

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14495

凡纳滨对虾鳃细胞膜 IHNV 衣壳蛋白受体的筛选

尹晓彤, 费荣梅

南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095

摘要: 对虾传染性皮下及造血组织坏死病(IHNV)为对虾主要病毒病之一, 近些年, 在全球范围内广泛流行并造成严重的经济损失。目前, 在流行病学和诊断方面受到重视, 但其致病机理鲜有报道。本研究首先构建了 IHNV CP 原核表达载体, 纯化 CP 蛋白并制备多抗, 抗体效价达到 1 : 51200; 利用匀浆、超速离心方法分离未感染 IHNV 的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)鳃细胞膜蛋白; 用 VOPBA 和 HIS PULL-DOWN 方法筛选凡纳滨对虾鳃细胞膜 IHNV CP 受体, 分别将疑似的蛋白条带进行 LC-MS/MS 分析。结果表明, 信号转导与转录激活因子(STAT)、热休克蛋白 90 (HSP 90)、酚氧化酶原 2 型、Na⁺/K⁺-ATP 酶 α 亚基 4 种蛋白能与 IHNV 衣壳蛋白产生相互作用, 并具有多种生物学活性, 可能参与病毒的入侵及细胞病变的产生。其具体作用有待深入研究。

关键词: IHNV CP; 鳃细胞膜蛋白; 受体; VOPBA

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1160-07

对虾传染性皮下及造血组织坏死病(Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis, IHNV)也称慢性矮小残缺综合征(runt-deformity syndrome, RDS), 最初于 1981 年在美国夏威夷地区养殖的细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)中被发现^[1]。其病原传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHNV)属于细小病毒科(Parvoviridae)、浓核症病毒亚科(Densovirinae, DNVs)、短浓核症病毒属(*Brevidensovirus*), 是目前最小的对虾致病病毒, 病毒粒子无囊膜, 大小为 22 nm。IHNV 主要感染对虾外胚层组织(表皮角质、前后肠上皮细胞、神经线和神经节等)和中胚层器官(造血器官、触角腺小管上皮细胞、性腺、淋巴器官、结缔组织和横纹肌等), 急性感染表现为游泳异常、死亡率高, 慢性感染则以引起组织坏死、甲壳病变、生长缓慢为主要症状。IHNV 流行范围遍布全球, 敏感宿主是细角滨对虾和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), IHNV 对细角滨对虾有较高致病性和

致死率, 对凡纳滨对虾可导致慢性矮小残缺综合征(RDS), 对养殖业造成巨大经济损失。世界动物卫生组织(OIE)将 IHNV 列为必须申报的甲壳类重要疾病之一。

目前对传染性皮下及造血器官坏死病毒的研究主要是针对分子流行病学和诊断方法, 对其致病机理研究较少。病毒感染细胞的第一步即病毒与细胞膜表面的受体结合, 受体决定病毒的细胞嗜性^[2]。因此, 细胞膜表面的病毒受体是病毒致病机理研究的重要组成部分。

病毒覆盖蛋白结合法(virus overlay protein blot assay, VOPBA)是一种较早用来鉴定病毒受体的经典方法: 首先提取病毒易感细胞的膜蛋白, 进行 SDS-PAGE, 将蛋白转印至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜或聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 使其与病毒或病毒蛋白结合, 通过化学方法显示能与病毒发生特异结合的蛋白条带。Li 等^[3]用 VOPBA 鉴定出了唾液酸 3

收稿日期: 2014-12-01; 修订日期: 2015-01-28.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103034).

