

淋巴囊肿病毒结构蛋白及其抗原性分析

程顺峰, 战文斌, 绳秀珍

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:病鱼为威海水产养殖场感染淋巴囊肿病的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*), 收集病鱼的囊肿组织, 匀浆破碎, 采用差速离心和蔗糖密度梯度离心方法, 分离纯化淋巴囊肿病毒粒子。负染后, 电镜观察证实获得的病毒纯度高, 杂质极少, 病毒粒子呈近似于圆形的多角形, 结构完整。纯化的淋巴囊肿病毒粒子经 SDS-PAGE、硝酸银染色后, 电泳图谱清晰显示病毒结构蛋白带共有 22 条, 且分子量主要集中在 123~26 kD。应用 Western blotting 法分析病毒结构蛋白的抗原性, 结果显示, 分子量分别为 123.55 kD、65.292 kD 和 54.438 kD 的 3 条蛋白带发生了免疫反应, 其中分子量为 65.292 kD 的蛋白带反应强度明显高于其他 2 条蛋白带。本研究旨在确定淋巴囊肿病毒主要衣壳蛋白提供基础依据。[中国水产科学, 2006, 13(3): 415~420]

关键词:淋巴囊肿病毒; 结构蛋白; 抗原性

中图分类号: S943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)03-0415-06

淋巴囊肿病(lymphocystis disease, LCD)是鱼类中常见的一种病毒病, 淡水鱼均可感染发病。现已知该病在 42 科、125 种鱼上被发现^[1]。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, 丧失商品价值。目前, 各国学者对该病的流行情况、病理变化、病原特性、免疫诊断等方面都进行了大量研究^[2-11]。Heppell 等^[10]对淋巴囊肿病毒(LCDV)粒子的超微结构进行了细致的描述, Garcia-Rosado 等^[11]建立了 LCDV 的血清学诊断方法。但在病毒结构蛋白及其抗原性的研究中, 由于病毒来源、纯化方法以及操作等方面的不同, 结果存在一定的差异^[12-14]。Iwamoto 等^[12]认为, 淋巴囊肿病毒株 KU、YO、KA 的结构蛋白带分别为 26 条、27 条、29 条且分子量为 50 kD 的多肽为 LCDV 种特异性抗原蛋白; Garcia-Rosado 等分析了欧洲不同宿主的 LCDV 后, 结论是 LCDV1 和 ATCC VR342 病毒株结构蛋白为 21 条, 而 LCDV3、LCDV4、LCDV7 和 LCDV11 病毒株结构蛋白为 30 条^[13]。最近, Alonso 等^[14]报道, 分子量为 80 kD、55 kD、44 kD、和 40 kD 的多肽为该病毒具有抗原性的结构蛋白。为此, 本研究采用差速离心、蔗糖密度梯度离心的方法, 拟

从病鱼囊肿组织获得高纯度的病毒粒子, 进而应用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法对纯化的淋巴囊肿病毒进行结构蛋白成分分析, 同时使用免疫印迹技术(Western blotting)对病毒结构蛋白的抗原性进行探讨, 以期为进一步研究确定淋巴囊肿病毒的主要衣壳蛋白提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

患病牙鲆采自山东威海牙鲆鱼养殖场, 病鱼的体表可见有单个或聚集成团的乳头瘤状赘生物, 尤其在口唇部、背鳍及尾鳍较多, 大小不一, 形状不规则, 颜色有乳白色、灰白色及红色。70%酒精棉球消毒患病部位后, 用灭菌手术刀片切下囊肿, -80℃下分装保存备用。

纯系新西兰大白兔由青岛药检所购得。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)、5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸(BCIP)均购自 Sigma 公司。

收稿日期: 2005-08-15; 修订日期: 2005-11-04。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271016); 国家“863”计划项目(2001AA622030); 海水养殖教育部重点实验室开放课题资助项目(200423)。

作者简介: 程顺峰(1978-), 男, 博士研究生, 主要从事水产动物分子病毒学与免疫学研究。E-mail: chengshunfeng@gmail.com

通讯作者: 战文斌。E-mail: wbzhuan@ouc.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 病毒提纯与电镜观察 解冻病料,剥除囊肿瘤组织表面的薄膜,加入适量石英砂和10倍体积的TNE缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl; 0.15 mol/L NaCl; 0.01 mol/L EDTA; pH 7.4),冰浴匀浆。匀浆液600 g离心30 min,取上清液,1 800 g再次离心30 min;收集上清液,78 000 g离心2 h;弃上清,向沉淀中添加适量TNE,此为病毒粗提液。将其轻置于由37%、40%、47%、52%、57%、62%(W/V)组成的蔗糖密度梯度离心管上层,78 000 g离心2 h;用一次性注射器吸出各病毒带,TNE重悬各病毒带,78 000 g离心1 h以除去蔗糖。上述各步离心均于4℃下进行。然后将病毒用2%磷钨酸负染,电镜观察、拍照。

