

TẠO DÒNG TẾ BÀO LAI SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG PROTEIN VỎ VP28 CỦA VIRUS GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG TRÊN TÔM SÚ

Đỗ Thị Thảo, Đỗ Thị Phương, Đỗ Khắc Hiếu, Hà Thị Thu, Đinh Thương Vân, Đinh Duy Kháng, Lê Trần Bình

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Tạo kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody) để ứng dụng trong các chẩn đoán nhanh, đặc hiệu các bệnh của người và vật nuôi là điều không mới. Tuy nhiên, lần đầu tiên ở Việt Nam, chúng tôi đã lai tạo và tách dòng thành công 05 dòng tế bào lai (hybridomas) có khả năng sản xuất ra kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu VP28 tái tổ hợp - protein vỏ của virus WSSV gây hội chứng đốm trắng trên tôm ở nồng độ gây miễn dịch là 0,05 mg/ml. Hiệu giá kháng thể đơn dòng tinh sạch thu được từ dịch nổi nuôi cấy 05 dòng tế bào này đạt từ 1000 - 3500 với hàm lượng thu được từ 54 - 95 μ g/l một cách tương ứng. Các kháng thể đơn dòng thu được đều thể hiện kết quả dương tính đối với các mẫu phẩm của tôm bị bệnh đốm trắng. Tuy nhiên, các kháng thể đơn dòng thu được sẽ còn cần được kiểm tra các đặc tính trong các nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: Hybridomas, monoclonal antibody, myeloma, VP28, WSSV

MỞ ĐẦU

Thủy sản là ngành kinh tế mũi nhọn trong sự nghiệp phát triển kinh tế của Việt Nam. Theo đà phát triển của thế giới, ngành nuôi tôm Việt Nam đang phát triển mạnh mẽ ở nhiều địa phương, nhất là các tỉnh phía Nam và đang triển khai ở các tỉnh phía Bắc. Tuy nhiên, một số loại virus đã gây chết tôm hàng loạt mà virus gây hội chứng đốm trắng (White spot syndrome virus, WSSV) gây hại nhiều nhất, như tôm sú khi bị nhiễm virus này có tỷ lệ chết rất cao (> 80%) trong khi chưa có thuốc trị hiệu quả (Nguyễn Mạnh Hùng, 1996). WSSV ở tôm có kích thước khoảng 70 - 150 nm $\times$ 180 - 250 nm. Virus này chứa DNA sợi kép có chiều dài gen xấp xỉ 290 kb, là đại diện của nhóm virus mới Whispovirus. Virion của WSSV gây ra bệnh đốm trắng được tách từ tôm nhiễm bệnh chứa 5 protein chính là: VP26, VP24 và VP15 kết hợp với vỏ nhân, còn VP28 và VP19 thuộc vỏ của virus (Tsai *et al.*, 2004; Hội *et al.*, 2000; Marielle, Van Hulsten, 2002; Van Hulsten *et al.*, 2000).

Để phát hiện được mầm bệnh trên tôm do các loại virus gây ra, việc ứng dụng các chỉ thị phân tử và các kỹ thuật của sinh học phân tử như PCR, two-step PCR, RT-PCR... đã được thực hiện (Đinh Thương Vân *et al.*, 1999; Lightner, 1996; Takahashi *et al.*, 2003). Tuy nhiên, các kỹ thuật này còn một số hạn chế, ví dụ như khó có thể phát hiện được các

chủng khác nhau của một số loại virus hoặc chỉ có thể thực hiện ở các phòng thí nghiệm sinh học phân tử hiện đại, chưa thể ứng dụng rộng rãi và trực tiếp tại các nông trại nuôi tôm để giúp người nuôi phát hiện sớm, chính xác căn bệnh để phòng tránh được bệnh dịch lây lan. Hiện nay, nhiều nghiên cứu đang hướng về sử dụng kháng thể đơn dòng để tạo các que thử phát hiện nhanh nhiều loại bệnh trên cả người và động vật nhờ vào tính đặc hiệu và độ nhạy rất cao của kháng thể đơn dòng (Birch, Lennox, 1995; Celis *et al.*, 1994; Kohler, Milstein, 1975; Me, Speir, 1996). Đối với căn bệnh đốm trắng trên tôm do WSSV gây ra, một số nước phát triển trong khu vực như Nhật Bản, Thái Lan... đã sản xuất thành công các que thử nhanh sử dụng kháng thể đơn dòng để phát hiện sớm virus gây bệnh (Sithigomgul *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2003).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng protein VP28 là protein thuộc vỏ của virus WSSV làm kháng nguyên gây miễn dịch. VP28 đã được tách dòng, biểu hiện và tinh sạch để sử dụng làm kháng nguyên trong quá trình tạo kháng thể đơn dòng nhằm phát hiện sớm bệnh đốm trắng trên tôm Việt Nam (Hà Thị Thu *et al.*, 2007; Phan Thị Phương Trang *et al.*, 2003). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đã tạo được những dòng tế bào hybridoma lai giữa tế bào lympho B tách từ lách chuột BALb/c và tế bào myeloma Sp2/0-Ag14 sản xuất kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu protein VP28 của virus gây

