

vp28 重组核酸疫苗对凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的免疫反应和保护效果

张敬艳^{1,2} 刘庆慧^{2*} 黄 捷²

(¹上海海洋大学, 201306)

(²农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 利用改构的 pEGFP-N1-ie1 强启动子载体构建含 vp28 基因的核酸疫苗, 通过肌肉注射和饲料添加的形式免疫对虾, 分析各实验组相对保护率和免疫基因 (Dicer, Argonaute, STAT 和 Lyzome) 表达, 研究构建 vp28 重组核酸疫苗对凡纳滨对虾的保护效果。RT-PCR 结果表明, 注射和口服 vp28 组均可在对虾鳃组织中检测到 vp28 基因表达。在注射组中 vp28 的相对保护率为 22.4%, 饲料免疫组中 vp28 的相对保护率可达到 36.84%。相对于对照组, vp28 的注射组的 STAT 基因和 Dicer 基因表达量于第 7 天达到最大值。Argonaute 基因表达量于第 3 天达到最大值, 以后呈下降趋势。溶菌酶基因表达量一直呈相对较高的趋势。vp28 的饲料投喂组的 STAT 基因和 Argonaute 基因表达量于第 7 天达到最大值, 以后呈下降趋势。Dicer 基因表达量第 3 天达到最大值。实验结果表明, 构建的 vp28 核酸疫苗在对虾抗 WSSV 防治中具有潜在应用价值。

关键词 vp28 疫苗 凡纳滨对虾 基因调控

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)03-0077-06

Protection efficacy of vp28 DNA vaccine and immune responses in *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus

ZHANG Jing-yan^{1,2} LIU Qing-hui^{2*} HUANG Jie²

(¹Shanghai Ocean University, 201306)

(²Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT In this study, pEGFP-N1-ie1 was reconstructed by inserting WSSV immediate early gene, and vp28 was cloned in a new constructed vector. The survival rates and antiviral associated factors (Dicer, Argonaute, STAT and Lyzome) were detected in *Litopenaeus vannamei* after immunity by injection and oral-feeding. RT-PCR results showed that vp28 was detected in gill of shrimp by injection and oral-feeding immunity treatment. The relative protection rate of vp28 group reached 22.4% (injection group) and 36.84% (oral feeding group). The STAT and dicer mRNA expression in vp28 group were significantly higher than that of control

对虾行业专项(201103034)和国家虾产业体系(nycytx-46)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-07-02; 接受日期: 2011-11-30

作者简介: 张敬艳(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物技术方面的研究。E-mail: zhangjingyandh@136.com

group after injection treatment for 7 d. The argonaute mRNA expression in vp28 group was significantly higher than that of control group after injection treatment for 3 d and then decreased. The lysozyme mRNA expression in vp28 injection group was consistently significantly higher than that of control group. But the STAT and Argonaute mRNA expression in vp28 group was significantly higher than that of control group on the 7th d of oral-feeding treatment and then decreased. The dicer mRNA expression in vp28 group was significantly higher than that of control group on the 3rd day of oral treatment. These results demonstrated that vp28 DNA vaccine has a potential utility for control of WSSV disease in shrimp.

KEY WORDS vp28 Vaccine *Litopenaeus vannamei* Gene regulation

对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)又称对虾白斑杆状病毒(White Spot Bacilliform Virus, WSBV),是对全球对虾养殖业危害最大的病原之一(Inouye *et al.* 1993;黄捷等 1996; Lightner 1996;Wang *et al.* 1998)。vp28是WSSV主要囊膜蛋白,试验证明vp28是对虾致病的主要蛋白之一(van Hulten *et al.* 2002)。在病毒感染的中和实验中,用vp28的多克隆抗体与WSSV一起注射对虾,其致死率明显低于注射WSSV的对照组,表明WSSV的感染能够被vp28的多克隆抗体中和,并证明这种中和机制具有浓度依赖性(Li *et al.* 2006)。通过多种方式免疫vp28类疫苗后的对虾均显示了较高的抗感染能力(Witteveldt *et al.* 2004;袁军法等 2005;Jha *et al.* 2007;Fu *et al.* 2009;Satoh *et al.* 2008;Li *et al.* 2010),但其机制不详。

核酸疫苗作为一种新型的疫苗,相比传统的灭活疫苗、蛋白疫苗,其有操作性和稳定性好(Wolff *et al.* 1990)、免疫效果好(Ning *et al.* 2009)、作用时间长、可构建多价疫苗(Ulmer *et al.* 1993)、使用安全等优点。

