



· 综述 ·

白斑综合征病毒囊膜蛋白VP19及VP28的研究进展

贾睿¹, 朱婵¹, 庄旻敏¹, 廖圣瑜¹, 施定基^{1,2}, 何培民^{1*}

(1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306;

2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要: 自二十世纪90年代, 白斑综合征病毒(WSSV)就因其暴发范围广、致死率高得到了广泛的关注。研究主要集中在确定该病毒蛋白的结构及功能, 以及利用其囊膜蛋白制备亚单位疫苗、研发DNA疫苗等来提高对虾抵抗白斑综合征病毒的能力, 尽管免疫防治目前在实验室阶段已取得了显著的保护效果, 但因其给药方式局限以及成本较高等因素一直没有应用于实际生产中。VP19和VP28是白斑综合征病毒主要的囊膜蛋白, 在WSSV感染对虾的过程中起着非常重要的作用。本文从WSSV的基因组学、VP19和VP28的蛋白质结构及其在免疫防治中的应用等方面概述了VP19和VP28的研究进展, 包括蛋白亚单位疫苗、DNA疫苗、RNA疫苗以及相关抗体的研究。在总结了不同类型疫苗的保护效果后发现, VP19和VP28的双价疫苗的保护率较高, 为今后制定有效的WSSV控制方法提供了参考。

关键词: 对虾; 白斑综合征病毒; VP19; VP28; 囊膜蛋白; 疫苗

中图分类号: S 945.1

文献标志码: A

对虾养殖是我国海水养殖业中最具代表性的产业^[1], 但1992年暴发白斑病后^[2], 对虾产量急剧下降。国内外研究人员相继对其病原体进行分离纯化, 发现该病毒为一种新型的非包涵体病毒。随后通过PCR技术, 结合发病对虾的临床症状、病理变化等, 发现各地的病毒差异很小, 应为同一种病毒, 因此将该病毒统一命名为白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)^[3-4]。鉴于其基因组序列与基因库中已知基因的同源性较低, 2005年国际病毒分类委员会(ICTV)正式将其归类为线形病毒科(Nimaviridae)白斑病毒属(*Whispovirus*), WSSV成为该属的唯一成员^[5]。

对虾一旦感染此病毒, 在3~7 d内死亡率高

达100%^[6]。自该病毒暴发以来, 全球对虾养殖行业的经济损失高达150亿美元, 远超世界动物卫生组织目前列出的几种重要甲壳类动物病原体导致的经济损失: 传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV, 10亿美元)、黄头病(YHD, 5亿美元)、对虾桃拉综合征病毒(TSV, 30亿美元)和对虾传染性肌肉坏死病毒(IMNV, 10亿美元)^[7]。

目前尚无有效方法能够防控该病毒, 对虾生产上一般采用养殖抗病力强的品种或者切断WSSV传播途径等方法来预防WSSV的传播^[1]。VP19和VP28是WSSV主要的两个囊膜蛋白, 且多用于免疫研究, 因此本文就WSSV基因组、蛋白结构及其囊膜蛋白VP19和VP28免疫防治研究新进展进行综述, 以期今后有效防控对虾WSSV

收稿日期: 2018-12-05 修回日期: 2019-04-12

资助项目: 上海市农委科技兴农项目[沪农科推字(2017)第1-13号]; 上海市科委创新项目(16391903500, 17391902200); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2014AA093506)

通信作者: 何培民, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

提供新思路。

1 对虾WSSV的基因组和结构蛋白

1.1 对虾WSSV基因组学

WSSV是一种有囊膜的环状双链DNA病毒^[8],是已知最大的动物DNA病毒,大约300 kb^[9]。病毒粒子直径约65~70 nm,长约300 nm,呈现卵圆形至短杆状,在末端有一尾状延伸。

目前GenBank中已经公布了10株WSSV分离株的基因组序列^[10],研究最多的分别为中国大陆株(WSSV-CN, AF-332093)、中国台湾株(WSSV-TW, AF440570)、泰国株(WSSV-TH, AF-369029)、韩国株(WSSV-KR, JX-515788)和澳大利亚株(WSSV-AU, MF768985)。其中,中国大陆株分离自中国大陆养殖的日本对虾(*Penaeus japonicus*),基因组为305 107 bp,含531个ORF(open reading frame,可读框),确定181个ORF可编码功能蛋白,其基因组3%与其他物种ORF同源,97%为WSSV特征ORF^[11];中国台湾株基因组全长307 287 bp,分离自中国台湾养殖的斑节对虾(*P. monodon*)^[12];泰国株分离自泰国的斑节对虾,基因组为292 967 bp,其中主要的ORF有184个,其基因组6%与其他物种ORF同源,94%为WSSV特征ORF^[13];韩国株分离自韩国养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),基因组全长为295 884 bp,含有515个ORF,其中有90个ORF与已知序列有同源性^[14];澳大利亚株分离自澳大利亚养殖的斑节对虾,基因组全长为285 973 bp,已识别出904个ORF,93.7%为WSSV特征编码框^[10]。通过基因组全序列比对,发现这5个病毒株的基因组序列有约97%的核苷酸是一致的^[15],中国大陆株比泰国株全序列多出1个12 kb片段,中国台湾株比泰国株全序列多出14 kb,与中国大陆株序列一样,比泰国株多出的序列均位于同一位置(31 135 bp处);韩国株比已知最大的中国台湾株少一个12 kb的片段;澳大利亚株比中国台湾株少一个22 kb的片段,这就预示着在WSSV的基因组序列中存在有差异的位点^[10-14]。

Marks等^[16]通过对从中国大陆、中国台湾和泰国分离出的3个病毒株序列基因组的研究,认为泰国株是最原始的病毒株,在ORF 23/24和ORF14/15区域容易发生重组和删除,这些可变区域之间的删除区域具有特殊的进化意义。Oakey

