Tạp chí Công nghệ Sinh học 9(2): 179-185, 2011

NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ ĐA DÒNG KHÁNG PROTEIN VỎ VP28 CỦA VIRUS GÂY BỆNH ĐỐM TRẮNG TRÊN TÔM SÚ *(PENAEUS MONODON)*

Hà Thị Thu, Đinh Duy Kháng, Đinh Thương Vân

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Tại Việt Nam, ngành nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là nghề nuôi tôm hiện đang phát triển mạnh đóng góp một phần quan trọng trong việc tạo việc làm, nâng cao thu nhập cho người dân, đảm bảo an ninh lương thực, và xuất khẩu thu được nguồn ngoại tệ lớn. Tuy nhiên, bên cạnh sự phát triển đó, nghề nuôi tôm Việt Nam đang bị thiệt hại lớn do gặp một số trở ngại về ô nhiễm môi trường và dịch bệnh, mà chủ yếu dịch bệnh là do virus , trong đó có sự lan truyền bệnh virus đốm trắng (WSSV) là tác nhân gây bệnh được quan tâm nhất giữa các loài tôm. Vì vậy, để hỗ trợ cho việc chẩn đoán nhanh và chữa trị loại bệnh này, các nhà khoa học đã chú trọng nghiên cứu và ứng dụng công nghệ sản xuất kháng thể đa dòng và kháng thể đơn dòng để chế tạo que thử nhanh virus WSSV ở tôm. Virus đốm trắng (WSSV) là tác nhân gây bệnh được quan tâm đặc biệt do làm gây chết hàng loạt và làm tổn thất nặng nề cho ngành công nghiệp nuôi tôm, đặc biệt là tôm sú (*Penaesus monodon*). Chính vì vậy, việc phát hiện sớm và chính xác virus đốm trắng là cần thiết, protein vỏ VP28 của virus đốm trắng được quan tâm nghiên cứu trong việc chẩn đoán virus đốm trắng bằng phương pháp miễn dịch. Với mục đích tạo ra nguồn kháng thể kháng lại protein VP28 tự nhiên phục vụ chẩn đoán virus đốm trắng, gen mã hóa *vp28* được tiến hành biểu hiện trong tế bào *E. coli*. Sau khi biểu hiện, protein tái tổ hợp VP28 được làm sạch bằng việc tinh chế qua cột sắc ký ái lực His-tag và sử dụng nguồn protein tái tổ hợp này gây miễn dịch trên thỏ. Huyết thanh thỏ có chứa kháng thể kháng VP28 phản ứng đặc hiệu với protein VP28 tự nhiên của virus gây bệnh đốm trắng thông qua phản ứng Westerblot. Kết quả tạo ra kháng thể đa dòng này làm nền để cho nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng kháng VP28 để ứng dụng trong việc chế tạo kit chẩn đoán nhanh bệnh virus đốm trắng trên tôm.

***Từ khóa**: Kháng thể đa dòng, tôm sú, vius gây bệnh đốm trắng, Vp28*

MỞ ĐẦU

Hội chứng đốm trắng là một bệnh nghiêm trọng đối với tôm nuôi trên toàn thế giới. Nguyên nhân gây ra là do virus đốm trắng (WSSV). Khi bị nhiễm bệnh khả năng miễn dịch của tôm yếu dần và tỷ lệ chết lên 80 - 100% sau từ 3 đến 10 ngày dịch bùng phát. Virus gây bệnh đốm trắng trên tôm (WSSV) được phát hiện lần đầu tiên ở Đài Loan năm 1992 (Chou *et al.*, 1995), sau đó, ở Nhật Bản năm 1993 (Nakano *et al.*, 1994), Trung Quốc năm 1995 (Huang *et al.*, 1995) và nhiều vùng khác trên thế giới. Virus này cũng được phân lập từ các loài giáp xác sống gần biển và nước ngọt, như tôm, cua, tôm hùm, tôm he… (Lo *et al.*, 1996, Peng *et al.*, 1999), đe dọa đến việc nuôi trồng tôm. Hiện nay, trên thế giới bao gồm có Việt Nam đã áp dụng các phương pháp hiện đại trong chẩn đoán bệnh tôm như phương pháp nhân dòng gen bằng PCR (Chang *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1996; Nunan, Lightner, 1997; Lê Thị Hội *et al.*, 2001), Bằng kỹ thuật PCR và lai DNA *in situ* (Chang *et al.*, 1996) và Real-time PCR (Durand *et al.*,2003). Tuy nhiên. các kỹ thuật trên còn nhiều hạn chế như rất phức tạp để phát hiện khi tôm bị nhiễm nhiều loại virus hoặc đòi hỏi phải thực hiện trong phòng thí nghiệm với trang thiết bị hiện đại. Hiện nay, trên thế giới một số nước như Thái Lan đã sản xuất thành công kháng thể đơn dòng để phát hiện virus đốm trắng (Parin *et al.*,. 2004). WSSV chứa 5 protein cấu trúc chính là VP 28, VP 19 ở phần vỏ và VP 26, VP 24 và VP 15 ở trong nucleocapsid (Van Hulten *et al.*, 2001).

