

넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 immunoglobulin M에 대한 단클론 항체 생산

김위식 · 김기홍 · 김춘섭¹ · 오명주*

전남대학교 수산생명의학과, ¹주엔바이로젠

Production of Monoclonal Antibodies Against the Immunoglobulin M of Olive Flounder *Paralichthys Olivaceus*

Wi-Sik Kim, Ki-Hong Kim, Choon-sup Kim¹ and Myung-Joo Oh *

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

¹EnbioGene, Yeosu 59771, Korea

Immunoglobulin M (IgM) was purified from olive flounder *Paralichthys olivaceus* sera using mannan-binding protein (MBP) and protein L affinity columns (designated as MBPIgM and ProLIgM, respectively). A monoclonal antibody (MAb) against olive flounder IgM was produced. The MBPIgM and ProLIgM had apparent molecular weights of 77, 73, and 28 kDa in SDS-PAGE. Nine hybridomas secreting MAbs against olive flounder IgM were established: five MAbs for MBPIgM (1, 2, 3, 4, and 5) and four for ProLIgM (6, 7, 8, and 9). Western blotting indicated that seven MAbs recognized heavy (H; MAbs 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7) chains and one recognized light (L; MAb 9) chains of IgM, while MAb 8 did not recognize IgM. The results of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bovine serum albumin (BSA, antigen) and the nine MAbs revealed that the optical density (OD) values of sera differed significantly between BSA- and non-immunized fish, despite some sera from non-immunized fish with slight high OD values. These results suggest that the MAbs produced in this study reacted specifically with the IgM from olive flounder.

Key words: Immunoglobulin M, Olive flounder, Monoclonal antibody, Mannan-binding protein affinity column, Protein L affinity column

서 론

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 가자미목 넙치과에 속하는 해산어종으로서 완전양식 기술이 확립되어 있으며, 식용으로서의 기호도가 높아 우리나라의 대표적인 양식 어종으로서 자리매김하고 있다. 2015년 넙치류의 양식 생산량은 45,759톤(약 5,040억원)으로 전체 어류 양식 생산량의 약 53%를 차지하고 있다(KOSIS, 2016). 하지만 고밀도 사육, 병원체의 출현, 어장의 노후화 등으로 인해 다양한 감염성 질병이 발생하여 경제적으로 피해를 입고 있다.

항체 검출 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)는 혈중에 존재하는 특이 항체를 검출하는 방법으로 저렴한 비용으로 다수의 샘플처리가 가능하고, 민감도와 특이도가 높아 육상동물에서는 병원체의 감염 이력의 파악, 백신의 효능 검증, 건

강상태 모니터링 등의 목적으로 널리 사용되고 있다(Crowther, 1995; OIE, 2016). 포유류의 항체는 immunoglobulin A (IgA), IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 구성되어 있으며, 일반적으로 체내에 항원이 유입되게 되면 초기에는 IgM이 생성되며 다음으로 IgG가 생성되어 항원에 더 효과적으로 반응하게 된다(Crowther, 1995; Peter, 2014). 경골어류의 항체는 주로 IgM, IgD 및 IgT/IgZ로 구성되어 있고, 이중 IgM은 경골어류의 혈청과 점액에서 가장 많이 존재하며 감염성 병원체의 중화, 세포성 세포독성 매개, 보체 경로의 활성화 등의 기능을 하나 포유류의 항체(IgG)에 비해 친화성과 다양성이 낮다(Wilson and Warr, 1992; Kaattari and Piganelli, 1996; Pilström and Bengtén, 1996; Tort et al., 2003; Ye et al., 2013). 하지만 어류도 항원에 노출되면 항원에 대한 특이적인 항체가 생성되며(Yoshimizu et al., 1992; LaPatra, 1996; Kim et al., 2009; Kim et al., 2011),

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2017.0169>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(2) 169-174, April 2017

Received 10 February 2017; Revised 20 March 2017; Accepted 23 March 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 61. 659. 7173 Fax: +82. 61. 659. 7170

