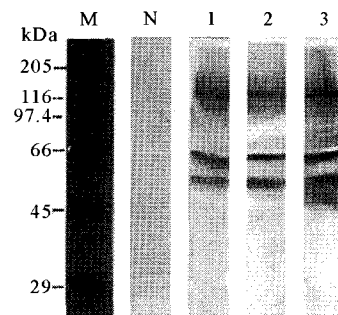


M: 分子量标准; 1: 分离自威海的病毒;
2: 分离自青岛的病毒; 3: 分离自秦皇岛的病毒

M: The molecular weight marker; 1: Virus from Weihai of Shandong;
2: Virus from Qingdao of Shandong;
3: Virus from Qinhuangdao of Heibei

图 3 淋巴囊肿病毒的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 The protein profiles obtained by SDS-PAGE using purified virus



M: 分子量标准; N: 阴性血清对照; 1: 威海病毒株与抗血清反应结果;
2: 青岛病毒株与抗血清反应结果; 3: 秦皇岛病毒株与抗血清反应结果

M: the molecular weight marker; N: Negative antiserum;
1: Virus from Weihai reacted with antiserum;
2: Virus from Qingdao reacted with antiserum;
3: Virus from Qinhuangdao reacted with antiserum

图 4 淋巴囊肿病毒与抗血清的 Western blotting 结果

Fig. 4 Western blot analysis with LCDV-specific rabbit antiserum

3 讨论

目前用于提纯 LCDV 的方法很多,如蛋白酶降解后离心(王亮等 2004)、滤膜过滤(Nishida *et al.* 1998)和匀浆后离心等(刘允坤等 2002;宋晓玲等 2003;Iwamoto *et al.* 2002),通过实验发现前两种方法获得的病毒纯度及数量皆不理想,不能满足实验的要求。本文采用差速离心和密度梯度离心方法纯化 LCDV 病毒,一般来讲,差速离心是利用了不同的粒子在离心力场中沉降的差别,在同一离心条件下,沉降速度不同,通过不断增加相对离心力,使一个非均匀混合液内的大小、形状不同的粒子分步沉淀。而密度梯度离心是用一定的介质在离心管内形成密度梯度,将混悬液置于介质的顶部,通过重力或离心力场的作用使混悬液分层、分离(殷震等 1997)。本实验的病毒样品经电镜负染观察证实病毒纯度高,杂质极少,证明采用的差速离心结合密度梯度离心方法是合适的。

病毒纯化时离心力的选择通常是根据病毒大小、密度来确定的,对于中、大型病毒,在 $80\ 000 \times g$ 离心 60 min,即能沉淀 80% 以上的病毒粒子(殷震等 1997),LCDV 属于一种较大型的病毒,作者选用 $78\ 500 \times g$ 离心力能够把大部分的 LCDV 沉淀下来。但实验中用常规冻融、匀浆破碎囊肿细胞后采取低速及超速离心却没有收到较理想的结果,而超薄切片电镜观察却显示囊肿细胞内病毒非常密集。究其原因可能如下:(1)囊肿组织的外面包有一层较厚的、具有弹性的膜,该外膜滑韧并附有大量的黏液,在匀浆过程中会加剧病毒粒子之间或病毒粒子和细胞碎片间的黏附,加大溶液黏度,降低病毒分离效率;(2)光镜观察病变细胞的 H-E 染色切片,可见囊肿细胞的细胞膜外有一厚层均质的透明囊壁,可能是匀浆时该透明囊壁未被破碎,病毒仍然在细胞

中。通过3种处理方法的对比,认为剥离囊肿组织外膜后对含有淋巴囊肿细胞的溶液进行多次匀浆处理是获得高纯度、高密度病毒的关键。

利用超速离心法提纯病毒时,必须考虑到离心速度、离心时间、所用介质及缓冲液等因素,过高的离心速度、过长的离心时间等都会影响病毒的纯化效果及其结构的完整性(殷震等 1997)。实验中曾用无蔗糖垫底的超速离心(78 500×g, 120 min)进行分离,结果得到的沉淀较多且黏度较大,难以悬浮。采用30%(W/W)蔗糖溶液垫层的超速离心,结果虽然观察到了病毒粒子,但病毒杂质较多,亦未达到纯化目的。以蔗糖垫底超速离心浓缩病毒后再用蔗糖密度梯度超速离心(78 500×g)纯化病毒。结果发现,在蔗糖密度梯度溶液出现两条折光带,电镜观察证实,出现在47%~52%蔗糖密度区域的病毒带含有多量、较为纯净、大小和结构一致的完整病毒粒子。通过反复实验对比,发现采用差速离心、蔗糖垫底超速离心再结合连续蔗糖密度梯度离心,能够成功的分离LCDV。此外,采用蔗糖作为密度梯度离心介质还具有以下优点:(1)由于蔗糖的作用,减少了离心过程中机械作用对病毒表面结构造成的损伤,并起到浓缩病毒的效果;(2)连续蔗糖密度梯度具有类似CsCl的分辨能力,能较好地除去一些杂质;(3)蔗糖价格低廉,适合广泛使用。