1.2.2 抗血清制备 调整提纯病毒的蛋白质量浓度为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;2周后加强免疫,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;1周后再加强免疫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;再1周后加强免疫第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℃过夜;次日,4℃下1 500 g离心15 min分离抗血清。

1.2.3 抗血清纯化 采用辛酸-硫酸铵法从血清中纯化IgG,具体过程如下:抗血清用4倍体积乙酸-乙酸钠缓冲液(0.06 mol/L, pH 4.0)稀释,NaOH调pH为4.5;室温下滴加辛酸(25 mL/L血清稀释液),同时缓慢搅拌,然后4℃,10 000 g离心30 min;收集上清,加入10倍体积0.1 mol/L磷酸盐(PBS)缓冲液,NaOH调pH为7.4;计算溶液总体积,按313 g/L加入硫酸铵粉末,同时缓慢搅拌,防止出现沉淀,4℃静置过夜;次日4℃,5 000 g离心20 min,沉淀用少量透析液溶解(0.01 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$; 0.015 mol/L NaCl; pH 7.2),4℃透析12 h后,5 000 g离心20 min,吸出上清,即为纯化的抗体,-20℃保存备用。

1.2.4 非特异性抗体的吸收 非特异性抗体的吸收参照Sambrook等的方法^[15],取正常牙鲈鱼的表皮组织、肌肉组织,加入TNE缓冲液,冰浴匀浆;匀浆液经4℃,600 g离心30 min,1 800 g离心30 min

后,取上清液,4℃,78 000 g离心2 h,弃去上清;沉淀用2 mL/g预冷到4℃的0.1 mol/L NaCl重悬,混匀;加入4倍体积的丙酮(-20℃),混匀后冰浴1 h;4℃,78 000 g离心30 min;弃上清液,加入与上一步相同体积的丙酮,重悬,混匀后冰浴10 min,悬液4℃,78 000 g离心30 min;弃上清液,沉淀转移到保鲜膜上晾干;纯化的抗体中加入干燥后的粉末至终浓度为1%(W/V),混匀悬液,冰浴15 min,然后4℃,78 000 g离心30 min,取上清,即为处理的抗体,-20℃保存备用。

1.2.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及凝胶染色 电泳凝胶由浓度为12%分离胶和浓度为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,冷却后加样;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℃电泳,稳流状态下,浓缩胶30 mA,分离胶60 mA,至溴酚蓝指示剂达到分离胶底部边缘时停止电泳;采用硝酸银染色法进行凝胶染色;经全自动凝胶成像分析系统扫描和Gel-Pro软件分析处理,计算出各结构蛋白分子量及其相对百分含量。

1.2.6 免疫印迹法(Western blotting)分析病毒结构蛋白的抗原性 电泳完毕后,取出凝胶移到电泳转移槽中,加入转移缓冲液(0.025 mol/L Tris; 0.192 5 mol/L Gly; 20% 甲醇; pH 8.3),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37℃封闭1 h, PBS浸洗3次,每次5 min;加入第一抗体(处理后的抗血清),37℃孵育45 min, PBS浸洗3次,每次5 min,以正常兔血清代替第一抗体,作为阴性对照;加入第二抗体(碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG, 1:30 000),37℃孵育45 min, PBS浸洗3次,每次5 min;最后,加入新鲜配制的NBT/BCIP作用液,室温显色。

2 结果

2.1 LCDV的电镜观察

病毒粗提液在蔗糖梯度溶液中分成2条带,位置分别在37%~40%和47%~52%蔗糖密度区域,均呈乳白色,吸出病毒带,脱糖,负染,电镜观察。结果发现2条带中均有病毒粒子存在,37%~40%病毒带中病毒粒子极少,杂质较多;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 1a)。电镜下可清楚地看到病毒粒子呈近似于圆形的多角形,直径为 210~250 nm,病毒