作者简介: 尹晓彤(1989-), 女, 硕士, 从事兽医微生物学与免疫学研究. E-mail: 2012107045@njau.edu.cn

通信作者: 费荣梅, 副教授, 硕士生导师, 从事兽医微生物学与免疫学研究. E-mail: feirongmei@njau.edu.cn

型牛腺病毒受体; Das 等^[4]利用该方法鉴定出了日本脑炎病毒的细胞受体-热休克蛋白 70 (HSP 70); 犬瘟热病毒、伪狂犬病病毒的病毒受体也是通过该方法得以鉴定。VOPBA 在对虾病毒研究上也有广泛应用: Sritunyalucksana 等^[5]利用 VOPBA 筛选出斑节对虾血淋巴细胞膜白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV) VP28 结合蛋白-PmRab7; Liang 等^[6]利用 VOPBA 筛选出凡纳滨对虾鳃细胞膜白斑综合征病毒结合蛋白-F₁-ATP 合成酶 β 亚基; Havanapan 等^[7]通过 2-DE, 得到一种抗菌肽 Crustin, 是斑节对虾(*Penaeus monodon*) 血淋巴细胞黄头病毒(Yellow Head Virus, YHV)的受体蛋白。本研究通过 VOPBA 结合 HIS PULL-DOWN 方法, 筛选 IHNV 衣壳蛋白(capsid protein, CP)的受体蛋白, 开展了 IHNV 衣壳蛋白鳃细胞膜受体的研究, 为 IHNV 致病机理的相关研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

自发病的凡纳滨对虾中分离得到 IHNV 射阳株, 保存于南京农业大学预防兽医微生物学与免疫学实验室。

1.2 试剂与仪器

卡那霉素, IPTG, 尿素, ISA206 佐剂, 可溶型 TMB 底物显色液, HRP-DAB 底物显色液, HRP 标记羊抗兔 IgG, OMEGA 胶回收试剂盒, OMEGA 质粒小量提取试剂盒均购自北京鼎国生物技术有限公司; *E. coli* BL21、DH5 α 感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技有限公司; HisTrapTM HP 柱购自 GE 公司。

1.3 IHNV CP 蛋白原核表达载体的构建及多抗的制备

提取 IHNV 射阳株发病凡纳滨对虾鳃组织的 DNA。根据 GenBank 公布的射阳株序列 (Accession KF214742) 设计引物如下:

F5'-GGATCC ATGTGCGCCGATTCAACAAG-3'*Bam*H I

R5'-CTCGAGCGGGTATATATTGCACATCG-3'*Xho*I

以提取的发病鳃组织 DNA 为模板, 扩增 IHNV CP(衣壳蛋白)蛋白全长序列, 构建到 pET-28a 载体, 转化至 DH5 α 感受态细胞中。提取阳性单克隆的质粒并进行酶切鉴定, 鉴定正确后测序, 将测序正确的质粒转化到 BL21 感受态细胞中, 将鉴定正确的阳性克隆命名为 BL21-pET-28a-CP。

阳性克隆 BL21 表达菌经 28℃、IPTG 诱导表达, 超声破碎, 用 HisTrapTM HP 柱纯化目的蛋白, 尿素透析。将透析后的蛋白免疫新西兰兔, 制备多克隆抗体。

1.4 IHNV CP 蛋白凡纳滨对虾鳃细胞膜受体的筛选

1.4.1 凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白的提取 取 PCR 鉴定为 IHNV 阴性的对虾鳃组织, 与预冷后 RSB-NP40 匀浆缓冲液以体积比 1:5, 于玻璃匀浆器内冰上研磨。匀浆液 4℃, 600 g, 离心 10 min, 取上清; 再次离心, 取上清。上清 4℃, 100000 g, 离心 20 min, 弃上清。取适量 RSB-NP40 匀浆缓冲液悬浮沉淀, 用 Nanodrop 检测蛋白浓度后, 分装小份, -70℃ 保存。

1.4.2 VOPBA 实验 鳃细胞膜蛋白上样量为 50 μ g/孔, 同时制备 2 块 SDS-PAGE, 一块转印 PVDF 膜, 一块留作分析。

转印完毕后进行 PVDF 膜上复性, 复性过程是^[5-6]: 复性液 A 洗膜 2 次, 30 mL/20min/次; 复性液 B 洗膜 2 次, 30 mL/20 min/次; 复性液 C 洗膜 2 次, 30 mL/15 min/次; 复性液 D 洗膜 5 次, 15 mL/20 min/次 (A: 20 mmol/L Tris-HCl, 20%异丙醇, pH 8.0; B: 20 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0; C: 20 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L β -巯基乙醇, 6 mol/L 盐酸胍, pH 8.0; D: 20 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L β -巯基乙醇, 0.03% Tween-20, pH 8.0)。

