

# Advances in the Application of Insect Baculovirus-Mediated Gene Transfer and Expression System in Marine Animals

Mengxi Wu<sup>1</sup>, Huarong Guo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, and College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao Shandong

<sup>2</sup>Institute of Evolution and Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao Shandong

Email: \*huarongguo@ouc.edu.cn

Received: Apr. 19<sup>th</sup>, 2020; accepted: May 8<sup>th</sup>, 2020; published: May 15<sup>th</sup>, 2020

---

## Abstract

Baculovirus-mediated gene transfer and expression system was designed to effectively deliver the foreign genes into the target cells by the translocation of Tn7 transposon, the packaging of insect cells and infection of the recombinant baculovirus, with the merits of biological safety, high expression level and post-translational modification of the recombinant proteins. Thus, the baculovirus-mediated gene transfer and expression system has been widely used in the mammals, birds, insects and freshwater fishes, but rarely in the marine animals. This review has summarized and prospected the applications of the above-mentioned gene transfer and expression technology in the marine vertebrates and invertebrates.

## Keywords

Baculovirus-Mediated Gene Transfer and Expression System, Marine Vertebrates, Marine Invertebrates

---

# 昆虫杆状病毒基因转移与表达系统在海洋动物中的应用进展

毋梦茜<sup>1</sup>, 郭华荣<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>中国海洋大学, 海洋生命学院, 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛

<sup>2</sup>中国海洋大学, 海洋生物多样性与进化研究所, 山东 青岛

Email: \*huarongguo@ouc.edu.cn

---

\*通讯作者。

收稿日期: 2020年4月19日; 录用日期: 2020年5月8日; 发布日期: 2020年5月15日

## 摘要

昆虫杆状病毒介导的基因转移与表达系统是基于Tn7转座酶的转座原理而设计的一种基因转移与表达技术, 因其安全性能好、重组蛋白表达量高和表达产物可进行翻译后加工等优点, 目前已在哺乳动物、鸟类、昆虫与淡水鱼类等动物中得到广泛应用, 但是其在海洋动物中的应用还不多。本文对昆虫杆状病毒介导的基因转移与表达技术在海洋脊椎和无脊椎动物中的应用进行了综述与展望。

## 关键词

昆虫杆状病毒基因转移与表达系统, 海洋脊椎动物, 海洋无脊椎动物

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

昆虫杆状病毒(Baculovirus)又称为多角体病毒, 是一种节肢动物病毒, 主要宿主为鳞翅目、双翅目和膜翅目昆虫。感染杆状病毒的昆虫出现厌食与不喜运动的特点, 虫体组织于染毒 4~5 天完全溶解, 表皮完整且易破裂, 染毒 1~2 周内虫体死亡, 该病毒不能在哺乳动物体内进行感染和复制。昆虫杆状病毒的生活周期中出现两种不同形态的病毒粒子, 即芽生型病毒粒子(Budded virion, BV)和包埋型病毒粒子(Occlusion-derived virion, ODV), 这两类病毒体具有相同的核衣壳结构与遗传信息[1] [2] [3]。在昆虫细胞内感染的病毒粒子为芽生型病毒粒子, 而在昆虫细胞与细胞之间进行传播的病毒粒子为包埋型病毒粒子。昆虫杆状病毒是一种双链环状 DNA 病毒, 其基因组较为庞大(80~160 kb), 能够编码产生 150 多种蛋白[4] [5] [6]。1983 年, Smith 等将人  $\beta$ -干扰素基因( $\beta$ -Interferon,  $\beta$ -IFN)克隆至重组杆状病毒的多角体蛋白基因 PH (polyhedron)的启动子下游, 在体外培养的昆虫细胞内成功表达了重组蛋白  $\beta$ -IFN, 标志着昆虫杆状病毒表达载体系统的诞生[7] [8]。1993 年, Kitts 等在昆虫杆状病毒的非必须基因 ORF603 与必须基因 ORF1929 之间各引入了一个杆状病毒基因组中不存在的 Bsu36 I 位点, 获得了重组杆状病毒 BacPAK6, 推动了重组杆状病毒技术的发展[9]。同年, 随着细菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome, BAC)技术的发展, Luckow 等(1993)根据 F 因子载体的构建原理, 将 F 因子复制子、细菌 Tn7 转座位点 attTn7、卡那霉素抗性基因引入昆虫杆状病毒载体质粒中, 构建了杆状病毒穿梭质粒 Bacmid, 从而发明了 Bac-to-Bac 重组杆状病毒基因转移与表达系统, 大大简化了重组杆状病毒的构建过程[10] [11]。