E-mail address: ohmj@jnu.ac.kr

혈액 중에 존재하는 특이 항체 검사를 통해 병원체에 감염되지 않은 친어 선별, 양식장에서의 병원체에 대한 감염이력 등의 조사가 가능한 것으로 보고되어 있다(LaPatra, 1996; Watanabe et al., 1998; 2000; Kibenge et al., 2002). 어류는 사육 환경에 따라 면역 반응이 달라지므로 어류를 대상으로 한 항체 검출 ELISA를 실시하기 위해서는 사육 환경에 따른 특이 항체 반응에 대한 정보가 필요하며, 또한 실험을 실시하는데 있어서는 2차 항체로서 어류 IgM을 인식하는 항체가 필요하다. 본 연구에서는 넙치를 대상으로 항체 검출 ELISA를 실시하기 위한 기초 연구로서 넙치 IgM에 대한 단클론 항체(monoclonal antibody, MAb)를 생산하고자 하였다. 넙치의 IgM은 mannan binding protein (MBP) affinity column과 protein L affinity column을 사용하여 정제한 후 항원으로 사용하였다.

재료 및 방법

넙치 혈청 분리

넙치의 혈청은 전남대학교 수산과학연구소에서 사육중인 건강한 넙치(체중: 1.0-1.5 kg)의 미부정맥에서 채혈하여 분리하였다. 채혈한 혈액은 상온에서 30분간 방치한 후 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 실험에 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

항 bovine serum albumin (BSA) 넙치 혈청 생산

항 BSA 넙치 혈청은 건강한 넙치(체중: 1.0-1.5 kg) 2마리에 BSA를 1 mg/200 μ L씩 복강에 주사한 후 17-20℃에 사육하면서 0, 7, 14, 21일째 미부정맥에서 채혈하여 원심분리(6,000 rpm, 4℃, 20 min)하여 얻었으며, 대조구의 혈청은 2마리의 넙치에 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5)를 200 μ L씩 복강에 주사한 후 위와 동일한 방법으로 분리하였다.

넙치 IgM 정제

1) MBP affinity column

Shin et al. (2007)이 언급한 방법에 따라 ImmunoPure IgM purification kit (Pierce, USA)를 사용하여 넙치 IgM을 정제하였다. ImmunoPure MBP column을 preparation buffer 5 mL로 수세한 후 binding buffer 20 mL로 column을 equilibration 하였다. 넙치 혈청과 binding buffer를 1:1로 혼합한 후 column에 넣고 4℃에서 30분간 반응시킨 후, binding buffer 42 mL로 수세하였다. Elution buffer 3 mL를 column에 넣고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 1 mL씩 수집하였다. 정제된 IgM (MBPIgM)은 실험에 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

2) Protein L affinity column

Protein L resin (GenScript, USA)을 column에 넣고 멸균된 증류수와 binding buffer (20 mM Na_2HPO_4 , 0.15 M NaCl, pH 8)로 수세한 후, 넙치 혈청과 binding buffer를 1:1로 혼합하여

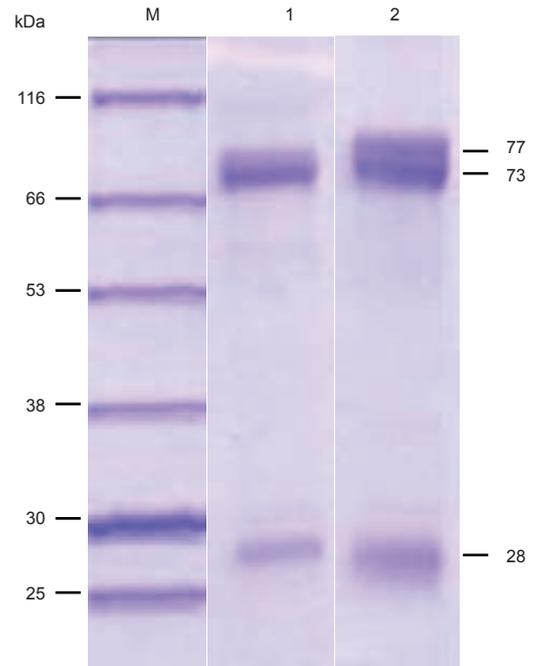


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of olive flounder *Paralichthys olivaceus* IgM purified with mannan-binding protein (MBP) and protein L affinity columns. Lanes are M, molecular marker; 1, IgM purified with MBP affinity column; 2, IgM purified with protein L affinity column.