脱脂奶 4℃ 封闭过夜, PBST 洗膜, 平衡 Buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L MgCl₂, pH 6.5) 洗膜 20 min。将透析后的 IHNV CP 蛋白用平衡 Buffer(加 0.02% 脱脂奶, 1% Triton X-100)稀释, 孵育 PVDF 膜, PBST 洗膜; 孵育兔源 CP 蛋白多抗, PBST 洗膜; 孵育羊抗兔二抗,

PBST 洗膜; DAB 显色。同时做未孵育 IHHNV CP 蛋白的空白对照。

将另一块相同条件下制备的 SDS-PAGE 相应位置的条带切胶做液相色谱-质谱联用 (liquid chromatograph-mass spectrometer/mass spectrometer, LC-MS/MS), 并用 MASCOT 软件分析。

1.4.3 HIS-Pull Down 将复性后的 CP 蛋白注入 HisTrapTM HP 柱中, 用上清 binding buffer 洗涤杂蛋白; 注入鳃膜蛋白, 用上清 binding buffer 洗涤未结合蛋白; 用上清 elution buffer 洗脱, 洗脱液制备 SDS-PAGE 电泳。同时做未注入 CP 蛋白、只注入鳃膜蛋白的空白对照, 根据差异条带确定疑似受体蛋白的位置。将显色条带切胶进行 LC-MS/MS, 并用 MASCOT 软件分析。

2 结果与分析

2.1 IHHNV CP 蛋白原核表达载体的构建及多抗的制备

扩增 IHHNV CP 全长基因, 目的基因大小 1070 bp (图 1)。双酶切鉴定 DH5 α -pET-28a-CP, 目的条带 1070 bp, pET-28a 载体条带 5344 bp (图 2)。将阳性克隆测序, 测序结果正确。28℃、IPTG 诱导 BL21-pET-28a-CP, 目的片段大小 38 kD (实际大小 35.6 kD), 蛋白在包涵体表达; 用 HisTrapTM HP 柱纯化目的蛋白, 尿素复性, 制备兔源多抗, 三免效价达 1:51200, Western-blot 检测抗体特异性良好 (图 3)。

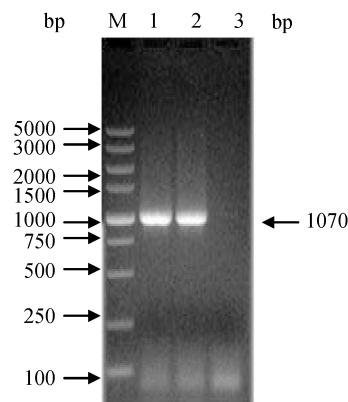


图 1 IHHNV CP PCR 电泳图

M: DNA marker; 1-2: CP PCR 产物; 3: 空白对照。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of IHHNV CP PCR products

M: DNA marker; 1-2: CP PCR products; 3: Blank control.

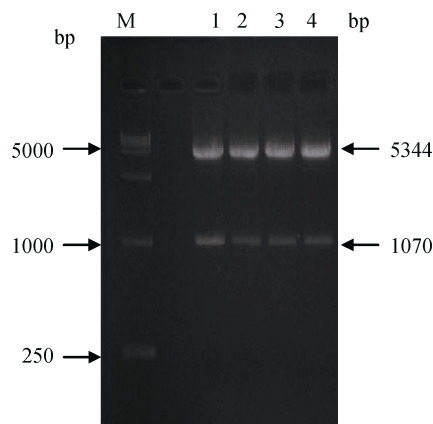


图 2 DH5 α -pET-28a-CP 酶切鉴定电泳图

M: DNA marker; 1-4: 酶切产物。

Fig. 2 Enzyme identification of DH5 α -pET-28a-CP

M: DNA marker; 1-4: Enzyme products.