Trong nghiên cứu này, một đoạn của protein VP28 đã được biểu hiện trong *E. coli* để sản xuất kháng đa dòng. Các kháng thể này có độ đặc hiệu cao với WSSV trong phản ứng Western blot.

Để thăm dò chúng tôi đã sử dụng protein VP28 của virus đốm trắng làm kháng nguyên trong quá trình tạo kháng thể đa dòng làm bước đệm cho nghiên cứu đơn dòng sau đó với mục đích chế tạo que thử phát hiện bệnh virus đốm trắng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Tôm nhiễm virus đốm trắng do Trung tâm Nghiên cứu Nuôi trồng tôm nước mặn Cát Bà, Hải

Phòng cung cấp. Cặp mồi biểu hiện VP28NdeI và VP28XhoI, plasmis pET21 a(+) chủng tế bào *E. coli* BL21DE3, kit tinh sạch protein, màng lai PVDF, cộng hợp kháng thể kháng thỏ do hãng Invitrogen cung cấp; Thỏ thí nghiệm do Viện Thú y cung cấp.

Phương pháp

Thiết kế vector biểu hiện mang gen VP28

Từ nguồn DNA của virus đốm trắng thu được khi tách từ tôm bị bệnh đốm trắng, gen VP28 được nhân lên với số lượng lớn bằng cặp mồi VP28NdeI và VP28XhoI, gồm 30 chu kỳ với 3 bước sau: Bước 1 biến tính DNA ở 94°C trong 1 phút; bước 2 bắt cặp mồi bổ sung với đoạn gen tương đồng 48°C trong 50 giây, bước 3 kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 20 giây. Kết thúc phản ứng ở 72°C trong 8 phút và ủ mẫu ở 4°C.

Sản phẩm PCR được tiếp tục tinh sạch bằng kit tinh sạch của Fermentas, cặp mồi dùng nhân gen VP28 được thiết kế có treo vị trí cắt của 2 enzyme giới hạn *NdeI* và *XhoI* do đó chúng tôi sử dụng 2 enzyme này để cắt sản phẩm PCR và vector pET21a(+). Ghép nối đoạn gen trên và pET21 a(+) bằng enzyme T4-ligase. Sản phẩm của phản ứng nối được biến nạp vào tế bào DH5α để tiến hành chọn dòng plasmid mang gen mong muốn. Cắt kiểm tra các dòng plasmid đã chọn lọc bằng 2 enzyme hạn chế *NdeI* và *XhoI*. Để chính xác dòng plasmid mang gen VP28 mong muốn tiến hành xác định trình tự DNA và so sánh với các gen VP28 đã công bố trên ngân hàng gen thế giới.

Biểu hiện gen

Vector biểu hiện mang gen VP28 được biến nạp vào tế bào kha biến *E coli* chủng BL21DE3 để kiểm tra khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp. Sau khi cấy qua đêm trong môi trường LB lỏng, dòng tế bào mang gen được cấy chuyển sang môi trường LB lỏng mới với tỷ lệ 1/100. Nuôi cấy ở tế bào biểu hiện ở nhiệt độ 37°C khoang 2 h cho đến khi OD ở bước song 600 nm của môi trường nuôi cấy đạt 0,6 - 0,8 tiến hành cảm ứng. Chất cảm ứng của hệ biểu hiện này là IPTG với nồng độ cuối cùng là 0,5 mM. Nhiệt độ biểu hiện của protein này là 37°C.

