

对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP53B 原核表达及抗血清的制备

姚迁会^{1,2} 覃冰^{1,2} 潘迎捷^{1,2} 王永杰^{1,2*}

(1. 上海海洋大学 食品学院 上海 201306)

(2. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室 上海 201306)

摘要:【目的】研究对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)囊膜蛋白 sVP53B 克隆、表达、纯化及抗血清制备。【方法】根据 WSSV 囊膜蛋白基因序列,设计引物,PCR 扩增出功能序列(Svp53B),构建到 pET-16b 载体后,转化至大肠杆菌 Rosetta 2 诱导表达,用 SDS-PAGE、Western blotting 检测优化表达。表达产物采用 Ni-NTA 琼脂糖磁珠进行纯化、割胶回收融合蛋白,以纯化的 Svp53B-his 为抗原,免疫兔子获得多克隆抗体,通过间接 ELISA 检测抗体的效价。【结果】构建重组质粒 pET-16b-Svp53B,在大肠杆菌 Rosetta 2 中以 1 mmol/L IPTG 诱导表达量最高,主要以包涵体形式表达。纯化包涵体蛋白免疫兔子,获得多克隆血清,效价达到 1:150 000。【结论】原核表达并纯化得到高纯度的 WSSV 囊膜蛋白 sVP53B,制备的兔源多克隆血清亲和力高、特异性好,这对后期进一步研究 VP53B 与经口侵染相关功能奠定了基础。

关键词: 对虾白斑综合征病毒, 囊膜蛋白, VP53B, 原核表达, 多克隆血清

Prokaryotic expression and serum preparation of envelope protein VP53B of white spot syndrome virus (WSSV)

YAO Qian-Hui^{1,2} QIN Bing^{1,2} PAN Ying-Jie^{1,2} WANG Yong-Jie^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

Abstract: [Objective] To clone, express and purify envelope protein sVP53B of WSSV (white spot syndrome virus) for polyclonal serum preparation. [Methods] Based on the GenBank sequence of WSSV *vp53B*, primers were designed, and PCR was done to amplify functional sequence of *Svp53B*. *Svp53B* was inserted into prokaryotic expression vector, pET-16b. Recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* Rosetta 2. The expression of sVP53B was detected by SDS-PAGE and Western blotting. The protein was purified with Ni-NTA agarose beads, then applied to immune rabbits for polyclonal serum detecting its titer by indirect ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). [Results] The sVP53B was expressed most by 1 mmol/L IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)

基金项目: 教育部高等学校博士点基金项目(No. 20133104110006); 上海市教委科研创新重点项目(No. 14ZZ144)

*通讯作者: ✉: yjwang@shou.edu.cn

收稿日期: 2015-01-05; 接受日期: 2015-03-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-08

inducing and mainly expressed as inclusion bodies. Polyclonal serum, prepared by immunizing rabbit, revealed a titer as high as 1:150 000. **[Conclusion]** Recombinant protein sVP53B was highly expressed in *E. coli* and showed high purity after purification. The prepared polyclonal serum had high affinity and specificity against sVP53B. The results pave the way for functional study of VP53B during WSSV oral infection.

Keywords: White spot syndrome virus, Envelope protein, VP53B, Prokaryotic expression, Polyclonal serum

对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV) 1992 年发现于中国台湾, 随后在中国大陆^[1]、日本^[2]、韩国^[3]、泰国^[4]、印度^[5]、美国^[6]、法国^[7]等世界各国及地区都有暴发。对虾白斑病病毒可以侵染多种水生生物, 如虾、蟹、水生节肢动物^[8], 3–10 d 内可造成对虾 100% 的死亡^[9]。对亚洲、美洲(北部、南部、中东部)以及世界其他地区的水产养殖业造成了严重的经济损失^[10–11]。WSSV 是 Nimaviridae 科 *Whispovirus* 属的唯一一种^[12–13], 目前已发现的 WSSV 有中国台湾株(WSSV-TW)^[14]、大陆株(WSSV-CN)^[15]、泰国株(WSSV-TH)^[16]和韩国株(WSSV-KR)^[17], 其基因组约 300 kb, 是目前发现的海洋病毒最大基因组之一^[14–18]。WSSV 病毒粒子具囊膜, 囊膜蛋白位于病毒粒子的最表面, 所以在侵染过程中, 病毒的囊膜蛋白首先会和宿主发生作用^[19–20]。近年来, 基因组学和蛋白质组学等研究发现 PmRab (*Penaeus monodon* Rab7)^[21]、ICP11^[22–23]和 PmCBP (*Penaeus monodon* chitin-binding protein)^[24–25]等参与 WSSV 的侵染; 而对于 WSSV 侵染至关重要的结构蛋白的研究也在不断的探索中, 如 VP28^[25–26]、VP26^[27–28]、VP53A^[20]等; 还有研究显示 WSSV 通过细胞膜穴样凹陷介导的内吞方式进入虾细胞侵染宿主^[29]。尽管 WSSV 的研究还在不断深入, 关于 WSSV 致病机理还是不清楚, 没有非常有效的方法可以阻断或防治其侵染。

VP53B 是 WSSV 的囊膜蛋白, 开放阅读框为 wsv115, 理论分子量 108 kD, 在病毒颗粒上的实际分子量为 53 kD^[30], 在被侵染 2 h 后开始表达^[31]。Wang 等^[32]发现 VP53B 与昆虫 DNA 病毒经口感染

因子 P74 有相似性, 且序列的保守区域主要位于 VP53B N 端前 300 aa。此外, VP53B、P74 (*Autographa californica* nucleopolyhedro virus, AcMNPV)两者均在 C 端含 3 个跨膜区。鉴于 P74 已被确认为昆虫 DNA 病毒经口感染关键因子^[33], 我们推测 VP53B 和 P74 很有可能进化自同一个古老病毒的蛋白, 其主要功能是对宿主的识别。VP53B 作为 WSSV 经口侵染对虾的关键囊膜蛋白的可能性非常高。所以, 我们选取 VP53B N 端前 350 个氨基酸的碱基序列(Svp53B)进行克隆, 构建到表达载体 pET-16b, 转化 Rosetta 2 菌株表达, 纯化出包涵体蛋白 sVP53B-His, 免疫兔子获得多克隆抗体, 通过 ELISA 检测血清效价达到 1:150 000 以上。这为后期进一步研究 VP53B 是 WSSV 经口侵染的关键因子奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)基因组 DNA 由国家海洋局第三海洋研究所(厦门)提供, 于–20 °C 保存。BCA 蛋白定量试剂盒、LB 培养基, 购自上海生工; 福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂, 购自美国 Sigma 公司; KOD-Plus 高保真酶, 购自杨凌伯泰生物有限公司; 克隆菌株 *Escherichia coli* DH5 α , 购自天根生化(北京)科技有限公司; 表达菌株 *Escherichia coli* Rosetta, 购自上海迈其有限公司。

1.2 方法

1.2.1 pET-16b-Svp53B 重组质粒构建: 根据预测的 VP53B 功能性区域 Svp53B 序列, 设计引物。正向引物 5'-GGAATTCCATATGATGGCAACATTTAC

TGAA-3' (下划线为 *Nde* I 酶切位点), 反向引物 5'-CGGGATCCTTATACACCTTCCCTATTAAC-3' (下划线为 *Bam*HI 酶切位点)。以对虾白斑综合征病毒基因组 DNA 为模板, 采用 KOD-Plus 高保真酶进行 PCR 反应(10×KOD-Plus 酶缓冲液 5 μL, 2 mmol/L dNTPs 5 μL, 25 mmol/L MgSO₄ 2 μL, 无菌水 34 μL, KOD-Plus 酶 1 μL, 模板 100 ng, 10 μmol/L 正向引物 1 μL, 10 μmol/L 反向引物 1 μL), 扩增目的片段。反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 15 s, 55 °C 30 s, 68 °C 1 min; 10 °C 保存。取 PCR 产物进行检测并纯化回收。*Svp53B* 与 pET-16b 载体进行连接, 转化 DH5α, 筛选阳性克隆, 提取重组质粒进行双酶切和测序验证。

1.2.2 pET-16b-Svp53B 表达及 SDS-PAGE、Western blotting 检测: pET-16b 及 pET-16b-Svp53B 重组质粒分别化学转化至 Rossetta 2。挑取单菌落, 转移至新鲜 LB 培养基中(含 100 g/L 氨苄), 37 °C、180 r/min 培养过夜。次日, 菌液按 1:100 稀释至新鲜含氨苄抗生素 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.5, 加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L), 37 °C、180 r/min 诱导培养 10 h。取 2 mL 菌液离心收集菌体, PBS 重悬菌体, 冰上超声破碎后 12 000 r/min 离心 5 min 分离收集上清及沉淀进行 SDS-PAGE。蛋白被分离后转至 PVDF 膜 400 mA 1 h, 转膜后用封闭液(10 °C 脱脂奶粉用洗涤液配置)封闭 1 h, 加入一抗二抗各 1 h 孵育。His 抗体: 1:10 000 稀释, 二抗 IgG-HRP: 1:5 000 稀释, ECL 显色(暗室操作)。

1.2.3 sVP53B-his 包涵体蛋白纯化及 SDS-PAGE 检测: 将含 pET-16b-Svp53B 重组质粒的 Rossetta 2 菌株扩大培养至 1 L 的 LB 氨苄培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.5, 1 mmol/L IPTG, 37 °C、180 r/min 诱导 3 h。诱导结束后 12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 磷酸缓冲液 PBS 重悬菌体、超声破碎, 12 000 r/min 离心 5 min 收集沉淀。沉淀用溶解液(100 mmol/L NaH₂PO₄; 10 mmol/L Tris-HCl; 8 mol/L 尿素; pH 8.0)室温溶解 1 h,

12 000 r/min 离心 20 min 收集上清, 用 0.45 μm 膜过滤后, 采用 Ni-NTA 琼脂糖磁珠对上清液室温过夜纯化, 3 000 r/min 离心 2 min 收集磁珠, 1 mL 磁珠洗涤液(100 mmol/L NaH₂PO₄; 10 mmol/L Tris-HCl; 8 mol/L 尿素; pH 6.3)清洗磁珠 3 次, 取上清加入上样缓冲液煮沸, 取 2 μL 样品用于 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 抗 VP53B 血清的制备: 取少量 sVP53B 纯化产物, 用 BCA 蛋白定量试剂盒定量目的蛋白。剩余的样品上样于单孔 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白。电泳结束后, 切取其中一小块胶体染色。根据染色结果及目的蛋白分子量大小, 用干净刀片切下未染色的目的胶块。将胶体磨碎, 磨碎后的胶体收集于干净的 1.5 mL 离心管, 加入蒸馏水于 4 °C 过夜渗透, 得到纯化的目的蛋白。将蛋白按比例与佐剂充分乳化后, 颈背部皮下多点(至少 8 点)注射, 免疫 2 只新西兰大白兔。此后, 每隔 14 d 加强一次免疫, 免疫 4 次。第 4 次要耳部静脉取血, 确定是否产生抗体, 确定后收集血液。

1.2.5 ELISA 法检测血清的效价: 使用 sVP53B 作为抗原, 用碳酸包被缓冲液(pH 9.6)稀释抗原至蛋白浓度为 5 mg/L, 每孔加入 100 μL, 4 °C 过夜包被。次日, 将酶标板中的液体倾尽, 用 PBST 洗涤 3 次后, 用 PBS 配置 5%脱脂奶粉封闭, 200 μL/孔, 37 °C 封 1.5 h, 再用 PBST 洗涤 3 次。将待检测抗体用 2.5%脱脂奶粉做不同倍数稀释, 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1 h 后用 PBST 洗涤 3 次。每孔加入 100 μL 用 2.5%脱脂奶粉做 1: 5 000 倍稀释的羊抗兔-HRP 抗体, 37 °C 孵育 1 h 后, 用 PBST 洗涤 3 次后, 加入底物显色液, 100 μL/孔, 暗处显色 30 min 后, 2 mol/L H₂SO₄ 终止液 50 μL/孔终止反应, 用酶标仪测 OD₄₉₂。

1.2.6 Western blotting 检测抗血清的特异性: pET-16b-Svp53B 重组质粒分别化学转化至 Rossetta。挑取单菌落, 转移至新鲜 LB 培养基中(含 100 mg/L 氨苄), 37 °C、180 r/min 培养过夜。次日,

菌液按 1:100 稀释至新鲜含氨苄抗生素 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.5。先取 100 μ L 菌液离心收集菌体为未诱导组, 加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L), 37 °C、180 r/min 继续诱导培养 4 h。取 100 μ L 菌液离心收集菌体为实验组总蛋白, PBS 重悬菌体, 等体积加入上样缓冲液煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE。蛋白被分离后转至 PVDF 膜 180 mA 45 min, 转膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗二抗各 1 h 室温孵育。中间用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。sVP53B 抗体 1:50 000 稀释, 二抗 IgG-AP 1:10 000 稀释, BCIP 底物显色。

2 结果与分析

2.1 pET-16b-Svp53B 重组质粒构建

琼脂糖凝胶电泳检测显示, *vp53B* N 端目的片段 *Svp53B* 通过 PCR 方式从 WSSV 基因组 DNA 中扩增出, 且分子量大小符合预期值(图 1A)。菌落 PCR 筛选出的 pET-16b-Svp53B 重组质粒 *Bam*H I 酶切结果显示, 酶切产物分子量大小与预期一致, 共为 6 761 bp (图 1B)。为确保插入序列的正确性, 酶切验证后的重组质粒进行测序, 测序结果显示

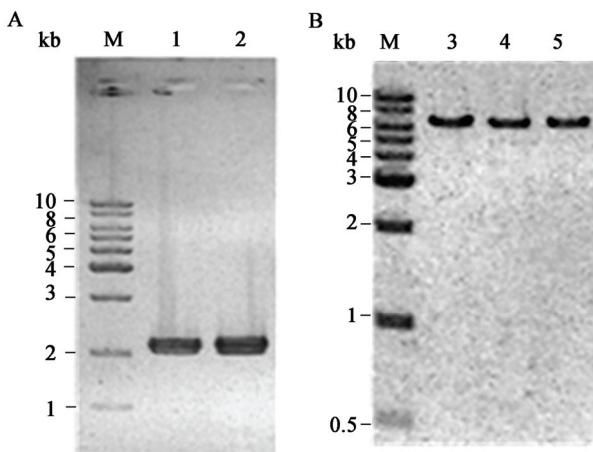


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测图谱

Figure 1 Electrophoretogram of agarose gel detection

注: M: 1 kb DNA 分子量 Marker; 1, 2: *Svp53B* PCR 产物 (1 050 bp); 3-5: pET-16b-Svp53B *Bam*H I 酶切产物(6 761 bp).

Note: M: 1 kb DNA marker; 1, 2: *Svp53B* PCR products (1 050 bp); 3-5: pET-16b-Svp53B *Bam*H I enzyme digestion products (6 761 bp).

Svp53B 序列插入正确, 说明 pET-16b-Svp53B 重组质粒构建成功, 可用于 sVP53B 蛋白表达。

2.2 pET-16b-Svp53B 表达及检测

蛋白质分子量预测显示, sVP53B 理论分子量约为 40 kD, 则 sVP53B-His 融合蛋白预期分子量约为 41 kD。SDS-PAGE、Western blotting 检测结果显示, sVP53B 在 pET-16b-Svp53B 体系中以包涵体的形式表达(图 2)。

2.3 sVP53B-his 包涵体蛋白纯化及检测

SDS-PAGE 检测显示, sVP53B-His 包涵体几乎完全溶于包涵体溶解液。同时, sVP53B-His 蛋白特异性的被 Ni-NTA 琼脂糖磁珠纯化且纯化效率很高(图 3A)。根据 SDS-PAGE 凝胶上已知的 BSA 量, 粗略估计 sVP53B-His 纯化产物每微升含约 1.5 μ g 蛋白(图 3B)。溶解足量 sVP53B-His 包涵体并纯化后, 将从凝胶上收集的 3 mg sVP53B-His 融合蛋白制备 VP53B 抗体。

2.4 抗血清的 ELISA 效价检测

效价曲线(图 4)显示, sVP53B 的抗血清效价很高, 达到 1:150 000 以上。

2.5 抗血清的 Western blotting 特异性检测

Western blotting 检测(图 5)显示只有单一的条带, 抗血清被稀释了 50 000 倍仍可以特异性地结合到 sVP53B, 足以显示该抗血清特异性好、亲和性高。

3 结论

本文对 *vp53B* 基因进行序列同源性分析显示, 调出的序列大部分属于杆状病毒科的 *p74* 基因。*p74* 又称 *pif0* (Per oral infectivity factor 0), 是第一个被发现并认定与杆状病毒经口侵染昆虫相关的基因^[33], 也是杆状病毒基因组中一个高度保守的核心基因。研究发现 AcMNPV P74 通过其 C 端的跨膜区连接到 ODV (Occlusion body derived virus) 囊膜, 而其 N 端则暴露在 ODV 囊膜表面^[34]。本文的分析显示, VP53B 与 P74 一样, 均在 C 端有 3 个高度保守的跨膜区, 其他杆状病毒经口侵染相关的因子 (*pif* genes) 如 *pif1*、*pif2* 和 *pif3* 也均有高度保守的疏

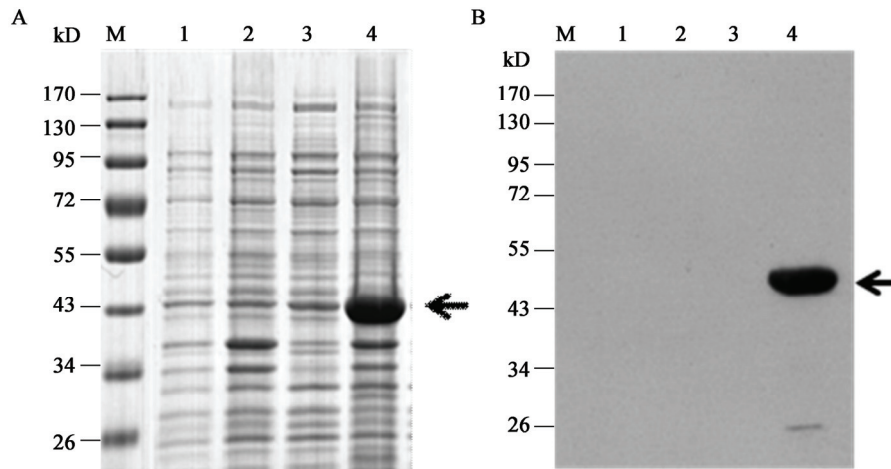


图 2 pET-16b-Svp53B 表达检测

Figure 2 pET-16b-Svp53B expression detection

注: A: SDS-PAGE 凝胶检测; B: Western blot 检测. M: 蛋白质分子量标准; 1: 未诱导 pET-16b-Svp53B; 2: 诱导 pET-16b 载体; 3: 诱导 pET-16b-Svp53B 上清液部分; 4: 诱导 pET-16b-Svp53B 沉淀部分. 箭头指示 sVP53B-his 融合蛋白.

Note: A: SDS-PAGE detection; B: Western blot detection. M: Protein marker; 1: Total protein of non-induced pET-16b-Svp53B; 2: Total protein of induced pET-16b vector; 3: Supernatant protein of induced pET-16b-Svp53B; 4: Pellet protein of induced pET-16b-Svp53B. Arrows refer to sVP53B-His fusion protein.

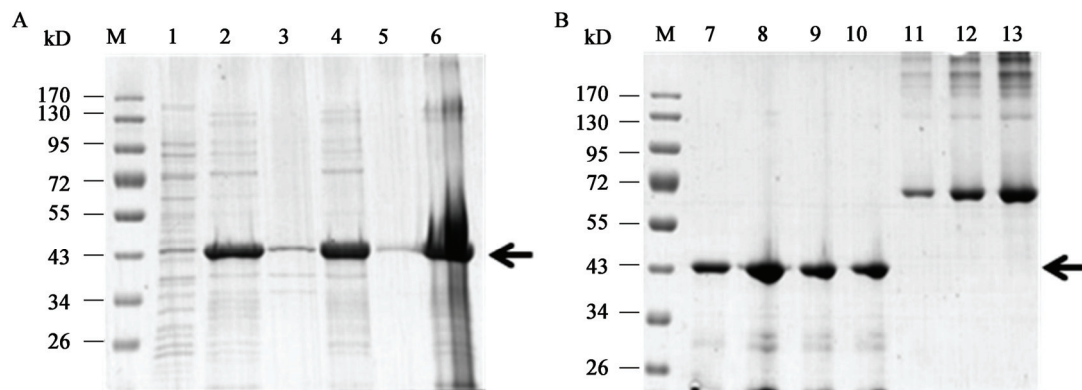


图 3 sVP53B-His 包涵体纯化(A)及粗定量(B) SDS-PAGE 检测

Figure 3 SDS-PAGE detection of sVP53B-his inclusion body purification (A) and quantification (B)

注: M: 蛋白质分子量标准; 1: 超声破碎菌体上清; 2: 溶解的包涵体; 3: 未溶解的包涵体; 4: 未结合到 Ni-NTA 琼脂糖磁珠的蛋白; 5: 清洗的杂蛋白; 6: sVP53B-his 纯化产物; 7-10: 1 μ L sVP53B-His 纯化产物; 11: 1 μ g BSA; 12: 3 μ g BSA; 13: 5 μ g BSA. 箭头指示 sVP53B-His 融合蛋白.

Note: M: Protein marker; 1: Protein in supernatant; 2: Dissolved inclusion body; 3: Un-dissolved inclusion body; 4: Protein unbinding to Ni-NTA argrose beads; 5: Washing protein; 6: sVP53B-His purification product; 7-10: 1 μ L sVP53B-His purification products; 11: 1 μ g BSA; 12: 3 μ g BSA; 13: 5 μ g BSA. Arrows refer to sVP53B-his fusion protein.

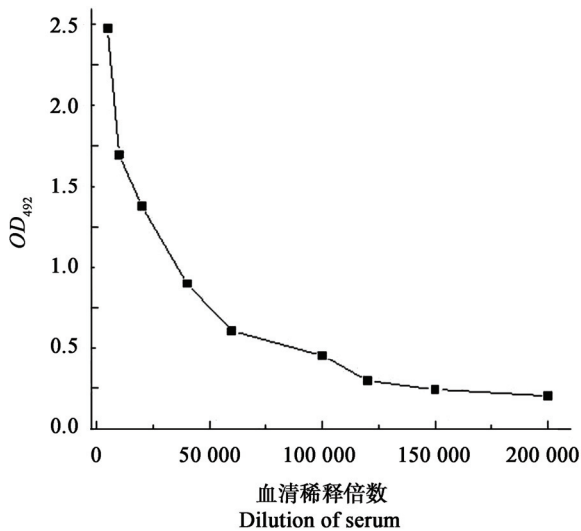


图4 抗 sVP53B 血清效价的 ELISA 法测定

Figure 4 ELISA detection of serum against sVP53B

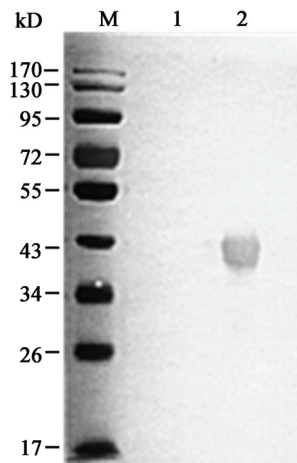


图5 Western blotting 特异性检测

Figure 5 Specificity detection by Western blotting

注: M: 蛋白分子量 Marker; 1: 未诱导组总蛋白; 2: 诱导组总蛋白。

Note: M: Marker; 1: Total protein uninduced; 2: Total protein induced.

水区^[35-37], 这在一个方面也证明了 VP53B 有可能是 WSSV 侵染的重要因子。另一个方面, WSSV 的主要宿主虾的中肠细胞也是有围食膜结构, 并且已经有研究发现虾子的围食膜蛋白和几丁质组成与昆虫细胞围食膜的组成非常相似^[38]。2007年, Chen 等通过酵母双杂交发现, 中国台湾株 VP53A 与虾

组织的 PmCBP (*Penaeus monodon* chitin-binding protein) C 端相互作用; 围食膜的一种组成蛋白称为 Peritrophin-A 也同样包含有几丁质结合域^[39], 由此我们猜测, WSSV 经口与虾中肠围食膜蛋白受体相互作用进行侵染, 类似于 P74 的经口侵染, VP53B 可能是与受体相互作用的蛋白。2009年又有研究发现 PmCBP 广泛存在于宿主细胞表面, VP53B 也可以与其发生相互作用^[24]更证实了我们的推测, 以上预测和分析的结果都为对 VP53B 进行进一步的研究提供了重要的信息。本文研究 VP53B 并制备出高效价的抗血清, 对进一步验证 WSSV 的经口侵染以及 VP53B 与围食膜蛋白的相互作用打下了基础。选取 VP53B 1-350 aa 进行表达, 一方面是因为这部分与 P74 相似性最高, 另一方面 N 端是暴露在病毒囊膜表面, 与宿主肠道受体最先接触, 这部分更有可能与侵染相关。本文在研究过程中, 尝试表达 VP53B 全长蛋白, 选择了不同的表达载体、不同表达菌株, 并对表达条件进行优化, 在表达过程发现, 囊膜蛋白 VP53B 全长不表达或极微弱的表达。表达其功能域蛋白时, 本文选择 Rosetta 作为表达菌株, 因为它补充了大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子 (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC 和 GGA) 对应的 tRNA, 提高了外源基因尤其是真核基因在原核系统的表达水平。本文研究的包涵体蛋白 sVP53B-His 表达量高, 经磁珠纯化后选择割胶的方法, 可以有效地去除杂蛋白, 快速简单地获得高纯度的目的蛋白。

致谢: 感谢国家海洋局第三海洋研究所徐洵院士惠赠 WSSV 基因组 DNA 样品, 感谢台湾成功大学罗竹芳教授给予的指导和帮助。

参 考 文 献

- [1] Zhan WB, Wang YH, Fryer JL, et al. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1998, 10(4): 405-410
- [2] Inouye K, Miwa S, Oseko N, et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus[J]. Fish Pathology, 1994, 29(2): 149-158
- [3] Park JH, Lee YS, Lee S, et al. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1998, 34(1): 71-75

- [4] Lo CF, Leu JH, Ho CH, 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
- [5] Karunasagar I, Ota SK, Karunasagar I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India[J]. *Aquaculture*, 1997, 153(1/2): 9-13
- [6] Lightner DV. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp[M]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996: 1-15
- [7] Rosenberry B. World Shrimp Farming 2002[M]. San Diego: Shrimp News International, 2002: 276
- [8] Shekar M, Pradeep B, Karunasagar I. White spot syndrome virus: genotypes, epidemiology and evolutionary studies[J]. *Indian Journal of Virology*, 2012, 23(2): 175-183
- [9] Pradeep B, Rai P, Mohan SA, et al. Biology, host range, pathogenesis and diagnosis of white spot syndrome virus[J]. *Indian Journal of Virology*, 2012, 23(2): 161-174
- [10] Escobedo-Bonilla CM, Alday-Sanz V, Wille M, et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(1): 1-18
- [11] Lightner DV. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 106(1): 110-130
- [12] Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV[J]. *Archives of Virology*, 2002, 147(8): 1655-1656
- [13] Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, et al. Virus taxonomy: eighth report of the international committee on taxonomy of viruses[A]/Family Picornaviridae[M]. London: Elsevier/Academic Press, 2005: 757-778
- [14] Tsai MF, Lo CF, van Hulten MC, et al. Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus[J]. *Virology*, 2000, 277(1): 92-99
- [15] Yang F, He J, Lin XH, et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus[J]. *Journal of Virology*, 2001(75): 11811-11820
- [16] van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence[J]. *Virology*, 2001, 286(1): 7-22
- [17] Chai CY, Yoon J, Lee YS, et al. Analysis of the complete nucleotide sequence of a white spot syndrome virus isolated from pacific white shrimp[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(5): 695-699
- [18] Chen LL, Wang HC, Huang CJ, et al. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus[J]. *Virology*, 2002, 301(1): 136-147
- [19] Li LJ, Yuan JF, Cai CA, 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
- [20] Wu W, Wang L, Zhang X. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection[J]. *Virology*, 2005, 332(2): 578-583
- [21] Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo CF, et al. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(21): 10734-10742
- [22] Wang HC, Wang HC, Ko TP, et al. White spot syndrome virus protein ICP11: a histone-binding DNA mimic that disrupts nucleosome assembly[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(52): 20758-20763
- [23] Wang HC, Wang HC, Kou GH, et al. Identification of icp11, the most highly expressed gene of shrimp white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 74(3): 179
- [24] Chen KY, Hsu TC, Huang PY, et al. *Penaeus monodon* chitin-binding protein (PmCBP) is involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(3): 460-465
- [25] Kulkarni A, Rombout J, Singh I SB, et al. Truncated VP28 as oral vaccine candidate against WSSV infection in shrimp: an uptake and processing study in the midgut of *Penaeus monodon*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 159-166
- [26] van Hulten MC, 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
- [27] Liu B, Tang X, Zhan W. Interaction between white spot syndrome virus VP26 and hemocyte membrane of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Aquaculture*, 2011, 314(1): 13-17
- [28] Xie X, Yang F. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin[J]. *Virology*, 2005, 336(1): 93-99
- [29] Huang ZJ, Kang ST, Leu JH, et al. Endocytic pathway is indicated for white spot syndrome virus (WSSV) entry in shrimp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 707-715
- [30] Tsai JM, Wang HC, Leu JH, et al. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(6): 3021-3029
- [31] Li Z, Lin Q, Chen J, et al. Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(9): 1609-1620
- [32] Wang Y, Bininda-Emonds ORP, Van Oers MM, et al. The genome of *Oryctes rhinoceros* nudivirus provides novel insight into the evolution of nuclear arthropod-specific large circular double-stranded DNA viruses[J]. *Virus Genes*, 2011, 42(3): 444-456
- [33] Kuzio J, Jaques R, Faulkner P. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies[J]. *Virology*, 1989, 173(2): 759-763
- [34] Slack JM, Dougherty EM, Lawrence SD. A study of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV envelope protein p74 using a GFP tag[J]. *Journal of General Virology*, 2001, 82(9): 2279-2287
- [35] Gilbert R, Ghosh K, Rasile L, et al. Membrane anchoring domain of herpes simplex virus glycoprotein gB is sufficient for nuclear envelope localization[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(4): 2272-2285
- [36] Smith S, Blobel G. The first membrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1993, 120(3): 631-637
- [37] Wozniak RW, Blobel G. The single transmembrane segment of gp210 is sufficient for sorting to the pore membrane domain of the nuclear envelope[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1992, 119(6): 1441-1449
- [38] Wang L, Li F, Wang B, et al. Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(6): 1285-1291
- [39] Chen LL, Lu LC, Wu WJ, et al. White spot syndrome virus envelope protein VP53A interacts with *Penaeus monodon* chitin-binding protein (PmCBP)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 74(3): 171-178