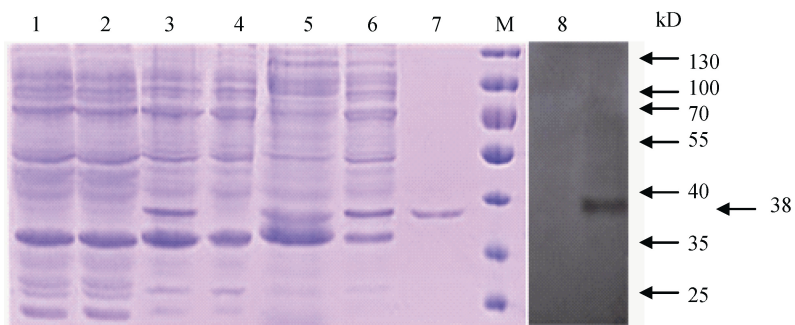


图 3 IPTG 诱导后 BL21-pET-28a-CP SDS-PAGE 及 Western-blot 结果

M: 蛋白 marker; 1: BL21-pET-28a 诱导后; 2: BL21-pET-28a 诱导前; 3: BL21-pET-28a-CP 诱导后; 4: BL21-pET-28a-CP 诱导前; 5: 上清中的 CP; 6: 沉淀中的 CP; 7: 用 HisTrapTM HP 纯化后的 CP; 8: Western-blot.

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of BL21-pET-28a-CP after IPTG induction and Western-blot

M: Molecular weight protein marker; 1: BL21-pET-28a after induced; 2: BL21-pET-28a before induced; 3: BL21-pET-28a-CP after induced; 4: BL21-pET-28a-CP before induced; 5: CP in supernatant; 6: CP in sediment; 7: Purified CP with HisTrapTM HP; 8: Western-blot.

2.2 IHHNV CP 蛋白凡纳滨对虾鳃细胞膜受体的筛选

2.2.1 未感染 IHHNV 凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白的提取 经研磨, 超速离心, 获得均匀分布的凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白条带(图 4)。

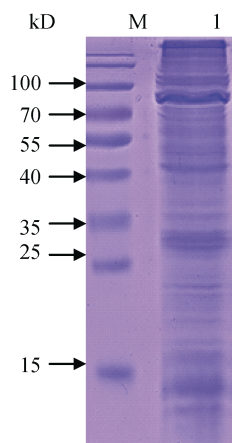


图 4 凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白 SDS-PAGE

M: 蛋白 marker; 1: 鳃细胞膜蛋白。

Fig.4 SDS-PAGE of *Litopenaeus vannamei* gill membrane proteins

M: Molecular weight protein marker; 1: Gill membrane proteins.

2.2.2 VOPBA 和 HIS Pull-Down VOPBA 结果见图 5。第一泳道中 70~100 kD 之间有一明显条带, 而第二泳道空白对照在相应位置没有显色条带, 说明鳃细胞膜蛋白与 IHHNV CP 相互作用的蛋白组分位于 70~100 kD。切下条带进行 LC-MS/MS。

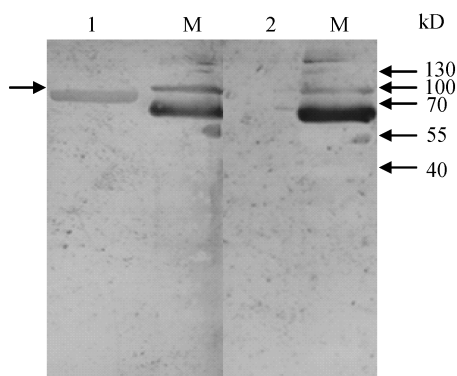


图 5 VOPBA 的 Western-blot

M: 蛋白 marker; 1: 鳃细胞膜蛋白和 IHHNV CP; 2: 鳃细胞膜蛋白。

Fig. 5 Western-blot of VOPBA

M: Molecular weight protein marker; 1: Gill membrane proteins and IHHNV CP; 2: Gill membrane proteins.