本研究以pEGFP-N1为载体,利用改构的pEGFP-N1-ie1强启动子载体构建含vp28基因的核酸疫苗,通过肌肉注射和饲料添加的形式免疫对虾,分析各实验组相对保护率和对虾抗病相关的信号传导和转录激活子(STAT)、Argonaute、Dicer和溶菌酶(Lysozyme)基因表达,研究构建vp28重组核酸疫苗对凡纳滨对虾的保护效果,为抗WSSV核酸制剂的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

表达载体 *E. coli* DH5 α /pEGFP-N1-ie1 为中国水产科学研究院黄海水产研究所病研室保存;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自 TIANGEN 公司;限制性内切酶 *SalI*、*BamHI* 购自 MBI 公司;T4 DNA Ligase 购于北京全式金公司;质粒小提试剂盒购自 Omega 公司;RNAisoTM Plus 购自上海生工生物工程有限公司;荧光定量试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;南美白对虾 *L. vannamei* 于 2010 年 7 月购自山东省青岛市沙子口。

1.2 方法

1.2.1 pEGFP-N1-ie1-vp28 质粒的重组

根据 NCBI 基因库中 vp28 的全序列设计引物,引入 *Sal I*、*BamH I* 两个酶切位点,正反向引物分别为 vp28-s: 5'-GCGGTCGACAATGGATCTTTCTTTTCAC-3', vp28-a: 5'-ATAGGATCCAACCTCGGTCTCAGT-GCCA-3'。采用 25 μ l 的 PCR 反应体系,其中 10 \times Ex *Taq* Buffer 2.5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP Mix 2 μ l, 正反向引物(10 μ mol/L)1 μ l, Ex *Taq*(5 U/ μ l)0.2 μ l, WSSV DNA 1 μ l, ddH₂O 17.3 μ l. PCR 反应仪进行 PCR 扩增: 94 $^{\circ}$ C 5 min 变性后,进行 PCR 反应,PCR 结束后,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。琼脂糖凝胶回收纯化 PCR 产物,用限制性内切酶 *Sal I*、*BamH I* 对 vp28 的纯化产物及 pEGFP-N1-ie1 质粒进行双酶切,双酶切产物经

过琼脂糖凝胶回收纯化后,用 T4 DNA 快速连接酶进行连接得到 pEGFP-vp28 重组质粒,分别将其转化 DH5 α 感受态细胞。从含卡那霉素(Kana,30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 LB 平板中挑取单克隆,做菌落 PCR 及测序筛选重组体。重组菌委托上海生工生物工程有限公司进行序列测定,采用 Omega 软件进行序列比对。

1.2.2 重组质粒 pEGFP-N1-ie1-vp28 的提取

用测序确认重组成功的阳性克隆划板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至长出单克隆,挑取单克隆,接种于 1ml 含卡那霉素(Kana,30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 LB 培养基的小离心管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 r/min 恒温振荡培养,过夜活化;然后将活化菌适量接种至盛有 10 ml LB 培养基(含卡那霉素 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 50ml EP 管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 r/min,恒温振荡培养 12 h。选取 1.5ml 的过夜培养物用质粒 DNA 小量提取试剂盒来提取质粒(博迈德公司),用 Nanodrop 2000 测定质粒浓度,并稀释至 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 口服饲料的制备

分别将含 pEGFP-N1-ie1 及 pEGFP-N1-ie1-vp28 的菌种扩大培养,分两部分,其中一部分 5 000 \times g 离心 10 min 得到菌体,反复冻融法灭活后以 1:4 的比例拌入饲料,阴凉通风处阴干,包裹蛋清再次阴干,得到包裹灭活菌体的饲料。

1.2.4 养殖试验

凡纳滨对虾(体重 10.2 \pm 0.35g),暂养 7d 后,分为注射组及投喂组两大组,每大组分 vp28 组(vp28),pEGFP-ie1(ie1)组及阴性对照组 3 个小组,每组两个平行,每个平行 20 尾虾。注射组每只虾注射 20 μg 质粒,分别于第 1、3、7 天取样,每个实验组取 3 尾虾的鳃,肌肉分别保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 。投喂组分别投喂制备的各组饵料,每日 3 次,每次 2g,分别于第 3、7、10、14 天取鳃、肌肉组织分别保存于-80 $^{\circ}\text{C}$,每个实验组 3 尾虾。