等^[10]认为原始病毒株中有些囊膜蛋白在感染宿主的过程中是不具备功能的,因此澳大利亚病毒株序列基因组比已知最大的泰国株(约312 kb, TH-96-11,未发表公布序列)少一个27 kb的片段。WSSV基因组中还包括一些均匀分布的重复序列,这类重复序列在其他病毒中也普遍存在,主要与早期基因转录起始、DNA复制起点有关,但其重复序列的具体功能目前尚不清楚^[17]。

1.2 对虾WSSV结构蛋白

蛋白是病毒最主要的组成成分之一,包括结构蛋白和非结构蛋白两大类。WSSV的结构蛋白包括囊膜蛋白、核衣壳蛋白和被膜蛋白三个部分,它们维持着病毒的基本结构,并保护病毒的核酸,同时参与病毒对宿主组织细胞的识别、吸附及侵入^[18]。非结构蛋白大多是一些催化、调节病毒复制的酶类和调控蛋白^[19]。目前已有59个与囊膜蛋白相关的基因组序列被公布^[19],已确定的囊膜蛋白有7个(VP28、VP19、VP31、VP36B、VP38A、VP51B和VP53A),核衣壳蛋白有3个(VP15、VP24和VP35),VP26、VP36A、VP39A和VP95蛋白则被定位于被膜结构中^[20]。

Van Hulten等^[21]通过实验发现VP28和VP19位于病毒囊膜上。Zhou等^[22]通过酵母双杂交检测揭示了几种WSSV结构蛋白(VP19-VP28、VP19-VP24、VP24-VP26和VP24-VP24)之间的相互作用,并确证该4种囊膜蛋白可形成复合物。Li等^[23]通过蓝色聚丙烯酰胺凝胶电泳(BN-PAGE)和SDS-PAGE结合质谱分析了WSSV的囊膜蛋白络合物,结果表明病毒囊膜是由多蛋白复合物(MPCs)组成,VP19以同源三聚体的形式存在,并且低丰度蛋白(如VP52B / VP38 / VP33和VP12 / VP150)之间也有相互作用。

VP19蛋白 VP19是WSSV的囊膜蛋白,由ORF 182编码,理论分子量13.6 ku,实际分子量19 ku。VP19在WSSV中的含量较高,仅次于VP28,它有2个跨膜结构域,并通过这2个结构域锚定在囊膜上^[24]。姜有声等^[25]利用VP19的单克隆抗体直接对VP19进行了定位,确证VP19蛋白位于WSSV的囊膜上。刘庆慧等^[26]对VP19进行了蛋白酶分析,发现VP19具有蛋白酶催化活性。Li等^[23]推测疏水性的VP19可能在WSSV病毒粒子的表层通过疏水簇吸收脂质的过程中发挥作用。Zhou等^[22]研究发现,MBP-VP19与VP24和VP28通

过体外折叠实验相互作用, Chang等^[27]发现VP19可以与VP52A交互作用。

VP28蛋白 VP28蛋白作为病毒粒子中含量很高的结构蛋白,也是主要的结构蛋白之一^[17],由ORF 001编码,理论分子量为23 ku^[28],实际分子量为28 ku。Van Hulten等^[21]发现其N-端和C-端具有强的疏水性,并且N-端存在潜在的跨膜区。Yi等^[29]通过体外实验证明,VP28-EGFP在pH 6.0的条件下,30 min内即可与对虾细胞结合,3 h后可进入细胞质。Zhang等^[30]认为,VP28在胞吞、细胞间感染和病毒传播进入宿主细胞的过程中起重要作用,并且作为附着蛋白参与WSSV的启动^[31]。王晓雯^[28]通过利用FITC(异硫氰酸荧光素)标记的重组囊膜蛋白进行WSSV囊膜蛋白介导细胞内吞实验,发现VP28能够单独介导血细胞、淋巴细胞、甲壳下表皮细胞、造血组织细胞引发内吞作用,证明VP28在WSSV侵染过程中发挥着重要作用。Li等^[23]通过BN-PAGE和SDS-PAGE结合质谱分析,发现VP28以大小不同的四聚体形式存在,分别为247、198、149、113、80和56 ku,认为不同大小的VP28四聚体在WSSV病毒粒子组装、细胞附着和渗透方面可能具有不同的功能。

2 VP19和VP28对WSSV的免疫防治研究

2.1 对虾WSSV免疫应答

对虾作为无脊椎动物,不能通过抗原抗体特异性反应达到自我保护的目的。其免疫机制主要是依靠非特异性免疫,非特异性免疫也即先天免疫,一般采用血淋巴酚氧化物酶(PO)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、酸性磷酸酶(ACP)以及碱性磷酸酶(AKP)等免疫酶的活性高低作为指标来评价免疫能力的强弱^[32],血细胞及体液因子也能以不同的途径作用于异物,并抵御病原体的侵袭^[33]。

然而近年来发现利用类似脊椎动物的疫苗对对虾进行免疫,比如灭活的病毒疫苗^[34]、反义RNA疫苗^[35]、DNA疫苗^[13]、蛋白亚单位疫苗^[36]等都可以在一定程度上诱发对虾体内产生免疫应答,增强对虾抵抗WSSV的能力,从而提高对虾的成活率。

2.2 VP19和VP28的亚单位疫苗免疫应用研究

目前研究较多的WSSV囊膜蛋白主要有

VP28、VP19、VP24、VP15、VP26,以及蛋白VP281、VP466等,但应用于对虾免疫保护的却以VP28和VP19为主,且以单价亚单位疫苗研究居多。为此,下文对VP19和VP28作为亚单位疫苗,从单价亚单位疫苗和双价(或多价)亚单位疫苗两个方面分别阐述。

VP19和VP28的单价亚单位疫苗免疫应用研究 Witteveldt等^[37]首次将VP19和VP28的N-端分别与麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)融合,并在细菌中表达后进行纯化,通过肌肉注射来免疫斑节对虾。在免疫斑节对虾后的第2天和第25天分别进行攻毒实验,发现与对照组斑节对虾相比,接种VP19疫苗组在第2天和第25天相对存活率分别达到33%、57%。此外,接种VP28疫苗组在2 d后的相对存活率为44%,但在第25天没有保护效果。结果表明,亚单位疫苗VP19和VP28可以提高斑节对虾的存活率,且VP28的短期免疫效果优于VP19,但VP19的长期免疫效果优于VP28。

贾启军等^[38]通过pET32b载体在大肠杆菌Origami(DE3)pLysS成功表达融合蛋白Trx-VP19,纯化之后注射克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*),结果显示Trx-VP19重组蛋白有显著提高克氏原螯虾抗WSSV感染的能力。Jha等^[39-40]将vp19基因分别构建载体后转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中,表达蛋白并纯化后免疫克氏原螯虾,结果显示在大肠杆菌和毕赤酵母中表达的VP19纯化蛋白都可以提高对虾抵抗WSSV感染的能力。Ha等^[41]将VP19在Sf21昆虫细胞中表达纯化,通过注射和口服两种方法免疫中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*),相对存活率分别达到50%和51%。这些研究说明VP19亚单位疫苗可以保护对虾抵抗WSSV的侵害,具体研究见表1。

相较于VP19亚单位疫苗,关于VP28亚单位疫苗的研究更多,同时其保护效果更佳。VP28的表达系统主要有大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、毕赤酵母等。Yang等^[42]利用大肠杆菌表达的VP28注射免疫虾,注射rVP28组在WSSV攻毒后100%存活。Jia等^[43]将vp28基因连接质粒构建穿梭表达载体,通过三亲接合转移法分别转化聚球藻7002和鱼腥藻7120,然后使用转基因蓝藻投喂虾苗后再进行攻毒,聚球藻7002和鱼腥藻7120实验组相对存活率分别达到77%和

表 1 不同形式VP19亚单位疫苗的WSSV攻毒保护率

Tab. 1 Comparison of VP19 subunit vaccines against WSSV infection

表达的宿主 expression host	蛋白质的形式 proteins form	攻毒方式 challenge way	保护率/% protection rate	文献 reference
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	MBP-VP19蛋白 MBP-VP19 protein	注射 injection	57	[37]
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	纯化的VP19蛋白 purified VP19 protein	口服 oral	24	[39]
		注射 injection	47	
		浸泡 immersion	17	
毕赤酵母 <i>Pichia pastories</i>	纯化的rVP19蛋白 purified rVP19 protein	口服 oral	29	[40]
杆状病毒 Baculovirus	纯化的VP19蛋白 purified VP19 protein	注射 injection	50	[41]
		口服 oral	51	

68%。Solis-Lucero等^[44]将VP28在M13丝状噬菌体上表达, 免疫凡纳滨对虾后攻毒, 接种疫苗组的对虾相对存活率达到45%, 表明噬菌体也可以作为VP28亚单位疫苗的表达宿主。即使是相同的宿主, 相同的表达蛋白, 对对虾的保护率也各不相同, 可能与免疫时间、疫苗剂量、免疫途径、蛋白纯度^[45]等因素有关。不同的免疫方式保护效率从低到高依次为注射>口服>浸泡。由于注射耗时费力, 一般在规模养殖中采用浸泡或口服免疫方法来预防WSSV的感染。目前一般使用大肠杆菌、枯草杆菌等表达系统用于WSSV疫苗的生产, 但这些系统在有效性、生物安全性、成本、时间和产量方面都存在一些缺陷, 从而限制了它们在对虾养殖中的应用, 具体研究见表2。

VP19-VP28的双价亚单位疫苗免疫应用研究 鉴于VP28和VP19单价亚单位疫苗对对虾有着较好的免疫保护效果, 国内外研究者为进一步提高其免疫保护作用, 针对两个蛋白进行了联合双价亚单位疫苗的研究。

Witteveldt等^[37]采用细菌表达的VP19和VP28纯化蛋白与虾饲料混合制成混合饲料, 投喂VP19、VP28和VP19-VP28口服疫苗的相对生存率分别为0%、61%和31%。VP19和VP28混合投喂时, 保护率更低, 可能是由于混合物中VP28的浓度是单独使用VP28处理时浓度的一半。

Jha等^[39]采用3种方式免疫克氏原螯虾, 第一组用重组蛋白VP19、VP28、VP19-VP28混合饲料投喂, 第二组用纯化的VP19、VP28、VP19-VP28蛋白直接注射, 第三组在含VP19、VP28、VP19-VP28蛋白的水中浸泡7 h, VP19-VP28混合组在口服、注射、浸泡3种方式下相较于VP19组

的保护率分别提高了25%、17%和27%; VP19-VP28混合组在口服和浸泡两种方式下相较于VP28的相对保护率分别降低了13%和7%, 而注射则提高了7%的保护率。结果表明将VP19和VP28蛋白中属于疫苗的有效成分, 通过注射法免疫克氏原螯虾能获得最高的保护率, 联合使用的双价亚单位疫苗也能比单价产生更好的免疫效果。

Cho等^[58]用罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)进行口服疫苗及攻毒实验, 发现双价疫苗FL2-VP(19+28)比单价疫苗FL2-VP19或FL2-VP28在口服方面的存活率分别提高了23%和18%, 可能是由于细胞传递和囊膜蛋白表达增强, 从而诱导产生更高的免疫力。

以上结果表明, 无论是口服还是注射, 多价亚基蛋白疫苗相比于单价蛋白亚单位疫苗可显著提高对对虾的保护率, 甚至可提高至100%^[59]。这种增加的保护率的原因可能是由于多抗体结合位点的数目增加, 能够更有效地中和病毒, 具体研究见表3。

2.3 基于VP19和VP28的RNA干扰在WSSV免疫防治研究中的应用

RNA干扰是双链RNA(dsRNA)介导的序列特异性地转录后基因沉默^[60], 其机制是外源RNA通过与靶序列特定位点互补配对, 进而阻碍靶基因的翻译或者诱导mRNA降解来抑制基因表达, 是一项高效率、强特异性的基因沉默技术^[61]。

2004年, Robalino等^[47]首次报道了给凡纳滨对虾肌肉注射从脊椎动物体内得到的不同dsRNA, 对虾均表现出对WSSV抗性。该研究表明无脊椎动物的免疫系统就像脊椎动物一样, 可以将

表2 不同形式VP28亚单位疫苗的WSSV攻毒保护率

Tab. 2 Comparison of VP28 subunit vaccines against WSSV infection

表达的宿主 expression host	蛋白质的形式 proteins form	攻毒方式 challenge way	保护率/% protection rate	文献 reference
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	纯化的VP28蛋白 purified VP28 protein	口服 oral	77	[46]
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	纯化的VP28蛋白 purified VP28 protein	口服 oral	100	[47]
		浸泡 immersion	71	
		注射 injection	61	
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	纯化的VP28蛋白 purified VP28 protein	口服 oral	57	[40]
		注射 injection	60	
		浸泡 immersion	54	
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	纯化的rVP28 purified rVP28 protein	注射 injection	100	[42]
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	转基因大肠杆菌 transgenic <i>E. coli</i>	注射 injection	60	[48]
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	纯化VP28C, VP28N蛋白 purified VP28C, VP28N protein	口服 oral	48, 17	[49]
		注射 injection	30, 8	
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	r-VP28蛋白 r-VP28 protein	口服 oral	65	[45]
	纯化的r-VP28蛋白 purified r-VP28 protein	口服 oral	70	
	纯化r-VP28+CS/TPP purified rVP28+CS/TPP	口服 oral	75	
枯草芽胞杆菌 <i>B. subtilis</i>	转基因枯草杆菌孢子 transgenic <i>B. subtilis</i> spore	口服 oral	78	[50]
	转基因枯草芽胞杆菌 transgenic <i>B. subtilis</i>	口服 oral	52	
枯草芽胞杆菌 <i>B. subtilis</i>	转基因枯草芽胞杆菌 transgenic <i>B. subtilis</i>	口服 oral	83	[51]
短芽孢杆菌 <i>B. brevis</i>	纯化的VP28蛋白 purified VP28 protein	口服 oral	80	[52]
杆状病毒 Baculovirus	转基因杆状病毒 transgenic Baculovirus	注射 injection	86	[53]
		口服 oral	82	
		浸泡 immersion	75	
桥石短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus choshinensis</i>	rNVP28, rVP28-MLV	口服 oral	72, 74	[55]
毕赤酵母 <i>Pichia pastoris</i>	毕赤酵母rVP28 <i>P. pastoris</i> rVP28	口服 oral	87	[39]
蚕蛹 silkworm chrysalis	HyNPV-VP 28-感染蛹 HyNPV-VP 28-infected pupae	口服 oral	94	[56]
杜氏盐藻 <i>Dunaliella salina</i>	转基因盐藻 transgenic <i>D. salina</i>	口服 oral	59	[57]
鱼腥藻 <i>Anabaena</i>	转基因鱼腥藻 transgenic <i>Anabaena</i>	口服 oral	68	[43]
M13噬菌体 M13 phage	重组M13噬菌体 recombinant M13 phage	注射 injection	45	[44]

表3 不同形式的VP(19+28)亚单位疫苗的WSSV攻毒保护率

Tab. 3 Comparison of VP19-VP28 subunit vaccines against WSSV infection

表达的宿主 expression host	蛋白质的形式 proteins form	攻毒方式 challenge way	保护率/% protection rate	文献 reference
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	VP19和VP28混合物 mixture of VP19 and VP28	口服 oral	31	[37]
毕赤酵母 <i>P. pastoris</i>	VP19和VP28混合物 mixture of VP19 and VP28	口服 oral	72	[39]
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	VP19和VP28混合物 mixture of VP19 and VP28	注射 injection	64	[40]
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	VP19和VP28混合物 mixture of VP19 and VP28	口服 oral	100	[59]

dsRNA当作病毒相关分子,引起一个先天的抗病毒反应的激活。2007年, Kim等^[62]在中国明对虾幼体中注射与WSSV蛋白激酶基因、*vp28*基因相关的长链dsRNAs, *vp28*实验组相较于阳性对照组,存活率提高了53%,说明在肌肉注射长链dsRNAs能够防治WSSV。2015年, Jariyapong等^[63]以MrNv-VLPs (*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus-like particles)为载体构建了*vp28* dsRNA,免疫虾后,实验组相较于阳性对照组,在攻毒后相对存活率为44.5%,表明*vp28*-dsRNA介导的免疫保护可以控制WSSV感染,从而提高对虾的存活率。

傅玲琳等^[8]认为将病毒囊膜蛋白的反义RNA基因导入虾体,转录后反义RNA与病毒囊膜蛋白的mRNA结合,阻止mRNA翻译成病毒囊膜蛋白,抑制WSSV的复制和增殖,从而提高受感染虾的存活率。Robalino等^[64]通过注射法将WSSV的囊膜蛋白*vp19*、*vp28* RNAi基因导入虾体内,攻毒后二者的保护率分别达到81%和85%。Sarathi等^[65]通过口服*vp28* dsRNA的方法来探讨RNA干扰法是否能够帮助斑节对虾抵抗WSSV感染,结果显示口服*vp28* dsRNA能达到68%的保护率。

以RNA为基础的疫苗的保护率高于其他类型的疫苗,可能是RNA疫苗直接作用于病毒复制的早期转录阶段,能够靶向针对病毒从而抑制病毒感染^[66]。目前, RNA干扰技术是新兴、应用前景广阔的预防WSSV感染的手段之一。

2.4 VP19和VP28的DNA疫苗免疫防治研究

DNA疫苗又称基因工程疫苗或核酸疫苗,是将编码病原的抗原基因插入环状的真核表达DNA载体中,经接种被宿主细胞摄取,从而被转录为表达病原的抗原蛋白,刺激机体产生应答反应。

Krishnan等^[67]通过RNA干扰确定了稳定且成本较低的DNA疫苗来沉默斑节对虾中白斑综合征病毒,将*vp28*基因构建成pCMV-VP28-LH表达成长发卡RNA(long-hairpin RNA)结构,然后注射斑节对虾并进行WSSV攻毒实验,结果显示保护效率可达到75%。Li等^[68]将*vp28*基因克隆到表达载体pVAX1中扩增,然后注射凡纳滨对虾,通过攻毒来检测保护率,免疫实验结果表明,实验组的对虾成活率相较于阳性对照组,提高了52.5%。张娜等^[69]将*vp28*、*vp19*基因串联克隆为

融合基因,再克隆至pVAX1.0真核表达载体,制备多价基因DNA疫苗, pVAX1.0-VP19组相对保护率为25%, pVAX1.0-VP28组相对保护率为31.25%, pVAX1.0-VP19-VP28组相对保护率为43.75%。结果显示构建的DNA疫苗有抗WSSV的免疫保护性,且pVAX1.0-VP19-VP28多价DNA疫苗的保护率高于单价疫苗。

以上研究表明DNA疫苗对保护对虾抗WSSV感染有显著效果^[67-69]。与重组WSSV亚单位疫苗相比, DNA疫苗具有更长的保护时间和更高的保护率^[31]。此外,质粒DNA可以通过垂直传播,从亲本传递到子代,从而保护子代对虾免受病原体感染^[70],然而国际上对是否认定免疫DNA疫苗的动物为转基因动物存在不同标准,因此有必要统一。此外,可利用壳聚糖^[71]包裹DNA疫苗,这样便于建立口服免疫途径,可以高效地将DNA疫苗导入对虾体内,并有利于将其大规模地应用于养殖生产。

2.5 VP19和VP28对应抗体在防治WSSV中的应用

Chaivisuthangkura等^[72]把*vp19*基因通过pMAL-C2表达载体转入BL 21大肠杆菌后,纯化蛋白制备单克隆抗体,并用得到的单抗检测WSSV,结果显示,联合应用VP19和VP28特异性单抗比只用一种单抗的灵敏度高出2倍。受疫苗保护作用的启发,研究人员探索了针对WSSV囊膜蛋白的抗体对对虾是否有保护作用。Ha等^[73]利用囊膜蛋白VP19的抗体,李青龙等^[74]利用囊膜蛋白VP28的抗体,分别证实了这两种抗体对对虾有明显的保护作用,存活率分别为93.3%和83.3%。Li等^[75]通过实验发现,在15~22 °C的环境下,使用VP19-VP28融合蛋白的血清免疫过的克氏原螯虾受WSSV感染后的存活率能达到100%,但在26 °C的温度下存活率只有65%,结果表明VP19-VP28融合蛋白的血清可以提高小龙虾的存活率,但存活率受温度影响较大,且稳定性不是很好。

可能是由于多抗体结合位点的数目增加,由多价亚单位疫苗^[76]或蛋白质融合疫苗^[77]产生的抗体能够更有效地中和WSSV。鉴于使用联合抗体的检测灵敏度比只使用单抗的灵敏度高,可以针对VP(19+28)设计更加有效的检测手段来提高WSSV的检测效率,但这种方法受抗体合成、

纯化技术、环境温度的限制^[77],应用抗体来防治WSSV感染还需要进一步的探索和研究才能满足对虾养殖业的需要。

3 结论及展望

综上所述,不论是通过蛋白亚单位疫苗、融合蛋白亚单位疫苗、RNA干扰技术、DNA疫苗、还是相应抗体,都能提高对虾抗WSSV感染的能力,进而提高对虾的存活率。

在实验室阶段, RNA疫苗、DNA疫苗、对应抗体疫苗的保护效率都比蛋白亚单位疫苗的保护效率高,但是由于RNA疫苗和DNA疫苗需要注射给药,抗体疫苗需要免疫动物,成本都较高,所以目前的研究多集中在蛋白亚单位疫苗的研制。由于缺乏有效的给药途径和免疫方案,WSSV疫苗的研制方法至今还不完善。根据蓝藻是对虾幼虾的天然饵料这一特点, Jia等^[43]把蓝藻开发成新的表达系统,将vp28基因导入蓝藻,并将其作为口服疫苗来保护对虾免受WSSV的感染,攻毒实验结果表明,投喂高剂量转基因蓝藻的对虾存活率约为68%。郭媛媛等^[78]用转vp28基因蓝藻投喂凡纳滨对虾后攻毒,免疫后酶活性检测超氧化物歧化酶、酚氧化酶、过氧化氢酶的活性均有上升,结果表明转vp28基因蓝藻能够增强对虾的抗病免疫能力,并延缓对虾死亡。由于转基因蓝藻可作为虾苗的饵料直接投喂,无需纯化,成本较低,且具有较高的免疫保护效果,起到药食同源的作用,这可为对虾白斑综合症的防治提供新的研发思路,并有望应用到对虾养殖产业中。

参考文献:

- [1] 衣启麟,王玲玲,宋林生.对虾白斑综合症及其免疫防控[J].生命科学,2014,26(9):903-911.
Yi Q L, Wang L L, Song L S. White spot syndrome in shrimp and its immunological prevention and control[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2014, 26(9): 903-911(in Chinese).
- [2] Flegel T W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 13(4): 433-442.
- [3] Lo C F, Leu J H, Ho C H, *et al.* Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1996, 25(1-2): 133-141.
- [4] Wang C H, Lo C F, Leu J H, *et al.* Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, 23(3): 239-242.
- [5] Mayo M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV[J]. *Archives of Virology*, 2002, 147(8): 1655-1656.
- [6] 殷嵘,郭媛媛,韦章良,等.不同途径感染白斑综合症病毒(WSSV)对日本沼虾的致病性[J].*生物工程学报*, 2017, 33(6): 946-956.
Yin R, Guo Y Y, Wei Z L, *et al.* Pathogenicity of white-spot syndrome virus in *Macrobrachium nipponensis* via different infection routes[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(6): 946-956(in Chinese).
- [7] Stentiford G D, Neil D M, Peeler E J, *et al.* Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 141-157.
- [8] 傅玲琳,帅江冰,许梓荣.对虾白斑综合症病毒的分子生物学研究进展[J].*中国兽医杂志*, 2005, 41(4): 42-44.
Fu L L, Shuai J B, Xu Z R. Recent advances in the molecular biology of white spot syndrome virus of prawns[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2005, 41(4): 42-44(in Chinese).
- [9] Huang J J, Li F, Wu J J, *et al.* White spot syndrome virus enters crayfish hematopoietic tissue cells via clathrin-mediated endocytosis[J]. *Virology*, 2015, 486: 35-43.
- [10] Oakey H J, Smith C S. Complete genome sequence of a white spot syndrome virus associated with a disease incursion in Australia[J]. *Aquaculture*, 2018, 484: 152-159.
- [11] Yang F, He J, Lin X H, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(23): 11811-11820.
- [12] Tsai M F, Yu H T, Tzeng H F, *et al.* Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase[J]. *Virology*, 2000, 277(1): 100-110.
- [13] Van Hulten M C W, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence[J]. *Virology*, 2001, 286(1): 7-22.
- [14] Chai C Y, Yoon J, Lee Y S, *et al.* Analysis of the complete nucleotide sequence of a white spot syndrome virus isolated from pacific white shrimp[J]. *Journal of*
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Microbiology (Seoul, Korea)*, 2013, 51(5): 695-699.
- [15] 蔡苗,孙新颖,刘庆慧,等. 2016年中国部分地区白斑综合征病毒高变异区序列的分析比较[J]. *海洋渔业*, 2018, 40(4): 454-464.
Cai M, Sun X Y, Liu Q H, *et al.* Variation analysis of highly variable regions of white spot syndrome virus from partial areas of China in 2016[J]. *Marine Fisheries*, 2018, 40(4): 454-464(in Chinese).
- [16] Marks H, Van Duijse J J A, Zuidema D, *et al.* Fitness and virulence of an ancestral White Spot Syndrome Virus isolate from shrimp[J]. *Virus Research*, 2005, 110(1-2): 9-20.
- [17] 邬君君. 对虾白斑综合征病毒(WSSV)进入宿主细胞的方式及增殖情况[D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所, 2013.
Wu J J. The modes of entry into host cells and proliferation of white spot syndrome virus (WSSV)[D]. Xiamen: Third Institute of Oceanography, MNR, 2013(in Chinese).
- [18] 许华,黄健,杨官品. 对虾白斑综合征病毒蛋白质组的研究进展[J]. *海洋水产研究*, 2008, 29(2): 118-125.
Xu H, Huang J, Yang G P. Advancements on proteomics of white spot syndrome virus in shrimp[J]. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(2): 118-125(in Chinese).
- [19] 孙玉苗. 白斑综合征病毒(WSSV)三种重要囊膜蛋白的重组表达及在病害防控中的作用[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2012.
Sun Y M. Recombinant expression of three important white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins and their ability on disease control[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012(in Chinese).
- [20] Sánchez-Paz A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern[J]. *Veterinary Research*, 2010, 41(6): 43.
- [21] Van Hulten M C W, Westenberg M, Goodall S D, *et al.* Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp[J]. *Virology*, 2000, 266(2): 227-236.
- [22] Zhou Q, Xu L M, Li H, *et al.* Four major envelope proteins of white spot syndrome virus bind to form a complex[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(9): 4709-4712.
- [23] Li Z C, Xu L M, Li F, *et al.* Analysis of white spot syndrome virus envelope protein complexome by two-dimensional blue native/SDS PAGE combined with mass spectrometry[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(7): 1125-1135.
- [24] Van Hulten M C W, Reijns M, Vermeesch A M G, *et al.* Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins[J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83(1): 257-265.
- [25] 姜有声,战文斌,程顶峰,等. 对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白VP19的单克隆抗体制备及其定位[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(1): 69-74.
Jiang Y S, Zhan W B, Cheng S F, *et al.* Production of monoclonal antibody against WSSV VP 19 and VP 19 location[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(1): 69-74(in Chinese).
- [26] 刘庆慧,黄健,贾佩峤,等. WSSV具蛋白酶活性肽段的检测[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(6): 531-536.
Liu Q H, Huang J, Jia P Q, *et al.* Identification of peptide with protease activity from white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(6): 531-536(in Chinese).
- [27] Chang Y S, Liu W J, Lee C C, *et al.* A 3D model of the membrane protein complex formed by the white spot syndrome virus structural proteins[J]. *Plos One*, 2010, 5(5): e10718.
- [28] 王晓雯. 凡纳滨对虾与WSSV侵染相关的细胞与基因功能分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Wang X W. Functional analysis of the cells and the gene related with WSSV infection in *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014(in Chinese).
- [29] Yi G H, Wang Z M, Qi Y P, *et al.* Vp28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 37(6): 726-734.
- [30] Zhang H D, Kolb F A, Brondani V, *et al.* Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(21): 5875-5885.
- [31] Rout N, Kumar S, Jaganmohan S, *et al.* DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp[J]. *Vaccine*, 2007, 25(15): 2778-2786.
- [32] 王专伟,黄建华,杨其彬,等. 感染白斑综合征病毒的斑节对虾免疫酶变化特征[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(9): 1851-1854.
Wang Z W, Huang J H, Yang Q B, *et al.* Characteristics

- of immuno-enzymes of *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50(9): 1851-1854(in Chinese).
- [33] 叶建生, 阎斌伦, 王兴强, 等. 中草药制剂提高虾类免疫作用研究进展[J]. *江西水产科技*, 2017(5): 36-39.
Ye J S, Yan B L, Wang X Q, *et al.* Advances in research on the effect of Chinese herbal medicine preparation on shrimp immunity[J]. *Jiangxi Fishery Science and Technology*, 2017(5): 36-39(in Chinese).
- [34] Lu Y N, Liu J J, Jin L J, *et al.* Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(5): 604-610.
- [35] Akhila D S, Mani M K, Rai P, *et al.* Antisense RNA mediated protection from white spot syndrome virus (WSSV) infection in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2015, 435: 306-309.
- [36] Thomas A, Sudheer N S, Viswanathan K, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a major white spot syndrome virus (WSSV) envelope protein VP24 expressed in *Escherichia coli* against WSSV[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2014, 123: 17-24.
- [37] Witteveldt J, Vlak J M, Van Hulst M C W. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16(5): 571-579.
- [38] 贾启军, 孟小林, 徐进平, 等. 对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白VP19的融合表达及其抗病毒感染作用[J]. *中国病毒学*, 2006, 21(6): 585-588.
Jia Q J, Meng X L, Xu J P, *et al.* Expression of envelope protein VP19 of *Penaeus monodon* WSSV in *E. coli* and the effect against WSSV[J]. *Virologica Sinica*, 2006, 21(6): 585-588(in Chinese).
- [39] Jha R K, Xu Z R, Shen J, *et al.* The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*[J]. *Immunology Letters*, 2006, 105(1): 68-76.
- [40] Jha R K, Xu Z R, Bai S J, *et al.* Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using recombinant oral vaccine expressed in *Pichia pastoris*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(4): 295-307.
- [41] Ha Y M, Kim Y I, Kim K H, *et al.* Neutralization of white spot syndrome virus (WSSV) for *Penaeus chinensis* by antiserum raised against recombinant VP19[J]. *Journal of Environmental Biology*, 2008, 29(4): 513-517.
- [42] Yang J Y, Chang C I, Liu K F, *et al.* Viral resistance and immune responses of the shrimp *Litopenaeus vannamei* vaccinated by two WSSV structural proteins[J]. *Immunology Letters*, 2012, 148(1): 41-48.
- [43] Jia X H, Zhang C L, Shi D J, *et al.* Oral administration of *Anabaena*-expressed VP28 for both drug and food against white spot syndrome virus in shrimp[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2): 1001-1009.
- [44] Solís-Lucero G, Manoutcharian K, Hernández-López J, *et al.* Injected phage-displayed- VP28 vaccine reduces shrimp *Litopenaeus vannamei* mortality by white spot syndrome virus infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 401-406.
- [45] Taju G, Kumar D V, Majeed S A, *et al.* Delivery of viral recombinant VP28 protein using chitosan tripolyphosphate nanoparticles to protect the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* from white spot syndrome virus infection[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107: 1131-1141.
- [46] Witteveldt J, Cifuentes C C, Vlak J M, *et al.* Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(4): 2057-2061.
- [47] Robalino J, Browdy C L, Prior S, *et al.* Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(19): 10442-10448.
- [48] Sun Y M, Li F H, Chi Y H, *et al.* Enhanced resistance of marine shrimp *Exopalaemon carinicauda* Holthuis to WSSV by injecting live VP28-recombinant bacteria[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2013, 32(2): 52-58.
- [49] Qiu Z G, Liu Q H, Huang J. Efficiency of two fragments of VP28 against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2012, 338-34: 2-12.
- [50] Fu L L, Li W F, Du H H, *et al.* Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46(5): 581-586.
- [51] Fu L L, Shuai J B, Xu Z R, *et al.* Immune responses of *Fenneropenaeus chinensis* against white spot syndrome virus after oral delivery of VP28 using *Bacillus subtilis* as vehicles[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 28(1): 49-55.
- [52] Caipang C M A, Verjan N, Ooi E L, *et al.* Enhanced survival of shrimp, *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* from white spot syndrome disease after oral administration of recombinant VP28 expressed in *Brevibacillus brevis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 315-320.
- [53] Musthaq S S, Madhan S, Sahul Hameed A S, *et al.* Localization of VP28 on the baculovirus envelope and its immunogenicity against white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*[J]. *Virology*, 2009, 391(2): 315-324.
- [54] Musthaq S S, Kwang J, Boudinot P. Oral Vaccination of baculovirus-expressed VP28 displays enhanced protection against white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e26428.
- [55] Mavichak R, Takano T, Kondo H, *et al.* The effect of liposome-coated recombinant protein VP28 against white spot syndrome virus in Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(1): 69-74.
- [56] Wei K Q, Yang J X. Histological alterations and immune response in the crayfish *Procambarus clarkii* given rVP28-incorporated diets[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 1122-1128.
- [57] Feng S Y, Feng W P, Zhao L, *et al.* Preparation of transgenic *Dunaliella salina* for immunization against white spot syndrome virus in crayfish[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(3): 519-525.
- [58] Cho H, Park N H, Jang Y, *et al.* Fusion of flagellin 2 with bivalent white spot syndrome virus vaccine increases survival in freshwater shrimp[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 144: 97-105.
- [59] 李红霞. 对虾白斑综合征病毒(WSSV)囊膜基因vp19、vp28的克隆、融合表达及中和抗体的制备[D]. 武汉: 武汉大学, 2004.
- Li H X. Cloning, fusion expression of envelope protein genes vp19 and vp28 of shrimp white spot syndrome virus, and preparation of neutralizing antibody[D]. Wuhan: Wuhan University, 2004(in Chinese).
- [60] Hannon GJ. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.
- [61] 张泰, 蔡英, 翟博智. RNA干扰技术的研究进展[J]. 现代诊断与治疗, 2015, 26(6): 1254-1256.
- Zhang T, Cai Y, Zhai B Z. Progress on RNA interference[J]. *Modern Diagnosis and Treatment*, 2015, 26(6): 1254-1256(in Chinese).
- [62] Kim C S, Kosuke Z, Nam Y K, *et al.* Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(1): 242-246.
- [63] Jariyapong P, Chotwiwatthanakun C, Direkbusarakom S, *et al.* Delivery of double stranded RNA by *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus-like particles to protect shrimp from white spot syndrome virus[J]. *Aquaculture*, 2015, 435: 86-91.
- [64] Robalino J, Bartlett T, Shepard E, *et al.* Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response?[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(21): 13561-13571.
- [65] Sarathi M, Simon M C, Venkatesan C, *et al.* Oral administration of bacterially expressed VP28 dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus[J]. *Marine Biotechnology(New York, N.Y.)*, 2008, 10(3): 242-249.
- [66] Shu L, Li C R, Zhang X B. The role of shrimp miR-965 in virus infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 427-434.
- [67] Krishnan P, Babu P G, Saravanan S, *et al.* DNA constructs expressing long-hairpin RNA (lhRNA) protect *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus[J]. *Vaccine*, 2009, 27(29): 3849-3855.
- [68] Li X, Liu Q H, Hou L, *et al.* Effect of VP28 DNA vaccine on white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture International*, 2010, 18(6): 1035-1044.
- [69] 张娜, 刘骁. 对虾白斑综合征病毒表面抗原基因免疫保护性的研究[J]. *检验检疫学刊*, 2015, 25(1): 5-8.
- Zhang N, Liu X. Research on immune protection of white spot syndrome virus surface antigen gene[J]. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2015, 25(1): 5-8(in Chinese).
- [70] Chowdhury L M, Gireesh-Babu P, Pavan-Kumar A, *et al.* First report on vertical transmission of a plasmid DNA in freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2014, 121: 24-27.
- [71] Pathan M, Gireesh-Babu P, Pavan-Kumar A, *et al.* *In vivo* therapeutic efficacy of recombinant *Penaeus monodon* antiviral protein (rPmAV) administered in three different forms to WSSV infected *Penaeus*

- monodon*[J]. *Aquaculture*, 2013, 376-379: 64-67.
- [72] Chaivisuthangkura P, Longyant S, Rukpratanporn S, *et al.* Enhanced white spot syndrome virus (WSSV) detection sensitivity using monoclonal antibody specific to heterologously expressed VP19 envelope protein[J]. *Aquaculture*, 2010, 299(1-4): 15-20.
- [73] Ha Y M, Soo-Jung G, Thi-Hoai N, *et al.* Vaccination of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18(5): 964-967.
- [74] 李青龙, 战文斌, 绳秀珍. 抗WSSV囊膜蛋白(VP28和VP19)单抗的体内中和效果研究[J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 56-61.
- Li Q L, Zhan W B, Sheng X Z. *In vivo* neutralization assay of monoclonal antibodies specific to WSSV envelope protein (VP28 and VP19)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 56-61(in Chinese).
- [75] Li H X, Meng X L, Xu J P, *et al.* Protection of crayfish, *Cambarus clarkii*, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2005, 28(5): 285-291.
- [76] Li L J, Yuan J F, Cai C A, *et al.* Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish[J]. *Archives of Virology*, 2006, 151(7): 1309-1317.
- [77] 李婷婷, 王君伟. 口蹄疫合成肽疫苗研究进展[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(4): 76-79.
- Li T T, Wang J W. Progress on synthetic peptide vaccine against foot-and-mouth disease[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33(4): 76-79(in Chinese).
- [78] 郭媛媛, 殷嵘, 施定基, 等. 转vp28蓝藻口服剂对凡纳滨对虾抗白斑综合征病毒能力及免疫反应的影响[J]. *水产学报*, 2017, 41(9): 1473-1485.
- Guo Y Y, Yin R, Shi D J, *et al.* Effect of *Anabaena*-expressed VP28 against white spot syndrome virus and related immune response in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(9): 1473-1485(in Chinese).

Review of research progress on white spot syndrome virus (WSSV) envelope protein VP19 and VP28

JIA Rui¹, ZHU Chan¹, ZHUANG Minmin¹, LIAO Shengyu¹, SHI Dingji^{1,2}, HE Peimin^{1*}

(1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Since the outbreak of white spot syndrome virus (WSSV) in prawn in 1990s, WSSV has attracted extensive attention and research due to its wide outbreak range and high mortality. VP19 and VP28 are main envelope proteins of WSSV, which play important roles in the early stage of the prawn WSSV infection. These studies focused on using envelope proteins VP28 and VP19 to prepare submit vaccines to protect the host, which currently creates significant protective effect. This paper reviews the protein structure of VP28 and VP19 and their role in WSSV invasion, and the immune application of VP19 and VP28 vaccines in WSSV invasion, including protein subunit vaccine, DNA vaccine, RNA vaccine, and corresponding antibody. The protective efficiency of different types of vaccines is summarized, and the protective rate of VP19 + VP28 dual-potency vaccine is relatively high, which provides a reference for formulating effective methods of WSSV control.

Key words: prawn; WSSV; VP19; VP28; envelope protein; vaccine

Corresponding author: HE Peimin. E-mail: pmhe@shou.edu.cn

Funding projects: Shanghai Agriculture Science and Technology Innovation Project (2017, No 1-13); Shanghai Science and Technology Commission Innovation Project (16391903500, 17391902200); National High Technology Research and Development Program (863 Program)(2014AA093506)