bệnh đốm trắng trên tôm. Dưới đây là kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp nuôi cấy tế bào Sp2/0-Ag14 *in vitro*

Tế bào Sp2/0-Ag14 do GS. J. M. Pezzuto thuộc trường Đại học Hawaii, Hoa Kỳ cung cấp. Tế bào được nuôi cấy dưới dạng hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy RPMI-1640 có bổ sung 10% FBS, 1% PSF, 10% Sodium pyruvat (GIBCO cat. 11875). Tế bào được cấy chuyển sau 3 - 5 ngày với tỷ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ẩm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂.

Phương pháp gây miễn dịch

Chuột BALb/c cái, khỏe mạnh từ 6 - 8 tuần tuổi được gây miễn dịch với kháng nguyên protein VP28 (Hà Thị Thu *et al.*, 2007). Kháng nguyên ở nồng độ 0,05 mg/ml được trộn đều với tá chất CFA (Completed Freund's adjuvant) theo tỷ lệ 1:1 cho lần tiêm đầu và với tá chất IFA (Incompleted Freund's adjuvant) theo tỷ lệ 1:1 cho lần tiêm nhắc lại. Kháng nguyên sau khi được trộn với tá chất sẽ được tiêm dưới da của chuột. Lần tiêm nhắc lại được thực hiện vào 3 - 4 tuần sau lần tiêm đầu. Lần tiêm cuối cùng cho chuột được thực hiện 3 ngày trước khi thí nghiệm lấy tế bào lympho B.

Phương pháp lai tế bào và tách dòng

Lách chuột được lấy khỏi cơ thể chuột và tách rời thành từng tế bào (Liddell, Cryer, 1993). Hỗn dịch này được rửa sạch bằng PBS và đem lai với tế bào Sp2/0-Ag14 với tỷ lệ 1:10 trong điều kiện tác động của 40% polyethylene glycol (PEG, MW1500 - Sigma), tỷ lệ 1:2 trong 1 phút, tiếp tục thêm 20 ml môi trường RPMI-1640 để rửa. Sau quá trình rửa để loại bỏ PEG, tế bào được bổ sung môi trường Dulbecco Modified Eagle medium (DMEM) (GIBCO cat. 11995) có bổ sung 10% HAT (GIBCO cat. 21060-017) và được chia vào các phiên 96 giếng. Sau 5 ngày, tế bào lai được thay môi trường có bổ sung 10% HT (GIBCO cat. 11067-030). Sau 7 ngày, 100 µl dịch nổi thu nhận từ mỗi giếng nuôi tế bào được kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng đặc hiệu VP28 bằng phương pháp ELISA. Dịch nổi nào có được giá trị OD cao gấp 3 lần so với đối chứng âm được xem là có hoạt tính, nói cách khác là có kháng thể kháng VP28 trong dịch nổi tương ứng với sự xuất hiện của tế bào lai có khả năng sản xuất kháng thể kháng VP28. Thu nhận tế bào lai hybridomas từ các giếng có hoạt tính mạnh (giá trị

OD cao) cấy chuyển sang phiên 24 giếng có môi trường RPMI-1640 để tiếp tục nuôi cấy. Kiểm tra hoạt tính bằng ELISA để tiến hành tách dòng. Lựa chọn các giếng có một dòng tế bào, có sinh kháng thể kháng VP28 để nhân nuôi lượng lớn, từ đó tinh sạch và kiểm tra hiệu giá của kháng thể đơn dòng thu được.