结构完整,衣壳可分为 2 层,且层次清晰,衣壳与核髓之间并未紧密接触,有一定空隙(图 1b)。

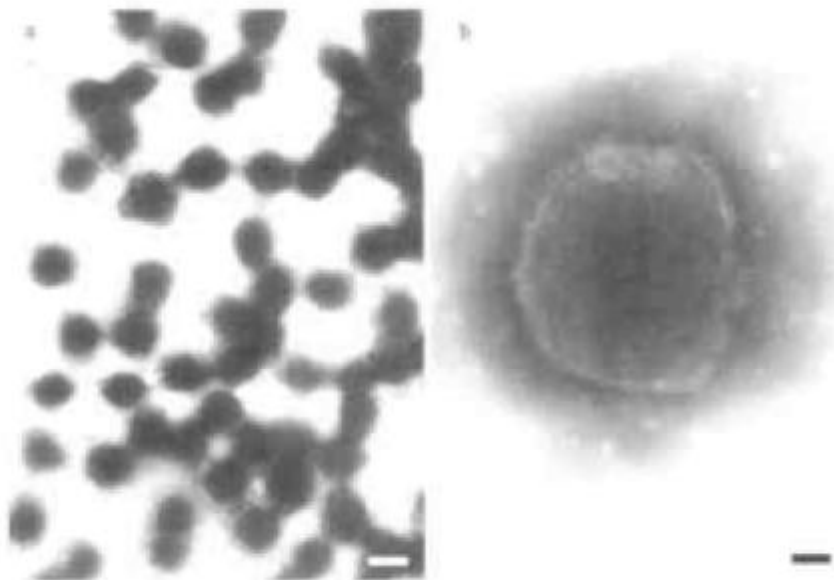


图1 淋巴囊肿病毒提纯结果(电镜拍照)

a: 47%~52%病毒带负染结果, (bar=200 nm); b: 淋巴囊肿病毒粒子放大图 (bar=50 nm)

Fig.1 Results of virus purification (EM)

a: Negative stain of LCDV (bar=200 nm); b: Magnification LCDV virion (bar=50 nm)

2.2 LCDV 的 SDS-PAGE

调整病毒液的蛋白浓度,使其与等体积电泳样品缓冲液混合后,电泳样品中分别含有 50 μ g、100 μ g、200 μ g、400 μ g 的蛋白量。多次实验后发现样品中蛋白含量为 100~200 μ g 时,条带清晰,且数目较多,故加样量定为每孔 200 μ g 蛋白。提纯的病毒经 SDS-PAGE 电泳,凝胶采用硝酸银染色后,SDS-PAGE 图谱显示:清晰分辨的条带共计有 22 条。其中 9 条蛋白条带 (VP6、VP7、VP8、VP9、VP10、VP11、VP12、VP13、VP14) 密集的集中在电泳带的中间部分;电泳图谱中染色相对较深的蛋白条带分别是 VP6、VP7、VP8、VP9、VP12、VP13、VP14 (图 2)。Gel-Pro 软件分析处理各结构蛋白分子量结果表明(表 1),LCDV 结构蛋白的分子量范围为 123~26 kD。其中着色相对较深的 7 条蛋白条带 VP6、VP7、VP8、VP9、VP12、VP13、VP14 的分子量集中在 74~44 kD 区间,分别是 73.662 kD、67.352 kD、65.292 kD、63.362 kD、54.438 kD、47.674 kD 和 44.759 kD。由 Gel-Pro 软件分析各蛋白条带相对百分含量可知,在所有蛋白条带中 VP12 蛋白带相对

百分含量最高,为 32.27%;其次 VP8,为 13.13%。

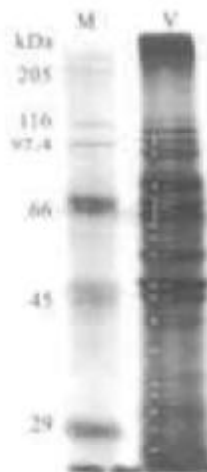


图2 提纯淋巴囊肿病毒的电泳图谱

M: marker; V: 病毒; Gel-ProAnalyzer 软件分析中选取的蛋白带,加“+”所示。

Fig.2 Protein profiles obtained by SDS-PAGE using purified virus

M: the molecular weight marker; V: purified virus; “+” indicates the bands chosen by Gel-ProAnalyzer 3.1.