目前, 商品化的昆虫杆状病毒表达系统已陆续发展起来, 其中以 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac 表达系统与 BD 公司的 BaculoGold 表达系统的应用最为广泛。商业化的昆虫杆状病毒也已成功应用于肿瘤治疗、疫苗研究与农业病害防控等方面。王浩等(2011)比较了甲型 H1N1 病毒血凝素蛋白(HA)在上述两种昆虫杆状病毒表达系统中的表达效率, 发现 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac 表达系统的表达效率更高[12]。本文对昆虫杆状病毒介导的基因转移技术在海洋动物中的应用进展进行了综述, 并对其研究前景进行了展望。

## 2. 昆虫杆状病毒介导的基因转移与表达系统简介

昆虫杆状病毒基因转移与表达系统由昆虫杆状病毒供体质粒 pFastBac1、大肠杆菌感受态细胞 DH10Bac 和昆虫包装细胞三部分组成。其中, 供体质粒又称转移质粒, 用于引入外源基因, 含有 Tn7 转座子的左右两个识别元件: Tn7R 和 Tn7L, 这两个识别元件之间构建有庆大霉素基因(Gentamicin)、苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 多角体蛋白基因启动子 PH 或 P10 及其之后的多克隆酶切位点(MCS)。外源基因首先被克隆到供体质粒的 MCS, 然后携带外源基因的供体质粒被转化到大肠杆菌感受态细胞 DH10Bac 中。在感受态细胞 DH10Bac 中, 已转化有杆状病毒 Bacmid 质粒和编码转座酶的 Helper 质粒, 因而在 Helper 质粒所编码的转座酶的作用下, 供体质粒 pFastBac1 上的两个识别元件之间的序列被转座到 Bacmid 质粒上的识别位点 attTn7。Bacmid 质粒中含有 miniF 复制子和 attTn7 识别位点, 其中, miniF 复制子的作用是驱动 Bacmid 质粒在大肠杆菌中复制, 而 attTn7 识别位点则位于 Bacmid 质粒中的 LacZ 基因内部。pFastBac1 上的两个识别元件之间的序列的插入, 会破坏 LacZ ( $\beta$ -半乳糖苷酶)基因的表达, 因而可通过蓝白斑筛选的方法, 筛选出含有 Bacmid 重组质粒的菌株, 从而实现在大肠杆菌细胞中构建并扩增 Bacmid 重组质粒的目的。之后, 利用脂质体转染技术, 将 Bacmid 重组质粒的 DNA 转染到昆虫包装细胞中, 进行病毒的包装、纯化和浓缩以及病毒滴度的测定。将包装病毒感染靶细胞, 则外源基因即可在多角体蛋白启动子 PH 或 P10 的驱动下, 在宿主细胞中过表达。其中, 应用最广泛的包装细胞系为 Sf21 及其衍生细胞系 Sf9, 来源于草地贪夜蛾的卵巢细胞。Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统所采用的包装细胞就是 Sf21 或 Sf9 细胞系。Wickham 等(1992)报道, 粉蚊夜蛾(*Trichoplusia ni*)的胚胎细胞系 BTI-TN-5B1-4 也能够用于包装重组昆虫杆状病毒, 并生产出大量的外源蛋白[13] [14] [15]。目前, 重组昆虫杆状病毒表达系统已成功应用于人、鱼、果蝇、蜜蜂、鸡和鱼等的基因转移研究, 被誉为最有希望的基因转移技术[16]-[23]。

