

文章编号: 1000-0615(2017)09-1473-13

DOI: 10.11964/jfc.20160910535

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

郭媛媛^{1,2}, 殷嵘^{1,2}, 施定基³, 周园¹, 何培民^{1,2*},
吴倩萍^{1,2}, 庄旻敏^{1,2}, 韦章良⁴, 贾睿^{1,2*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学海洋科学研究院, 上海 201306;

3. 中国科学院植物研究所, 北京 100093;

4. 中国科学院南海海洋研究所, 热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301)

摘要: 为探讨转vp28蓝藻(*Anabaena* sp. PCC7120)口服剂对凡纳滨对虾抗白斑综合征病毒能力及其相应的免疫反应, 本研究将此口服剂免疫幼虾7 d, 再分别通过投喂攻毒和浸泡攻毒, 测定其存活率及相应的免疫指标。投喂攻毒和浸泡攻毒的实验组存活率分别为78.8%和83.19%, 表明该口服剂能显著增强对虾抗白斑综合征病毒的能力。蓝藻口服剂免疫对虾的酶活性检测结果显示, 超氧化物歧化酶(SOD)、酚氧化酶(PO)、过氧化氢酶(CAT)和碱性磷酸酶(AKP)活性在免疫后2 h均有上升趋势, 且在48或96 h达到最高值, 这表明该口服剂能引起对虾体内酶活性变化。投喂攻毒的对虾酶活性检测结果显示, 实验组攻毒后的对虾肝胰腺SOD活性分别比阳性对照组、野生型组、空载体组显著提高42.10%、32.26%和16.04%, 且攻毒后的肌肉SOD活性分别比阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组略微提高17.70%、11.50%、15.00%以及10.00%。实验组攻毒后的对虾肝胰腺PO、CAT和AKP活性比阳性对照组分别提高12.17%、88.80%和240.07%, 比野生型组分别提高21.49%、30.90%和100%; 酸性磷酸酶(ACP)活性比阴性对照组略微提高, 而在肌肉中各组ACP活性无显著性差异。同时浸泡攻毒组结果与投喂攻毒组具有类似的趋势。浸泡攻毒的实验组CAT和AKP活性显著高于其余处理组, 且CAT活性比投喂攻毒更为显著。浸泡攻毒的实验组肝胰腺PO活性显著高于阳性对照组、野生型组和空载体组, 而各组肌肉ACP活性无显著性差异。研究表明, 转vp28蓝藻口服剂能够增强凡纳滨对虾抗病能力并延缓对虾死亡。转vp28蓝藻PCC7120本身可作为幼虾饵料直接投喂, 无需提取纯化, 有望大规模应用于对虾养殖产业。

关键词: 凡纳滨对虾; 白斑综合征病毒; 转vp28蓝藻口服剂; 免疫反应

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是迄今对虾养殖业致死率最高的一种病毒, 其地理分布广、传染能力强、宿主范围广^[1], 不仅感染凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 而且感染中国明对虾(*Fenneropenaeus*

chinensis)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)等淡水和海水甲壳类动物^[2-4]。对虾感染WSSV后, 3~10 d之内死亡率可达100%。1992年WSSV首次

收稿日期: 2016-09-10 修回日期: 2016-10-23

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2014AA093506); 上海市科委项目(16391903500)

通信作者: 何培民, E-mail: pmhe@shou.edu.cn; 贾睿, E-mail: rjia@shou.edu.cn

在中国台北对虾养殖场中发现后,其他亚洲国家均发现此病毒^[5-7],如今已传播至中东、欧洲、南美洲和北美洲等国家^[8],并对以上国家造成巨大的经济损失。尽管据联合国粮农组织(FAO)统计,2014年全球对虾产量高达 3.66×10^6 t,但WSSV仍然是我国对虾养殖业的头号杀手。因此,研制出应用于对虾生产中的抗WSSV药物具有重要意义。

传统免疫学认为对虾等无脊椎动物缺乏适应性免疫系统,通常依赖先天免疫系统抵御病原体的感染。近年来研究表明,无脊椎动物具有免疫记忆的现象^[9-10]。VP28作为WSSV囊膜上含量最高的一种结构蛋白,在WSSV感染对虾的起始阶段起着关键作用^[11]。2000年Venegas等^[12]首次报道,对虾感染WSSV后会诱导产生中和(抑制)病毒的能力;2001年van Hulten等^[13]证明VP28的功能与WSSV感染宿主有关。2004年Witteveldt等^[14]用大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达的VP28经口服和注射免疫对虾,可提高对虾抗WSSV的能力,免疫7 d后相对成活率高达77%。这种针对WSSV囊膜蛋白的药物在防治WSSV上是一种突破。目前国内外学者研制出各种疫苗,然而大部分疫苗都需要分离、纯化并需包裹于饲料中,成本高、工艺复杂,且多数通过注射法进行免疫^[15-16],无法应用于实际生产中。

本实验采用转vp28蓝藻(*Anabaena* sp. PCC7120)免疫凡纳滨对虾幼虾,研究其对对虾的免疫保护效果,同时探讨口服剂引起对虾常用免疫指标的变化情况,为对虾白斑综合征病毒病的免疫预防提供理论和应用依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野生型蓝藻PCC7120、转vp28蓝藻PCC7120(PCC7120 pRL-489-vp28)以及转空载体蓝藻PCC7120(PCC7120 pRL-489)均来自中国科学院植物研究所^[1]。藻种在100 L光反应器中进行培养。以白光与蓝光、红光混合作为光源(24 h连续光照),光照强度条件为 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ^[17],用BG-11培养液,pH为7.2~7.4、搅拌条件下、(30±1) °C培养7 d后沉淀、离心,收集转基因蓝藻并洗涤、冷冻干燥和粉碎,存放于-80 °C冰箱中待用。

凡纳滨对虾幼虾购自厦门新荣腾水产技术开发有限公司,选用个体健壮、活力强的幼虾,体长(2.2±0.2) cm,实验前在21 L的白色塑料箱中暂养并驯化7 d,暂养期间投喂基础饵料。养殖用水为充分曝气3 d的海水,盐度为7,pH值为7.4~7.8,实验温度为(28±1) °C,在自然光照下进行。

病毒株为中国大陆株(WSSV-CN, AF-332093^[18]),其WSSV悬液由国家海洋局第三海洋研究所馈赠,病毒含量为 2×10^8 拷贝/ μL 。

1.2 实验方法

养殖管理 养殖实验分为浸泡攻毒和投喂攻毒2组,每组设5个处理,分别为阴性对照组、阳性对照组、空载体组、野生型组和实验组,每个处理设3个重复,每个重复60尾幼虾。阴性对照组和阳性对照组白天均投喂普通饵料,空载体组、野生型组和实验组白天分别投喂转空载体蓝藻PCC7120、野生型蓝藻PCC7120和转vp28蓝藻PCC7120,晚上所有组别均投喂卤虫(*Artemia salina*)。另设转vp28蓝藻处理组共3个重复,每个重复60尾对虾,用于持续监测免疫期间酶活性变化。每天投喂3次(8:00, 15:00, 22:00),日投饵量为对虾体质量的10%。蓝藻免疫持续7 d,免疫剂量为6 mg/尾,每日及时移除残饵和粪便,每2 d换水1次,每次换水量为1/3,驯养及实验期间保持连续通气。免疫前以及免疫结束后称取对虾的体质量并测量其体长,计算各组虾的相对增重率(weight gain, WG)和相对增长率(length gain, LG)。

$$WG(\%) = (W_2 - W_1) / W_1 \times 100$$

$$LG(\%) = (L_2 - L_1) / L_1 \times 100$$

W_2 为免疫后体质量(g); W_1 为免疫前体质量(g); L_2 为免疫后体长(cm); L_1 为免疫前体长(cm)。

攻毒实验 WSSV的增殖参照邓康裕等^[19]的方法,将WSSV悬液稀释 10^3 倍,再用无菌注射器向每尾健康的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)体内注射50 μL 稀释后的病毒悬液,注射时针头由第四腹节向第三腹节插入。感染后继续投喂普通饵料,感染WSSV期间及时捞出死亡对虾获取病料,并通过PCR技术检测确保含WSSV,且病毒含量平均为 10^7 拷贝/mg。

病毒悬液的制备参照Xie等^[20]的方法,取上述感染有WSSV的死亡日本沼虾,去除肝胰腺,剪碎,经多步差速离心获取乳白色病毒悬液,

置于4 °C保存备用, 所有操作在冰浴下进行。获取的WSSV悬液参照秦崇涛等^[21]的方法, 测定OD₆₀₀并计算出病毒悬液浓度为10⁸拷贝/μL。

养殖实验其中一组用于投喂攻毒, 另一组用于浸泡攻毒, 攻毒期间阴性对照组仍投喂普通饵料。投喂攻毒之前饥饿处理对虾12 h, 于液氮下充分研磨病料的肌肉组织, 使其成为细小颗粒后等量投喂于各处理组, 投喂量按对虾体质量的3%进行。攻毒后每天记录对虾活跃情况以及死亡数, 7 d后结束感染实验。浸泡攻毒参照Witteveldt等^[14]的方法, 阴性对照组使用TAE溶液, 阳性对照组、野生型组、空载体组和实验组用WSSV悬液浸泡, 分别浸泡攻毒4 h, 病毒浓度达10¹⁰ 拷贝/mL, 攻毒后立刻用低浓度聚维酮碘以及大量海水冲洗, 并转移至不含WSSV的海水中, 感染后各处理组继续投喂人工饵料和卤虫。

攻毒结束后投喂时间与之前保持一致, 每日14:00换水, 换水量为1/3, 据实际情况进行日投喂量的调整。时刻观察对虾的死亡情况, 及时捞出死虾并记录, 避免对虾残食现象。记录攻毒后20 d对虾的死亡数。投喂攻毒和浸泡攻毒均根据对虾累计死亡情况统计死亡率, 计算存活率。

病毒分子检测 按照海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)的方法提取死亡对虾以及阴性对照组对虾的DNA。采用Mendoza-Cano等^[22]使用的vp28引物进行PCR扩增, vp28正向引物为5'-AGGTGTGGAACAACACATCAAG-3', 反向引物为5'-TGCCAACTTCATCCTCATCA-3'。PCR体系包括12.5 μL 2×PCR MasterMix(天根生化科技有限公司, 北京), 引物(10 μmol/L)各1 μL, 1 μL模板, ddH₂O补足至25 μL。PCR扩增程序: 95 °C预变性4 min; 94 °C变性45 s, 57 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 共30个循环; 72 °C终延伸7 min。DNA经1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

免疫参数检测 取免疫2、24、48、96以及168 h的对虾, 用于分析免疫期间酚氧化酶(PO)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和碱性磷酸酶(AKP)活性变化情况。另取投喂攻毒前对虾、投喂攻毒和浸泡攻毒后开始出现大量死亡时期的对虾, 分析幼虾SOD在投喂攻毒前后的变化情况, 以及攻毒后虾体内的

PO、CAT、酸性磷酸酶(ACP)和AKP活性变化。用小号眼科解剖刀和镊子取出肌肉、肝胰腺, -80 °C保存备用。

SOD活性测定采用南京建成生物工程研究所的T-SOD试剂盒。

PO活性测定参照Ashida^[23]的方法, 以L-Dopa为底物, 将100 μL肝胰腺组织在25 °C条件下与50 μL胰蛋白酶(1 mg/mL)共同孵育10 min, 再将100 μL 0.1 mol/L pH 6.0的磷酸盐缓冲液和50 μL 0.01 mol/L L-Dopa溶液于室温下混匀, 每隔2 min在酶标仪中读取在490 nm波长, 以空白组织样液作阴性对照。

CAT活性测定采用南京建成生物工程研究所的CAT试剂盒, 紫外比色法。

AKP和ACP活性测定分别采用南京建成生物工程研究所的AKP试剂盒和ACP试剂盒, 采用分光光度计法。

1.3 数据处理

实验结果采用平均值±标准差(mean±SD)的表示方法, 数据用Excel 2007和Origin Pro 8.0进行处理, 并用SPSS 19.0分析软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 转vp28蓝藻口服剂对凡纳滨对虾生长的影响

摄食空载体组和实验组藻的幼虾相对增长率显著高于阴性对照组($P < 0.05$), 摄食野生型组、空载体组和实验组藻的幼虾相对增重率显著高于阴性对照组($P < 0.05$)。特别是口服免疫7 d后, 实验组幼虾体长增加50%, 显著高于阴性对照组、阳性对照组和野生型组($P < 0.05$); 实验组幼虾相对增重2.83倍, 显著高于阴性对照组和阳性对照组($P < 0.05$)(表1)。实验结果表明蓝藻作为幼虾的优良饵料的确能够促进对虾生长。

2.2 转vp28蓝藻口服剂对凡纳滨对虾抗WSSV感染的效果

投喂攻毒累积死亡率实验结果显示, 对虾从第2天开始死亡, 阳性对照组第2天死亡率为5.77%, 而其余组未死亡。第4天阳性对照组累积死亡率达75%, 野生型组累积死亡率为7.69%、

表 1 凡纳滨对虾幼虾免疫强化前后体长和体质量变化情况

Tab. 1 Juvenile *L. vannamei* length and weight before and after immunization strengthening

组别 group	免疫前体长/cm before immunization strengthening	免疫后体长/cm after immunization strengthening	相对增长率/% relative length gain	免疫前体质量/g before immunization strengthening	免疫后体质量/g after immunization strengthening	相对增重率/% relative weight gain
阴性对照组 negative control	2.15±0.13	3.02±0.10 ^a	40.5±1.87 ^a	0.056±0.008	0.174±0.010 ^a	210.71±20.32 ^a
阳性对照组 positive control	2.26±0.15	3.12±0.12 ^{ab}	38.0±2.12 ^{ab}	0.060±0.010	0.190±0.010 ^a	216.67±18.57 ^a
野生型组 wild type	2.30±0.10	3.25±0.05 ^{ab}	41.3±2.05 ^{ab}	0.065±0.009	0.215±0.030 ^b	230.77±16.75 ^b
空载体组 blank	2.36±0.36	3.35±0.10 ^{bc}	41.9±1.03 ^{bc}	0.070±0.008	0.235±0.035 ^{bc}	235.71±17.65 ^{bc}
实验组 experiment	2.20±0.07	3.30±0.05 ^c	50.0±1.42 ^c	0.060±0.008	0.230±0.010 ^d	283.33±19.85 ^d

注：同列中不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

Notes: in the same row, values with different small letter superscripts meant significant differences (P<0.05)

空载体组为46.20%、实验组为3.85%、阴性对照组未出现死亡。第5天阳性对照组、野生型组以及空载体组累积死亡率显著增加，分别高达90.40%、82.70%和80.80%，而实验组仅7.69%。第7天除阴性对照组未出现死亡外，实验组累积死亡率为21.20%，其他组累积死亡率均达100% (图1-a)。

浸泡攻毒累积死亡率结果显示，实验持续17 d，实验过程中阴性对照组未出现死亡。其他组对虾在第5天开始出现死亡，阳性对照组死亡率为5.04%；随着攻毒实验时间的延长，累积死亡率逐渐上升，第8天阳性对照组以及野生型组累积死亡率分别高达84.87%和79.83%、空载体组

为52.10%、而实验组累积死亡率仅8.40%；第11天所有攻毒对照组死亡率为100%、实验组累积死亡率为16.81%，且持续7 d保持稳定(图1-b)。

2.3 对虾感染(攻毒)分子检测

以vp28基因特异性引物进行PCR扩增，扩增的PCR片段预期大小为140 bp。通过PCR扩增及电泳结果可知，感染前野生型组以及空载体组的WSSV呈阴性，投喂转vp28蓝藻7 d且感染前的实验组、阳性对照组、感染WSSV后的实验组、野生型组以及空载体组的WSSV呈阳性(均扩增出目的条带)，而阴性对照组的WSSV呈阴性(图2)。感染前的实验组具有阳性扩增条带，表明对虾

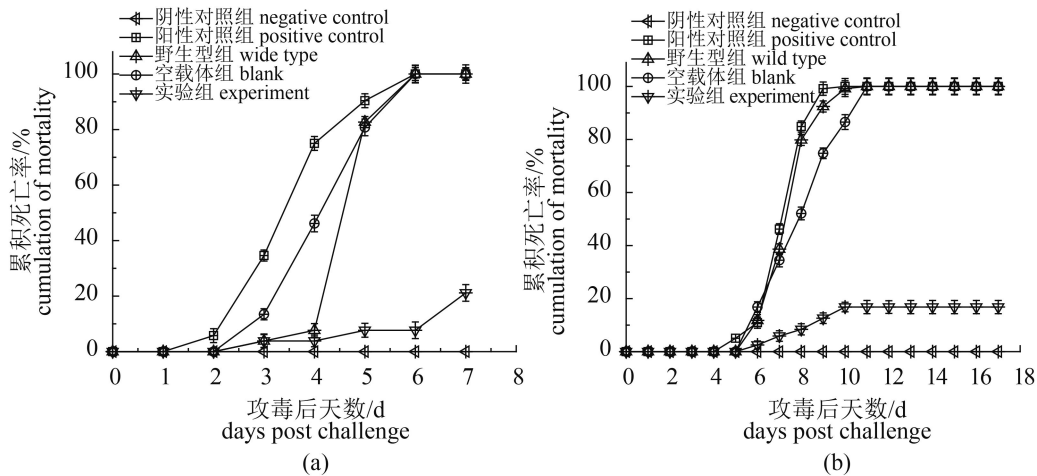


图 1 感染WSSV后凡纳滨对虾累积死亡率

(a)、(b)分别表示投喂感染和浸泡感染WSSV后凡纳滨对虾累积死亡率

Fig. 1 Cumulative mortality of *L. vannamei* after WSSV infection

(a) and (b) represent *L. vannamei*'s cumulative mortality of feeding and immersing infection

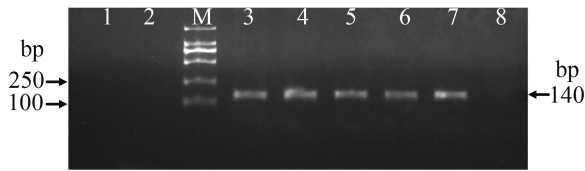


图2 攻毒后各组凡纳滨对虾体内WSSV PCR检测

M. DNA Marker DL 2000; 1. 攻毒前野生型组; 2. 攻毒前空载体组; 3. 阳性对照组; 4. 攻毒后野生型组; 5. 攻毒后空载体组; 6. 攻毒后实验组; 7. 攻毒前实验组; 8. 阴性对照组

Fig. 2 PCR test for WSSV in *L. vannamei* post challenge

M. DNA Marker DL 2000; 1. wide type (before challenge); 2. blank (before challenge); 3. positive control; 4. wide type (post challenge); 5. blank (post challenge); 6. experiment (post challenge); 7. experiment (before challenge); 8. negative control

确实已口服转vp28蓝藻; 攻毒后的对虾也出现vp28阳性扩增条带, 表明对虾确为WSSV感染致死。

2.4 免疫指标检测

转vp28蓝藻口服剂免疫对虾对其酶活性的影响 分析不同时间点凡纳滨对虾体内酶活性, 发现酶活性变化呈现一定的趋势。SOD、PO、CAT和AKP活性在免疫后2 h呈明显上升趋势, 在48或96 h达到最高水平。

转vp28蓝藻口服剂免疫对虾2 h后, 对虾体内SOD活性明显提高, 到第48 h时SOD活性达到最高值, 与免疫前差异显著($P<0.05$); 第168 h时, SOD活性恢复到最初水平(图3)。

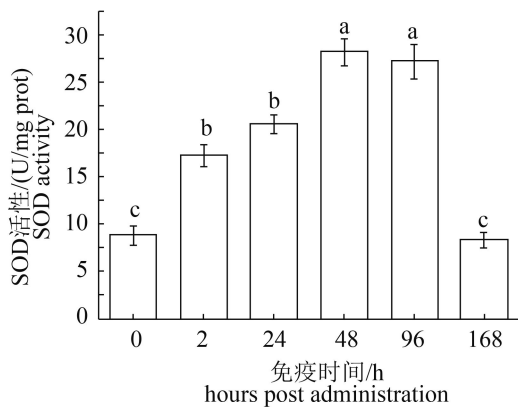


图3 免疫转vp28蓝藻后凡纳滨对虾肌肉SOD活性变化

不同上标字母表示差异显著($P<0.05$), 下同

Fig. 3 SOD variation of shrimp muscle after administrating *Anabaena*-expressed vp28

The columns with different letters in different groups are significantly different ($P<0.05$), the same below

转vp28蓝藻口服剂免疫对虾2 h后, 对虾体内PO活性开始提高, 到96 h时对虾体内PO活性达到最高值。第96 h时PO活性比免疫前高130.13%, 差异极显著($P<0.01$)。这说明口服剂能激活对虾体内酚氧化酶原系统, 从而引起PO活性增强(图4)。

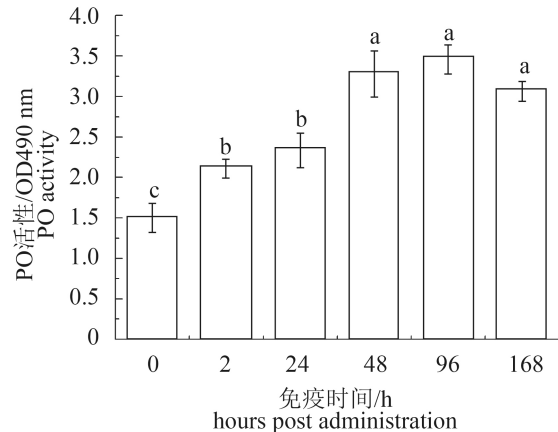


图4 免疫转vp28蓝藻后凡纳滨对虾肝胰腺PO活性变化

Fig. 4 PO variation of *L. vannamei* hepatopancreas after administrating *Anabaena*-expressed vp28

免疫2、24和48 h对虾肌肉CAT活性变化不明显; 到第96 h时, CAT活性显著增强, 比免疫前提高2.5倍($P<0.01$); 而在对虾肝胰腺中, 免疫2 h后CAT活性开始上升, 到第48 h CAT活性达到最高值, 与免疫前差异显著($P<0.05$), 此后酶活性开始降低(图5)。

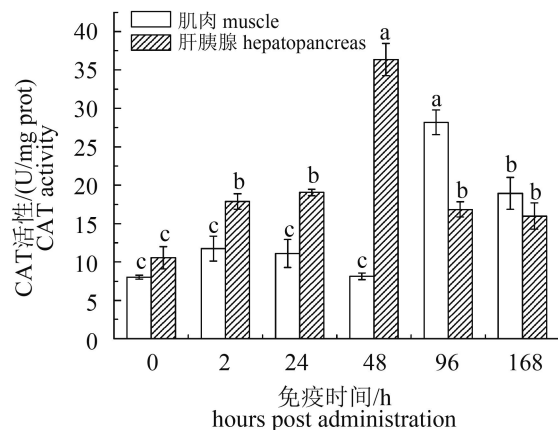


图5 免疫转vp28蓝藻后凡纳滨对虾肌肉和肝胰腺CAT活性变化

Fig. 5 CAT variation of *L. vannamei* muscle and hepatopancreas after administrating *Anabaena*-expressed vp28

对虾肝胰腺中AKP活性明显高于肌肉，免疫48 h肝胰腺活性达到较高值，比免疫前对虾肝胰腺酶活性高4.28倍($P < 0.05$)，同时免疫第48 h肌肉中AKP活性也达到最高水平(图6)。

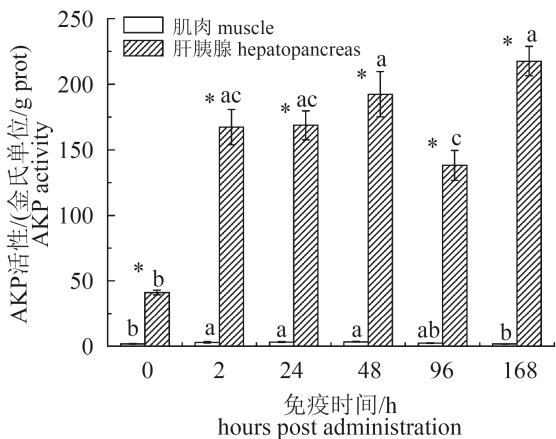


图6 免疫转vp28蓝藻后凡纳滨对虾肌肉和肝胰腺AKP活性变化

不同组上标字母不同表示差异显著($P < 0.05$)；*表示不同组同一时间差异显著($P < 0.05$)，下同

Fig. 6 AKP variation of *L. vannamei* muscle and hepatopancreas after administrating *Anabaena*-expressed vp28

The columns with different letters in different groups are significantly different ($P < 0.05$); * means significant difference under same stage at different groups ($P < 0.05$), the same below

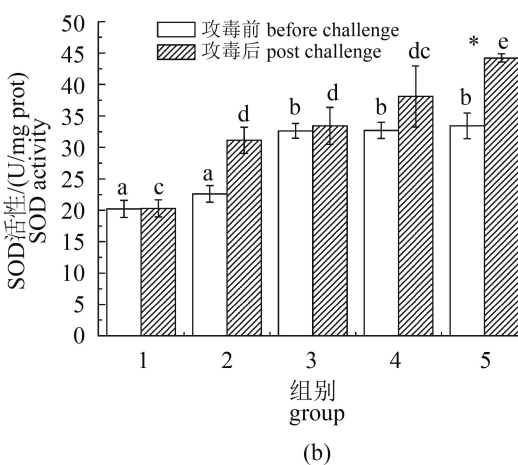
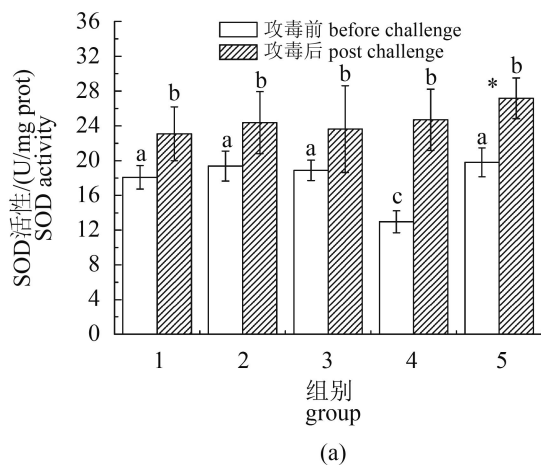


图7 阴性对照组以及投喂感染WSSV前后各组凡纳滨对虾肌肉、肝胰腺SOD的变化

(a)阴性对照组以及投喂感染WSSV前后各组凡纳滨对虾肌肉SOD变化；(b)阴性对照组以及投喂感染WSSV前后各组凡纳滨对虾肝胰腺SOD变化；1. 阴性对照组；2. 阳性对照组；3. 野生型组；4. 空载体组；5. 实验组

Fig. 7 SOD variation of the negative control and other groups' *L. vannamei*'s muscle, hepatopancreas before and post WSSV-infection

(a) SOD variation of the negative control and other control *L. vannamei*'s muscle before and post WSSV-infected; (b) SOD variation of the negative control and other control *L. vannamei*'s hepatopancreas before and post WSSV-infection; 1. negative control; 2. positive control; 3. wild type; 4. blank; 5. experiment

投喂攻毒对幼虾体内酶活性的影响 感染前实验组肌肉中SOD活性分别比阴性对照组、阳性对照组、空载体组和野生型组高9.56% ($P > 0.05$)、2.28% ($P > 0.05$)、52.70% ($P < 0.05$)和4.90% ($P > 0.05$)。同时投喂感染WSSV第4天各对照组大量死亡，各组对虾肌肉中SOD活性均比感染前增强，感染后实验组活性为27.17 U/mg prot，阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组活性分别为23.08、24.37、23.63和24.70 U/mg prot，实验组分别比阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组对虾提高17.70%、11.50%、15.00%以及10.00% ($P > 0.05$)，且感染后实验组比感染前高出37.19% ($P < 0.05$) (图7-a)。

肝胰腺中(图7-b)，感染前实验组SOD活性为33.41 U/mg prot，分别比阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组高65.15% ($P < 0.05$)、47.71% ($P < 0.05$)、2.40% ($P > 0.05$)和2.19% ($P > 0.05$)。感染后实验组SOD活性44.20 U/mg prot，阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组活性分别为20.32、31.10、33.42和38.09 U/mg prot，实验组与阴性对照组、阳性对照组和野生型组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。感染后实验组SOD活性比感染前高32.30% ($P < 0.05$)，而感染后野生型组比感染前仅高2.42% ($P > 0.05$)。

对虾PO多数存在于颗粒血细胞以及肝胰腺中, 鉴于对虾体格较小, 选取投喂攻毒出现大量死亡时期对虾的肝胰腺为对象, 检测PO活性。结果显示实验组PO活性为1.784(OD), 实验组比阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组分别高17.18%、12.17%、21.49%和32.21%。实验组PO活性显著高于野生型组以及空载体组($P<0.05$)(图8)。

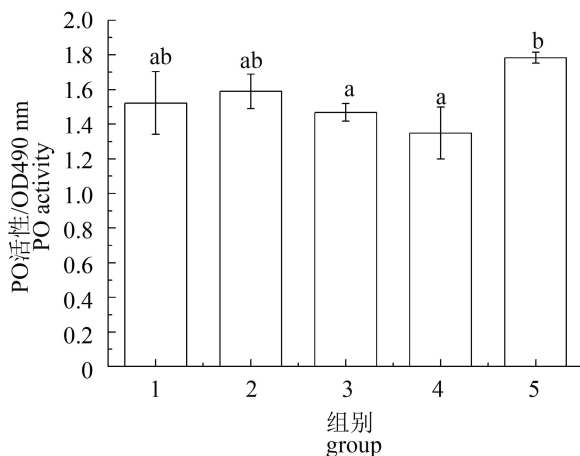


图8 阴性对照以及投喂感染WSSV的各组凡纳滨对虾肝胰腺PO的活性

Fig. 8 PO activity of the negative control and other groups' *L. vannamei* hepatopancreas post WSSV-infection

攻毒后对虾出现大量死亡时, 实验组和对照组对虾体内CAT差异显著($P<0.05$)。与对照组相比, 实验组对虾肌肉CAT活性分别比阳性对照组、野生型组和空载体组高49.50%、47.60%、45.60%($P<0.05$)。在肝胰腺中变化更为显著, 实验组分别比阳性对照组、野生型组和空载体组高88.80%、30.90%和100% ($P<0.05$)(图9)。

转vp28蓝藻PCC7120能提高凡纳滨对虾的AKP活性(图10), 特别在肝胰腺中, AKP活性显著高于肌肉($P<0.05$)。肝胰腺中实验组AKP活性为159.46金氏单位/g prot, 阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组分别为11.19、46.89、52.27和65.25金氏单位/g prot, 实验组显著高于其他处理组($P<0.05$), 且在肝胰腺中野生型组、空载体组AKP活性也显著高于阴性对照组($P<0.05$)。此外, 实验组肌肉AKP活性显著高于其他处理组($P<0.05$)。

对虾检测结果表明, 在肌肉和肝胰腺中ACP活性均存在。实验组肝胰腺ACP活性为90.66 U/g prot, 阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体

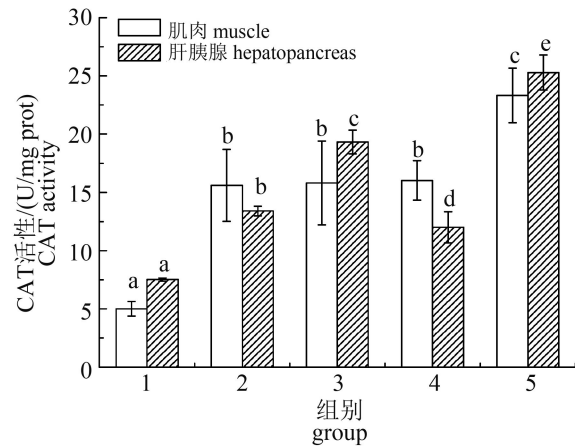


图9 阴性对照组以及投喂感染WSSV的各组凡纳滨对虾肌肉和肝胰腺CAT的活性

Fig. 9 CAT activity of the negative control and other groups' *L. vannamei*'s muscle and hepatopancreas before and post WSSV-infection

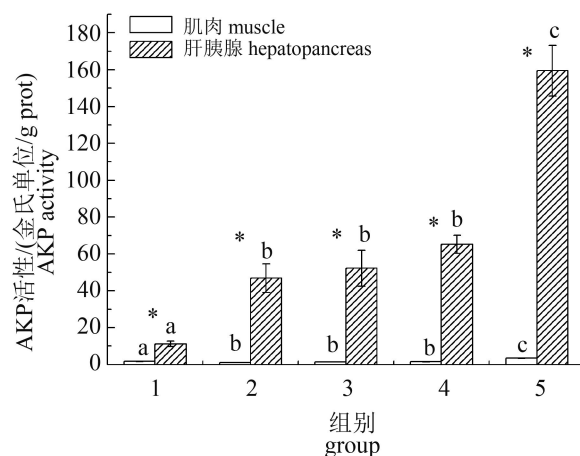


图10 阴性对照组以及投喂感染WSSV的各组凡纳滨对虾肌肉和肝胰腺AKP的活性

Fig. 10 AKP activity of the negative control and other groups' *L. vannamei*'s muscle and hepatopancreas before and post WSSV-infection

组分别为87.96、75.84、66.03、79.90 U/g prot; 实验组肌肉ACP活性为20.09 U/g prot, 阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组分别为24.12、23.40、21.20、21.97 U/g prot, 均无显著差异($P>0.05$)(图11)。

浸泡攻毒对凡纳滨对虾幼虾体内酶活性的影响 对虾免疫7 d后进行浸泡攻毒, 取出现大量死亡时间段的对虾检测其肝胰腺PO活性。结果显示, 实验组PO活性为2.395(OD), 阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组分别为2.169、1.964、1.870、1.773, 分别比阴性对照

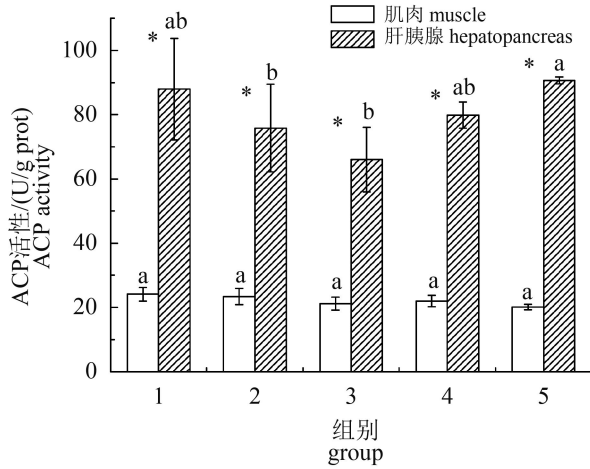


图 11 阴性对照组以及投喂感染WSSV的各组凡纳滨对虾肌肉和肝胰腺ACP的活性

Fig. 11 ACP activity of the negative control and other groups' *L. vannamei*'s muscle and hepatopancreas before and post WSSV-infection

组、阳性对照组、野生型组和空载体组提高10.40%、22.10%、28.10%和35.10%，实验组PO活性显著高于阳性对照组、野生型组和空载体组 ($P<0.05$)(图12)。

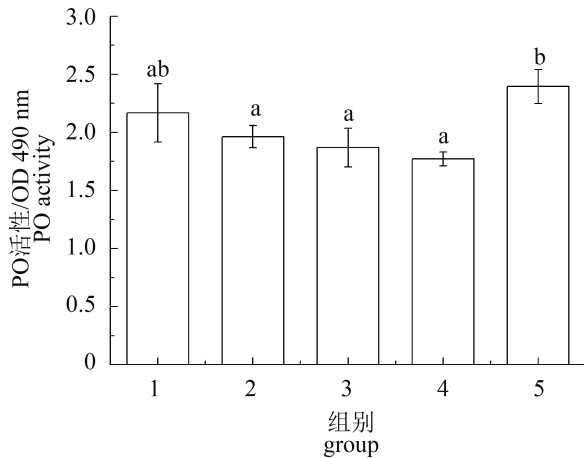


图 12 阴性对照组以及浸泡感染WSSV的各组凡纳滨对虾肝胰腺PO的活性

Fig. 12 PO activity of the negative control and other groups' *L. vannamei* hepatopancreas post WSSV-infection

取上述同时时间段的对虾，检测其肌肉中CAT活性，结果显示，实验组CAT活性比阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组高313.78%、570.33%、161.68%和278.67% ($P<0.01$)，这种变化比投喂攻毒更加显著(图13)。

转vp28蓝藻能提高凡纳滨对虾AKP活性。

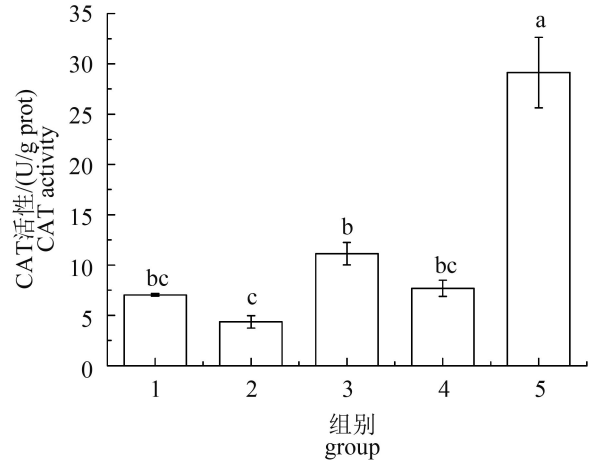


图 13 阴性对照组以及浸泡感染WSSV的各组凡纳滨对虾肌肉CAT的活性

Fig. 13 CAT activity of the negative control and other groups' *L. vannamei*'s muscle before and post WSSV-infection

结果显示，实验组显著高于其余各组AKP活性 ($P<0.05$)，分别比阴性对照组、阳性对照组、野生型组和空载体组高23.97%、233.05%、58.26%和59.52% ($P<0.05$)。同时空载体组、野生型组肌肉中AKP活性显著高于阴性对照组 ($P<0.05$)(图14)。

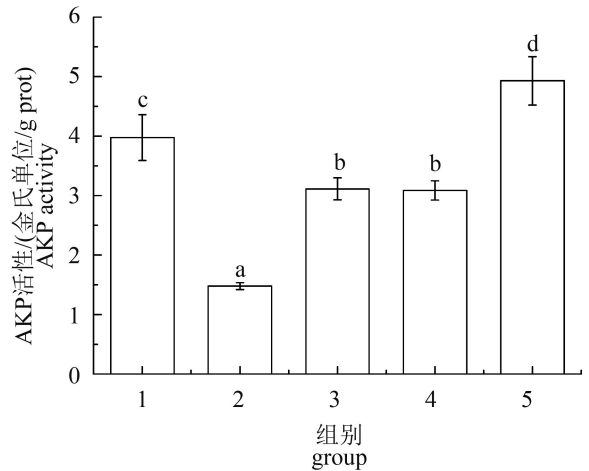


图 14 阴性对照组以及浸泡感染WSSV的各组凡纳滨对虾肌肉AKP的活性

Fig. 14 AKP activity of the negative control and other groups' *L. vannamei*'s muscle before and post WSSV-infection

浸泡攻毒的对虾检测结果表明，对虾肌肉中ACP活性均存在，阴性对照组、阳性对照组、野生型组、空载体组和实验组ACP活性分别为22.566、16.456、26.159、23.864和21.230 U/g prot，实验组与其余各组间无显著性差异 ($P>0.05$)(图15)。

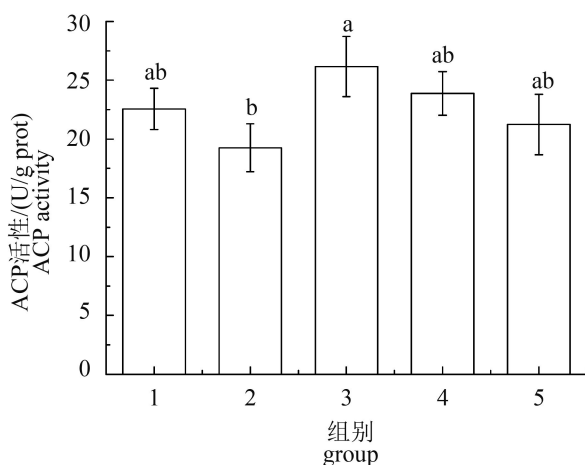


图 15 阴性对照组以及浸泡感染WSSV的各组凡纳滨对虾肌肉ACP的活性

Fig. 15 ACP activity of the negative control and other groups' *L. vannamei*'s muscle before and post WSSV-infection

3 讨论

蓝藻PCC7120可作为饵料直接投喂幼虾,且生长速率较快、培养成本低、通常不含内毒素、含蛋白酶较少、蛋白产物不形成包含体等,是表达外源基因的优良宿主之一^[24]。已有研究表明,蓝藻与其他模式生物一样,适合对外源基因进行表达^[25]。Jia等^[1]将vp28基因连接质粒构建穿梭表达载体并转入大肠杆菌,再通过三亲结合转移法,将白斑综合征病毒囊膜蛋白vp28基因转入蓝藻7120获得重组菌株,且用荧光定量PCR和Western blotting技术检测,其vp28基因蛋白表达量高达1.03%,并且对对虾具有显著地抗病毒保护效应。此外,蓝藻口服剂作为一种灭活亚单位疫苗,与DNA疫苗、RNA疫苗相比具有更强的应用性。本研究探讨了投喂转vp28蓝藻口服剂对凡纳滨对虾的保护效果及相应的免疫反应。

攻毒实验结果显示,实验组投喂攻毒和浸泡攻毒存活率分别高达78.80%和83.19%,且投喂攻毒后3~7 d(浸泡攻毒后5~17 d)对虾死亡率明显低于对照组。Feng等^[26]用含vp28基因的盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)制备一种新型口服亚单位疫苗,对虾在口服转vp28盐生杜氏藻后存活率高达59%,阳性对照组100%死亡。这提示含WSSV囊膜蛋白VP28的盐生杜氏藻可能增强了抗WSSV保护效应,特异性提高对虾免疫力。且本实验免

疫7 d后实验组、野生型组和空载体组的相对增长率和相对增重率均增加,证实了口服剂作为幼虾的优良饵料的确能够促进对虾生长。

为探究转vp28蓝藻口服剂对凡纳滨对虾免疫反应的影响,本实验分析了SOD、PO、CAT、AKP和ACP的活性,这些酶是反映机体免疫特性和抗病力强弱的重要指标^[27-29]。PO系统在甲壳动物体液免疫中起着重要作用^[30]。PO以酶原形式存在于血细胞中,其被活化后产生高活性的物质——黑色素和醌,引起吞噬作用和包囊化作用,抑制甚至杀死入侵的病原体^[31]。活化的血细胞同时产生其他杀菌物质,如H₂O₂和超氧阴离子(O₂^{-·}),有毒的(O₂^{-·})能够快速地被SOD催化生成H₂O₂和O₂,H₂O₂进而经过CAT分解成H₂O,保证机体内自由基代谢平衡。SOD是一种重要的抗氧化酶^[32],本实验结果显示,投喂蓝藻后对虾体内SOD、PO、CAT、AKP和ACP活性随时间动态变化,在第48或96 h酶活性处在较高水平,投喂攻毒和浸泡攻毒对幼虾免疫指标产生类似影响,且投喂攻毒后实验组肌肉SOD活性比对照组略微增强,实验组肝胰腺中SOD活性较其余组显著增强,且不论是在肌肉还是肝胰腺中实验组攻毒后与攻毒前差异显著,推测该口服剂能促进对虾体内,特别是对虾重要的免疫器官肝胰腺中SOD活性的提高,一定程度上增强了对虾的免疫力。投喂攻毒后实验组CAT活性增强,且对虾肝胰腺中活性更是高于对照组,同时浸泡攻毒的实验组CAT活性也显著高于其余处理组(P<0.05)。该结果与何晓东等^[33]用纯化融合蛋白免疫对虾7 d后,实验组对虾SOD和CAT表达量显著提高相符合。衣启麟等^[34]和Arts等^[35]认为酚氧化酶活性的升高与对虾抗WSSV能力直接相关。而本实验投喂攻毒和浸泡攻毒后实验组肝胰腺PO活性显著高于其他组对虾(P<0.05),推测口服剂提高了对虾免疫反应,从而增强对虾抗病力。Fu等^[36]将表达VP28的重组大肠杆菌(rVP28-bs)添加进饵料进行口服免疫中国明对虾,发现在免疫后14 d对虾PO和SOD活性达到最高水平,显著高于阴性对照组。丁晶等^[37]以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为活载体口服递呈对虾WSSV囊膜蛋白VP28的研究结果表明,其能显著提高对虾proPO活性(P<0.05)。Taju等^[38]向对虾注射dsRNA-VP28,实验组对虾proPO和SOD水平也不同程度地提高。Rajesh等^[39]用含vp28基因的DNA

疫苗免疫斑节对虾(*P. monodon*), 实验组对虾存活率为56.6%~90.0%, 同时对虾体内的proPO和SOD水平增加, 表明该疫苗可能增强对虾抵抗WSSV能力并提高对虾免疫力。

ACP和AKP是溶酶体酶的重要组成部分, 具有清除、水解、消化异物的作用, 对于虾的生存具有重要意义^[40]。Li等^[41]向凡纳滨对虾接种含vp28的DNA疫苗并检测免疫后对虾AKP活性, 结果发现在14 d AKP活性达到最高值, 显著高于PBS对照组($P<0.05$)。本实验结果表明肝胰腺AKP活性显著高于肌肉, 且实验组攻毒后肝胰腺变化更为显著($P<0.05$), 转vp28蓝藻7120能提高凡纳滨对虾的AKP活性。投喂攻毒后实验组肝胰腺ACP高于其他组($P<0.05$), 各对照组间无显著差异($P>0.05$); 浸泡攻毒得到类似结果。这可能是转vp28蓝藻7120以一定方式刺激了AKP和ACP等酶活性的提高, 且肝胰腺中AKP和ACP活性较强。以上研究表明, 投喂转vp28蓝藻7120口服剂能刺激对虾产生WSSV抗性, 可以激活相关酶活性以提高对虾的防御能力。

综上所述, 蓝藻口服剂能显著增强凡纳滨对虾抗WSSV能力, 且攻毒后实验组对虾免疫相关的SOD、PO、CAT、AKP和ACP活性均有不同程度的增强。同时给虾口服药物是唯一具有实际应用意义的免疫方式, 目前口服法均用于免疫成虾, 可能影响免疫力的持久性。本研究将VP28的编码基因转入蓝藻表达, 一方面蓝藻本身可作为仔虾的饵料, 其优于其他宿主; 另一方面是转vp28蓝藻可以作为口服疫苗, 在中医上属于“药食同源”^[1]。本研究为转基因蓝藻应用到对虾产业中, 成为对虾养殖中抵抗WSSV的有效药物提供理论基础。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1999, 38(2): 65-69.
- He J G, Zhou H M, Yao B, *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSBV) host range and transmission route[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni (Natural Science Edition)*, 1999, 38(2): 65-69(in Chinese).
- [3] Badhul H M A, Vignesh R, Srinivasan M. Deep insight into white spot syndrome virus vaccines:a review[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2012, 2(1): 73-77.
- [4] Ding Z F, Yao Y F, Zhang F X, *et al.* The first detection of white spot syndrome virus in naturally infected cultured Chinese mitten crabs, *Eriocheir sinensis* in China[J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 220: 49-54.
- [5] 刘飞. 中国大陆几株WSSV毒株毒力测定及分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- Liu F. Determination and analysis for virulence of WSSV strains from mainland of China[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013 (in Chinese).
- [6] He F, Fenner B J, Godwin A K, *et al.* White spot syndrome virus open reading frame 222 encodes a viral E3 ligase and mediates degradation of a host tumor suppressor via ubiquitination[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(8): 3884-3892.
- [7] 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.
- [8] Moser J R, Álvarez D A G, Cano F M, *et al.* Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans[J]. *Aquaculture*, 2012, 326-329: 9-14.
- [9] Rowley A F, Powell A. Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific?[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 179(11): 7209-7214.
- [10] Kurtz J, Armitage S A O. Alternative adaptive immunity in invertebrates[J]. *Trends in Immunology*, 2006, 27(11): 493-496.
- [11] 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.
- [12] Venegas C A, Nonaka L, Mushiaki K, *et al.* Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 42(2): 83-89.
- [13] van Hulten M C W, Witteveldt J, Snippe M, *et al.* White

- spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp[J]. *Virology*, 2001, 285(2): 228-233.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Rowley A F, Pope E C. Vaccines and crustacean aquaculture—a mechanistic exploration[J]. *Aquaculture*, 2012, 334-337: 1-11.
- [17] 施定基, 贾晓会, 张春莉, 等. 一种阻断白斑综合症病毒感染对虾的口服剂及其制备方法和应用: CN103272229A[P]. 2013-09-04.
- Shi D J, Jia X H, Zhang C L, *et al.* Oral agent for blocking prawns from infecting white spot syndrome viruses, and preparation method and application thereof: CN103272229A[P]. 2013-09-04 (in Chinese).
- [18] Yang F, He J, Lin X, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(23): 11811-11820.
- [19] 邓康裕, 孔杰, 孟宪红, 等. 聚β-羟基丁酸酯对凡纳滨对虾抗WSSV能力及免疫基因表达量的影响[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(5): 877-886.
- Deng K Y, Kong J, Meng X H, *et al.* Effects of poly-β-hydroxybutyrate on non-specific immune gene expression and WSSV resistance in WSSV-infected *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(5): 877-886(in Chinese).
- [20] Xie X X, Li H Y, Xu L M, *et al.* A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles[J]. *Virus Research*, 2005, 108(1-2): 63-67.
- [21] 秦崇涛, 杨丰. 一种简单快速测定对虾白斑综合症病毒浓度方法的建立[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(20): 30-34.
- Qin C T, Yang F. Evaluate the concentration of purified white spot syndrome virus with spectrophotometry[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(20): 30-34(in Chinese).
- [22] Mendoza-Cano F, Sánchez-Paz A. Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the White Spot Syndrome Virus in marine crustaceans[J]. *Virology Journal*, 2013, 10: 186.
- [23] Ashida M. Purification and characterization of prephenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1971, 144(2): 749-762.
- [24] 张春莉. WSSV囊膜蛋白vp28基因在蓝藻中克隆和表达[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2002.
- Zhang C L. Cloning of envelope protein vp28 gene of WSSV and its expression in cyanobacteria[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, 2002 (in Chinese).
- [25] Jia X H, Zhang P P, Shi D J, *et al.* Regulation of *pepc* gene expression in *Anabaena* sp. PCC 7120 and its effects on cyclic electron flow around photosystem I and tolerances to environmental stresses[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57(5): 468-476.
- [26] 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.
- [27] Sivagnanavelmurugan M, Thaddaeus B J, Palavesam A, *et al.* Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 439-449.
- [28] 魏克强. 家蚕蛹表达的重组Vp28疫苗对克氏原螯虾免疫反应的影响[J]. *分子细胞生物学报*, 2006, 39(6): 527-536.
- Wei K Q. Influence of white spot syndrome virus envelope protein Vp28 expressed in silkworm (*Bombyx mori*) pupae on immune response in *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2006, 39(6): 527-536(in Chinese).
- [29] Kumaran T, Michaelbabu M, Selvaraj T, *et al.* Production of anti WSSV IgY edible antibody using herbal immunoadjuvant *Asparagus racemosus* and its immunological influence against WSSV infection in *Penaeus monodon*[J]. *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 2010, 2(1): 1-5.

- [30] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10(1): 23-28.
- [31] 陈昌福, 陈萱, 陈超然, 等. 水产甲壳动物的免疫防御机能及其免疫预防研究进展[J]. *华中农业大学学报*, 2003, 22(2): 197-203.
Chen C F, Chen X, Chen C R, *et al*. Advances in aquatic crustacean immunologic defence mechanisms and immunoprophylaxis[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2003, 22(2): 197-203.
- [32] Afsharnasab M, Kakoolaki S, Mohammadidost M. Immunity enhancement with administration of *Gracilaria corticata* and *Saccharomyces cerevisiae* compared to gamma irradiation in expose to WSSV in shrimp, in juvenile *Litopenaeus vannamei*: a comparative study[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 56: 21-33.
- [33] 何晓东, 刘庆慧, 黄捷. VP28和Hsp70融合蛋白对凡纳滨对虾抗WSSV感染的免疫保护效果[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(5): 17-23.
He X D, Liu Q H, Huang J. Immune protection effects of Fusion Protein of VP28 and Hsp70 to *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus infection[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(5): 17-23(in Chinese).
- [34] 衣启麟, 王玲玲, 宋林生. 对虾白斑综合征及其免疫防控[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).
- [35] Arts J A J, Taverne-Thiele A J, Savelkoul H F J, *et al*. Haemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(1): 164-170.
- [36] 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, 28(1): 49-55.
- [37] 丁晶, 王彦波, 傅玲琳. 以枯草芽孢杆菌递呈VP28对南美白对虾免疫相关基因表达和细胞特异性吞噬的影响[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(4): 705-711.
Ding J, Wang Y B, Fu L L. Immune-related genes expression and phagocytosis against white spot syndrome virus after oral delivery of vp28 using *Bacillus subtilis* as vehicles in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(4): 705-711(in Chinese).
- [38] Taju G, Madan N, Majeed S A, *et al*. Immune responses of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), to bacterially expressed dsRNA specific to vp28 gene of white spot syndrome virus[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2015, 38(5): 451-465.
- [39] Rajesh K S, Ishaq Ahamed V P, Sarathi M, *et al*. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(4): 467-478.
- [40] 常杰. 对虾和刺参敏感免疫学指标的筛选和评价[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
Chang J. Studies on sensitive immunology parameters screening and evaluation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010 (in Chinese).
- [41] 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.

Effect of *Anabaena*-expressed VP28 against white spot syndrome virus and related immune response in *Litopenaeus vannamei*

GUO Yuanyuan^{1,2}, YIN Rong^{1,2}, SHI Dingji³, ZHOU Yuan¹, HE Peimin^{1,2*},
WU Qianping^{1,2}, ZHUANG Minmin^{1,2}, WEI Zhangliang⁴, JIA Rui^{1,2*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Beijing 100093, China;

4. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: This paper described a kind of subunit vaccine, and the effect of *Anabaena*-expressed VP28 against white spot syndrome virus (WSSV) and the related immune response in *Litopenaeus vannamei*. Firstly, *L. vannamei* was orally administered by feeding *Anabaena*-expressed VP28 for 7 days. Secondly, the shrimp was challenged with WSSV and its mortality was monitored. Finally, the shrimp related immune index was measured. The results revealed that *Anabaena*-expressed vp28 can significantly improve the shrimp's ability against WSSV. The survival rate of feeding and immersing infected WSSV is 78.80% and 83.19% respectively. The results showed that oral agent can enhance the ability against WSSV in *L. vannamei*. After shrimp was administrated by *Anabaena*-expressed vp28, the shrimp enzyme activity at different time points showed that superoxide dismutase (SOD), phenoloxidase (PO), catalase (CAT), alkaline phosphatase (AKP) at 2 h after immunization were rising, and reached peak at 48 h or 96 h, which suggested that oral agent could cause the change of enzyme activity. The enzyme activity of shrimp hepatopancreas and muscle after feeding infection showed that the SOD activity of experimental group in hepatopancreas after challenge was 42.10%, 32.26% and 16.04% higher than those of the positive group, wide type group and blank group. In muscle, SOD activity was 17.70%, 11.50%, 15.00% and 10.00% higher than those of negative control, positive control, wide type and blank group after challenge. And the PO activity, CAT activity, and AKP activity of the experimental group were 12.17%, 88.80% and 240.07% higher than that of the positive control after challenge in hepatopancreas respectively. The PO activity, CAT activity, and AKP activity of the experimental group were 21.49%, 30.90% and 100% higher than that of wide type after challenge in hepatopancreas respectively. ACP activity was slightly higher than that of negative control, but ACP activity had no significant difference in the muscle groups. The results of shrimp PO, CAT, AKP and ACP activity of immersing infection were similar to feeding infection. The experiment group CAT and AKP activity after immersing infection is significantly higher than other groups, and the CAT activity of immersing infection were more significant than feeding infection. The PO activity of shrimp hepatopancreas of experiment group after immersing infection was significantly higher than those of positive control, wide type and blank, but ACP activity of different group was not significantly different. This paper showed that *Anabaena*-expressed vp28 can strengthen shrimp's resistance to WSSV and decrease the mortality of *L. vannamei* from white spot disease. The *Anabaena*-expressed vp28 can be drug and feed from the same feedstock without purification, which has great application potential for field use in large-scale production.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; white spot syndrome virus (WSSV); *Anabaena*-expressed vp28; immune response

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

JIA Rui. E-mail: rjia@shou.edu.cn

Funding projects: Chinese Ministry of Science and Technology "863" Program (2014AA093506); Shanghai Science and Technology Commission Project (16391903500)