表1 淋巴囊肿病毒结构蛋白的分子量、抗原性及含量

Tab.1 Molecular weight, antigenic proteins and amount of polypeptides of LCDV

标准分子量条带 Band	标准分子量 Mol. W.	多肽名称 Band	多肽分子量 Mol. W.	免疫印迹结果 Western blot	多肽百分含量/% Amount
1	205	VP1	123.55	+	0.45
2	116	VP2	110.93	-	1.05
3	97.4	VP3	101.63	-	0.78
4	66	VP4	98.809	-	0.54
5	45	VP5	92.142	-	3.46
6	29	VP6	73.662	-	7.79
		VP7	67.352	-	1.66
		VP8	65.292	+++	13.13
		VP9	63.326	-	9.19
		VP10	61.674	-	2.25
		VP11	57.899	-	1.77
		VP12	54.438	++	32.27
		VP13	47.674	-	6.66
		VP14	44.759	-	3.92
		VP15	41.945	-	2.88
		VP16	38.849	-	0.68
		VP17	35.392	-	2.60
		VP18	34.387	-	0.92
		VP19	32.940	-	0.28
		VP20	31.291	-	3.63
		VP21	29.040	-	0.77
		VP22	26.347	-	3.31

注: +++ 强阳性; ++ 中等阳性; + 阳性; - 阴性。

Note: +++ strong positive; ++ moderate positive; + positive; - negative.

2.3 Western blotting 对病毒结构蛋白抗原性分析

应用特异性抗血清进行 Western blotting 分析, 结果显示(图3), VP1(123.55 kD)、VP8(65.292 kD)、

VP12(54.438 kD)3 条结构蛋白显示出较强的特异性免疫反应, 其中 VP8 蛋白带反应强度明显高于其他 2 条蛋白带, 而 VP1 蛋白带的反应强度要比 VP12 蛋白带弱些。

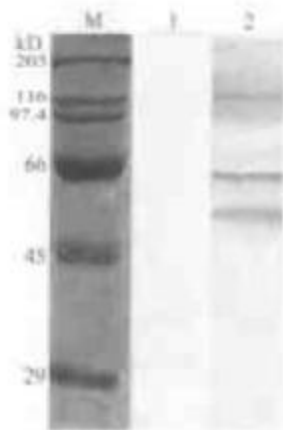


图3 淋巴囊肿病毒与抗血清的 Western blotting 结果

M: marker; 1: 阴性血清; 2: 抗血清

Fig.3 Western blotting analysis with LCDV-specific rabbit antiserum

M: the molecular weight marker; 1: Negative antiserum; 2: Positive antiserum

3 讨论

本研究通过剥离囊肿组织外膜、匀浆、差速离心和蔗糖密度梯度离心获得了大量高纯度的病毒。应用 SDS-PAGE 和 Western blotting 方法分析了 LCDV 的结构蛋白及其抗原性。结果显示, LCDV 病毒结构蛋白由 22 条多肽组成, 其中分子量为 123.55 kD、65.292 kD 和 54.438 kD 的 3 条蛋白带显示出较强的抗原性。

目前, 提纯 LCDV 病毒有以下 3 种方法: (1) 采用滤膜过滤的方法^[16]; (2) 胶原酶消化、水解组织中的胶原蛋白和糖蛋白, 然后离心获得病毒^[9]; (3) 组织匀浆液通过差速离心、蔗糖密度梯度超速离心的方法分离获得病毒^[5,12]。通过对各种方法的实验比较, 认为前两种方法纯化效果不稳定, 病毒纯度及数量皆不理想, 不能满足实验需要。本实验中采用

差速离心、蔗糖密度梯度离心获得 LCDV 病毒粒子, 经电镜观察证实病毒纯度高, 杂质少, LCDV 病毒粒子结构完整且病毒囊膜损伤小。这为病毒精细结构观察、结构蛋白分析提供了合格的材料。

国内外的学者对病毒的超微结构研究发现, LCDV 病毒衣壳外形呈五角形或六角形, 病毒粒子直径多在 130~260 nm^[3,5,10]。本实验纯化病毒的直径为 210~250 nm, 病毒粒子近似圆形, 被衣壳覆盖, 外围则是一层纤突结构, 衣壳与核髓之间并未紧密连接, 有一定空隙。对于这一差异, Heppell 等^[10]认为, LCDV 的大小在不同地域、不同宿主的分离株中表现不同, 从 120 nm 到 227 nm, 有时甚至达到 380 nm; 病毒粒子被两层蛋白鞘所覆盖, 其外层蛋白可被蛋白酶 K 消化, 内层可被碱性磷酸酶 A2 消化。因此推测其外层蛋白可能为相互紧密连接而形成表面蛋白结构单位, 而内层蛋白则是脂蛋白膜。此外, 正是因为囊膜与核髓的空隙, 使得病毒的囊膜在受到外力后得不到核髓的有效支持, 使囊膜具有一定的柔韧性。因此在匀浆、离心等处理过程中, 病毒粒子受到外部机械压力导致部分纤突的脱落, 同时使病毒囊膜失去原来形状, 成为近似圆形的结构。

