

# 对虾白斑综合症病毒的概述

马晓燕 李 鹏 严 洁 周开亚

(南京师范大学生命科学学院 江苏省生物多样性和生物技术重点实验室 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 白斑综合症病毒( White spot syndrome virus ,WSSV) ,已在全球范围内成为对虾养殖业中最普遍、分布最广、最致命的病毒. 但目前仍没有一种有效可行的措施来控制该病毒的发生和扩散. 自 1993 年发现该病毒至今, 国内外学者对对虾白斑综合症病毒的认识也越来越全面深入, 取得了一些突破性的进展. 本文全面综述了近年来对对虾白斑综合症病毒的认识和研究进展. 这些信息将会拓展我们的认知, 可能有助于发展有效的预防策略或治疗措施.

**[关键词]** 白斑综合症病毒 综述 研究进展 预防策略

**[中图分类号]** S945.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2012) 04-0090-11

## A Review on Shrimp White Spot Syndrome Virus

Ma Xiaoyan ,Li Peng ,Yan Jie ,Zhou Kaiya

( Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology School of Life Sciences ,Nanjing Normal University ,Nanjing 210023 ,China)

**Abstract:** The white spot syndrome virus( WSSV) has emerged globally as one of the most prevalent ,widespread and lethal virus for cultured shrimp populations. There is no treatment available to interfere with the unrestrained occurrence and spread of the disease so far. Domestic and foreign researchers have gradually deepening understanding of the WSSV and made some breakthrough since the virus was first reported in 1993. The aim of this review is to present an update of the knowledge generated so far on different aspects of WSSV morphology ,molecular characterization ,pathology and pathogenesis. This information will expand our knowledge and may contribute to develop effective prophylactic or therapeutic measures.

**Key words:** WSSV ,review ,research progress ,prophylactic strategies

对虾白斑综合症病毒( White spot syndrome virus ,WSSV) 对全世界的水生甲壳动物养殖业造成严重危害, 为已知基因组最大的动物病毒. 2009 年被农业部《一、二、三类动物疫病病种名录》列为水生生物一类动物疫病病毒. 自 1993 年以来, 国内外对白斑综合症病毒基因组进行了大量研究. 白斑综合症病毒感染的宿主范围很广, 它不仅侵染各种野生及养殖对虾, 而且侵染其他水生甲壳类如蟹类、螯虾和龙虾等<sup>[1-8]</sup>, 已成为对水生甲壳类危害最大、传染最广泛的病毒. 特别是对对虾种群影响最严重<sup>[9]</sup>. 至今已报道有 40 多种节肢动物可感染或携带白斑综合症病毒<sup>[10-15]</sup>.

已有研究表明, 白斑综合症病毒是一种无包涵体、具囊膜、一端有尾巴状结构、杆状的双链环状 DNA 病毒<sup>[16]</sup>. 其基因组大小为 300 kb, 含有 184 个开放阅读框, 但只有 6% 的阅读框与数据库中的序列有一定的同源性<sup>[17,18]</sup>. 目前 GenBank 已公布 3 个版本的 WSSV 全序列<sup>[19]</sup>, 其基因组大小的测定结果相差较大. 迄今, 对白斑综合症病毒的形态学、形态发生、发病机理、基因组和蛋白质组等诸多方面有了较深入的研究<sup>[20-26]</sup>. 对一些物种的抗 WSSV 免疫相关基因也进行了一些研究<sup>[27]</sup>. 已知 VP28 和 VP26 是 WSSV 最主要的衣壳蛋白, 它们作为粘附蛋白将病毒颗粒绑定于宿主细胞上从而进一步侵害宿主细胞<sup>[9,28]</sup>. 但由于缺少对虾细胞系, 对该病毒的复制机理及其基因功能的研究进展很慢, 只对少数的基因如胸苷激酶和胸苷合成酶基因、核糖核酸还原酶大小亚基基因、蛋白激酶基因和 DNA 聚合酶基因等进行了转录分析和进化分

收稿日期: 2011-12-09.

基金项目: 江苏省基础研究计划(自然科学基金) 资助项目( BK2010541) .

通讯联系人: 李鹏, 博士, 讲师, 研究方向: 从事动物分子进化与比较基因组学研究. E-mail: biolipeng@163.com

析<sup>[29]</sup>,目前对该病毒仍无有效的防治措施.肖广侠比较了3种PCR检测方法<sup>[30]</sup>,确定了PCR方法检测WSSV的灵敏度由高到低依次为:定量PCR、巢式PCR、一步法PCR,为白斑病毒的快速检测提供了理论依据.随着分子生物学技术的发展,通过WSSV侵染易感宿主细胞并在其中稳定复制、筛选特异性抗体等方面的研究,可望获得该病毒的主要侵染蛋白、免疫因子、免疫机制与防治策略方面的信息<sup>[9]</sup>.周俊芳等在凡纳滨对虾体内实施了RNA干扰(RNAi)抗WSSV增殖的试验<sup>[31]</sup>,结果显示:5个shRNA不同程度地抑制了WSSV的复制,降低了对虾的死亡率.其中,靶向病毒核糖核酸还原酶的shRNA RR9的RNA干扰效果最佳.

## 1 WSSV的命名及分类地位

对虾白斑综合症病毒分子量较大、结构特异,是已知动物病毒中基因组最大的病毒.自1992年发现以来,多国学者对WSSV进行了研究.由于他们研究的方法及研究的侧重点不同,所以对其命名也各异.陈秀男称之为白斑综合症杆状病毒(WSBV)<sup>[32]</sup>;Kiyoshi等称之为日本对虾杆状病毒(RV-PJ),后又改名为对虾杆状DNA病毒(PRDV)<sup>[33]</sup>;黄健等将其命名为皮下与造血组织坏死病毒(Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus, HHNBV)<sup>[34]</sup>;荷兰Wongteerasupaya称其为系统外胚层和中胚层杆状病毒(SEMB)<sup>[16]</sup>.随着研究的不断深入,Nadala等发现从斑节对虾(*Penaeus monodon*) (印度尼西亚)、日本对虾(*P. japonicus*) (中国大陆)以及白对虾(*P. setiferus*) (美国)分离的病毒粒子的大小、形态非常相似;用EcoRI消化3种病毒株DNA,它们之间没有区别<sup>[35]</sup>.Lo等用RAPD技术比较研究了来自6个国家的4种对虾的WSSV在亲源关系上的关联性,结果显示,除了来自德克萨斯的南美白对虾(*P. vannamei*)以外,其余地域的WSSV基因密切相关<sup>[36]</sup>.因此,国际虾类病毒研究者普遍认为暂时给这些不同分离株一个统一命名是完全可以的.Lightner等建议将这类杆状病毒统一命名为白斑综合症病毒(WSSV)<sup>[10]</sup>.

1991年国际分类委员会(ICTV)第5次报告将WSSV归为杆状病毒科(Baculoviridae)无包涵体杆状病毒(Non-occluded baculovirus);1995年第6次ICTV报告中杆状病毒科只包括核型多角体病毒属(Nucleopolyhedrovirus)和颗粒病毒属(Granulovirus),取消了亚科分类阶元<sup>[37]</sup>.显然,WSSV不属于以上2个病毒属.2001年第7次ICTV报告把WSSV放在线性病毒科(Nimaviridae)白斑病毒属(Whispovirus);2005年的第8次ICTV报告中增设3个新科,在dsDNA病毒中新增细尾病毒科(Nimaviridae)白斑综合症病毒属(Whispovirus)<sup>[38]</sup>.

## 2 WSSV的大小及形态结构

Kasornchandra等对6个亚洲国家的不同品种对虾的WSSV分离株进行电镜观察<sup>[39]</sup>,发现各分离株的病毒粒子大小和核衣壳大小均不同.不同的研究者发现即使从同一区域相同宿主体内分离到的病毒大小亦有差异,但形态结构十分相似<sup>[40-42]</sup>.病毒粒子呈卵圆形至短杆状,完整的病毒粒子横切面为圆形,纵切面为杆状而略带椭圆,大小约为250 nm~380 nm×80 nm~120 nm.粒子外被囊膜,囊膜为双层结构,在尾部延伸成一长尾.囊膜内可见杆状的核衣壳和内部致密的髓核<sup>[16,43]</sup>.完整的核衣壳通常具有14~19节横纹,每节横纹宽约23 nm,由6 nm的电子致密带分隔开.研究表明,这种横纹是由指环结构堆叠而成,每个指环结构又由2排12~14个直径约8 nm~10 nm的球状亚基平行构成<sup>[44]</sup>.每个病毒粒子由2个边缘颗粒和1个中间颗粒组成,呈“<”形结构,粒子排列周期为14 nm<sup>[41,43]</sup>.在衣壳的两端为一对梯形的帽状结构,帽状结构之间有13圈衣壳螺旋.谢数涛等通过对提纯的WSSV负染观察发现<sup>[45]</sup>,纯化的WSSV病毒核衣壳2个末端的结构并不相同,其中一端为圆形,高约21 nm,而另一端则较平,高只有15 nm.完整的核衣壳2个末端结构间的螺旋单位一般为15圈,这与黄健等报道的13圈<sup>[43]</sup>和石拓等报道的14圈不同<sup>[46]</sup>.

## 3 WSSV的基因组

目前GenBank公布了3个版本的WSSV全序列,简要分述如下.

### 3.1 泰国株

病毒分离自泰国的斑节对虾(*Penaeus monodon*),用克氏螯虾(*Procambarus clarkii*)作宿主感染增殖,WSSV用于测序. Van Hulten报道的WSSV泰国株基因组序列全长292 967bp<sup>[17]</sup>,GenBank Accession No.

AF369029. 分析选出 184 个 ORF, 占全基因组的 92%, 其中有 9 个同源重复区域(Homology regions, Hr) 散布于基因组, 每个同源区域由数个 250 个核苷酸重复单位串联组成. 有 72% 的 ORF 具有真核生物翻译起始的 Kozak; 46% 的 ORF 的启动子具有 TATA box, 但对已鉴定的 VP28、VP26、VP24、VP19 基因分析结果表明, 只有 VP19 和 VP15 具有 TATA 框, 由此看来 TATA 框并非其转录所必须的.

### 3.2 中国大陆株

病毒分离自中国厦门市养殖的日本对虾(*Penaeus japonicus*), Yang 等报道的 WSSV 中国大陆株基因组序列全长 305 107 bp<sup>[18]</sup>, GenBank Accession No. AF332093, 含 531 个 ORF, 确定其中 181 个 ORF 可编码有功能的蛋白, 全基因组长度比 van Hulten 公布的全序列<sup>[17]</sup> 多出了 12 kb. 因为复制起点不知, 用 *Bam*HI 酶切大片段作为起始点, 其基因组 3% 是由 9 个同源重复区构成, 其余 97% 是特异的. 在这 181 个 ORF 中, 96 个翻译产物具有潜在的跨膜域, 32 个翻译产物具有信号肽序列和高度疏水域. 其中, 80% ORF 下游具有 poly(A), 只有 45 个 ORF 编码与其他已知蛋白或结构域类似的多肽(同源性大于 20%), 余下的预测蛋白序列与已知蛋白没有任何同源性或不包括任何特定结构域.

### 3.3 中国台湾株

病毒分离自中国台湾的斑节对虾(*Penaeus monodon*), Tsai 报道的 WSSV 中国台湾株基因组序列全长 307 287 bp<sup>[47]</sup>, GenBank Accession No. AF440570, 是 3 株 WSSV 分离株中基因组最大的, 比 van Hulten<sup>[17]</sup> 公布的全序列多出 14 kb, 以 TaiMore 表示. 与中国大陆株基因组序列一样, 比泰国株多出的序列都位于同一位置 31 135 bp 处, 其余序列基本一致. 3 者的关系如图 1 所示.

目前, ICTV 白斑病毒研究委员会选择了中国大陆株作为该属的代表株系, 其基因组的基本结构如图 2 所示.

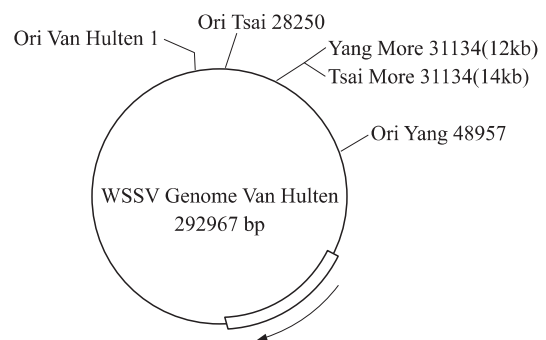


图1 WSSV 基因组结构

Fig. 1 The structure of WSSV genomic map

## 4 WSSV 的宿主

WSSV 病毒的感染力非常强, 养殖对虾被感染后 3 d ~ 10 d 内累积死亡率可达 100%, 给对虾养殖业带来巨大的损失<sup>[17, 34]</sup>. WSSV 的宿主非常广泛, 在甲壳类和昆虫纲动物中均有其敏感的宿主, 以虾、蟹等十足目物种为多, 已发现和确定的有近 40 种. 雷质文等<sup>[8]</sup>运用斑点杂交和组织病理学方法以及对典型样品进行原位杂交证明 WSSV 可自然感染中国对虾、南美白对虾、脊尾白虾、斑节对虾、刀额新对虾、天津厚蟹、日本大眼蟹, 说明上述物种是 WSSV 的天然宿主. 这个结果与 Lightner<sup>[10]</sup>、Chang<sup>[48]</sup> 等人的实验结果一致. 克氏原螯虾、哈氏美人虾、肉球方蟹、短脊鼓虾可被 WSSV 人工注射感染, 它们是否是 WSSV 的天然宿主有待进一步研究<sup>[8]</sup>. 黄健等用单抗 ELISA<sup>[49]</sup> 在浮游生物、海葵、糠虾、白虾、毛虾等动物中检测出 WSSV. Lo 等用 PCR 法<sup>[1]</sup> 在厚蟹(*Helice tridens*)、桡足类和昆虫(Ephydriidae) 体内检出 WSSV. 魏静等<sup>[50]</sup> 首次证实 WSSV 可在克氏原螯虾体内增殖, 且染毒克氏原螯虾与对虾组织病理学相似. 雷质文等<sup>[8]</sup> 在浸浴感染的藤壶体内未检出 WSSV, 而在注射感染 10 d 的藤壶体内可检出 WSSV. 但何建国等用 PCR、生物检验(Bioassay)、组织病理和电镜技术在藤壶体内未检出 WSSV<sup>[7]</sup>. 由此推断, 藤壶在自然条件下不是 WSSV 的宿主. 卤虫、轮虫等在传播 WSSV 中的作用近几年也有报道<sup>[51]</sup>.

## 5 WSSV 的传播途径

WSSV 的传播途径主要有以下 3 种.

### 5.1 水平传播

水平传播为目前公认的 WSSV 的传播方式, 主要是通过口传播<sup>[49, 51, 52]</sup>. 另外, 携带 WSSV 的苗种的引入、携带 WSSV 的水产经济甲壳动物的交易、运输设备被 WSSV 污染等, 也会导致 WSSV 的引入和传播<sup>[8]</sup>.

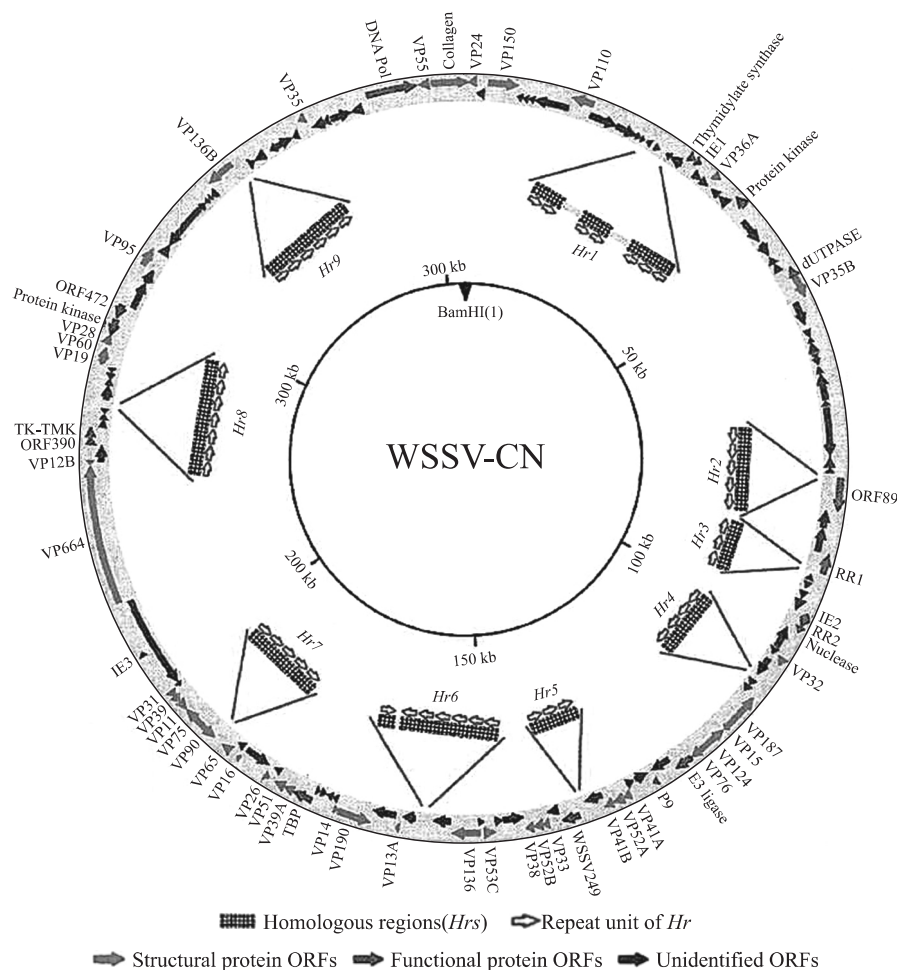


图2 WSSV(中国大陆株)基因组基本结构

Fig.2 The structure of WSSV( Chinese mainland strain) genomic map

## 5.2 垂直传播

Lo 等用 PCR 和原位杂交技术<sup>[1]</sup>在雄虾精小管外围的结缔组织检测到 WSSV 感染;同时在雌虾卵巢滤泡细胞、卵原细胞和初级卵母细胞等也检测到 WSSV 感染,但在发育成熟的卵细胞中没有发现 WSSV,推测被感染的初级卵母细胞在发育成熟过程中被清除.江世贵等发现感染 WSSV 的斑节对虾亲虾能产出携带 WSSV 的卵<sup>[53]</sup>,且这些卵可发育成部分携带 WSSV 的幼体.

## 5.3 其他方式

人们已经发现 WSSV 可以在多毛类的消化道中累积,在那儿 WSSV 的感染依然存在.因此,蠕虫在水生生物系统中可以被视为是一种被动的 WSSV 带菌者.此外,当摄取被 WSSV 感染的蠕虫后,WSSV 可以横向感染,成功率高达 83%.最后,还有报道声称海鸟可能是病毒潜在的传播途径.

# 6 对虾白斑综合症病毒的病症

对虾感染白斑综合症病毒后,会减少进食并在其甲壳上出现白斑.特别是在头胸甲处,身体褪色,略呈红色.头胸甲膨大向外张开,易于剥离;淋巴器官和肝胰腺肿大,肠胃空瘪;鳃、皮下组织、胃、心脏等组织均发生病变.在光学显微镜下观察,部分细胞核肿大、游离;粘膜下层结构组织空泡化,结缔组织糜烂,只剩余少量核及细胞残屑;坏死上皮及肌束间均有肿大的离散细胞核,约为正常核的 1.5 倍.透射电镜照片显示:感染 WSSV 后的病虾在感染前期,靶细胞核膨胀,核仁分解,染色质浓缩成团块或破成数小块并边移,内质网断裂,核糖体脱落,线粒体肿胀,高尔基体增生形成膜迷路,溶酶体空泡化;感染中期,病毒粒子在核内大量复制并充满整个细胞核,细胞质混浊,细胞形态模糊不清;感染后期,细胞核胀破,病毒粒子从核内释放出来,细胞器解体,细胞功能丧失,行动变得迟缓,漫游于水面或伏于池边水底不动,很快会死亡<sup>[54]</sup>.

## 7 对虾白斑综合症病毒主要的结构蛋白

1999~2001年期间,中国科学家完成了 WSSV 基因组全序列的测定,并进行了深入的研究<sup>[55]</sup>。目前共发现 23 种主要蛋白,现分述如下。

### 7.1 VP26

VP26 是在 WSSV 病毒粒子中含量非常高的主要结构蛋白之一。作为粘附蛋白将病毒颗粒绑定于宿主细胞上从而进一步侵害宿主细胞<sup>[9 28]</sup>。van Hulten 等<sup>[56]</sup>鉴定了该蛋白的基因序列,该蛋白序列在 N 端存在 30 个氨基酸的跨膜结构域,认为该蛋白为核衣壳蛋白,但刘非等<sup>[57]</sup>综合计算机分析结果和动物 DNA 病毒的特性,倾向于认为 VP26 与 VP28 功能是相似的,并且二者可能都为囊膜蛋白。Zhang 等用免疫金抗体定位其也为囊膜蛋白<sup>[58]</sup>。

### 7.2 VP28

VP28 是对虾白斑综合症病毒的主要囊膜蛋白,已有实验证明 VP28 是对虾致病的主要蛋白之一<sup>[59]</sup>,该基因是由 ORF421 编码。van Hulten 等通过对该蛋白的 N-末端氨基酸序列测定,确定了 *vp28* 基因序列,同时认为其蛋白的 N-末端存在潜在的跨膜区,N-端和 O-末端存在潜在的多个糖基化位点<sup>[60]</sup>;赵新颜通过计算机分析 VP28 的氨基酸残基序列时发现 VP28 的 N 端存在着一个强疏水区,其中可能包括一个穿膜  $\alpha$  螺旋区<sup>[61]</sup>。刘非等研究发现 VP28 蛋白可独立地与宿主细胞表面发生结合<sup>[57]</sup>,因而可以推断这个蛋白极可能参与 WSSV 侵染宿主的初始阶段。van Hulten 等<sup>[59]</sup>通过杆状病毒表达系统表达 VP28,并用兔子制备相应的多克隆抗体,结果显示,VP28 的抗血清能中和 WSSV 对对虾的感染,并且证明了 VP28 定位于病毒粒子表面,可推知 VP28 在 WSSV 感染对虾的初级阶段起了重要作用。Li 等<sup>[62]</sup>的研究结果证明,VP (19+28) 融合蛋白的抗血清在 15℃~22℃ 对对虾抗 WSSV 有 100% 的保护率;在 26℃ 时,有 65% 的保护率。

### 7.3 VP24

van Hulten 等<sup>[56]</sup>从纯化的病毒中分离鉴定出 VP24,并且发现 VP24 和 VP26、VP28 有很高的同源性,推测他们可能来源于同一祖先。VP24 由 208 个氨基酸构成,具有 4 个潜在的 N-连接糖基位点,1 个 O-连接糖基化位点和 9 个可能磷酸化位点<sup>[63]</sup>。

### 7.4 VP31

Tsai 等发现了该蛋白,认为 VP31 由 WSSV396 ORF 编码,共有 261 个氨基酸,理论分子量为 30 kDa,电泳图谱显示为 31 kDa<sup>[64]</sup>。Li 等<sup>[62]</sup>通过 Western blot 和 IEM (Immuno-electron microscopy method) 分析证明 VP31 是囊膜蛋白,其专一存在于病毒囊膜中,在基因组中位置从 196 252 至 195 510 碱基位点,随后在中和试验中进一步证实了 VP31 在 WSSV 感染对虾过程中起中和作用。

### 7.5 VP15

VP15 属于核衣壳蛋白<sup>[65]</sup>,由 ORF109 编码,它在基因组上的核苷酸位点是 163 996~164 238,是一单拷贝基因。VP15 具有 8 个潜在的磷酸化位点,其 N-末端和 O-末端均没有糖基化,理论等电点(pI)值为 13.2,是强碱性蛋白,说明该蛋白可能是与核酸相结合的多肽,具有潜在的浓缩和包装病毒基因组的功能。

### 7.6 VP19

VP19 是囊膜蛋白的主要成分之一,基因全长 366 bp,由 ORF182 编码,它主要具有 2 个跨膜结构域,通过这 2 个结构域锚定在囊膜上<sup>[56]</sup>。贾启军等通过给螯虾注射 Trx-VP19<sup>[67]</sup>,发现螯虾个体抗 WSSV 感染能力提高了,这进一步证实了 WSSV 的结构蛋白可以被螯虾免疫系统识别。WSSV 的几个主要衣壳蛋白 VP15、VP28、VP24、VP26、VP19 都不存在糖基化,这也是 WSSV 不同于其他有囊膜病毒之处<sup>[21]</sup>。

### 7.7 VP35

VP35 被认为在病毒核酸侵入细胞中起重要作用。Chen 用昆虫细胞表达该蛋白,发现其定位于细胞核,有 2 个核定位信号(NLS),其中一个的 N-末端 4 个带正电荷的氨基酸残基 KRKR 对 VP35 核定位信号的功能至关重要,将 KRKR 突变为 AAAA 后,发现 VP35 定位于细胞质<sup>[67]</sup>。

### 7.8 VP36A

VP36A 是由 wssv ORF134 编码,共由 297 个氨基酸组成,为囊膜蛋白,理论分子量为 33.1 kDa,电泳图谱显示为 36 kDa。Tsai 等研究发现 VP36A 与 VP31、VP36B、VP110、VP136A 和 VP664 均具有 RGD 位

点<sup>[64]</sup>. Li 等<sup>[62]</sup> 根据这一特性,构建了 VP31、VP36A、VP36B 这 3 个蛋白的原核表达体系,并制备了相应的抗体,进行中和实验.结果显示 VP31、VP36A 和 VP36B 抗体对克氏原螯虾最初感染阶段有明显的延缓效果,但是注射抗体 11 d 后死亡率仍然达到 100%. 然而 VP36B 和 VP31 混合抗体在阻断 WSSV 感染上有很好的效果.

7.9 VP466

Yang 等首先报道了 *vp466* 基因<sup>[18]</sup>,其在 WSSV 基因组中位置从 177 124 至 178 521 碱基位点,总长为 1 398 bp,编码 466 个氨基酸. Huang 等<sup>[68]</sup> 通过蛋白质分离方法、分子生物学手段对 VP466 蛋白进行相关研究,其理论分子量为 51.2 kDa,理论等电点 (pI) 值为 6.51,并通过免疫鼠抗体进行 Western blot 检测其特异性,用免疫标记证明 VP466 是 WSSV 囊膜蛋白的一种. Wu 等制备了 VP466 的抗体,并进行了中和实验<sup>[69]</sup>,结果表明,该抗体能延缓 WSSV 的感染过程.

表 1 WSSV 基因组中推测和已鉴定的功能蛋白

Table 1 The putative and identified functional proteins of WSSV genome

ORF	位置和大小	预测结构与功能	参考文献
结构蛋白	WSV001	300501-445( 1 684)	胶原蛋白, TM, 保护病毒粒子, 使病毒粒子在环境中长时间存活
	WSV002	1118-495( 208)	核衣壳蛋白 VP24, TM, SP
	WSV214	115053-115292( 80)	DNA 结合蛋白, 使基因组 DNA 高度螺旋化
	WSV254	141696-142538( 281)	囊膜蛋白 VP28
	WSV308	177124-178521( 466)	囊膜蛋白 VP466
	WSV311	180036-179425( 204)	核衣壳蛋白 VP26, TM, SP
	WSV414	241637-241275( 121)	囊膜蛋白 VP19, TM, SP
	WSV421	244242-244853( 204)	囊膜蛋白 VP28, TM, SP
参与核苷酸代谢的酶	WSV067	31092-31958( 289)	胸苷酸合成酶
	WSV112	51809-50427( 461)	dUTP 酶
	WSV172	91607-89064( 848)	核苷酸还原酶大亚基, TM
	WSV 188	97548-98786( 413)	核苷酸还原酶小亚基, TM
	WSV395	231603-232796( 398)	胸苷激酶; ATP/GTP 结合基
参与 DNA 复制和转录的蛋白质	WSV083	40718-38976( 581)	蛋白激酶, TM
	WSV100	45951-47822( 624)	CBP; Cys2/Cys2-type 锌指
	WSV191	98854-99786( 311)	核酸, TM, SP
	WSV289	169814-165120( 1 565)	蛋白激酶, TM
	WSV303	173178-175850( 891)	TBP; Cys2/Cys2-type 锌指, TM
	WSV423	247143-244954( 730)	蛋白激酶, TM
	WSV447	264975-259168( 1 936)	解旋酶, ATP/GTP 结合基
	WSV514	292190-298774( 2 195)	DNA 聚合酶, TM
	WSV472	249230-247362( 623)	EF-hand 钙结合基
蛋白基	WSV079	38917-37385( 511)	EF-hand 钙结合基; 指环样蛋白; 丝氨酸/天冬氨酸丰富区

注: TM: transmembrane domains; SP: signal peptides;  
TBP: TATA-box binding protein; CBP: CREB-binding protein.

8 WSSV 的检测方法

WSSV 的主要检测方法有: 目视观察法、传统组织学方法、电子显微技术、生化检验法、细胞培养方法、免疫学的 ELISA 技术、分子生物学的核酸探针和 PCR 技术等<sup>[70]</sup>.

8.1 目视观察法

目视观察法是通过观察白斑综合症的典型症状进行判断,如观察是否有虾体出现白斑、虾在池边打圈或常静卧水底、行动缓慢、离群、不喜进食、甲壳易被剥离等症状进行判断. 这种方法简便易行,可随时进行观察诊断,以便及时发现,采取抢救措施,减少损失<sup>[70]</sup>.

8.2 传统组织学方法

主要方法有 T-E 染色法和 H-E 染色法等. 黄健等首创的一种用于现场检测的方法,即 T-E 染色法,整个过程只需 10 min 左右,具有快速、简单、方便等优点,对比其染色效果比 Giemsa 染色涂片法好许多<sup>[71]</sup>.



### 8.3 PCR 检测方法

PCR 具有特异性高、简单、快速等特点,因而被广泛运用于 WSSV 的检测. PCR 技术的原理是根据病毒 DNA 序列,设计 PCR 引物,直接扩增样品中待检测病毒的 DNA 片段,通过电泳、染色把它显示出来.近年来,一些学者还对 PCR 技术作了不同的改进,已发展为 RT-PCR、套式 PCR、竞争式 PCR 等方法,使检测方法更加快速、准确<sup>[72]</sup>.

### 8.4 随机扩增多态性 DNA(RAPD) 方法

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)即随机扩增多态性 DNA 标记,是 1990 年发明并发展起来的,是建立在 PCR(Polymerase Chain Reaction)基础之上的一种可对整个未知序列的基因组进行多态性分析的分子技术.其基本原理是采用随机合成的较短的单个随机引物,对病毒或其他生物基因 DNA 进行 PCR 扩增.孔杰等将这一技术用于鉴别对虾病毒,发现 1994 年和 1995 年引起中国对虾死亡的病原同为 WSSV<sup>[73]</sup>.

### 8.5 免疫学检测方法

免疫学检测技术是建立在抗原抗体反应的基础之上,利用已知的抗原检测未知的抗体或利用已知的抗体检测未知的抗原.

酶联免疫吸附试验(ELISA)是目前应用最广泛的免疫检测方法.该方法是将二抗标记上酶,抗原抗体反应的特异性与酶催化底物的作用结合起来,根据酶作用底物后的显色变化来判断试验结果,其敏感度可达 ng 水平.涂小林等采用多克隆抗体酶联免疫技术成功地检测了 WSSV,建立了病毒的间接 ELISA 检测方法<sup>[74]</sup>.汪岷等建立了双抗体夹心直接 ELISA 的检测方法<sup>[75]</sup>,但是由于多克隆抗体的专一性不强,容易造成 WSSV 免疫学检测中的假阳性,所以最佳方案是制备单克隆抗体.

### 8.6 核酸探针技术

核酸探针(DNA probe)是指被某种物质标记了的从而可以被探测到的核酸片段,它能特异性地与待检测的核酸结合、杂交.核酸探针检测技术中核酸探针的制备方法有 2 种,其一是分离质粒制备探针法;其二是采用 PCR 合成法.Lightner 等利用 DNA 探针技术研究早期病毒在宿主中的传播<sup>[76]</sup>.张岩用 Pub18 构建了 WSSV 的 DNA 重组质粒,提取后经斑点杂交及酶切分析,证实了质粒中插入的片段为病毒 DNA<sup>[77]</sup>.刘萍等从纯化的病毒中提取 DNA,用限制性内切酶酶切并组装到质粒上构建 WSSV 的 DNA 文库,并从中筛选出 3 种重组质粒,分别用光敏生物素标记做成核酸探针,用于检测 WSSV,取得了很好的结果<sup>[78,79]</sup>.徐洪涛等利用地高辛标记的 WSSV DNA 探针,对病虾标本及纯化 DNA 进行斑点杂交检测<sup>[80]</sup>.另一种核酸探针检测技术是原位杂交,可运用原位杂交技术来确定 WSSV 的宿主和传播途径,直观定位是否是 WSSV 的靶组织及靶组织中 WSSV 敏感的细胞类型<sup>[2,81]</sup>.Chang 等<sup>[81]</sup>则用原位杂交法对斑节对虾的 WSSV 进行了检测.

## 9 WSSV 的防治方法

到目前为止,还没有一个很好的治疗 WSSV 病的方法,所以早期预防就显得极为重要.病原体、虾体和环境是虾类发病的 3 个重要因素,三者相互影响.因此,预防 WSSV 病的产生也应从这 3 个方面采取综合性的防治措施.

### 9.1 改善养殖环境

对虾养殖池是一个高密度放养的相对独立的生态系统,其自我调节能力小、稳定性差,因此要恰当管理,改善养殖环境,注意养殖用水的消毒、大量增氧等处理.另外,还要合理控制对虾养殖的密度.

### 9.2 控制和消灭病原体

首先要保证亲虾的质量,切断病原的传播途径.亲虾入池前,应严格检验,凡带病毒或有伤残的亲虾应该淘汰.另外,亲虾入池前还应进行适当的杀菌处理,以消灭体表病原体.此外,还应对虾池进行严格消毒,以控制和消灭病原体.

### 9.3 提高对虾机体抗病能力

已有一些报道<sup>[82]</sup>利用药物饵料提高虾体自身非特异性免疫能力.王雷<sup>[83]</sup>、Direkbusarakom<sup>[84]</sup>研究发现,口服免疫多糖或中草药能使对虾免疫活性和抗毒力有所提高; $\beta$ -葡聚糖已经成功应用于鱼类及甲壳

类中以提高其对细菌及病毒抗感染能力<sup>[85-89]</sup>。除此之外,还有许多研究者在虾饲料中添加免疫增强物质也达到了很好地增强对虾抗病能力的效果<sup>[85-88]</sup>。

## 10 存在的问题及展望

虽然到目前为止,国内外对 WSSV 的研究已有较大进展,但还是远远不够的,如很多基因和蛋白的结构与功能还不清楚;对 WSSV 的致病机理的研究还不够深入;亦没有一种很好地防治 WSSV 的抗体或疫苗。而且,海洋病毒和它们各自宿主的相互作用的研究仍处在一个初期阶段,还有大量的研究工作值得科技工作者们去开展。

### [参考文献]

- [1] Lo C F, Ho C H, Peng S E. White spot syndrome baculovirus( WSBV) detected in cultured and capture shrimp, crabs and other arthropods[J]. Dis Aquat Organ, 1996, 27( 3) : 215-225.
- [2] Wang C S, Tsai Y J, Chen S N. Detection of white spot baculovirus infection in shrimp using in site hybridization[J]. J Invertebr Pathol, 1998, 72( 2) : 170-173.
- [3] Chen L L, Lo C F, Chiu Y L, et al. Natural and experimental infection of white spot syndrome virus( WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata* [J]. Dis Aquat Organ, 2000, 40( 2) : 157-161.
- [4] Sahul Hameed A S, Xavier Charles M, Anilkumar M. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus [J]. Aquaculture, 2000, 183( 3/4) : 207-213.
- [5] Sahul Hameed A S, Yoganandhan K, Sathish S, et al. Experimental pathogenicity of white spot syndrome virus( WSSV) in two freshwater crabs( *Paratylus hydromedusa* and *P. pulvinata*) [J]. Aquaculture, 2001, 201( 3/4) : 179-186.
- [6] Sahul Hameed A S, Murthi B L M, Rasheed M, et al. An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus( WSSV) transmission to *Penaeus indicus* [J]. Aquaculture, 2002, 204( 1/2) : 1-10.
- [7] 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.
- [8] 雷质文, 黄健, 史成银, 等. 白斑综合症病毒( WSSV) 的宿主调查[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33( 3) : 250-258.
- [9] Sánchez-Paz A. White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern[J]. Vet Res, 2010, 41( 6) : 43.
- [10] Lightner D V. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp[M]//Section 3: Viruses World Aquaculture. Louisiana: Baton Rouge, 1996.
- [11] Wang B, Li F H, Dong B, et al. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus( WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray[J]. Mar Biotechnol, 2006, 8( 5) : 491-500.
- [12] Wang H C, Wang H C, Leu J H, et al. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection[J]. Dev Comp Immunol, 2007, 31( 7) : 672-86.
- [13] Lei K, Li F, Zhang M, et al. Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense [J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32( 7) : 808-813.
- [14] Sarathi M, Nazeer B A, Ravi M, et al. Clearance of white spot syndrome virus( WSSV) and immunological changes in experimentally WSSV-injected *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2008, 25( 3) : 222-230.
- [15] Xu H, Yan F, Deng X B, et al. The interaction of white spot syndrome virus envelope protein VP28 with shrimp Hsc70 is specific and ATP-dependent[J]. Fish & Shellfish Immunol, 2009, 26( 3) : 414-421.
- [16] Wongteerasupaya C, Vickers J E, Sriurairatana S, et al. A non-occluded systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. Dis Aquat Organ, 1995, 21( 1) : 69-77.
- [17] 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.
- [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] 康桦华, 陆承平. 对虾白斑综合症病毒中国地方株变异区基因的比较[J]. 病毒学报, 2007, 23( 6) : 490-493.
- [20] He J G, Deng M, Long Q X, et al. Theory and strategies for controlling white spot syndrome( WSS) of cultured *Penaeus monodon* in South China [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2000, 39( Suppl) : 147-153.



- [21] 易志刚, 黄健, 李筠. WSSV 结构、功能及基因组学研究概况[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(1): 79-84.
- [22] Xu J Y, Han F, Zhang X B. Silencing shrimp white spot syndrome virus( WSSV) genes by siRNA[J]. Antiviral Res, 2007, 73(2): 126-131.
- [23] 王玉珍, 张晓华, 肖因, 等. 一种抗对虾白斑综合症病毒( WSSV) 线性抗原表位单链抗体的筛选[J]. 生物工程学报, 2008, 24(8): 1387-1394.
- [24] 王吉桥, 姜玉声, 张健. 白斑综合征病毒( White spot syndrome virus) 的形态和分子生物学[J]. 现代渔业信息, 2008, 23(11): 3-6.
- [25] Tan Y W, Shi Z L. Proteomic analyses of the shrimp white spot syndrome virus[J]. Virological Sinica, 2008, 23(3): 157-166.
- [26] Escobedo-Bonilla C M, Alday-Sanz V, Wille M, et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus[J]. J Fish Dis, 2008, 31(1): 1-18.
- [27] 曾勇, 陆承平, 朱建中. cDNA 芯片结合抑制性差减杂交技术构建对虾白斑综合症病毒表达基因和螯虾免疫相关基因文库[J]. 水产学报, 2006, 30(5): 690-694.
- [28] Sarathi M, Simon M C, Ishaq Ahmed V P, et al. Silencing VP28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA[J]. Mar Biotechnol, 2008, 10(2): 198-206.
- [29] 解云礼. 对虾白斑综合症病毒( White Spot Syndrome Virus, WSSV) 一个结构蛋白基因的功能研究和病毒重组系统的构建[D]. 武汉: 中国科学院武汉病毒研究所, 2003.
- [30] 肖广侠, 李战军, 孟宪红, 等. 白斑综合症病毒( WSSV) 3 种 PCR 检测方法的灵敏度比较[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 667-673.
- [31] 周俊芳, 杨先乐, 万夕和, 等. 不同靶点 shRNA 干扰对虾白斑综合症病毒增殖效果分析[J]. 华中农业大学学报: 自然科学版, 2011, 30(1): 105-108.
- [32] 陈秀男, 张朴性, 郭光雄. 草虾杆状病毒之特性[C]//中华台北: 渔业特刊第四十二号, 1993: 4-10.
- [33] 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 Pathol, 1994, 29(2): 149-158.
- [34] 黄健, 宋晓玲, 于佳. 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[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 1-10.
- [35] Nadala E C B Jr, Tapay L M, Loh P C. A comparative study of three different isolates of white spot virus[J]. Dis Aquat Organ, 1998, 33(3): 231-234.
- [36] Lo C F, Lightner D V, Ho C H, et al. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus[J]. Dis Aquat Organ, 1999, 35: 175-185.
- [37] Wang Q. SDS-PAGE of the structural protein of six geographic isolates of the white spot syndrome virus and partial amino acid sequencing of three of the major structural polypeptides[D]. Arizona: College of Agriculture and Life Sciences, University of Arizona, 1999: 112-132.
- [38] 洪健, 周雪平. ICTV 第八次报告的最新病毒分类系统[J]. 中国病毒学, 2006, 21(1): 84-96.
- [39] Kasornchandra J, Wongteerasupaya C, Sitidilokratana N, et al. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and PCR[J]. Aquaculture, 1998, 164(1): 243-251.
- [40] Chou H Y, Huang C Y, Wang C H, et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan[J]. Dis Aquat Org, 1995, 23(3): 165-173.
- [41] Wang C H, Lo C F, Leu J H, et al. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with spot syndrome( WSBV) of *Penaeus monodon*[J]. Dis Aquat Org, 1995, 23(3): 239-242.
- [42] 郭银汗, 林诗发, 杨小强, 等. 福州地区白斑病毒的超微结构[J]. 中国病毒学, 2000, 15: 277-284.
- [43] 黄捷, 于佳, 宋晓玲, 等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 11-23.
- [44] van Etten J L. Lesser Known Large dsDNA Viruses[M]. Berlin: Springer, 2009.
- [45] 谢数涛, 任涛, 辛朝安. 对虾白斑症 I: 病原生物[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2000, 39(6A): 234-237.
- [46] 石拓, 孔杰, 包振民, 等. 从中国对虾分离纯化的一种杆状病毒及其超微结构的研究[J]. 海洋学报, 1998, 20(2): 60-64.
- [47] Tsai M F, Yu H T, Tzeng H F, et al. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular type thymidine kinase and thymidylate kinase[J]. Virology, 2000, 277(1): 100-110.

- [48] Chang P S ,Chen H C ,Wang Y C. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp ,crab and lobsters by in situ hybridization [J]. Aquaculture ,1998 ,164( 1/4) : 233-242.
- [49] 黄捷 ,于佳 ,王秀华 ,等. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血器官组织坏死病的病原及其传播途径 [J]. 海洋水产研究 ,1995 ,16( 1) : 40-50.
- [50] 魏静 ,陆承平 ,黄捷 ,等. 用对虾的致病病毒人工感染克氏原螯虾 [J]. 南京农业大学学报: 自然科学版 ,1998 ,21( 4) : 78-82.
- [51] 邓灯 ,刘萍 ,孔杰. 卤虫在 WSSV 病毒病传播中的媒介作用 [J]. 海洋水产研究 ,2004 ,25( 5) : 35-41.
- [52] Corsin F ,Turnbull J F ,Hao N V ,et al. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice-shrimp farming system [J]. Dis Aquat Organ ,2001 ,47( 1) : 1-12.
- [53] 江世贵 ,何建国 ,马之明 ,等. 白斑综合症病毒对斑节对虾幼体和仔虾的致病性 [J]. 中山大学学报: 自然科学版 ,2000 ,39( 增刊) : 172-176.
- [54] 张吕平 ,胡超群 ,吴灶和. 实验感染白斑杆状病毒( WSBV) 的斑节对虾血液病理学研究 [J]. 热带海洋 ,2000 ,19( 3) : 1-6.
- [55] Feng Y ,Jun H ,Xiong H L ,et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [J]. Journal of Virology ,2001 ,75( 23) : 11811-11820.
- [56] van Hulten M C W ,Goldbach R W ,Viak J M ,et al. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication [J]. J Gen Virol ,2000 ,81( pt10) : 2525-2529.
- [57] 刘非 ,寸树健 ,杨凯 ,等. 对虾白斑综合症病毒( WSSV) 结构蛋白 VP28 与 VP26 的功能分析 [J]. 中山大学学报: 自然科学版 ,2006 ,45( 4) : 83-86.
- [58] Zhang X ,Huang C ,Xu X ,et al. Transcription and identification of an envelope gene( p22) from shrimp white spot syndrome virus [J]. J Gen Virol ,2002 ,83( 2) : 471-477.
- [59] van Hulten M C W ,Witteveldt J ,Marjolein S ,et al. White spot syndrome virus envelop protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp [J]. Virology ,2001 ,285( 2) : 228-233.
- [60] van Hulten M C W ,Westenberg M ,Snippe M ,et al. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp [J]. Virology ,2000 ,266( 2) : 227-236.
- [61] 赵新颜 ,魏聪 ,戴玲芳 ,等. 对虾白斑综合症病毒结构蛋白 VP28 的原核表达和性质研究 [J]. 水生生物学报 ,2004 ,28( 3) : 234-239.
- [62] Li H X ,Meng X L ,Xu J P ,et al. Protection of crayfish *Cambarus clarkia* from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein [J]. J Fish Dis ,2005 ,28( 5) : 285-912.
- [63] Huang C ,Zhang X ,Lin Q ,et al. Characterization of a novel envelope protein( VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry [J]. J Gen Virol ,2002 ,83( pt 10) : 2385-2392.
- [64] Tsai J M ,Wang H C ,Leu J H ,et al. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus [J]. J Virol ,2004 ,78( 20) : 11360-11370.
- [65] Van Hulten M C W ,Reijns M ,Vermeesch A M ,et al. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus( WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins [J]. J Gen Virol ,2002 ,83( pt1) : 257.
- [66] 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.
- [67] Chen L L ,Leu J H ,Huang C J ,et al. Identification of a nucleocapsid protein( VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells [J]. Virology ,2002 ,293( 1) : 44-53.
- [68] Huang C ,Zhang X ,Lin Q ,et al. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466 [J]. Mol Cell Proteomics ,2002 ,1( 3) : 223-231.
- [69] Wu W L ,Wang L ,Zhang X B. Identification of white spot syndrome virus( WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection [J]. Virology ,2005 ,332( 2) : 578-583.
- [70] 郑天伦 ,王国良. 对虾白斑综合症病毒研究进展 [J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版 ,2002 ,21( 1) : 57-61.
- [71] 黄捷 ,杨丛海 ,于佳 ,等. T-E 染色法用于对虾暴发性流行病的现场快速诊断 [J]. 海洋科学 ,1995( 1) : 29-34.
- [72] 吕玲 ,何健国 ,谢数涛 ,等. 白斑综合症杆状病毒( WSBV) PCR 检测方法的改进及应用 [J]. 热带海洋 ,2000 ,19( 2) : 90-95.
- [73] 孔杰 ,韩玲玲. 中国对虾一种 C 型杆状病毒随机扩增多态性 DNA 分析 [J]. 海洋与湖沼 ,1997 ,28( 4) : 394-398.

- [74] 涂小林, 钟江, 高双城, 等. 中国对虾一种杆状病毒的 ELISA 检测方法[J]. 水产学报, 1995, 19(4): 315-321.
- [75] 汪岷, 戴继勋. 对虾病毒的研究进展[J]. 海洋湖沼通报, 2000(2): 71-77.
- [76] Lightner D V, Jones L S, Warre G W. Proceeding of the Taura Syndrome Workshop: executive summary reports, and transcribed notes[R]. Tucson: University of Arizona, 1994.
- [77] 张岩, 刘萍, 孔杰, 等. 对虾病毒 HHNBVDNA 构建质料的研究与分析[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 68-71.
- [78] 刘萍, 孔杰, 李健, 等. 暴发性流行病病原对中国对虾仔虾的人工感染试验研究[J]. 海洋科学, 1998, 16(1): 1-4.
- [79] 刘萍, 张岩, 孔杰, 等. 中国对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒 DNA 探针的制备及应用[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 59-62.
- [80] 徐洪涛, 朴春爱, 杨朵, 等. PCR 方法制备地高辛标记 DNA 探针检测中国对虾非包涵体型杆状病毒[J]. 病毒学报, 2000, 16(1): 73-75.
- [81] Chang P S, Lo C F, Wang Y C, et al. Identification of white spot syndrome associated baculovirus( WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization[J]. Dis Aquat Org, 1996, 27(2): 131-139.
- [82] 萧歌. 中国对虾病害防治新技术——口服多糖类免疫药物研制成功[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(1): 113-114.
- [83] 王雷, 李光友, 王远兴, 等. 口服免疫型药物对中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 25(5): 486-491.
- [84] Direkbusarakom S, Herunsalee A, Boonyaratpaline S, et al. Effect of *Phyllanthus* spp. against yellow-head baculovirus infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [C]//Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Asian Fisheries Society, 1995: 81-88.
- [85] Sung H H, Kou G H, Song Y L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp( *Penaeus monodon*) [J]. Fish Pathol, 1994, 29(1): 11-17.
- [86] Song Y L, Liu J J, Chan L C, et al. Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp( *Penaeus monodon*) [J]. Fish Vaccinol, 1997, 90: 413-421.
- [87] Chang C F, Su M S, Chen H Y, et al. Dietary beta-1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of *penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus[J]. Fish & Shellfish Immunol, 2003, 15(4): 297-310.
- [88] Namikoshi A, Wu J L, Yamashita T, et al. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus[J]. Aquaculture, 2004, 299(1/4): 25-35.
- [89] Chang C F, Chen H Y, Su M S, et al. Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1, 3-glucan in the brooders of the grass prawn *Penaeus monodon* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2000, 10(6): 505-514.

[责任编辑: 黄 敏]