Tinh sạch protein tái tổ hợp VP28

Sinh khối tế bào sau khi biểu hiện 3 h được thu lại bằng ly tâm ở tốc độ 6000 vòng trong 5 phút. Tế bào sau ly tâm được giữ ở -20°C, sau đó tế bào được hòa lại trong đệm phá Guanidin (6 M guanidinum hydrochloride, 20 mM Sodium phosphate, pH 7.8, 500 mM NaCl) (dùng lượng tế bào thu từ 100 ml dịch biểu hiệnmôi trường), vortex nhẹ. Dùng siêu âm để phá tế bào trong 5 phút, dưới tác dụng của sóng siêu âm tế bào biểu hiện bị phá vỡ và giải phóng toàn bộ protein nội bào. Tinh sạch protein tái tổ hợp từ protein tổng số nhờ cột sắc ký ái lực His-tag (Invitrogen). Các bước tiến hành tinh chế này được miêu tả theo phương pháp của hãng Invitrogen.

Xác định nồng độ protein

Nồng độ protein được xác định bằng phương pháp Bradford. Pha dung dịch BSA 0,1 mg/mL (bovine serum albumin) thành các nồng độ khác nhau sao cho lượng BSA là 2, 4, 6 mg... So sánh chỉ số $OD_{595\ nm}$ của các dung dịch BSA với chỉ số $OD_{595\ nm}$ của mẫu, từ đó suy ra lượng protein có trong mẫu theo nguyên tắc chỉ số OD của protein bằng chỉ số OD của BSA thì khối lượng của protein bằng khối lượng của BSA ở chỉ số OD đó.

Gây miễn dịch

Mỗi lần gây miễn dịch cần 150 - 250 mg kháng nguyên. Trộn đều dịch protein với cùng thể tích muối sinh lý 0,9% và 1 ml tá dược (Fruent's ajuvent complete). Tới khi tạo thành keo thì tiêm dưới da của thỏ (tại 2 - 3 vị trí, mỗi vị trí tạo nhiều u). Ngày tiêm mũi thứ 1 được tính là ngày 1, mũi tiêm thứ 2 tiêm sau mũi một 7 ngày, mũi tiêm 3 sau mũi một 14 ngày, mũi thứ 4 tiêm vào ngày thứ 30 tính từ ngày thứ nhất.

Sau mũi 4 từ 9 - 10 ngày thì tiến hành thu huyết thanh theo các bước sau: Bước đầu tiên là lấy toàn bộ máu của con thỏ đã được gây miễn dịch, tiếp theo ủ máu thỏ đã thu ở 37°C trong 1 h và giữ qua đêm ở 4°C. Cuối cùng là thu phần dịch trong và ly tâm dịch này với tốc độ 1500 vòng/ phút ở 4°C để loại tế bào hồng cầu bị lẫn, giữ lại phần dịch trong và loại bỏ cặn, phần dịch trong này là huyết thanh có chứa kháng thể. Chia nhỏ phần dịch trong ra các lọ penicillin (mỗi lọ từ 1 - 2 ml) sau đó mang đông khô và bảo quản ở 4°C.

Phân tích Westernblot

Phương pháp được thực hiện theo Towbin (1979). Protein tái tổ hợp VP28 và protein tổng số được tách từ mô của tôm bị nhiễm đốm trắng và mô của tôm không bị nhiễm bệnh đốm trắng được điện di trên gel polyacrylamide 12%. Các mẫu protein này được chuyển từ gel polyacrylamide sang mang PVDF bằng bộ chuyển màng của BioRad trong khoảng thời gian 2 h ở hiệu điện thế là 100 V trong

4°C. Sau khi hoàn tất quá trình chuyển màng, màng được phủ bằng sữa tách bơ 5% pha trong TBS1X qua đêm. Loại dung dịch phủ màng, rửa lại 3 lần bằng TBS 1X, lắc nhẹ trong 5 phút. Sau đó, tiếp tục rửa 2 lần bằng TBS 1X với 5 - 10 phút/lần.

Gắn kháng thể 1: Kháng thể 1 (huyết thanh thỏ thu được) pha loãng 500X trong 25 ml dung dịch sữa tách bơ 5% trong TTBS 1X. Phủ lên màng và lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng 1,5 h, loại hết dung dịch kháng thể 1 bằng cách rửa màng 3 lần bằng TTBS 1X, lắc nhẹ và 3 lần bằng TBS 1X, 5 - 10 phút/lần.