本研究在应用免疫印迹技术鉴定病毒蛋白抗原性及其免疫特性时, 使用的是多克隆抗体, 其中存在针对宿主蛋白的抗体, 与宿主蛋白发生交叉反应, 影响结果的特异性。针对这一问题, 本研究中参考了 Sambrook 等的方法来消除非特异性抗体^[15], 即用正常的牙鲆表皮组织、肌肉组织对抗血清中的非特异性抗体进行吸收, 排除了与宿主蛋白发生交叉反应的可能。

本研究所得 SDS-PAGE 图谱显示, LCDV 结构蛋白为 22 条, 免疫印迹分析显示其中仅有 3 条多肽具有良好的抗原性, 类似情况也出现在 Iwamoto 和 Alonso 的研究结果中^[12,14]。分析其原因, 一是由于结构上的遮掩和空间阻碍, 以及生化构成的差异, 有的病毒结构蛋白具有较强的免疫原性, 有的免疫原性却很弱或无; 二是部分结构蛋白属于内部抗原, 其存在于病毒体内, 不暴露于病毒颗粒表面, 导致在制备免抗 LCDV 抗血清时未能激发兔体产生抗体。

在本实验中, LCDV 结构蛋白的分子量为 123~26 kD。对于结构蛋白的研究, 不同研究者得出的结果也不尽相同。Iwamoto 等^[12]分析了日本牙鲆淋巴囊肿病毒株 KU、YO、KA 后, 发现其结构蛋白

带数分别为 26 条、27 条、29 条; 加拿大的 Robin 等^[17]则认为淋巴囊肿病毒 Leetown NFH 株结构蛋白为 21 条, 分子量为 210~33.7 kD; Garcia-Rosado 等^[13]在分析了欧洲不同宿主的淋巴囊肿病毒后, 结论是 LCDV1 和 ATCC VR342 病毒分离株结构蛋白为 21 条, 分子量在 30.5~136 kD, 主要结构蛋白分子量为 44.5 kD、55.6 kD、79.7 kD; LCDV3、LCDV4、LCDV7 和 LCDV11 病毒分离株结构蛋白为 30 条, 分子量在 29.7~187.6 kD, 主要结构蛋白分子量为 79.7 kD、76.9 kD、55.6 kD、52.8 kD、46 kD、43.8 kD、40.2 kD、37.6 kD。使用免疫印迹方法对 LCDV 结构蛋白的抗原性研究中, Iwamoto 等^[12]发现分子量为 50 kD 的多肽为 LCDV 种特异性抗原蛋白, 分子量为 90 kD 和 73 kD 的多肽为不同地区病毒分离株特有的抗原蛋白。Alonso 等^[14]得出的结论是分子量为 80 kD、55 kD、44 kD 和 40 kD 的多肽为具有抗原性的结构蛋白。而本实验发现具有抗原性的结构多肽分子量为 123.55 kD、65.292 kD 和 54.438 kD。究其原因, 淋巴囊肿病毒具有地域和种群的分布特征; 此外, 这是否预示着病毒存在着不同的血清型, 病毒蛋白抗原组成上存在着差异, 以及编码结构蛋白的基因组存在着差异, 都必须依赖于对病毒结构蛋白的多肽氨基酸顺序和病毒核酸序列的进一步研究。

参考文献:

- [1] 战文斌. 水产动物病害学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [2] 曲凌云, 张进兴, 孙修勤. 养殖牙鲆淋巴囊肿病流行情况与组织病理学研究[J]. 黄渤海海洋, 1999, 17(2): 43-47.
- [3] Sheng X Z, Zhan W B. Occurrence, development and histochemical characteristics of lymphocystis in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. High Technol Letters, 2004, 10(2): 92-96.
- [4] 张永嘉, 郭青, 吴泽阳. 云纹石斑鱼淋巴囊肿病病变过程的超微研究[J]. 海洋与湖泊, 1997, 28(4): 406-411.
- [5] 宋晓玲, 黄健, 杨冰, 等. 牙鲆淋巴囊肿病的病理和病原分离[J]. 中国水产科学, 2003, 10(2): 117-120.
- [6] 徐洪涛, 朴春爱, 姜忠良, 等. 养殖牙鲆淋巴囊肿病原的研究[J]. 病毒学报, 2000, 16(3): 223-226.
- [7] 吕宏旭, 汪岷, 李拱岩, 等. 利用牙鲆细胞系分离和培养淋巴囊肿病毒[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(2): 233-239.
- [8] 徐宋娟, 邢婧, 程顺峰, 等. 应用免疫技术检测牙鲆组织内的淋巴囊肿病毒[J]. 水产学报, 2004, 28(增刊): 101-105.
- [9] 王亮, 孙修勤, 张进兴, 等. 胶原酶消化法纯化牙鲆淋巴囊肿病毒[J]. 高技术通讯, 2004, 14: 31-34.

- [10] Heppell J, Berthiaume L. Ultrastructure of lymphocystis disease virus (LCDV) as compared to frog virus 3 (FV3) and chilo iridescent virus (CIV): effects of enzymatic digestions and detergent degradations[J]. Arch Virol, 1992, 125: 215 - 226.
- [11] Garcia-Rosado E, Castro D, Cano I, et al. Serological techniques for detection of lymphocystis virus in fish[J]. Aquat Living Resour, 2002, 15: 179 - 185.
- [12] Iwamoto R, Hasegawa O, Lapetra S, et al. Isolation and characterisation of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) lymphocystis disease virus [J]. J Aquat Anim Health, 2002, 14: 114 - 123.
- [13] Garcia-Rosado E, Castro D, Cano I, et al. Protein and glycoprotein content of lymphocystis disease virus (LCDV)[J]. Inter Micro, 2004, 7: 121 - 126.
- [14] Alonso M C, Cano I, Garcia-Rosado E, et al. Isolation of lymphocystis disease virus from sole scales *Senegalestes halap*, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo*[J]. J Fish Dis, 2005, 28: 221 - 228.
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] Nishida H, Yoshimizu M, Enura Y. Detection of antibody against lymphocystis disease virus in Japanese flounder by enzyme linked immunosorbent assay [J]. Fish Pathol, 1998, 33: 207 - 211.
- [17] Robin J, Laperriere A, Berthiaume L. Identification of the glycoproteins of lymphocystis disease virus (LDV) of fish [J]. Arch Virol, 1986, 87: 297 - 305.

Structural proteins and antigenicity of lymphocystis disease virus (LCDV)

CHENG Shun-feng, ZHAN Wen-bin, SHENG Xiu-zhen

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

Abstract: Lymphocystis disease (LCD), an important fish disease, is a chronic disease characterized by papilloma-like lesions typically on skin, fins and tail. The causative agent of the lymphocystis disease, lymphocystis disease virus (LCDV), has been reported in over one hundred teleost species and it has a world wide geographical distribution. In China LCD has resulted in a great economic loss in marine culture industry and become factors restricting aquaculture development. In this study, the diseased flounder *Paralichthys olivaceus* with typical lymphocystis symptom were collected from a flounder farm in Weihai, Shandong Province. The LCDV was purified with differential centrifugation followed by sucrose density gradient centrifugation from skin tumours. After centrifugation, two visible bands formed. Observed by electron microscopy after negative staining with 2% phosphotungstic acid, many cell debris but only a few virions were in band 1, however, large numbers of virus particles were present in band 2 and the virions were intact, round polygon in shape, with envelope outside. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of LCDV proteins was performed, then stained with silver nitrate. In the SDS-PAGE profile, 22 proteins were showed, with estimated molecular masses ranging from 26 kD to 123 kD and major proteins have molecular masses of 73.662 kD, 67.352 kD, 65.292 kD, 63.362 kD, 54.438 kD, 47.674 kD and 44.759 kD respectively. Western blotting profile showed three main antigenic proteins with molecular weights of 123.55 kD, 65.292 kD and 54.438 kD, suggesting these three structural proteins had higher antigenicity and could induce specific antibodies against LCDV. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 415 - 420]

Key words: lymphocystis disease virus; structural proteins; antigenicity

Corresponding author: ZHAN Wen-bin. E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn