

TẠO TÁI TỔ HỢP ADN VP28 CỦA VI-RÚT GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG (WSSV) TRÊN TÔM SÚ

Bùi Thị Bích Hằng¹

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is one of serious viruses in black tiger shrimp (Penaeus monodon). The aim of this study was making recombinant DNA content of VP28 gene of WSSV for using as antigen to develop antibody. DNA fragment of VP28 was amplified from WSSV, which infected to shrimp and showed specific band 516bp. PCR product was digested by restriction enzyme BamHI and PstI, and cloned to plasmid pUC18 by T4 DNA ligase. Recombinant DNA VP28-pU18 was transformed to Escherichia coli XL1Blue, the E. coli after transformation was examined and showed consisting DNA VP28 of WSSV

Keywords: WSSV, recombinant DNA and restriction enzyme

Title: Development DNA recombinant VP28 of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in black tiger shrimp

TÓM TẮT

Vi-rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) là một trong những vi-rút gây nguy hiểm cho tôm sú (Penaeus monodon). Mục tiêu của nghiên cứu nhằm tạo tái tổ hợp ADN của gen VP28 ở WSSV để sử dụng làm kháng nguyên cho việc phát triển kháng thể. Đoạn ADN của VP28 được khuếch đại từ vi-rút gây bệnh đốm trắng trên tôm sú thông qua biểu hiện vạch sáng đặc hiệu 516bp. Tiến hành phân cắt sản phẩm PCR bằng enzyme giới hạn BamHI và PstI, gắn kết với plasmid pUC18 bằng enzyme T4 DNA ligase. Tổ hợp VP28-pUC18 được biến nạp vào vi khuẩn Escherichia coli XL1Blue, tiến hành kiểm tra khuẩn lạc của vi khuẩn E.coli sau khi biến nạp cho thấy vi khuẩn có mang đoạn ADN VP28 của WSSV.

Từ khóa: WSSV, tái tổ hợp ADN và enzyme giới hạn

1 GIỚI THIỆU

Bệnh đốm trắng xuất hiện đầu tiên tại Đài Loan vào năm 1992, sau đó lan rộng ra nhiều nước trên thế giới (Chou *et al.*, 1995). Bệnh do white spot syndrome virus (WSSV) gây ra, vi-rút này hầu như gây bệnh trên tôm nước mặn và cả trên tôm nước ngọt, đồng thời cũng nhiễm trên rất nhiều đối tượng giáp xác khác nhau (Flegel, 1997; Hossain, 2001). Với khả năng lan truyền bệnh và gây chết tôm hàng loạt, bệnh đốm trắng đã gây thiệt hại lớn và gây ảnh hưởng không nhỏ đến nền công nghiệp nuôi tôm của nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam. Hiện nay bệnh này chưa có thuốc đặc trị nên công tác phòng ngừa và chẩn đoán bệnh sớm là một điều rất cần thiết. Đã có nhiều nghiên cứu phát triển nhiều phương pháp chẩn đoán như quan sát dấu hiệu lâm sàng và mô bệnh học, tuy nhiên các phương pháp đó cần nhiều thời gian cho công việc chẩn đoán, không giúp phát hiện bệnh sớm và đôi khi độ chính xác còn thấp, gần đây ứng dụng các phương pháp sinh học phân tử trong nghiên cứu và chẩn đoán bệnh đốm trắng được áp dụng khá nhiều như hóa mô miễn dịch, lai tại chỗ hay PCR, PCR thời gian thật, những phương pháp này mang đến độ chính xác khá cao đồng thời phát hiện bệnh rất sớm. Trong khuôn khổ bài viết này, chúng tôi bước đầu giới thiệu “Tạo tái tổ hợp ADN của

gen VP28 để phát triển kháng thể đa dòng trong chẩn đoán bệnh đốm trắng trên tôm sú”.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Dụng cụ

Máy chu kỳ nhiệt, máy so màu quang phổ, bộ micropipette, ống eppendorf 1.5 ml và 0.5 ml, máy ủ, máy li tâm, máy vortex, bộ điện di, máy chụp hình UV, lò viba, cân điện tử, que nghiền mẫu,...

Hóa chất

Dung dịch li trích ADN, ethanol, dung dịch đệm PCR, dung dịch điện di TAE, dung dịch nạp mẫu Loading dye 6X, ethidium bromide, dNTP, Taq ADN polymerase, MgCl₂, môi, agarose, nước cất,...

Mẫu vật

Mẫu tôm sú nhiễm WSSV được xét nghiệm bằng phương pháp PCR theo OIE (2006).

2.2 Phát hiện WSSV bằng phương pháp PCR

Ly trích ADN: Cho chân bơi của tôm sú có biểu hiện bệnh đốm trắng vào ống eppendorf 1,5ml. Nghiền kỹ mẫu với 500 µl dung dịch lysis (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS), 10 µg/ml Proteinase K. Ủ mẫu ở 95°C trong 10 phút. Sau đó, li tâm 12000 vòng/ phút. Chuyển 200 µl phần dịch trong phía trên sang ống nhựa 1,5 ml mới có chứa sẵn 400 µl dung dịch 95% ethanol. Lắc nhẹ, li tâm 12000 vòng/ phút trong 5 phút. Sau đó, rút bỏ ethanol và làm khô ADN. Hòa tan phần viên với 200 µl dung dịch TE (0.1 mM EDTA, 0.1 mM Tris-HCl, pH 8.0).

Khuếch đại ADN: Qui trình PCR phát hiện WSSV được thực hiện theo OIE (2006) bao gồm 2 bước. Thành phần hóa chất cho phản ứng PCR bước 1: 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 100 µM primer 146F1 và 146R1, 2U Taq DNA polymerase, mạch khuôn : 100-300 ng. Thành phần hóa chất cho phản ứng PCR bước 2 gồm 1X PCR buffer, 1.5mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 100 µM primer 146F2 và 146R2, 2U Taq DNA polymerase và 5µl sản phẩm PCR bước 1. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng lần lượt là 94°C trong 4 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút, sau đó tiếp tục 94°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút, lặp lại chu kỳ trên 39 lần và 72°C trong 5 phút cho kết thúc ở vòng cuối cùng.

Điện di sản phẩm PCR: 7µl sản phẩm PCR được điện di trên gel 1% agarose (Merck) trong dung dịch đệm 1X TAE (10 mM Tris; 5 mM acetate; 0,1 mM EDTA) ở hiệu điện thế 100V trong thời gian 45 phút. Kết quả điện di được đọc bằng bàn đọc UV. Kích thước ADN của các vạch được xác định thông qua thang ADN 1kb (Fermentas). Sản phẩm đặc hiệu của WSSV bước 1 là 1441bp và bước 2 là 941bp.

2.3 Qui trình PCR khuếch đại gen VP 28 của WSSV

Thiết kế môi cho gen VP 28: dựa theo trình tự ADN của đoạn gen VP28 của vi-rút gây bệnh đốm trắng có trên genbank, mã số AF380842.1. Trong quá trình

thiết kế mỗi tiến hành gắn thêm 2 enzyme giới hạn là BamH I (Fermentas) và Pst I (Fermentas) vào 2 đầu 5' và 3' của 2 đoạn mỗi. Trình tự mỗi như sau

VP28F: 5'-TGCACTGCAGCACACAGACAATATCGA-3'

VP28R: 5'-CGGGATCCTTACTCGGTCTCAGTGCCAG-3'

Thành phần hóa chất tham gia phản ứng PCR khuếch đại gen VP28: 1X PCR buffer, 1.5mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 1μM mỗi VP28F và VP28R, 1U Taq DNA polymerase, DNA mạch khuôn: 20ng. Điều kiện phản ứng: 95°C trong 5 phút, 95°C trong 40 giây, 63°C trong 45giây, 72°C trong 1 phút, lặp lại chu kỳ trên 30 lần, 72°C trong 5 phút cho kết thúc ở vòng cuối cùng. Sau khi phản ứng kết thúc, sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1% ở hiệu điện thế 100V trong khoảng thời gian từ 30 đến 45 phút. Kết quả sản phẩm PCR của gen VP28 là 516bp.

2.4 Tinh sạch sản phẩm PCR

Tinh sạch sản phẩm PCR được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit PCR purification (Invitrogen) với các bước như sau: cho dung dịch gắn kết vào sản phẩm PCR theo tỉ lệ 4:1, trộn đều. Tiếp tục cho toàn bộ hỗn hợp này vào cột chuyên dụng (Purelink Spin), ly tâm 10000 xg trong 1 phút, loại bỏ phần dung dịch, giữ lại cột và cho cột vào ống nhựa 1,5ml. Cho 650 μl dung dịch rửa vào cột, tiếp tục ly tâm 10000xg trong thời gian 1 phút ở nhiệt độ phòng, loại bỏ phần dung dịch, ly tâm lần 2 với tốc độ 13000 xg trong 3 phút để loại bỏ toàn bộ dung dịch rửa. Chuyển cột vào 1 ống nhựa 1,7ml mới (cung cấp theo kit), cho 50 μl dung dịch tách ADN vào giữa cột, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm ở 13000xg trong 2 phút, loại bỏ cột, phần dung dịch trong ống nhựa 1,7 ml chính là sản phẩm PCR tinh sạch. Trữ vào sản phẩm này từ âm 20 °C đến khi sử dụng.

2.5 Phân cắt DNA bằng enzyme giới hạn

Gen VP 28 được khuếch đại từ WSSV bằng phương pháp PCR được sử dụng cho quá trình phân cắt bằng enzyme giới hạn BamHI và PstI. Thành phần hóa chất tham gia quá trình phân cắt bao gồm 6 μl dung dịch đệm, 0.5 μl enzyme BamHI, 0.5 μl enzyme PstI và 30 μl DNA. Tiến hành ủ hỗn hợp ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 2 giờ. Kết thúc quá trình phản ứng, điện di 5μl sản phẩm với gel agarose 1% để kiểm tra kết quả quá trình phân cắt.

2.6 Phân cắt plasmid bằng enzyme giới hạn

Plasmid pUC18 (Fermentas) được sử dụng trong nghiên cứu. Thành phần hóa chất tham gia phân cắt plasmid bao gồm : 5 μl dung dịch đệm, 1 μl BamHI, 1 μl PstI và 5 μl plasmid. Ủ hỗn hợp trên ở 37°C trong 2 giờ.

2.7 Gắn kết gen VP28 và plasmid

Hai enzyme giới hạn là BamHI và PstI sẽ phân cắt đoạn gen VP28 và Plasmid tại cùng một vị trí có các nucleotide tương đồng nhau. Enzyme gắn kết là T4 ADN (Fermentas) để tạo cầu nối phosphodiester giữa 3'-hydroxyl và 5'-phosphate ở cuối mạch DNA. Thành phần phản ứng như sau: 10 μl dung dịch đệm 2X, 7.5 μl VP28 đã phân cắt, 1.5μl plasmid đã phân cắt và 1 μl enzyme gắn kết T4 ADN (Fermentas). Ủ ở nhiệt độ 16°C trong thời gian 12 giờ.

2.8 Biến nạp DNA tái tổ hợp VP28-pU18 vào vi khuẩn E.coli XL1 blue

Cho 20 µl của sản phẩm DNA tái tổ hợp VP28-pU18 vào ống nhựa 1,5ml có chứa 100 µl tế bào E.coli competent. Hỗn hợp này được trộn đều và giữ trong nước đá 30 phút, sau đó gây sốc nhiệt ở 42°C trong 2 phút. Cuối cùng để toàn bộ sản phẩm vào nước đá trong thời gian 5 phút. Cho toàn bộ sản phẩm trên vào 500 µl của môi trường LB, đem lắc và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Tiến hành cho toàn bộ hỗn hợp trên vào đĩa agar LB chứa 50 µg/ml ampiciline (Sigma Inc., St. Louis, MO) trải đều trên bề mặt của đĩa và ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Quan sát các khuẩn lạc mọc trên đĩa. Các khuẩn lạc này sẽ được sử dụng để kiểm tra đoạn ADN VP28 bằng phương pháp PCR.

2.9 Qui trình PCR phát hiện VP28 từ khuẩn lạc

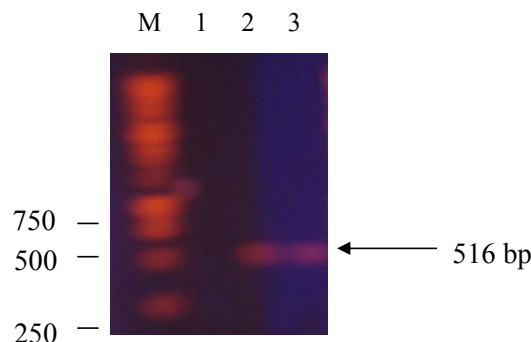
Thành phần hóa chất tham gia phản ứng PCR khuếch đại gen VP28 từ khuẩn lạc vi khuẩn: 1X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.3 µM mỗi VP28F và VP28R, 0.25 U Taq DNA polymerase, 1 ít khuẩn lạc. Điều kiện phản ứng: 94 °C trong 7 phút, 94°C trong 45 giây, 60°C trong 45 giây, 72°C trong 50 giây, lặp lại chu kỳ trên 30 lần, 72°C trong 5 phút cho kết thúc ở vòng cuối cùng. Sau khi phản ứng kết thúc, sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1% ở hiệu điện thế 100V trong khoảng thời gian từ 30 đến 45 phút. Kết quả sản phẩm PCR của gen VP28 là 516bp.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phát hiện WSSV và khuếch đại gen VP28 của WSSV

Các mẫu tôm thu có biểu hiện bệnh được tiến hành ly trích acid nucleic và kiểm tra bệnh đốm trắng bằng phương pháp PCR theo tiêu chuẩn OIE. Từ kết quả PCR cho thấy trong 10 mẫu tôm thu được từ ao nhiễm bệnh đốm trắng có 9 mẫu tôm biểu hiện bệnh khá rõ, đồng thời sau khi kết thúc phản ứng PCR cho kết quả điện di dương tính với WSSV (xuất hiện vạch tại vị trí 941bp) và một mẫu âm tính với WSSV.

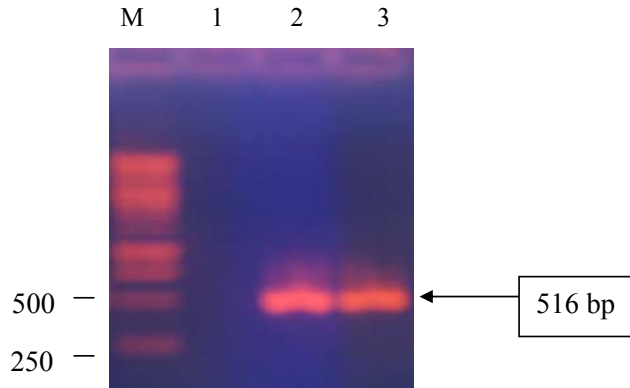
Từ những mẫu có kết quả dương tính với WSSV ở trên, chọn ngẫu nhiên 1 mẫu tôm vừa có biểu hiện bệnh rõ ràng nhất với nhiều đốm trắng xuất hiện trên vùng đầu ngực vừa cho kết quả dương tính với WSSV thông qua kết quả chạy PCR. Mẫu này sẽ được tiến hành thực hiện khuếch đại DNA của gen VP28 ở vi-rút gây bệnh đốm trắng.