HIS Pull-Down 实验中, 将 HisTrapTM HP 洗脱下的蛋白样品进行 SDS-PAGE, 银染结果见图 6。在第一泳道中 70~100 kD 处有一明显条带, 而第二泳道空白对照在相应位置没有条带, 说明鳃细胞膜蛋白在该位置有能与 IHHNV CP 结合的蛋白组分。切下条带进行 LC-MS/MS。

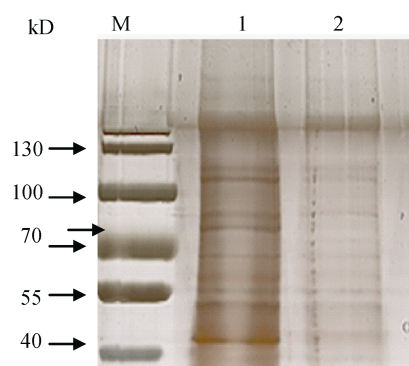


图 6 HIS PULL-DOWN 的 SDS-PAGE

M: 蛋白 marker; 1: 鳃细胞膜蛋白和 IHHNV CP; 2: 鳃细胞膜蛋白。

Fig. 6 SDS-PAGE of HIS PULL-DOWN

M: Molecular weight protein marker; 1: IHHNV CP and gill membrane proteins; 2: Gill membrane proteins.

LC-MS/MS 及其分析结果显示: VOPBA 和 HIS Pull-Down 质谱结果中同时存在信号转导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)、热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90)、酚氧化酶原 2 型(prophenoloxidase-2)、Na⁺/K⁺-ATP 酶 α 亚基(Na⁺/K⁺-ATPase alpha subunit) 4 种蛋白(表 1)。

3 讨论

IHHNV 自 1981 年在美国夏威夷细角滨对虾中被发现至今, 因其流行范围广、宿主种类多而得到广泛关注, 大量研究集中于流行病学调查及建立诊断方法, 关于致病机理的研究报道很少。本研究在 IHHNV CP 受体蛋白方面做了研究尝试。

本研究为避免利用病毒粒子可能发生的非特异性结合、高背景及杂带现象出现, 对 IHHNV CP 进行原核表达, 得到高纯度蛋白, 并制备效价 1 : 51200 的多抗。

表 1 LC-MS/MS 和 MASCOT 软件分析 VOPBA 结果
Tab. 1 Analysis of VOPBA by LC-MS/MS and MASCOT program

蛋白名称 protein	特征肽段 unique peptide	特征肽段覆盖率/% percentage of unique sequence coverage	分子量/kD molecular weight	GenBank 编号 GenBank No.
Na ⁺ /K ⁺ -ATP 酶 α 亚基 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase alpha subunit	7	13.2	75.078	ADM87522.1
酚氧化酶原 2 型 prophenoloxidase-2	19	36.3	78.834	ABY81277.1
热休克蛋白 90 heat shock protein 90	9	14	83.115	ADU03767.1
信号转导与转录激活因子 signal transducer and activator of transcription	7	14.2	90.56	ADQ43368.1

VOPBA 及 HIS Pull-Down 筛选出的 4 种蛋白可能参与 IHHNV 入侵及细胞病变的产生。STAT 为信号转导与转录激活因子, 主要参与 JAK/STAT 信号转导, 可能通过干扰素的信号转导参与宿主细胞对 IHHNV 的非特异性免疫防御。Melena 等^[8]及 Tang 等^[9]分别在凡纳滨对虾和细角滨对虾上预先感染 IHHNV 病毒粒子, 随后感染 WSSV, 发现感染 IHHNV 的实验组比对照组的死亡率有明显下降, 推测 IHHNV 和 WSSV 能共同作用于某种蛋白从而产生某种非特异性免疫, 达到预防的效果。经证实 STAT 能与 WSSV 囊膜蛋白结合, 因此, 推测 STAT 也能与 IHHNV CP 结合, 即通过 STAT 产生干扰素非特异性免疫, 防御病毒入侵。HSP90 是一种当细胞处于热、冷、葡萄糖饥饿以及病毒感染等应激状态时, 对细胞自身产生保护作用的蛋白, 能与多种蛋白形成多分子伴侣复合物, 并以二聚体的形式对多分子伴侣复合物进行调节, 影响多种病毒的复制和增殖, 如埃博拉病毒^[10]、轮状病毒^[11]、HIV^[12]等。酚氧化酶原 2 型(proPO-2)是酚氧化酶原系统重要组成部分, 后者是甲壳动物体内与免疫相关的重要功能系统之一, 对于甲壳动物的防御反应具有重要作用。酚氧化酶(PO)原系统通过病原体的刺激被激活, 使 proPO 变成 PO 并产生一系列生理活性物质, 例如, 通过包囊与黑化作用杀死或抑制病原体, 达到免疫效果。病原体通过刺激 proPO 系统产生黑色素, 致使节肢动物角质层出现了黑色的斑点^[13], 这可能与 IHHNV 能引起凡纳滨对虾触角和头胸部、腹部黑色斑点的甲壳病变有关。STAT、HSP90、proPO-2 大部分位于细胞内, 出现在分离的细胞