Phương pháp ELISA để kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng đặc hiệu VP28

Phương pháp ELISA được thực hiện theo Liddell và Cryer, 1993. Kháng nguyên được pha loãng ở nồng độ 250 ng/ml trong Carbonate coating buffer (100 µl/giếng) và ủ ban 1 h ở 37°C. Tiếp theo, bản ủ được rửa 5 lần bằng Washing buffer (Phosphate-buffered saline - PBS có bổ sung 0,05% Tween 20 và 1% skim milk). Tiếp tục bổ sung 100 µl dịch nổi cần kiểm tra vào từng giếng, ủ 1 h ở 37°C. Goat-Antimouse IgG conjugate HRP (horseradish peroxidase) (Promega cat. W4021) được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng VP28. Thêm 100 µl/giếng cơ chất TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) và ủ 1 h ở 37°C. Đọc kết quả ELISA ở bước sóng 450 nm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Gây miễn dịch cho chuột

Thu nhận kháng huyết thanh từ 06 chuột được gây miễn dịch bằng VP28 và kiểm tra hoạt độ của kháng huyết thanh bằng phương pháp ELISA. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hoạt độ kháng thể kháng VP28 của virus gây bệnh đốm trắng trên tôm từ kháng huyết thanh của chuột được gây miễn dịch.

STT	Mẫu kiểm tra	Giá trị OD	Độ pha loãng
1	Chuột 1	0,19	1000
2	Chuột 2	1,91	1000
3	Chuột 3	2,24	1000
4	Chuột 4	0,17	1000
5	Chuột 5	1,84	1000
6	Chuột 6	1,57	1000
7	BSA (đối chứng âm) (0,1%)	0,15	

Kết quả bảng 1 cho thấy đáp ứng miễn dịch trong thí nghiệm của chúng tôi có thể là thấp hơn so với nghiên cứu của một số tác giả khác. Kết quả này còn phụ thuộc vào phương pháp gây miễn dịch cũng như đáp ứng miễn dịch của từng cơ thể động vật khác nhau. Tuy nhiên, kết quả ELISA cho thấy lượng kháng thể kháng VP28 trong huyết thanh của chuột 3 cao hơn của các chuột khác. Chuột 3 được lựa chọn để thu nhận tế bào lympho B dùng cho quá trình lai với tế bào Sp2/0-Ag14.

Lai tạo các dòng tế bào hybridomas sản xuất kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu VP28 của WSSV trên tôm

Sau quá trình lai tế bào như đã được trình bày ở phần phương pháp, chúng tôi thu được 198/224 giếng có tế bào lai sau khi đã sàng lọc bằng môi trường chọn lọc HAT và HT. Như vậy, hiệu quả lai

(fusion efficiency) đã đạt tới 88%. Tiếp theo, phương pháp ELISA được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng đặc hiệu VP28 trong các giếng. Kết quả có 45 giếng/198 giếng (đạt 22,7%) thể hiện sự có mặt của kháng thể kháng VP28 của WSSV trên tôm. Các tế bào lai từ 5 giếng có OD cao nhất trong số 45 giếng dương tính này được thu nhận để làm sạch dòng bằng phương pháp pha loãng tới hạn và chọn lọc bằng phương pháp ELISA. Cuối cùng, chúng tôi thu nhận và chọn được 10 dòng tế bào lai kí hiệu MCAW1 đến MCAW10 sản sinh kháng thể đơn dòng kháng VP28 tốt nhất tương ứng với giá trị OD cao nhất. Kết quả được trình bày cụ thể ở bảng 2.

Kết quả cho thấy 05 dòng MCAW1, MCAW2, MCAW3, MCAW6, MCAW8 là 05 dòng tế bào lai sản sinh nhiều nhất kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu VP28 với giá trị OD cao nhất.

Bảng 2. Kết quả kiểm tra ELISA từ dịch nổi nuôi cấy của 10 dòng tế bào lai sản sinh kháng thể đơn dòng kháng VP28 được lựa chọn.