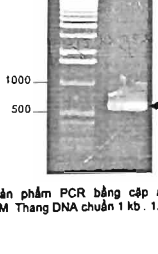
Gắn kháng thể 2: Cộng hợp kháng thể kháng thỏ (kháng thể 2) được pha loãng 10000 X trong 25 ml dung dịch sữa tách bơ 5% trong TBS 1X và phủ lên màng và lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng 2 h. Loại dung dịch gắn kháng thể 2 bằng rửa màng 3 lần bằng TTBS 1X, lắc nhẹ và 3 lần bằng TBS 1X, 5 - 10 phút/lần.

Hiện màu: Ngâm màng 5 - 10 phút trong hỗn hợp dung dịch A(30 mg chất hiện màu (HRP colour development reagent) + 10 ml metanol lạnh) và dung dịch B (30 ml H_2O_2 30% + 50 ml TBS) trong bóng tối và đọc kết quả.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector biểu hiện pET21 - VP28 trong tế bào *E. coli*

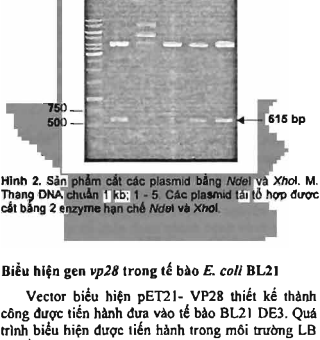
Sản phẩm PCR được chạy với cặp mồi biểu hiện VP28NdeI và VP28XhoI có kích thước khoảng 615 bp phù hợp với kích thước theo lý thuyết mà chúng tôi thiết kế (Hình 1).



Hình 1. Sản phẩm PCR bằng cặp mồi VP28NdeI và VP28XhoI. M: Thang DNA chuẩn 1 kb ; 1. Sản phẩm PCR

Để thuận lợi cho việc đưa thẳng sản phẩm PCR vào vector, chúng tôi đã tiến hành thiết kế trên cặp mồi đặc hiệu cho gen mã hóa cho protein VP28 với 2 điểm cắt của 2 enzyme hạn chế *NdeI* và *XhoI*. Hơn nữa việc sử dụng 2 enzyme này còn giúp việc chuyển gen vào vector được đúng chiều để tiến hành dịch mã tạo protein ngoại lai mong muốn. Ngoài ra, để kiểm tra khả năng mang gen ngoại lai của các dòng plasmid tái tổ hợp ta có thể sử dụng chính 2 enzyme hạn chế này (Hình 2).

Các plasmid ở đường chạy số 1, 4, 5 ở hình số 2 có khả năng mang gen VP28. Để khẳng định chắc chắn hơn chúng tôi tiến hành xác định trình tự 1 trong các dòng plasmid này. Kết quả trình tự đã khẳng định plasmid mà chúng tôi chọn được mang gen *vp28* mã hóa cho protein vỏ VP28 của virus đốm trắng.



Hình 2. Sản phẩm cắt các plasmid bằng *NdeI* và *XhoI*. M. Thang DNA chuẩn 1 kb; 1 - 5. Các plasmid tái tổ hợp được cắt bằng 2 enzyme hạn chế *NdeI* và *XhoI*.

Biểu hiện gen *vp28* trong tế bào *E. coli* BL21

Vector biểu hiện pET21- VP28 thiết kế thành công được tiến hành đưa vào tế bào BL21 DE3. Quá trình biểu hiện được tiến hành trong môi trường LB có bổ sung ampicillin và cảm ứng sau khi OD đạt 0,6 bằng IPTG với nồng độ cuối cùng là 0,5 mM. Sau cảm ứng 3 h, mẫu tế bào được thu nhận và kiểm tra mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp. Kết quả được trình bày ở hình 3.

Kết quả biểu hiện gen (Hình 3) cho thấy, sau cảm ứng xuất hiện một băng protein mới có kích thước khoảng 28 kDa tương ứng với kích thước của protein VP28 tính toán theo lý thuyết, như vậy gen *vp28* được biểu hiện khá mạnh trong tế bào *E. coli* BL21, mức độ biểu hiện được thể hiện trên băng

protein đậm có kích thước khoảng 28 kDa ở đường chạy 2 và 4.

Tinh sạch protein tái tổ hợp VP28

Protein tái tổ hợp VP28 sau khi biểu hiện được tiến hành tinh chế qua cột sắc ký ái lực Ni^{2+}.Cột sắc ký ái lực Ni^{2+} được thiết kế để tinh sạch protein tái tổ hợp có 6 đuôi histidine. Đây chính là điểm thuận lợi cho việc tinh chế protein VP28 vì protein VP28 tái tổ hợp đã được dung hợp thêm trình tự của 6 amino acid histidine được mã hóa bởi các bộ ba mã hóa nằm trên vector do nhà sản xuất thiết kế. Dưới điều kiện pH thích hợp (pH 7,5), Ion Ni^{2+} gắn trên hạt resin tạo liên kết tĩnh điện với đuôi histidine. Khi đó, protein tái tổ hợp sẽ được giữ lại trên cột. Sau khi đã rửa trôi những protein không mong muốn, protein tái tổ hợp được thu lại nhờ dịch thu có nồng độ Imindazole cao. Sản phẩm protein VP28 tái tổ hợp sau khi tinh sạch được kiểm tra trên gel acrylamid 12% (Hình 4).

Kết quả điện di trên hình 4 cho thấy, protein tái tổ hợp VP28 thu được sau khi tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni^{2+} tương đối sạch và có thể sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Để sử dụng protein tái tổ hợp này làm kháng nguyên gây miễn dịch cho thỏ, chúng tôi tiến hành xác định nồng độ protein VP28 tái tổ hợp thu được

BSA (bovine serum albumin) ở các nồng độ khác nhau được đo quang phổ ở bước sóng 595 nm. Chỉ số $OD_{595\ nm}$ của BSA ở các khối lượng khác nhau được đưa ra trong bảng dưới đây

Bảng 1. Chỉ số $OD_{595\ nm}$ của BSA.

TT	BSA (0,1 mg/ml)	Nước vô trùng (µl)	µg BSA	$OD_{595\ nm}$
1	0	900	0	0
2	20	880	2	0,118
3	40	860	4	0,261
4	60	840	6	0,34
5	80	820	8	0,524
6	100	800	10	0,556
7	120	780	12	0,600
8	140	760	14	0,680
9	160	740	16	0,808
10	280	720	18	0,912

Tiếp theo chúng tôi tiến hành đo dung dịch mẫu (890 ml nước + 10 ml mẫu + 300 ml dung dịch mẫu) ở bước sóng 595 nm, chỉ số đo được là 0,140. So sánh với chỉ số $OD_{595\ nm}$ của BSA ở bảng trên, chúng tôi thấy chỉ số này tương ứng với lượng BSA là 2 mg/ml. Như vậy protein tái tổ hợp thu được là 2 mg/ml.

Tạo kháng thể đa dòng kháng protein vỏ VP28 của virus đốm trắng

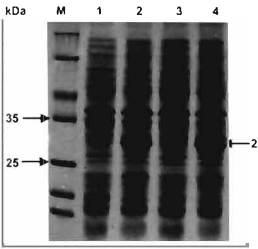
Bằng phương pháp gây miễn dịch trên thỏ, theo lý thuyết chúng tôi đã thu được huyết thanh chứa kháng thể kháng protein vỏ VP28 của virus gây bệnh hội chứng đốm trắng trên tôm sú. Để khẳng định việc tạo thành công protein tái tổ hợp VP28 và kháng thể kháng đặc hiệu của protein này, chúng tôi tiến hành kiểm tra bằng phản ứng Western blot.

Phương pháp Western blot là kỹ thuật lai protein với kháng thể đặc hiệu. Nếu kháng thể kháng đặc hiệu protein vỏ VP28 có mặt trong huyết thanh của thỏ thì phản ứng miễn dịch đặc hiệu giữa kháng thể này với protein VP28 tự nhiên trong tôm bệnh và với protein tái tổ hợp VP28 sẽ xảy ra. Trong phản ứng Western blot, phản ứng miễn dịch diễn ra sẽ xúc tác cho phản ứng hiện màu của enzyme cộng hợp kháng thể và ta có thể quan sát thấy các vạch màu tương ứng trên màng PDVF.

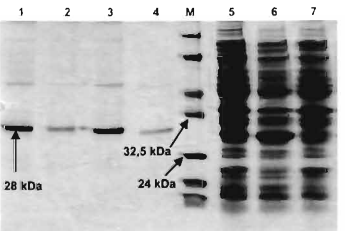
Protein tách chiết từ mô của tôm nhiễm và không nhiễm WSSV (đã được kiểm tra bằng PCR trước đó), protein tái tổ hợp sau khi điện di trên gel polyacrylamit được tiến hành chuyển màng và tham gia vào phản ứng Western blot. Kết quả của phản ứng Western blot được thể hiện ở hình 5.

Kết quả hình 5 cho thấy các băng protein phản ứng đặc hiệu với kháng thể thỏ. Cả hai mẫu tôm bệnh đều xuất hiện một băng đậm nét có kích thước khoảng 28 kDa (đường chạy 2 - 3) , trong khi mẫu tôm không bệnh không xuất hiện băng tương ứng (đường chạy 6). Ở đường chạy 4 - 5 sờ dĩ xuất hiện nhiều băng phản ứng là do khi tinh sạch protein VP28 tái tổ hợp vẫn còn một lượng nhỏ protein của *E. coli*, mà phản ứng Western blot là phản ứng rất nhạy lên chỉ cần một lượng nhỏ protein cũng có thể phát hiện được. Trong trường hợp này protein tái tổ hợp được sử dụng như là mẫu đối chứng dương cho phản ứng. Kháng thể thỏ có chứa kháng thể kháng VP28 tái tổ hợp đã phản ứng rất đặc hiệu với protein tự nhiên được tách chiết từ mô của tôm bị bệnh đốm trắng mà không phản ứng với protein tự nhiên được tách chiết từ mô của tôm không bị bệnh. Như vậy đã có phản ứng miễn dịch đặc hiệu đã xảy ra giữa

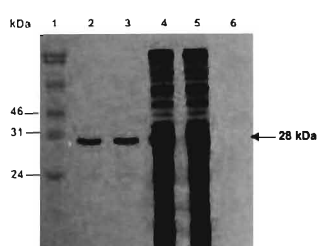
kháng thể được tạo ra trong huyết thanh của thỏ và protein vỏ VP28 tự nhiên của WSSV trong tôm bị bệnh. Điều này cho chứng tỏ rằng có thể sử dụng nguồn kháng thể đa dòng này vào việc chẩn đoán virus đốm trắng bằng kỹ thuật Westernblot hoặc Dotblot.



Hình 3. Kiểm tra khả năng biểu hiện của gen *vp28* trên gel polyacrylamide 12%. M: Thang protein chuẩn; 1,3. Protein tổng số thu được trong điều kiện nuôi cùng không cảm ứng IPTG sau 3 h; 2,4. Protein tổng số thu được sau 3 h cảm ứng bằng IPTG.



Hình 4. Kiểm tra protein trên gel polyacrylamide 1; 3: Protein VP28 tinh sạch thu được ở 8 ml đầu tiên; 2; 4: Protein VP28 tinh sạch thu được ở 3 ml tiếp sau; M: Thang maker protein; 5: Protein thu được từ mẫu nuôi cùng không cảm ứng bằng IPTG; 6: Protein thu được từ mẫu được cảm ứng bằng IPTG; 7: Protein thu được từ mẫu trước khi cảm ứng bằng IPTG.



Hình 5. Kiểm tra kháng thể đa dòng thu bằng phản ứng Western blot 1:Thang protein chuẩn; 2 - 3:Protein tách từ tôm nhiễm WSSV; 4 - 5: Protein tái tổ hợp; 6. Protein tách từ tôm không bị nhiễm WSSV.

KẾT LUẬN

Đã thiết kế thành công vector biểu hiện gen VP28 và biểu hiện được protein tái tổ hợp VP28 với kích thước 28 kDa.

Chúng tôi đã thành công trong việc tạo kháng thể đa dòng đặc hiệu của protein VP28 kháng protein vỏ VP28 tự nhiên của virus gây bệnh đốm trắng. Kháng thể đa dòng nhận được là nguyên liệu cho việc tạo kit để chẩn đoán nhanh bệnh virus trên tôm nuôi.

Lời cảm ơn: *Nhóm đề tài xin chân thành cảm ơn Chương trình Khoa học công nghệ cấp nhà nước KC06 đã giúp đỡ kinh phí để hoàn thành nội dung nghiên cứu "Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng (monolono-Antibody)để chẩn đoán nhanh bệnh virus trên tôm nuôi".*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Thị Hội, Đinh Thương Vân, Đinh Duy Khang, Lê Trần Bình (2001) Tách dòng và xác định trình tự đoạn ADN đặc hiệu của virut gây bệnh đốm trắng trên tôm sú ở Việt Nam. *Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học 2001:* 341-347

Chou HY, Huang CY, Wang CH, Chuang HC, Lo CF (1995) Pathogenicity of a baculovirus white spot syndrome

in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org* 23, 165-173.

Chang PS, Lo CF, Wang YC, Kou GH (1996) Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp Penaeus monodon by in situ hybridization. *Dis Aquat Org* 27: 131-139.

Durand SV, Redman RM, Mohney LL, TangNelson K, Bonami JR, Light DV (2003) Qualitative and quanti ative studies on the relative virus load of tail sand head of shrimp acutely infected with WSSV. *Aquaculture* 216: 9-18.

Huang J, Song X, Yu J, Yang C (1995) Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis-study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. *Mar Fish Res* 16: 51 - 58

Kimura T, Yamano K, Nakano H, Momoyama K, Hiraoka M, Inouye K (1996) Detection of penaeid rodshaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathol* 31. 93-98.

Li HX, Meng XL, Xu JP, Lu W, Wang J (2005) Protection of crayfish, Cambarus clarkii, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein. *J Fish Dis* 28(5): 285-291.

Lo CF, Ho CH, Peng SE, Chen CH, Hsu HC, Chiu YL, Chang CF, Lui KF, Su MS, Wang CH, Kou GH (1996) White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods *Dis Aquat Org* 27: 215-225.

Nakano H, Koube H, Umezawa S, Momoyama K, Hiraoka M, Inouye K, Oseko N (1994) Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, Penaeus japonicus, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol* 29: 135-139.

Nunan LN, Lightner DV (1997) Development of a non radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J Virol Methods* 63: 193-201.

Chaivisuthangkura P, Phattanapaijitkul P, Thammapaleri N, Rukpratanporn S, Longyant S, Sithigorngul W, Sithigorngul P (2006) Development of a polyclonal antibody specific to VP19 envelope protein of white spot syndrome virus (WSSV) using a recombinant protein preparation. *J Virol Methods* 133(2): 180-184.

Peng SE, Lo CF, Ho CH, Chang CF, Kou GH (1998) Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, Macrobrachium rosenbergii, using polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164: 253-262.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(9): 4350-4354.

VanHulten MCW, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, Vlak JM (2001) White spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7-22.

You Z, Nadala ECB, Yang J, van Hulten MCW, Loh C (2002) Production of polyclonal antiserum specific to the 27.5 kDa envelope protein of white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org* 51. 77-80.

Yoganandhan K, Syed Musthaq S, Narayanan RB, Sahul Hameed AS (2004) Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of whitespot syndrome virus in crustaceans. *J Fish Dis* 27: 517-522.

PRODUCTION OF POLYCLONAL ANTIBODY AGAINST THE VP28 PROTEIN OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS ON SHRIMP (*PENAEUS MONODON*)

Ha Thi Thu, Dinh Duy Khang, Dinh Thuong Van*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

In Vietnam, aquaculture, particularly cultured shrimp is developing rapidly, contributing significantly in creating jobs, increasing incomes, ensuring sufficient food supply as well as attracting foreign currencies by raising export revenue. However, besides the tremendous benefits, shrimp-farming in Vietnam is facing severe damage due to environmental pollution and diseases. These diseases are usually caused by viruses, of which White Spot Syndrome Virus is the most notable case. Thus, to support the diagnostic process of this disease, researchers have experimented and applied the techniques of producing polyclonal antibody and monoclonal antibodies to create WSSV diagnostic kits. White spot syndrome virus (WSSV) is of particular interest because it is an important pathogen which causes high mortality and considerable economic damage to the shrimp farming industry, especially *Penaeus monodon* Therefore, it's essential to rapidly and accurately diagnose

* *Author for correspondence:* E-mail: *thuongvanibt@gmail.com*

WSSV. VP28 envelope protein, a major antigen to detect WSSV by immunoassay, was expressed in *E. coli* to produce antibody against native VP28 protein. VP28 recombinant protein was purified by Nickel Resin column and purified recombinant protein was used to immunize rabbits. The rabbit serum containing anti-VP28 polyclonal antibodies specifically reacted with native VP28 protein of WSSV by Western blot. This result was a basis for development of polyclonal antibody against VP28 protein to manufacture rapid diagnostic kit of WSSV.

Keywords: *Penaeus monodon, polyclonal antibody, recombinant protein, VP28, WSSV*