column에 넣어 주었다. 4℃에서 15분간 반응시킨 후 binding buffer로 수세하였고, elution buffer (0.1 M glycine, pH 2.5)로 수집한 후 1M Tris-HCl (pH 8.5)로 중화시켰다. 정제된 IgM (ProLIgM)은 실험에 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

MAb 생산

정제된 넙치 IgM (MBPIgM과 ProLIgM)과 complete Freund's adjuvant (Gibco, USA)를 동량으로 섞어 100 μ L씩 2마리의 BALB/c 마우스의 복강에 1차 접종하였고, 2주 후에 정제된 넙치 IgM으로 2차 접종하였다. 다시 1주 후에 정제된 넙치 IgM으로 3차 접종한 후, 마우스로부터 비장을 분리한 후 polyethylene glycol (Roche, Germany)을 사용하여 SP2/0 myeloma 세포와 융합시킨 후 fetal bovine serum이 10% 첨가된 HAT 배지(0.1 mM hypoxanthine, 4×10^{-4} mM aminopterin, 1.6×10^{-2} mM thymidine in Dulbecco's modified eagle medium)로 suspension 시킨 후 96 well plate에 분주하여 37℃로 설정된 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 양성 hybridoma는 정제된 넙치 IgM을 사용하여 ELISA법으로 선별하였고 3회 이상 제한 희석법으로 클로닝하였다. 선별된 MAb의 isotyping은 마우스 Ig isotyping ELISA kit (BD Biosciences, USA)를 사용하여 결정하였다.

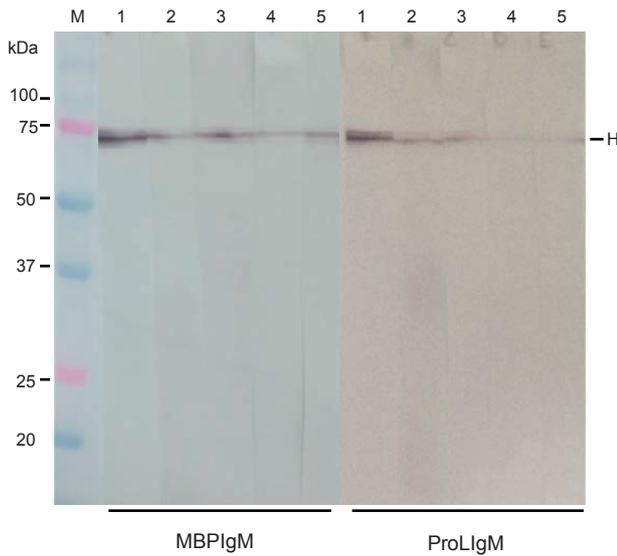


Fig. 2. Western blotting of purified olive flounder *Paralichthys olivaceus* IgMs (MBPIgM and ProLIgM) immunostained with 5 anti-MBPIgM monoclonal antibodies (MAbs). M, molecular marker; 1-5, MAbs against MBPIgM; MBPIgM, olive flounder IgM purified with mannan-binding protein affinity column; ProLIgM, olive flounder IgM purified with protein L affinity column.

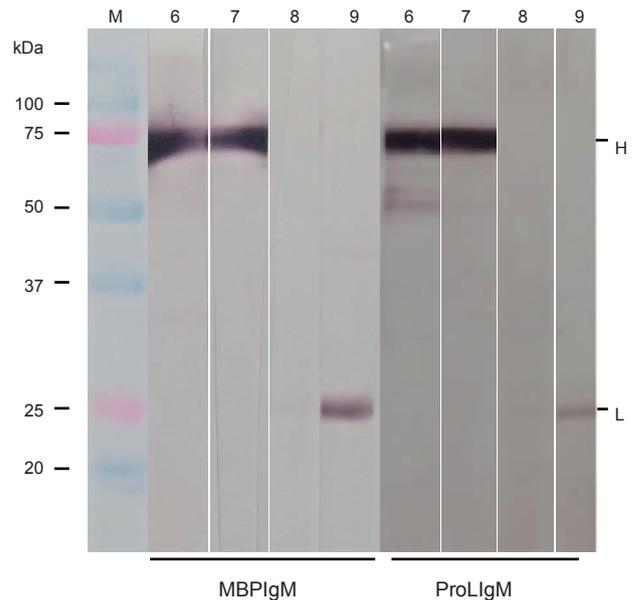


Fig. 3. Western blotting of purified olive flounder *Paralichthys olivaceus* IgMs (MBPIgM and ProLIgM) immunostained with 4 anti-ProLIgM monoclonal antibodies (MAbs). M, molecular marker; 6-9, MAbs against ProLIgM; MBPIgM, olive flounder IgM purified with mannan-binding protein affinity column; ProLIgM, olive flounder IgM purified with protein L affinity column.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)와 western blotting

Laemmli (1970)의 방법에 준해 SDS-PAGE를 실시하였다. 넙치 IgM의 인식부위를 확인하기 위해, 정제된 넙치 IgM (MBPIgM와 ProLIgM)을 12% polyacrylamide gel에 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동 종료 후 gel을 coomassie brilliant blue를 사용하여 염색하였다. Western blotting은 Towbin et al. (1979)의 방법에 따라 실시하였다. 전기영동한 넙치 IgM을 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, USA)에 옮긴 후, 본 연구에서 제작한 MAb (1차 항체)와 alkaline phosphatase (AP)가 붙어 있는 goat anti-mouse IgG (Sigma, USA, 2차 항체)로 반응시키고 AP가 붙어 있는 substrate kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 발색하였다.

ELISA

넙치 IgM에 대한 MAb를 생산하는 hybridoma의 선별과 제작된 MAb가 넙치 IgM을 인식하는지를 조사하기 위하여 ELISA를 실시하였다. Hybridoma 선별은 Kim et al. (2008)의 ELISA 방법을 변형하여 실시하였다. 정제된 넙치 IgM (MBPIgM와 ProLIgM)을 coating buffer (0.5M carbonate-bicarbonate, pH 9.6)로 희석한 후 ELISA plate (Nunc, Denmark)에 50 µL (250 ng/well)씩 분주한 후, 4°C에서 overnight하여 항원을 coating

하였다. Tween-20이 0.05% 포함된 PBS (T-PBS)로 3번 세척하였고 5% skim milk를 380 µL씩 넣어 25°C에서 1시간 동안 blocking 시켰다. 1차 항체로는 본 연구에서 제작한 hybridoma의 배양액을 사용하여 50 µL씩 분주하였고, 2차 항체로서 5% skim milk로 1,000배 희석된 peroxidase conjugated 항 마우스 IgG 염소 혈청(Younginfrontier, Korea)을 50 µL씩 분주하였다. 각각의 항체는 25°C에서 1시간 동안 반응하였다. T-PBS로 5번 수세하였고 ELISA 발색액(100 mM Na₂HPO₄, 50 mM citric acid, 1 mg/mL o-phenylenediamine, 0.03% H₂O₂)을 각 well에 50 µL씩 분주한 후 25°C에서 15분 동안 발색하였다. 각 well에 2 N H₂SO₄를 50 µL씩 넣어 발색 반응을 중지시킨 후 microplate photometer (Multiskan, USA)로 492 nm에서 흡광도(optical density, OD)값을 측정하였다. 제작된 MAb가 넙치 IgM을 인식하는지를 조사하기 위하여 BSA에 대한 특이 항체를 검출하는 ELISA를 Kim et al. (2007, 2011)의 방법에 준해 실시하였다. ELISA plate에 5 µg BSA/50 µL를 각 well에 분주한 후, 37°C에서 overnight하여 항원을 coating 하였다. 1차 항체로는 넙치 혈청(BSA 면역 및 비면역 넙치로부터 분리한 혈청)을 5% skim milk로 희석(40배)하여 1시간 반응시킨 후 50 µL씩 분주하였고, 2차 항체로는 본 연구에서 제작한 MAb를 50 µL씩 분주하였으며, 3차 항체는 peroxidase conjugated 항

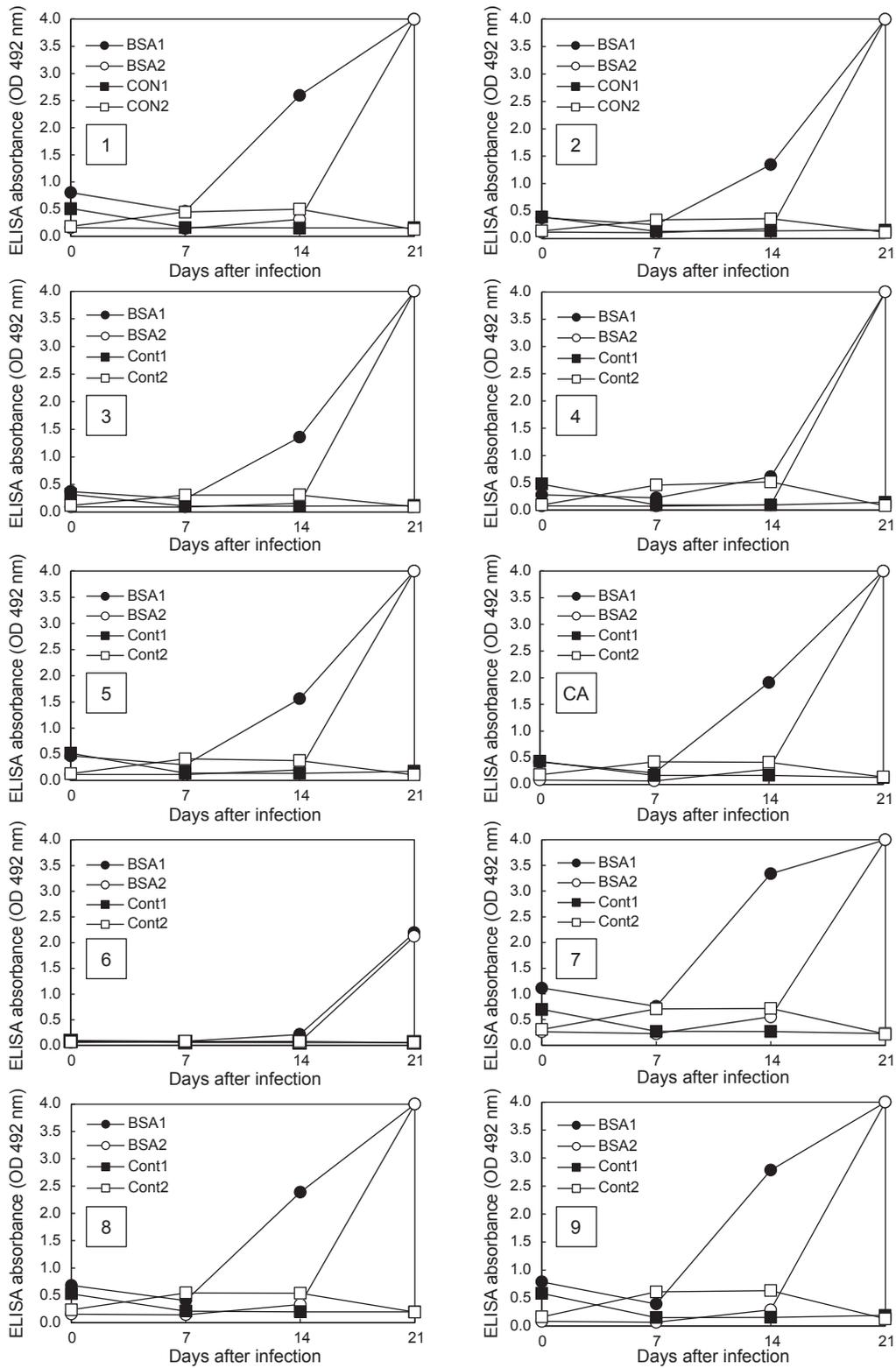


Fig. 4. Antibody detection enzyme-linked Immunosorbent assay with bovine serum albumin (antigen) and 10 monoclonal antibodies [1-9, commercial antibody (CA)]. BSA1 and BSA2, sera from BSA immunization of olive flounder *Paralichthys olivaceus*; Cont1 and cont2, sera from non-immunization of olive flounder.

마우스 IgG 염소 혈청을 50 µL씩 분주하였다. 항체 반응과 발색 조건은 위와 동일하게 실시하였다. 양성 대조구로는 시판중인 항 넙치 IgM에 대한 MAb (Diagnostics Ltd., Scotland)를 사용하여 위와 동일하게 ELISA를 실시하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 넙치를 대상으로 한 항체 검출 ELISA를 실시하는데, 반드시 필요한 넙치 IgM에 대한 항체를 생산하기 위하여 MBP와 protein L affinity column을 사용하여 넙치 IgM를 정제한 후, 정제된 IgM (MBPIgM와 ProLIgM)을 사용하여 MAb를 제작하였다. MBP와 protein L affinity column을 사용하여 넙치 Ig를 정제한 후 SDS-PAGE를 실시한 결과, MBPIgM과 ProLIgM 모두에서 약 77, 73, 28 kDa의 분자량이 관찰되었다(Fig. 1). ProLIgM에서는 넙치 혈청 로트에 따라서 약 77, 73, 28 kDa의 분자량 이외에도 약 57 kDa의 분자량이 관찰되기도 하였다(data not shown). 넙치 IgM의 분자량은 SDS-PAGE상에서 heavy (H) chain과 light (L) chain이 각각 75 kDa과 23 kDa (Nishida et al., 1998), 77, 72 kDa과 28, 26 kDa (Jang et al., 2004), 74 kDa과 24 kDa (Li et al., 2007), 68, 66 kDa과 27, 25 kDa (Shin et al., 2007)로 보고되어 있다. 본 연구의 정제한 Ig는 기존에 보고된 넙치 IgM의 분자량과 유사하므로 정제된 Ig는 IgM으로 사료된다. Shin et al. (2007)은 MBP affinity column을 사용하여 넙치 Ig를 정제한 결과 68 kDa (H chain)과 25, 27 kDa (L chain)의 분자량을 얻을 수 있었는데 본 연구에서는 동일한 MBP affinity column을 사용했음에도 불구하고 분자량에 차이를 보였다. 이는 전기영동에 사용한 항원의 양 또는 분자량 측정시에 발생하는 오차로 인한 것으로 추정된다. Protein L은 IgM, IgG, IgA, IgD 및 IgE의 L chain과 특이적으로 결합하는 단백질로 보고되어 있는데(Björck, 1988; Nilson et al., 1993), 본 연구의 결과(넙치 IgM 정제 결과) 넙치 IgM도 protein L과 특이적으로 결합한 것으로 사료된다.

MBPIgM과 ProLIgM을 마우스에 면역시킨 후 마우스의 비장 조직과 SP2/0 myeloma 세포를 융합시켜 hybridoma를 제작하였다. Hybridoma로부터 생성되는 항체를 ELISA법으로 선별한 후, 제한 희석법으로 클로닝하여 최종적으로 9개의 MAb를 선별하였다. MBPIgM에 대한 5개의 MAb (MBPIgM-MAb:1, 2, 3, 4, 5)와 ProLIgM에 대한 4개의 MAb (ProLIgM-MAb:6, 7, 8, 9). 9개의 MAb에 대한 isotyping 결과, H chain은 IgG1 (1, 2, 3, 4, 5, 9), IgG2a (7), IgG2b (6, 8)로 나타났으며, L chain은 모두 kappa로 확인되었다(data not shown). 9개의 MAb와 정제된 넙치 IgM을 사용하여 western blotting을 실시한 결과, MBPIgM-MAb 5개는 MBPIgM과 ProLIgM의 H chain을 인식하였다(Fig. 2). ProLIgM-MAb의 경우, 6과 7은 MBPIgM과 ProLIgM 모두 H chain을 강하게 인식하였고, 9는 L chain에 반응하였다(Fig. 3). 8은 H chain과 L chain 모두에 반응하지 않았다.

본 연구에서 제작된 MAb가 항체 검출 ELISA에 사용 가능한지를 평가하기 위해, 넙치에 BSA를 면역시킨 후 0, 7, 14, 21일째 혈청을 분리하여 BSA에 대한 항체가를 측정하였다(Fig. 4). ProLIgM-MAb 4개(6, 7, 8, 9)는 BSA 면역 넙치 혈청에 대해 시간이 경과됨에 따라 항체가가 증가되는 것으로 나타났으며, 대조구의 혈청(BSA 비면역 혈청)에서는 뚜렷한 항체가의 증가가 관찰되지 않았다. Kim et al. (2011)의 연구에 따르면 BSA 면역 후(사육 수온:15°C) 14일째부터 BSA에 대한 특이 항체가 검출되는 개체가 관찰되며, 21일째 모든 개체에서 BSA에 대한 특이 항체가 검출되었다고 보고하였다. 본 연구의 결과는 Kim et al. (2011)의 연구 결과와 유사하기 때문에 높은 OD값은 BSA에 대한 특이 넙치 항체를 인식한 것으로 사료된다. 또한, 양성 대조구(시판되고 있는 항 넙치 IgM에 대한 MAb 사용)에서도 유사한 OD값을 보였기 때문에, 본 연구에서 제작된 MAb는 넙치 IgM을 특이적으로 인식하는 것으로 사료된다. 그러나 MAb 6을 제외한 7, 8, 9 및 시판용 항 넙치 IgM에 대한 MAb에서는 BSA 비면역 넙치 혈청과 BSA를 면역시키기 전에 취한 혈청에서도 0.1-1.1의 OD값이 관찰되었다(Fig. 4). MBPIgM-MAb 5개(1, 2, 3, 4, 5)는 3개의 ProLIgM-MAb (7, 8, 9)와 유사한 결과를 보여 BSA 면역 혈청과 대조구의 혈청이 뚜렷이 구분되었다. 하지만 BSA 비면역 넙치 혈청과 BSA를 면역시키기 전에 취한 혈청에서도 OD값(0.08-0.8)이 관찰되었다(Fig. 4). 본 연구를 통해서 BSA 비면역 혈청에서 보이는 OD값의 원인에 대해서 알 수는 없으나 항체 검출 ELISA 방법에서 넙치 혈청을 5% skim milk로 전처리 과정을 경유하여 실시했기 때문에 (Kim et al., 2007) 넙치 IgM이 블로킹제에 비특이적으로 흡착하여 발생하는 높은 백그라운드와는 관계가 없을 것으로 사료된다. 향후 위의 원인을 규명하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

넙치의 Ig를 정제하는 방법으로는 sephacryl S-300 gel filtration을 사용하는 방법(Bang et al., 1996), salting-out, ion-exchange chromatography 및 gel filtration을 이용한 방법(Nishida et al., 1998), immune affinity column을 사용하는 방법(Jang et al., 2004; Shin et al., 2007), MBP affinity column을 사용하는 방법(Shin et al., 2007)이 보고되어 있다. 본 연구에서는 처음으로 protein L affinity column을 사용하여 넙치 IgM을 정제하였다. Protein L affinity column은 기존의 방법들에 비해(salting-out, ion-exchange chromatography 및 gel filtration을 이용한 방법, immune affinity column을 사용하는 방법) 간편하면서도 빠른 시간내에 넙치 IgM을 정제할 수 있는 장점을 지니고 있다. 또한 ProLIgM을 사용하여 제작한 MAb는 MBPIgM-MAb와 마찬가지로 넙치 IgM을 특이적으로 인식하는 것으로 확인되었다.

사 사

본 연구는 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었습니다(수산동물 바이러스 전염

병 진단용 항체 생산).

References

- Bang JD, Kim JW, Lee SD, Park SI, Chun SG, Jeong CS and Park JW. 1996. Humoral immune response of flounder to *Edwardsiella tarda*: the presence of various sizes of immunoglobulins in flounder. *Dis Aquat Org* 26, 197-203.
- Björck L. 1988. Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. *J Immunol* 140, 1194-1197.
- Crowther JR. 1995. ELISA. Theory and practice. Humana Press Inc., New Jersey, U.S.A.
- Jang HN, JK Woo, YH Cho, SB Kyong and SH Choi. 2004. Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of flounder (*Paralichthys olivaceus*) immunoglobulin. *J Biochem Mol Biol* 37, 314-319.
- Kaattari SL and Piganelli JD. 1996. The specific immune system: humoral defense. In the fish immune system: organism, pathogen and environment. Iwama G and Nakanishi T, eds. Academic Press, San Diego, U.S.A., 207-254.
- Kibenge MT, Opazo B, Rojas AH and Kibenge FSB. 2002. Serological evidence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection in farmed fishes, using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Dis Aquat Org* 51, 1-11.
- Kim CS, Jang MS, Kim WS, Kim JO, Kim DW, Kim DH, Han HJ, Jung SJ and Oh MJ. 2009. Evaluation of the stability of IgM and specific antibody response of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* for application of antibody-detection ELISA. *J Fish Pathol* 22, 335-342.
- Kim WS, Mochizuki M, Nishizawa T and Yoshimizu M. 2008. Detection of specific antibodies against infectious hematopoietic necrosis virus from rainbow trout sera by ELISA using two novirhabdoviruses. *Fish Pathol* 43, 112-116.
- Kim WS, Jang MS, Jung SJ, Kim SR, Park MA, Lee JH, Myeong JI and Oh MJ. 2011. Specific antibody response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* by water temperature. *J Fish Pathol* 24, 39-45.
- Kim WS, Nishizawa T and Yoshimizu M. 2007. Non-specific adsorption of fish immunoglobulin M (IgM) to blocking reagents on ELISA plate wells. *Dis Aquat Org* 78, 55-59.
- KOSIS (Korean statistical information service). 2016. Result of fish farm trends survey in 2015[Internet]. Retrieved from http://kosis.kr/eng/statisticsList/statisticsList_01List.jsp?vwcd=MT_ETITLE&parmTabId=M_01_01 on March 2016.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LaPatra SE. 1996. The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. *Annu Rev Fish Dis* 6, 15-28.
- Li Q, Zhan W, Xing J and Sheng X. 2007. Production, characterization and applicability of monoclonal antibodies to immunoglobulin of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol* 23, 982-990.
- Nilson BH, Lögdberg L, Kastern W, Björck L and Akerström B. 1993. Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *J Immunol Methods* 164, 33-40.
- Nishida H, Enokida T, Hiramatsu N, Hara A and Yoshimizu M. 1998. Purification of Immunoglobulin M (IgM) in serum of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Bull Faculty Fish Hokkaido Univ* 49, 157-164.
- Peter P. 2014. The immune system. Garland Science, Connecticut, U.S.A.
- Pilström L and Bengtén E. 1996. Immunoglobulin in fish-genes, expression and structure. *Fish Shellfish Immunol* 6, 243-262.
- Shin GW, Kim YR, Shin YS, Lee EG, Oh MJ, Yoshida T and Jung TS. 2007. Purification of two different immunoglobulins (Igs) from olive flounder *Paralichthys olivaceus* and analysis of *Lactococcus garvieae* antigens by the Igs. *Fish Pathol* 42, 19-28.
- Tort L, Balasch JC and Mackenzie S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Num* 22, 277-286.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354.
- Watanabe K, Nishizawa T and Yoshimizu M. 2000. Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis Aquat Org* 41, 219-223.
- Watanabe K, Suzuki S, Nishizawa T, Suzuki K, Yoshimizu M and Ezura Y. 1998. Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathol* 33, 445-446.
- Wilson MR and Warr GW. 1992. Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annu Rev Fish Dis* 2, 201-221.
- World organization for animal health (OIE). 2016. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals[Internet]. Retrieved from <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/> on May 2016.
- Ye J, Kaattari IM, Ma C and Kaattari S. 2013. The teleost humoral immune response. *Fish Shellfish Immunol* 35, 1719-1728. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.015>.
- Yoshimizu M, Direkbusarakom S, Nomura T, Ezura Y and Kimura T. 1992. Detection of antibody against *Aeromonas salmonicida* in the serum of salmonid fish by the enzyme linked immunosorbent assay. *Fish Pathol* 27, 73-82.