膜组分中可能的解释有以下两点: 一是 STAT、HSP90、proPO-2 有广泛的细胞定位, 有少部分可能存在于细胞膜上; 二是 STAT、HSP90、proPO-2 只存在于细胞质内, 细胞膜组分分离不彻底, 会留有一些细胞质蛋白组分。由于 IHHNV 是通过内吞作用进入宿主细胞, 内吞后 IHHNV CP 会与细胞质的蛋白分子作用, 产生一系列生物学效应。Na⁺/K⁺-ATP 酶是一种广泛存在于真核生物细胞膜上的跨膜转运蛋白, 主要调节细胞内外 Na⁺、K⁺的平衡, 维持细胞内环境稳定。Na⁺/K⁺-ATP 酶由 α、β 亚基组成, 其中 α1 在维持渗透压平衡中作用更显著^[14]。IHHNV CP 与 Na⁺/K⁺-ATP 酶结合可能会导致其功能紊乱, 影响细胞正常代谢活动, 从而参与 IHHNV 细胞病变的产生。

目前对于 IHHNV 受体的研究还比较少, 这主要是由于 IHHNV 只对细角滨对虾致死, 对凡纳滨对虾在短期内不会产生明显的损伤, 不利于实验结果的观察; 由于目前缺乏成熟的对虾细胞系, 无法更直观地研究 IHHNV CP 与其受体的相互作用。本研究利用传统 VOPBA 结合 HIS Pull-Down, 初步确定信号转导与转录激活因子(STAT)、热休克蛋白 90 (HSP90)、酚氧化酶原 2 型(proPO-2)、Na⁺/K⁺-ATP 酶 α 亚基为 IHHNV CP 疑似受体蛋白。由于 VOPBA 只能说明疑似蛋白的大小, 因此, 以上 4 种蛋白是否与 IHHNV CP 发生相互作用还需进一步研究加以证实。

参考文献:

[1] Lightner D V, Redman R M, Bell T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp[J]. J Invertebr Pathol, 1983, 42(1):

- 62–70.
- [2] Guo A Z, Lu C P. The Cytoplasmic membrane receptor of the virus[J]. *Virologica Sinica*, 1997, 12(4): 295–301. [郭爱珍, 陆承平. 病毒的细胞膜受体[J]. *中国病毒学*, 1997, 12(4): 295–301.]
- [3] Li X X, Bangari D S, Sharma A, et al. Bovine adenovirus serotype 3 utilizes sialic acid as a cellular receptor for virus entry[J]. *Virology*, 2009, 392(2): 162–168.
- [4] Das S, Laxminarayana S V, Chandra N, et al. Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus[J]. *Virology*, 2009, 385(1): 47–57.
- [5] Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo C F, et al. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp[J]. *J Virol*, 2006, 80(21): 10734–10742.
- [6] Liang Y, Cheng J J, Yang B, et al. The role of F_1 ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Virology*, 2010, 7: 144.
- [7] Havanapan P O, Taengchaiyaphum S, Bourchookarn A, et al. Yellow head virus binding to cell surface proteins from *Penaeus monodon* hemocytes[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 41(2): 126–136.
- [8] Melena J, Bayot B, Betancourt I, et al. Pre-exposure to infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus or to inactivated white spot syndrome virus (WSSV) confers protection against WSSV in *Penaeus vannamei* (Boone) post-larvae[J]. *J Fish Dis*, 2006, 29(10): 589–600.
- [9] Tang K F J, Durand S V, White B L, et al. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus—a preliminary study[J]. *Aquaculture*, 2003, 216(1–4): 19–29.
- [10] Smith D R, McCarthy S, Chrovian A, et al. Inhibition of heat-shock protein 90 reduces Ebola virus replication[J]. *Antiviral Res*, 2010, 87(2): 187–194.
- [11] Dutta D, Bagchi P, Chatterjee A, et al. The molecular chaperone heat shock protein-90 positively regulates rotavirus infection[J]. *Virology*, 2009, 391(2): 325–333.
- [12] Vozzolo L, Loh B, Gane P J, et al. Gyrase B inhibitor impairs HIV-1 replication by targeting Hsp90 and the capsid protein[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(50): 39314–39328.
- [13] 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. [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.]
- [14] Lin C H, Huang C L, Yang C H, et al. Time-course changes in the expression of Na, K-ATPase and the morphometry of mitochondrion-rich cells in gills of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during freshwater acclimation[J]. *J Exp Zool*, 2004, 301A(1): 85–96.