Hình 1: Kết quả PCR phát hiện VP28 của WSSV

(M: thang ADN 1kb, 1: đối chứng âm; 2, 3: mẫu dương tính với WSSV)

Từ kết quả hình 1 cho thấy mẫu khảo sát hiện 1 vạch nhỏ, mờ nhạt ở vị trí 516bp. Điều này thể hiện rằng, qui trình khuếch đại gen VP28 của WSSV có hoạt động tuy nhiên vẫn chưa được tốt và cần hiệu chỉnh, tối ưu thêm một số thành phần hóa chất cũng như chu kỳ nhiệt để cho kết quả tốt hơn. Sau khi khảo sát một số chỉ tiêu như tăng chu kỳ phản ứng lên 35 lần, hàm lượng DNA khuôn được tăng lên là ng/phản ứng, nồng độ mỗi với nhiều mức 0.5 và 1.5uM, nồng độ MgCl₂ thay đổi với 4 mức 1, 2, 3 và 4nM, nồng độ taq DNA polymerase tăng lên 1.5 và 2.0 U nhưng vẫn cho kết quả với vạch ADN mờ nhạt ở vị trí 516bp. Tuy nhiên khi khảo sát nhiệt độ gắn mỗi là 58 °C, 60 °C, 62 °C và 64 °C cho kết quả điện di xuất hiện vạch sáng, rõ nhất ở vị trí 516bp ở mức nhiệt độ 60 °C.

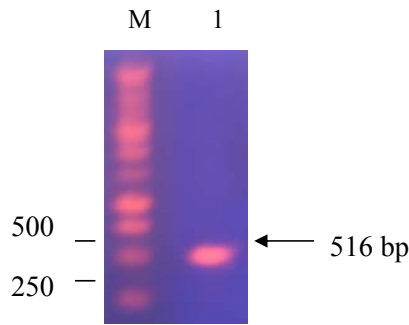


Hình 2: Kết quả PCR phát hiện VP28 ở mức nhiệt độ gắn mỗi là 60 °C

(M: thang DNA 1kb, 1: đối chứng âm, 2,3: mẫu dương tính với WSSV)

3.2 Phân cắt DNA của gen VP28 và plasmid

Phần sản phẩm PCR khuếch đại VP28 được sử dụng để tiến hành quá trình phân cắt bằng enzyme tới hạn BamHI và PstI theo qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi phân cắt, đoạn ADN VP28 được kiểm tra thông qua phương pháp điện di trên agarose. Kết quả cho thấy có rất nhiều vạch xuất hiện ở nhiều vị trí khác nhau, tuy nhiên không tìm thấy vạch DNA tại vị trí 516bp, như vậy quá trình phân cắt này thực hiện không thành công. Điều này có thể lý giải do lượng enzyme đưa vào quá ít nên quá trình phân cắt xảy ra không hoàn toàn, đồng thời sản phẩm PCR là một hỗn hợp bao gồm đoạn VP 28 và một số sản phẩm thừa trong quá trình khuếch đại. Do vậy cần có thêm một bước tinh sạch sản phẩm PCR trước khi phân cắt, đồng thời tăng nồng độ của enzyme giới hạn lên là 1ul ADN của gen VP28 sau khi thực hiện tinh sạch thông qua bộ kit tinh sạch PCR (invitrogen) để loại thải những sản phẩm thừa trong quá trình chạy PCR được sử dụng để phân cắt bằng enzyme tới hạn. Tiến hành điều chỉnh hàm lượng enzyme BamHI và PstI là 1ul mỗi loại trong phản ứng. Sau khi ủ ở điều kiện 37 °C trong 2 giờ, tiến hành điện di trong agarose và cho kết quả có vạch ở vị trí 516bp. Như vậy, đoạn DNA của gen VP28 được phân cắt thành công với enzyme tới hạn BamHI và PstI. Tương tự như VP28, Plasmid pUC18 cũng được tiến hành phân cắt bằng enzyme giới hạn BamHI và PstI. Sau khi phân cắt cũng tiến hành điện di trên agarose để kiểm tra. Kết quả điện di cho thấy plasmid thể hiện 1 vạch sáng ở vị trí 2443 bp.

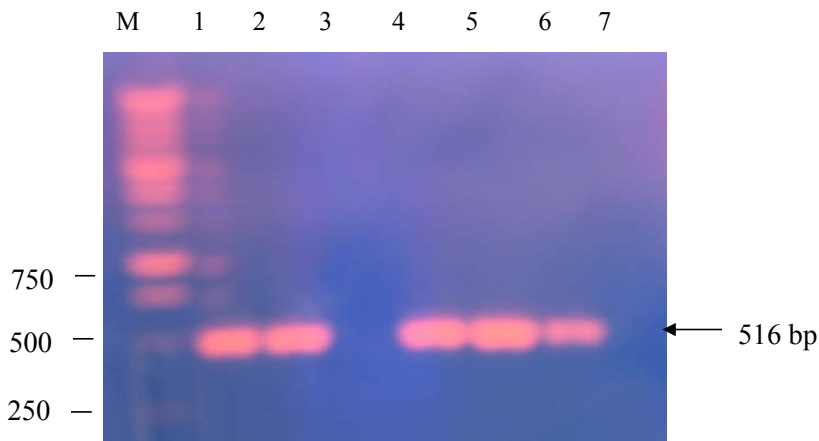


Hình 3: Sản phẩm VP 28 sau khi phân cắt bằng enzyme giới hạn

(M: thang ADN 1kb, 1: sản phẩm VP28 được phân cắt)

3.3 Gắn kết VP28 –plasmid và biến nạp tái tổ hợp VP28-plasmid vào vi khuẩn E.Coli

Sau khi phân cắt thành công, gen VP28 và plasmid được tiến hành cho gắn kết với nhau để tạo thành một plasmid mang đoạn gen VP28. Thực hiện gắn kết plasmid và gen VP28 theo phương pháp 2.5, ta được tái tổ hợp pUC18-VP28. Tiến hành biến nạp pUC18-VP28 vào vi khuẩn *Escherichia coli* XL1 Blue, trải đều hỗn hợp vi khuẩn *E.Coli* và pUC18-VP28 trên đĩa môi trường agar chứa ampiciline và ủ ở nhiệt độ 37 °C. Sau 16 tiếng, tiến hành kiểm tra cho thấy có khoảng 36 khuẩn lạc mọc trên đĩa agar. Chọn ngẫu nhiên 6 khuẩn lạc trên đĩa thạch để kiểm tra gen VP28 ở vi khuẩn này. Kết quả cho thấy 5 khuẩn lạc cho kết quả có thể hiện ADN ở vị trí 516bp, 1 khuẩn lạc cho kết quả âm tính. Điều này cho thấy khả năng biến nạp của VP28-plasmid vào vi khuẩn *Escherichia coli* XL1 Blue.



Hình 4: Kết quả PCR phát hiện gen VP28 ở E.Coli

(M: thang DNA 1 kb; 1, 2, 4, 5, 6: E.Coli mang gen VP28; 3: E.Coli không mang gen VP 28; 7: đối chứng âm)

3.4 Thảo luận

Tôm có dấu hiệu bệnh đốm trắng được kiểm tra thông qua phương pháp PCR, dựa theo hướng dẫn chẩn đoán bệnh động vật thủy sản của OIE, 2006. Tiếp đó, đoạn ADN VP28 được chọn để nghiên cứu. Đoạn ADN VP28 của WSSV được khuếch đại thành công ở mức nhiệt độ gắn mỗi là 60 °C, điều này cũng tương đối phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Khi nghiên cứu biểu hiện protein VP28, nhiệt độ

gắn mỗi khi thực hiện phản ứng PCR trong thí nghiệm này cũng được sử dụng là 60 °C (Patricia, 2011). Trước đây cũng có nhiều nhà khoa học chọn gen VP28 để nghiên cứu WSSV như Witteveldt *et al.* (2004) đã biểu hiện protein VP28 thành công thông qua vector biểu hiện pET 28a, kết quả cho thấy protein được biểu hiện có trọng lượng phân tử khoảng 29 kDa và sử dụng để phát triển vắc-xin kháng bệnh đốm trắng trên tôm. Rajeev *et al.* (2005) cũng nghiên cứu trên protein VP28 và VP19 của WSSV ở Trung Quốc, hai protein này cũng được biểu hiện thành công thông qua vector pUCm-T. Kỹ thuật tái tổ hợp ADN còn được ứng dụng thành công trong việc gắn kết gen VP19 của WSSV và plasmid pMAL-C2, sau đó ADN tái tổ hợp VP19-pMAL-C2 được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* BL21 và được biểu hiện protein sử dụng làm kháng nguyên tạo ra kháng thể đơn dòng trong chẩn đoán bệnh đốm trắng trên tôm sú (Parin C *et al.*, 2006). Khi VP28 được sử dụng gắn kết cùng với vector và biến nạp vào vi khuẩn *Escherichia coli*. Điều này cho phép nghiên cứu sâu hơn về qui trình sinh học của vi-rút gây bệnh đốm trắng cũng như mở ra một hướng mới trong việc phát triển phương pháp chẩn đoán.

4 KẾT LUẬN

Qui trình tái tổ hợp ADN pUC18-VP28 được thực hiện với thành phần hóa chất bao gồm 7.5µl VP28, 1.5µl pU18, 10µl dung dịch đệm 2X, 1µl enzyme T4 ligase. Đồng thời tái tổ hợp ADN pU18-VP28 cũng được biến nạp vào vi khuẩn *E.Coli* XL1 Blue.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chou, H.Y., C.Y.Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang and C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White Spot Syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 23, 165-173.
- Flegel, T.W., Boonyaratpalin S. and Withyachumnarnkul B.. 1997. Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In T.W. Flegel and I. MacRae (eds.) Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section, Asian Fisheries Soc, Manila, 285-296.
- Hossain,M.S.; Chakraborty, A.;Joseph, B.; Otta, S.K.; Karunasager, I. 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 198,111.
- Manual of diagnostic test for aquatic animal, 2006. White spot disease. www.oie.int/eng/normes/finnual.
- Parin C., Phiromsak P., Nitaya T., Sombat R., Siwaporn L., Weerawan S., Paisarn S. 2006. Development of a polyclonal antibody specific to VP19 envelope protein of white spot syndrome virus (WSSV) using a recombinant protein preparation. *J. Virol. Met.*,133, 180–184.
- Patricia B., Rafael D. R., Caroline H. S., Mariana B., Patricia H. S., Edmundo C.G. và Aguinaldo R. P. 2011. Molecular Cloning and Recombinant Expression of the VP28 Carboxyl-Terminal Hydrophilic Region from a Brazilian White Spot Syndrome Virus Isolate. *Brazilian archives of Biology and technology*, 54(2) 399-404
- Rajeev Kumar Jha and Zi-rong Xu. 2005. Production of recombinant enveloped structural proteins from the chinese wssv isolate. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20, 136-141.
- Witteveldt, J.; Cifuentes, C.C.; Vlask, J.M.; van Hulst, M.C.W. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J. Virol.*, 78, 2057-2061.