目前已知来自不同地区的淋巴囊肿病毒生物学特性是不同的,如Zhang等(2004)报道其分离的淋巴囊肿病毒与国外分离的淋巴囊肿病毒株(LCDV-1)在基因序列上有明显的不同,并将其分离的LCDV命名为淋巴囊肿病毒中国株(LCDV-C)。由于LCDV在我国分布范围较广,针对不同地区病毒株的免疫学特性及抗原成分差异的分析,目前尚未报道。本文在获得高纯度、高密度LCDV病毒基础上,制备了抗血清,进而研究不同地区LCDV是否存在差异。实验发现,来自秦皇岛、青岛及威海3个地区LCDV病毒的Western blotting反应结果一致,即分子量为125.66和55 kDa的3条蛋白带均与抗血清发生了特异性免疫学反应,说明这3个地区的牙鲆LCDV病毒存在共同的抗原决定簇。但不同LCDV分离株间是否存在构象依赖性抗原表位的差异,目前尚未明了。因此,对于病毒血清型的研究有待于进一步采用基因分型方法或根据LCDV病毒相应保守表达的某种抗原决定簇制备单克隆抗体进行分析。

参 考 文 献

- 王亮,孙修勤,张进兴,吴兴安,曲凌云,洪旭光,李继业. 2004. 胶原酶消化法纯化牙鲆淋巴囊肿病毒(Lymphocystis Disease Virus China, LCDV-cn). 高技术通讯,4:31~34
- 吕宏旭,汪岷,李红岩,郭华荣,张士瑾,包振民,周丽. 2003. 利用牙鲆鳃细胞系分离和培养淋巴囊肿病毒. 青岛海洋大学学报,33(2):233~239
- 刘允坤,孙修勤,黄健. 2002. 牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 淋巴囊肿病毒的分离. 高技术通讯,6:92~95
- 曲凌云,张进兴,孙修勤. 1999. 养殖牙鲆淋巴囊肿病流行情况与组织病理学研究. 黄渤海海洋,17(2):43~47
- 宋晓玲,黄健,杨冰,史成银,张立敬. 2003. 牙鲆淋巴囊肿病的病理和病原分离. 中国水产科学,10(2):117~120
- 殷震,刘景华. 1997. 动物病毒学. 北京:科学出版社,304~324
- 徐洪涛,朴春爱,姜忠良,王文兴. 2000. 养殖牙鲆淋巴囊肿病原的研究. 病毒学报,16(3):223~226
- Alonso, M. C., Cano, I., Garcia-Rosado, E., Castro, D., Lamas, J., Barja, J. L., and Borrego, J. J. 2005. Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo* (Brünnich). J. Fish Dis. 28:221~228
- Iwamoto, R., Hasegawa, O., and Lapatra, S. 2002. Isolation and characterization of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) lymphocystis disease virus. J. Aquat. Anim. Health, (14):114~123
- Nishida, H., Yoshimizu, M., and Ezura, Y. 1998. Detection of antibody against lymphocystis disease virus in Japanese flounder by enzyme linked immunosorbent assay. Fish Pathol. (33):207~211
- Plumb, J. A. 1993. Viral disease of marine fish. Pathobiology of Marine Fish and Estuarine Organisms, 25~52
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 112~156
- Sheng, X. Z., Zhan, W. B., Xu, S. J., and Cheng, S. F. 2007. Histopathological observation of lymphocystis disease and lymphocystis disease virus (LCDV) detection in culture diseased *Sebastes schlegeli*. J. Ocean University of China, 6(4):378~382
- Zhang, Q. Y., Xiao, F., Xie, J., Li, Z. Q., and Gui, J. F. 2004. Complete genome sequence of lymphocystis disease virus (LCDV-C) isolate from China. J. Virol. 78(1):6982~6994