Preliminary screening for infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus capsid protein receptors from *Litopenaeus vannamei* gill membrane proteins

YIN Xiaotong, FEI Rongmei

College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is one of the most serious diseases of shrimp, and has a wide host range. IHHNV is the smallest of all known shrimp viruses and is a non-enveloped, linear, single-stranded DNA virus in Brevitensovirus Densovirinae Parvoviridae. This disease causes serious economic losses worldwide. IHHNV is highly pathogenic and is associated with high *Litopenaeus stylirostris* mortality rates. IHHNV causes chronic infection, slow growth, lesions in the forehead sword, antenna, and the cephalothoracic and abdominal shell of *Litopenaeus vannamei*. Since IHHNV was first identified, many studies have established diagnostic methods, and epidemiological surveys have been conducted, but the pathogenic mechanisms of IHHNV infection remain relatively unknown. In this study, we identified putative host cell receptors for the IHHNV capsid protein (CP) in *L. vannamei* gill membranes. DNA was extracted from IHHNV-infected *L. vannamei* (Sheyang isolate) and preserved at the Microbiology and Immunology, Preventive Veterinary Laboratory of Nanjing Agricultural University. The IHHNV CP gene was amplified by polymerase chain reaction, and the IHHNV CP BL21-pET-28a-CP prokaryotic expression vector was prepared. The protein was expressed primarily in the precipitate. The CP in the precipitate was purified using a HisTrap™ HP column and then used to prepare a polyclonal antibody. The antibody titer reached 1 : 51200 after three immunizations. A Western blot analysis demonstrated that the polyclonal CP antibody bound specifically to CP. Then, gill membrane proteins from uninfected *L. vannamei* were obtained from a homogenate and ultracentrifuged to obtain a uniform gill membrane protein distribution. A virus overlay protein binding assay (VOPBA) and a His pull-down assay were carried out to localize the IHHNV CP receptors. VOPBA is a classic method used to identify virus receptors and has been used to identify the host cell receptors for White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Virus. The suspected protein strips were analyzed by mass spectrometry. Results of the two assays indicated that signal transducer and activator of transcription (STAT), heat shock protein 90 (HSP90), prophenoloxidase-2, and the Na⁺/K⁺-ATPase alpha subunit participate in IHHNV infection. These four proteins have various biological functions, such as interferon signal transduction, protection against stress, defense, and maintenance of osmotic balance. These proteins may interact with the IHHNV CP and are associated with penetration and the cytopathic effects caused by IHHNV. Few studies have evaluated putative IHHNV CP receptors, probably because of the lack of a mature shrimp cell line. We used traditional VOPBA to localize the CP receptors from *L. vannamei* gill membrane proteins. Taken together, STAT, HSP90, prophenoloxidase-2, and the Na⁺/K⁺-ATPase alpha subunit are involved in IHHNV infection. These results will lay the foundation to identify the IHHNV invasive mechanism. The specific effects of the four proteins remain to be studied in detail.

Key words: IHHNV capsid protein; gill membrane proteins; receptors; VOPBA

Corresponding author: FEI Rongmei. E-mail: feirongmei@njau.edu.cn