## 3. 昆虫杆状病毒基因转移与表达系统在海洋脊椎动物中的研究进展

昆虫杆状病毒基因转移与表达系统在淡水脊椎动物如斑马鱼、罗非鱼和鲤鱼等鱼类中的应用较为广泛[16] [24] [25] [26] [27], 而在海洋脊椎动物的研究较少。Leisy 等(2003)构建了细胞肥大病毒(CMV)增强子和鸡肌动蛋白启动子驱动的 lacZ 报告基因的重组昆虫杆状病毒, 并成功在鲑鱼心脏成纤维细胞系(CHH-1)中检测到 LacZ 报告基因的表达[17]。Satone 等(2013)构建了牙鲆三丁基锡结合蛋白基因(TBT-bps)的重组杆状病毒, 并在家蚕中成功表达了重组蛋白 rTBT-bp2, 并分析了其结合三丁基锡的能力[28]。Liu 等(2013)利用家蚕杆状病毒表达系统成功表达了条纹斑竹鲨的鲨肝活性肽(APSL)并应用于小鼠中, 发现其能够显著降低链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病模型小鼠的血糖水平, 并阐明了 APSL 作为口服药物在糖尿病治疗中的作用( $P < 0.05$ ) [29]。Hwang 等(2004)克隆构建了牙鲆穿孔素基因(perforin)的重组杆状病毒质粒, 并通过脂质体转染的方法在昆虫细胞中成功表达、纯化和浓缩得到了牙鲆穿孔素蛋白, 并对其氨基酸序列及重组蛋白的活性进行分析, 为进一步了解鱼类穿孔素蛋白裂解血细胞的机制奠定了基础[30]。

## 4. 昆虫杆状病毒基因转移与表达系统在海洋无脊椎动物中的研究进展

与昆虫相比, 昆虫杆状病毒介导的基因转移与表达系统在海洋无脊椎动物中的应用则很少, 仅限于对虾、海兔与桡足类动物。在体外培养对虾细胞的应用中, Puthuman 等(2015) 构建了 12 型腺病毒早期区域基因 1A (12SE1A)的重组杆状病毒 BacP2-12SE1A-GFP, 并将其感染斑节对虾(*Penaeus monodon*)的原代培养血淋巴细胞, 在感染 14 天后的血淋巴细胞中检测到癌基因 12SE1A 的表达, 但没有成功诱导对虾血淋巴细胞的永生性转化[31]。在对虾活体的应用中, Musthaq 等(2009)构建了对虾白斑综合征病毒(WSSV)早期基因 1 (Ie1)启动子驱动的 VP28 囊膜蛋白基因昆虫杆状病毒, 采用肌肉注射的方式感染对虾成体,

成功在对虾组织中表达了 VP28 囊膜蛋白,提高了染毒对虾对 WSSV 病毒的抗性[32]。Puthumana 等(2015)对 Bac-to-Bac 重组杆状病毒表达系统进行了改造,以绿色荧光蛋白 GFP 为报告基因,分别将对虾 WSSV 病毒的 Ie1 启动子和对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的 P2 启动子插入至杆状病毒供体质粒的昆虫多角体蛋白基因启动子(PH)的下游,构建了 PH-Ie1 与 PH-P2 两种双启动子杆状病毒系统,并应用于斑节对虾成体的研究中。结果表明,未经改造的仅含有 PH 启动子的重组杆状病毒不能有效感染斑节对虾成体组织,且对虾成体各组织中均未检测到 GFP 荧光信号,而改造后的重组杆状病毒能够感染对虾成体,但表达效率仅有 20% [33]。随后,Shi 等(2016)将昆虫杆状病毒表达系统的供体质粒 pFastBac1 中的多角体蛋白基因启动子(PH)切除,以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的  $\beta$ -actin 启动子: SbaP (ENX) 替换 PH 启动子,以红色荧光蛋白基因 RFP 为报告基因,制备了 SbaP (ENX)启动子驱动的 RFP 基因重组杆状病毒: Bacmid-SbaP (ENX)-RFP,在添加丁酸钠的条件下,以肌肉注射的方式感染凡纳滨对虾成体,在染毒 2 天的对虾多个组织中包括鳃、附肢、肝胰腺、血淋巴和肌肉组织可以检测到杆状病毒 DNA,但是 RFP 报告基因的 mRNA 表达仅在肌肉和肝胰腺中能够检测到,而且存在着时空上的组织特异性。其中,在肌肉组织中,染毒后 1~7 天都能检测到 RFP 的转录表达,但是肝胰腺中的表达仅能在前 3 天中检测到 [34]。Citarasu 等(2019)构建了罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)野田村病毒(MrNV)衣壳蛋白基因的重组杆状病毒,在昆虫细胞内表达并纯化得到了重组 MrNV 衣壳蛋白,并分析了其在罗氏沼虾中的抗病毒作用。结果表明,口服  $90 \pm 10$  mg MrNV 衣壳蛋白的罗氏沼虾幼虾在感染 MrNV 病毒后第 30 天和 60 天分别具有 65%和 80%的存活率,而未口服 MrNV 衣壳蛋白的罗氏沼虾在染毒后的死亡率为 100%,说明杆状病毒表达的 MrNV 衣壳蛋白可显著提高对罗氏沼虾幼虾抵抗 MrNV 病毒感染的能力[35]。

昆虫杆状病毒基因转移与表达系统应用于其他海洋无脊椎动物的研究报道很少,仅停留在利用上述表达系统在昆虫细胞中异源表达海洋无脊椎动物来源基因的水平上。Lin 等(2014)利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统,在昆虫 Sf9 细胞中成功表达了海兔乙酰胆碱结合蛋白(Ac-AChBP),并分析了 AChBP 蛋白的结构与功能[36]。Larionova 等(2018)利用昆虫杆状病毒表达系统,在昆虫细胞内表达了海洋桡足类动物分泌的高斯荧光素酶(Gaussia Luciferase, GpLuc),并分析了高斯荧光素酶的生物发光特性和结构特征[37]。

## 5. 前景与展望

昆虫杆状病毒基因转移与表达系统具有容纳大片段、表达量高、筛选阳性克隆耗时短的优点,是理想的基因转移与表达系统。但是,昆虫杆状病毒基因转移与表达系统在海洋动物成体及其体外培养细胞中的表达效率仍然很低,这可能与该表达系统所用的启动子等元件均来源于昆虫,不适用于海洋动物有关,也可能与体外培养的对虾细胞不分裂有关。因此,通过添加海洋无脊椎动物如对虾的启动子与转录元件,对昆虫杆状病毒基因转移与表达系统进行改造的尝试,可以明显提高上述昆虫杆状病毒介导的基因转移与表达系统在对虾中的感染与表达效率[33] [34]。但是,在上述对昆虫杆状病毒基因转移与表达系统的改造研究中,对虾和对虾病毒来源地启动子成分的引入,一定程度上影响了外源基因在昆虫包装细胞中的表达。我们实验室最近通过引入对虾病毒囊膜蛋白,显著提高了上述昆虫杆状病毒表达系统对对虾细胞的亲嗜性,从而提高了其在对虾成体组织中的感染效率,为促进昆虫杆状病毒基因转移与表达系统在海洋动物中的广泛应用奠定了基础。当然,由于对虾病毒的研究基础最好,所以可以预期的是,未来将最新构建对虾病毒介导的基因转移与表达系统,从而最终在对虾活体及其体外培养细胞中实现基因的高效转移与表达。

## 基金项目

国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2018YFD0901301),中央高校基本科研业务费项目(201822018)。

## 参考文献

- [1] 朱士茂, 李慧. 杆状病毒包埋型病毒粒子研究进展[J]. 病毒学报, 2016, 32(1): 93-100. <https://doi.org/10.7858/eamj.2016.010>
- [2] Blissard, G.W. (1996) Baculovirus-Insect Cell Interactions. *Cytotechnology*, **20**, 73-93. <https://doi.org/10.1007/BF00350390>
- [3] Faulkner, P. (1981) Baculovirus. In: Davidson, E.W., Ed., *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*, Allanheld, Osmun, Totowa, NJ, 3-33.
- [4] Volkman, L.E., Blissard, G.W., Friesen, P., Keddie, B.A., Possee, R. and Theilmann, D.A. (1995) Virus Taxonomy. In: *Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Springer-Verlag, Wien, 104.
- [5] Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. and Possee, R.D. (1994) The Complete DNA Sequence of Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology*, **202**, 586. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1380>
- [6] Ahrens, C.H., Russell R., Funk, C.J., Evans, J.T., Harwood, S.H. and Rohrmann, G.F. (1997) The Sequence of the *Orgyia pseudotsugata* Multinucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus Genome. *Virology*, **229**, 381. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8448>
- [7] Smith, G.E., Summers, M.D. and Fraser, M.J. (1983) Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. *Molecular and Cell Biology*, **3**, 2156-2165. <https://doi.org/10.1128/MCB.3.12.2156>
- [8] 于永利. 昆虫杆状病毒表达载体系统与疫苗研制的 30 年回顾[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(4): 1-15. <https://doi.org/10.7748/ns.30.15.43.s50>
- [9] Kitts, P.A. and Possee, R.D. (1993) A Method for Producing Recombinant Baculovirus Expression Vectors at High Frequency. *Biotechniques*, **14**, 810-817.
- [10] Luckow, V.A., Lee, C.S., Barry, G.F. and Olins, P.O. (1993) Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, **67**, 4566-4579. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.8.4566-4579.1993>
- [11] Ciccarone, V.C., Polayes, D. and Luckow, V.A. (1997) Generation of Recombinant Baculovirus DNA in *E. coli* Using Baculovirus Shuttle Vector. In: Reischt, U., Ed., *Methods in Molecular Medicine*, Humana Press Inc., Totowa, 13.
- [12] 王浩, 马驰, 崔莲仙, 巴德年, 何维. 利用两种真核昆虫表达系统表达可溶性甲型 H1N1 血凝素蛋白[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(4): 345-349. <https://doi.org/10.1016/j.nedt.2010.07.003>
- [13] Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Thompkins, G.J. and McCawley, P. (1977) The Establishment of Two Insect Cell Lines from the Insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro*, **13**, 213. <https://doi.org/10.1007/BF02615077>
- [14] Summers, M.D. and Smith, G.E. (1987) A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, No. 1555.
- [15] Wickham, T.J., Davis, T., Granados, R.R., Shuler, M.L. and Wood, H.A. (1992) Screening of Insect Cell Lines for the Production of Recombinant Proteins and Infectious Virus in the Baculovirus Expression System. *Biotechnology Program*, **8**, 391. <https://doi.org/10.1021/bp00017a003>
- [16] Wagle, M. and Jesuthasan, S. (2003) Baculovirus-Mediated Gene Expression in Zebrafish. *Marine Biotechnology*, **5**, 58-63. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0050-9>
- [17] Leisy, D.J., Lewis, T.D., Leong, J.A.C. and Rohrmann, G.F. (2003) Transduction of Cultured Fish Cells with Recombinant Baculoviruses. *Journal of General Virology*, **84**, 1173-1178. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18861-0>
- [18] Yan, Y., Du, J., Chen, T., Yi, M., Li, M., Wang, S., Li, C.M. and Hong Y. (2009) Establishment of Medakafish as a Model for Stem Cell-Based Gene Therapy: Efficient Gene Delivery and Potential Chromosomal Integration by Baculoviral Vectors. *Experimental Cell Research*, **315**, 2322-2331. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.04.015>
- [19] Huang, F., Cao, S., Cui, X., Xiong, C., Wang, M., Lu, Y., Wang, W., Ye, J. and Liu, X. (2011) Efficient Gene Delivery into Fish Cells by an Improved Recombinant Baculovirus. *Journal of Virological Methods*, **173**, 294-299. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.022>
- [20] Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P. and Strauss, M. (1995) Efficient Gene Transfer into Human Hepatocytes by Baculovirus Vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 10099-10103. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10099>
- [21] Ping, W., Ge, J., Li, S., Zhou, H., Wang, K., Feng, Y. and Lou, Z. (2006) Baculovirus-Mediated Gene Expression in Chicken Primary Cells. *Avian Diseases*, **50**, 59-63. <https://doi.org/10.1637/7418-080705R.1>
- [22] Lee, D.F., Chen, C.C., Hsu, T.A. and Juang, J.L. (2000) A Baculovirus Superinfection System: Efficient Vehicle for Gene Transfer into *Drosophila* S2 Cells. *Journal of Virology*, **74**, 11873-11880.