1.2.5 对虾攻毒及相对保护率计算

注射组对虾于第 7 天,饵料投喂组于第 14 天开始攻毒,每箱投喂切碎的病料 3 g,第 2 天开始都投喂普通饵料,并每日 3 次记录对虾的死亡数量,及时清理死虾。

相对保护率(%)=(1-实验组死亡率/对照组死亡率) \times 100%。

1.2.6 对虾体内 vp28 的表达

RNA 提取采用 Takara RNAiso Plus 试剂(大连,宝生物),按试剂盒所述方法进行,总 RNA 完整性和纯度通过凝胶电泳进行检测。采用核酸分析仪进行 RNA 浓度分析。cDNA 合成采用反转录试剂盒(大连,宝生物),合成的 cDNA 直接作为 PCR 反应的模板,采用 vp28 特异性引物进行 PCR,PCR 反应体系同 1.2.1,1% 琼脂糖电泳观察结果。

1.2.7 STAT、Argonaute、Dicer 及 Lysozyme 基因在对虾体内的变化

分别取注射(1、3、7d)和口服免疫(3、7、10、14 d) 各组对虾鳃、肌肉组织,RNA 提取按 1.2.6 方法,将提取的 RNA 稀释至 1 000 ng/ μl ,反转录为 cDNA(Takara PrimeScript RT Master Mix),反应体系 10 μl :5 \times PrimeScript RT Master Mix(for Real-time)2 μl ,RNase free H $_2$ O 7 μl ,稀释的 cDNA 1 μl 。反应条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 进行反应,85 $^{\circ}\text{C}$ 、5 sec 灭活反转录酶。以得到的 cDNA 为模板,分别用 β -actin(内参)、STAT、Argonaute、Dicer、Lysozyme 的引物(Zhang *et al.* 2010),采用 Rotor Gene3000(德国)进行荧光定量 PCR。2 \times SYBR Premix Ex Taq II 12.5 μl PCR Forward Primer 1.0 μl ,PCR Reverse Primer 1.0 μl , cDNA 2 μl , H $_2$ O 8.5 μl 。反应条件:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,PCR 产物送测序以确保其为预期的目的基因片断。每个组织的样品设 3 次重复。根据 Rotor-Gene 3000 仪器自带软件采用 2 $^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行 PCR 结果分析,并对每个组织的 3 次重复分析结果进行 *t*-检验(仪器自带的软件), $P<0.01$ 为差异显著。

2 结果

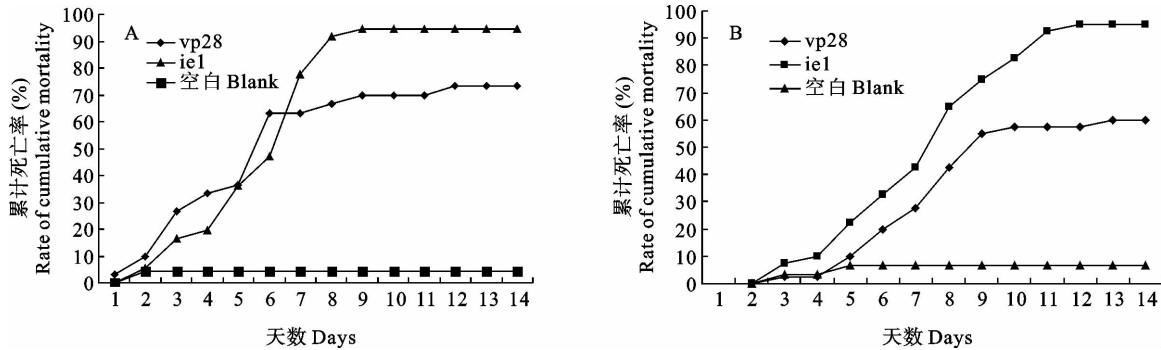
2.1 pEGFP-N1-ie1-vp28 质粒的重组

应用特异性引物进行 PCR 体外扩增,扩增 vp28 片段大小 633bp。双酶切 PCR 产物与 pEGFP-N1-ie1 载体连接,转化 DH5 α ,菌落 PCR 筛选的阳性克隆进行测序。测序结果表明,PCR 扩增的目的片段与预期片段完

全相符,且以正确的阅读框与载体首尾相接。提取重组核酸分子量大小为 2 800 bp 左右。

2.2 对虾攻毒后的死亡率

注射与口服饲料各组对虾攻毒后累计死亡率见图 1。由图 1A 可见, vp28 注射组在感染 7 d 后对虾死亡趋于稳定, 累积死亡率达 73.3%; 对照组在第 8 天后对虾死亡趋于稳定, 累积死亡率达 94.4%。口服免疫 vp28 组(图 1B), 对虾在感染第 8 天后死亡趋于稳定, 累积死亡率达 60%; 对照组对虾在感染第 10 天后死亡趋于稳定, 累积死亡率达 95%。在注射组中 vp28 的相对保护率为 22.4%, 饲料免疫组中 vp28 的相对保护率可达到 36.84%。表明用 vp28 重组核酸疫苗以饲料投喂灭活菌体的方式免疫凡纳滨对虾可得到较好的对抗 WSSV 的效果。



A: 注射组; B: 口服组

A: Injection group; B: Oral group

图 1 各组对虾攻毒后累计死亡率

Fig. 1 Cumulative mortality of shrimp after injection of WSSV

2.3 对虾体内 vp28 的表达情况

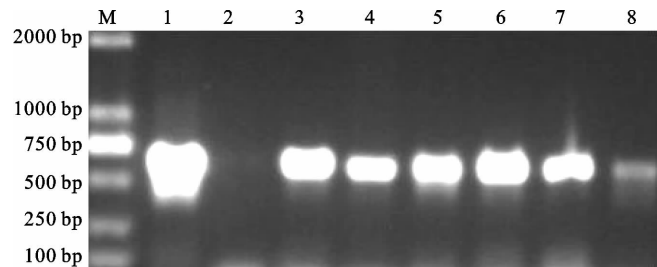
为确定所构建的重组质粒在对虾组织中的表达, 分别在注射免疫 1、3、7d 及口服免疫 3、7、10、14 d, 取实验组及对照组鳃组织, 经 RT-PCR 检验分析 vp28 的表达情况。结果表明(图 2), 注射免疫 1、3、7 d 及口服免疫 3、7、10、14 d, 在对虾鳃组织中均可检测到 vp28 的表达, 而对照组未检测到 vp28 表达, 表明所构建的重组质粒 vp28 可在虾体内表达。

2.4 Stat, Argonaute, Dicer 及 Lysozyme 基因在对虾体内的变化

2.4.1 注射组对虾体内 Stat, Argonaute, Dicer 及 Lysozyme 基因的变化

vp28 注射组, STAT 基因 mRNA 在鳃组织中的第 7 天的表达量明显升高 ($P < 0.01$) (表 1), Dicer 基因 mRNA 在肌肉组织中的第 7 天的表达量明显升高 ($P < 0.01$) (表 1), Argonaute 基因 mRNA 在肌肉组织中的第 3 天的表达量明显升高 ($P < 0.01$) (表 1), 而 Lyzome 基因 mRNA 在肌肉组织中的第 1 天和第 3 天表达量明显升高 ($P < 0.01$) (表 1), 随后下降。

2.4.2 饲料投喂组对虾体内 Stat, Argonaute, Dicer 及 Lysozyme 基因的变化



M. DNA Marker, 1. 注射免疫 7d, 2. 空白对照, 3. 注射免疫 3d, 4. 注射免疫 1d, 5. 饲料投喂 14d, 6. 饲料投喂 10d, 7. 饲料 7d, 8. 饲料投喂 3d

Lane M: DNA Marker; Lane 1: 7 d (post-injection); Lane 2: control; Lane 3: 3 d (post-injection); Lane 4: 1 d (post-injection); Lane 5: 14 d (post-feeding); Lane 6: 10 d (post-feeding); Lane 7: 7 d (post-feeding); Lane 8: 3 d (post-feeding)

图 2 vp28 在对虾鳃组织的表达

Fig. 2 vp28 expression in gill of shrimp

vp28 投喂组, STAT 基因 mRNA 在鳃组织中的 7 d 的表达量明显升高 ($P < 0.01$) (表 2), 在 10 和 14 d 时, 表达量下降; Dicer 基因 mRNA 在鳃组织中的第 7 天和第 10 天的表达量明显升高 ($P < 0.01$) (表 2); Argonaute 基因 mRNA 在鳃组织中的第 7 天的表达量明显升高 ($P < 0.01$) (表 2); 而 Lyzome 基因 mRNA 在鳃组织中, 第 3、7、10、14 天表达量明显升高 ($P < 0.01$) (表 2)。

表 1 注射各组对虾组织中基因 mRNA 表达

Table 1 The mRNA expression in tissues of shrimp post-injection ($n=3$)

基因 Gene	组别 Group	天 Day		
		1	3	7
STAT	vp28	2.27±0.15	4.63±0.16	12.97±1.23*
	ie1	0.76±0.01	0.98±0.02	1.34±0.10
	Blank	1±0.00	1±0.00	1±0.00
Dicer	vp28	0.84±0.04	1.67±0.11	2.96±0.2*
	ie1	0.77±0.05	0.74±0.04	0.55±0.07
	Blank	1±0.00	1±0.00	1±0.00
Argonaute	vp28	1.17±0.02	6.06±0.30*	0.46±0.03
	ie1	0.86±0.12	1.13±0.02	1.35±0.02
	Blank	1±0.00	1±0.00	1±0.00
Lyzozyme	vp28	3.8±0.26*	3.47±0.25*	2.73±0.15
	ie1	0.86±0.04	0.56±0.14	0.94±0.0
	Blank	1±0.00	1±0.00	1±0.00

* 差异显著 Significant difference ($P < 0.01$)

表 2 饲料投喂各组对虾鳃组织中基因表达分析

Table 2 The mRNA expression in gills of shrimp by oral feeding ($n=3$)

基因 Gene	组别 Group	天 Day			
		3	7	10	14
STAT	vp28	2.11±0.17	10.33±0.58*	5.87±0.15	6.63±1.48
	ie1	1.27±0.03	1.28±0.03	1.24±0.04	1.23±0.03
	Blank	1±0.00	1±0.00	1±0.00	1±0.00
Dicer	vp28	1.12±0.02	2.46±0.03*	3.27±0.04*	1.28±0.10
	ie1	1.08±0.01	1.19±0.02	1.13±0.03	1.23±0.03
	Blank	1±0.00	1±0.00	1±0.00	1±0.00
Argonaute	vp28	2.38±0.51	6.26±0.44*	2.93±0.35	2.67±0.25
	ie1	1.75±0.86	1.29±0.21	1.43±0.01	0.86±0.02
	Blank	1±0.00	1±0.00	1±0.00	1±0.00
Lyzozyme	vp28	3.09±0.10*	4.06±0.21*	3.70±0.20*	4.13±0.15*
	ie1	1.63±0.02	1.62±0.05	1.08±0.01	1.29±0.02
	Blank	1±0.00	1±0.00	1±0.00	1±0.00

* 差异显著 Significant difference ($P < 0.01$)

3 讨论

本研究中, 注射组 vp28 的相对保护率为 22.4%, 饲料免疫组中 vp28 的相对保护率可达到 36.84%。表明用 vp28 重组核酸疫苗以饲料投喂灭活菌体的方式免疫凡纳滨对虾可得到较好的对抗 WSSV 的效果。饲料免疫组的相对保护率相对于注射组的要高, 可能是由于灭活的菌体中含有一些多糖等有益于免疫的物质造成的, 而且饲料包裹免疫相对于注射免疫可操作性强, 有利于生产应用。

转录因子 STAT 在细胞内抗病毒途径中发挥作用 (Zhu *et al.* 2004)。现代研究表明, 由 IFN-gwas 诱导的 JAK/STAT 信号转导途径能够诱导控制病毒复制的基因的表达。STAT 诱导抗病毒途径在无脊椎动物中也有发现 (Cortti *et al.* 2007)。vp28 的注射组和饲料投喂组中的 Stat 基因表达量于第 7 天达到最大值, 相对于对照组有明显差异。表明 vp28 免疫可以诱导 Stat 的大量表达, 进而提高对虾免疫力。

Dicer 可以识别病毒的 RNA 并由此引发抗 DNA 和 RNA 病毒的免疫保护。它可以引导病毒 RNA 转变为病毒同源性的的小 RNAs, 这些病毒同源性的的小 RNAs 可以切割病毒 RNA, 直接调控病毒的复制过程, 因而 Dicer 基因在病毒侵染宿主过程中起到保护作用 (Aliyari *et al.* 2009)。在 vp28 的注射组和饲料投喂组中, Dicer 的表达量相对于对照组有明显的提高, 最高可达对照组的 2.27 倍, 因而表明在用 vp28 免疫对虾后可通过 Dicer 表达量的增高进而达到对抗 WSSV 的目的。

Argonaute 蛋白可以结合 miRNAs, 介导由 RNA 降解或翻译抑制产生的靶 RNAs 的抑制。由 Dicer 诱导的 miRNA 指导 Argonaute 到达最终被切割或降解的靶 miRNA 分子上。现代研究表明, 在对虾感染 WSSV 的第 1 天, Argonaute mRNA 的表达量即有显著上升, 表明 Argonaute 在对虾对抗 WSSV 方面可能是一个非常有效的抗病毒的工具体 (Hock *et al.* 2008)。vp28 的注射组中 Argonaute 在第 3 天即达到峰值, 表达量是对

照组的6倍,在饲料投喂虾中有相似的结果,只是在第7天达到最大,说明在vp28重组疫苗发挥作用时,很可能是先诱导了Argonaute的大量表达,进而指导Dicer结合miRNAs,降解病毒的mRNA,从而达到抗WSSV的作用。

参 考 文 献

- 黄 捷,宋晓玲,于 佳. 1995. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学. 海洋水产研究,16(1):1~10
- 袁军法,李莉娟,谷万港,祝璟琳,石正丽. 2005. 对虾白斑综合征病毒 vp28 免疫后克氏原螯虾血清酶活性及中和活性. 武汉大学学报,51(S2): 253~258
- Aliyari, R., and Ding, S. W. 2009. RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. Immunol. Rev. 227(1):176~188
- Crotti, A., Lusic, M., Lupo, R., Lievens, P. M. J., Liboi, E., and Chiara, G. D. 2007. Naturally occurring C-terminally truncated STAT5 is a negative regulator of HIV-1 expression. Blood,109(12):5 380~5 389
- Fu, L. L., Shuai, J. B., Xu, Z. R., Li, J. R., and Li, W. F. 2009. Immune responses of *Fenneropenaeus chinensis* against white spot syndrome virus after oral delivery of VP28 using *Bacillus subtilis* as vehicles. Fish Shellfish Immunol. 28(1):49~55
- Jha, R. K., Xu, Z. R., Bai, S. J., Sun, J. Y., Li, W. F., and Shen, J. 2007. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using recombinant oral vaccine expressed in *Pichia pastoris*. Fish Shellfish Immunol. 22(4):295~307
- Hock, J., and Meister, G. 2008. The Argonaute protein family. Genome Biol. 9(2):1~8
- Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., and Momoyama, K. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathol. 29:149~58
- Lightner, D. V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society
- Li, L. J., Yuan, J. F., Cai, C. A. et al. 2006. Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. Virol. 151(7): 1 309~1 317
- Li, X., Liu, Q. H., Hou, L., and Huang, J. 2010. Effect of VP28 DNA vaccine on white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture International. 18(6):1 035~1 044
- Ning, J. F., Zhu, W., Xu, J. P., Zheng, C. Y., and Meng, X. L. 2009. Oral delivery of DNA vaccine encoding VP28 against white spot syndrome virus in crayfish by attenuated *Salmonella typhimurium*. Vaccine, 27(7):1 127~1 135
- Satoh, J., Nishizawa, T., and Yoshimizu, M. 2008. Protection against white spot syndrome virus(WSSV) infection in kuruma shrimp orally vaccinated with WSSV rVP26 and rVP28. Diseases of Aquatic Organisms, 82(2):89~96
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., and Parker, S. E. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science, 259:1 745~1 749
- van Hulten, M. C., Wstenberg, M., and Goodall, S. D. 2002. Identification of two major viron protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. Virology, 266(2):227~236
- Wang, Y. C., Lo, C. F., Chang, P. S., and Kou, G. H. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. Aquaculture, 164(1-4):221~231
- Witteveldt, J., Cifuentes C. C., Vlak J. M., and van Hulten, M. C. W. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. Journal of Virology, 78(4):2 057~2 061
- Wolff, J. A., Malone, R. W. et al. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science, 247(4 949):1 465~1 468
- Zhang, Y., Song, L. S., Zhao, J. M., Wang, L. L., Kong, P. F., Liu, L., Wang, M. Q., and Qiu, L. M. 2010. Protective immunity induced by CpG ODNs against white spot syndrome virus(WSSV) via intermediation of virus replication indirectly in *Litopenaeus vannamei*. Development and Comparative Immunology, 34(4):418~424
- Zhu, H., Shang, X., Terada, N., and Liu, C. 2004. STAT3 induces anti-hepatitis C viral activity in liver cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 324(2):518~528