<https://doi.org/10.1128/JVI.74.24.11873-11880.2000>

- [23] Ando, T., Fujiyuki, T., Kawashima, T., Morioka, M., Kubo, T. and Fujiwara, H. (2007) *In Vivo* Gene Transfer into the Honeybee Using a Nucleopolyhedrovirus Vector. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **352**, 335-340. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.020>
- [24] Keiter, S., Burkhardt-Medicke, K., Wellner, P., Kais, B., Färber, H., Skutlarek, D., Engwall, M., Braunbeck, T., Keiter, S.H. and Luckenbach, T. (2016) Does Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) Act as Chemosensitizer in Zebrafish Embryos? *Science of the Total Environment*, **548-549**, 317-324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.089>
- [25] Cunha, V., Burkhardt-Medicke, K., Wellner, P., Santos, M.M., Moradas-Ferreira, P., Luckenbach, T. and Ferreira, M. (2017) Effects of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) on Multixenobiotic Resistance (MXR) Related Efflux Transporter Activity in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **136**, 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.022>
- [26] Fischer, S., Klüver, N., Burkhardt-Medicke, K., Pietsch, M., Schmidt, A.M., Wellner, P., Schirmer K. and Luckenbach, T. (2013) Abcb4 Acts as Multixenobiotic Transporter and Active Barrier against Chemical Uptake in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *BMC Biology*, **11**, 69. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-69>
- [27] Lassen, N., Estey, T., Tanguay, R.L., Pappa, A., Reimers, M.J. and Vasiliou, V. (2005) Molecular Cloning, Baculovirus Expression, and Tissue Distribution of the Zebrafish Aldehyde Dehydrogenase 2. *Drug Metabolism and Disposition*, **33**, 649-659. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.002964>
- [28] Satone, H., Akahoshi, E., Nakamura, A., Lee, J.M., Honda, M., Shimasaki, Y., Kawabata, S., Kusakabe, T. and Oshima, Y. (2013) Expression and Functional Characterization of Recombinant Tributyltin-Binding Protein Type 2. *The Journal of Toxicological Sciences*, **38**, 885-890. <https://doi.org/10.2131/jts.38.885>
- [29] Liu, Y., Chen, Y., Chen, J., Zhang, W., Sheng, Q., Chen, J., Yu, W., Nie, Z., Zhang, Y., Wu, W., Wang, L., Indran, I.R., Li, J., Qian, L. and Lv, Z. (2013) A Shark Liver Gene-Derived Active Peptide Expressed in the Silkworm, *Bombyx mori*: Preliminary Studies for Oral Administration of the Recombinant Protein. *Marine Drugs*, **11**, 1492-1505. <https://doi.org/10.3390/md11051492>
- [30] Hwang, J., Ohira, T., Hirono, I. and Aoki, T. (2004) A Pore-Forming Protein, Perforin, from a Non-Mammalian Organism, Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics*, **56**, 360-367. <https://doi.org/10.1007/s00251-004-0688-8>
- [31] Puthumana, J., Prabhakaran, P., Philip, R. and Bright-Singh, I.S. (2015) Attempts on Producing Lymphoid Cell Line from *Penaeus monodon* by Induction with SV40-T and 12S EIA Oncogenes. *Fish Shellfish Immunology*, **47**, 655-663. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.010>
- [32] Musthaq, S.S., Madhan, S., Sahul-Hameed, A.S. and Kwang, J. (2009) Localization of VP28 on the Baculovirus Envelope and Its Immunogenicity against White Spot Syndrome Virus in *Penaeus monodon*. *Virology*, **391**, 315-324. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.017>
- [33] Puthumana, J., Philip, R. and Bright-Singh, I.S. (2015) Transgene Expression in *Penaeus monodon* Cells: Evaluation of Recombinant Baculoviral Vectors with Shrimp Specific Hybrid Promoters. *Cytotechnology*, **68**, 1147-1159. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9872-y>
- [34] Shi, Y., Xiang, J., Zhou, G., Ron, T.B., Tong, H.I., Kang, W., Sun, S. and Lu, Y. (2016) The Pacific White Shrimp  $\beta$ -Actin Promoter: Functional Properties and the Potential Application for Transduction System Using Recombinant Baculovirus. *Marine Biotechnology*, **18**, 349-358. <https://doi.org/10.1007/s10126-016-9700-1>
- [35] Citarasu, T., Lelin, C., Babu, M.M., Anand, S.B., Nathan, A.A. and Vakharia, V.N. (2019) Oral Vaccination of *Macrobrachium rosenbergii* with Baculovirus-Expressed *M. rosenbergii* Nodavirus (MrNV) Capsid Protein Induces Protective Immunity against MrNV Challenge. *Fish Shellfish Immunology*, **86**, 1123-1129. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.010>
- [36] Lin, B., Meng, H., Bing, H., Zhangsun, D. and Luo, S. (2014) Efficient Expression of Acetylcholine-Binding Protein from *Aplysia californica* Bac-to-Bac System. *BioMed Research International*, **2014**, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2014/691480>
- [37] Larionova, M.D., Markova, S.V. and Vysotski, E.S. (2018) Bioluminescent and Structural Features of Native Folded *Gussia luciferase*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, **183**, 309-317. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.050>