STT	Ký hiệu dòng	Giá trị OD/độ pha loãng	STT	Ký hiệu dòng	Giá trị OD/độ pha loãng
1	MCAW1	2,46/2	6	MCAW6	2,20/2
2	MCAW2	2,25/2	7	MCAW7	1,89/2
3	MCAW3	1,97/2	8	MCAW8	1,98/2
4	MCAW4	1,78/2	9	MCAW9	1,62/2
5	MCAW5	1,94/2	10	MCAW10	1,37/2
BSA (đối chứng âm) (0,1%)					0,14

Tinh sạch và kiểm tra hiệu giá kháng thể đơn dòng

Sau quá trình tách dòng, chúng tôi đã nhân lên và kiểm chứng khả năng tạo kháng thể đơn dòng của từng dòng tế bào lai bằng phương pháp ELISA. Cuối cùng, chúng tôi đã lựa chọn ra 5 dòng tế bào lai hybridomas ký hiệu MCAW1, MCAW2, MCAW3, MCAW6, MCAW8 sản xuất ra kháng thể đơn dòng với số lượng lớn nhất (tương ứng với giá trị OD lớn nhất khi kiểm tra bằng ELISA). Năm dòng tế bào này được tiến hành nhân nuôi *in vitro* để có số lượng lớn tế bào nhằm (a) tạo nguồn tế bào để tạo u bóng cho chuột và từ đó thu kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu VP28 với số lượng lớn; (b) lưu giữ bảo quản trong nitrogen lỏng; (c) Tinh sạch và thu kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu VP28 từ dịch nổi nuôi cấy bằng ammonium sulfate (Liddell, Cryer, 1993).

Sau quá trình tinh sạch kháng thể từ dịch nổi nuôi cấy *in vitro* của 05 dòng tế bào lai nói trên, chúng tôi đã kiểm tra hiệu giá của 05 loại kháng thể đơn dòng thu được và kết quả được trình bày ở bảng 3.

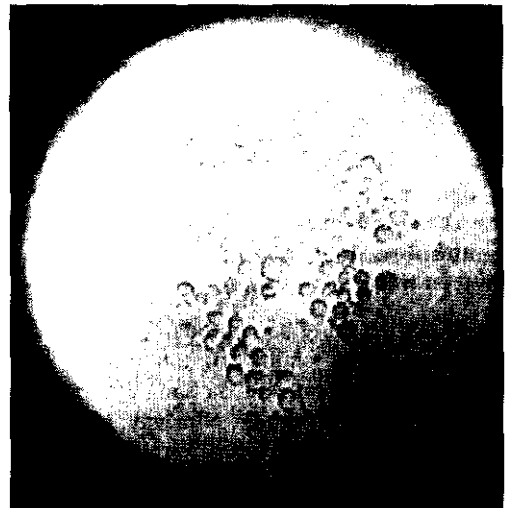
Kết quả cho thấy, chúng tôi đã thu được kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu VP28 của WSSV trên tôm Việt Nam từ 05 dòng tế bào lai hybridomas ký hiệu MCAW1, MCAW2, MCAW3, MCAW6, MCAW8 trong đó dòng MCAW1 sản sinh kháng thể đơn dòng có hiệu giá kháng thể lớn nhất. Tuy nhiên, lượng kháng thể đơn dòng thu được còn chưa cao (54 - 95 µg/l) và hiệu giá kháng thể cao nhất mới chỉ đạt mức là 3500. Hàm lượng thấp này có thể do mật độ tế bào đưa vào nuôi cấy còn thấp. Chúng tôi sẽ nghiên cứu thêm các điều kiện nuôi cấy khác để dần nâng cao hàm lượng kháng thể đơn dòng trong dịch

nuôi. Đồng thời, để có được lượng lớn kháng thể đơn dòng, chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu gây

bảng cho chuột bằng dòng tế bào MCAW1 theo Liddel và Cryer (1993).



Hình 1. Hình ảnh tế bào sau khi lai giữa tế bào lympho B và tế bào Sp2/0 (sau 5 ngày).



Hình 2. Tế bào lai sau khi tách dòng ký hiệu MCAW3.

Bảng 3. Hiệu giá kháng thể thu được từ 5 dòng tế bào sản xuất kháng thể đơn dòng kháng VP28 của virus gây bệnh đốm trắng trên tôm.

STT	Dòng tế bào sản xuất kháng thể đơn dòng	Hàm lượng kháng thể thu được ($\mu\text{g/l}$)	Kiểm tra bằng ELISA	Kiểm tra trên mẫu phẩm tôm bệnh	Hiệu giá kháng thể
1	MCAW1	75	+	+	3500
2	MCAW2	54	+	+	2500
3	MCAW3	60	+	+	2000
4	MCAW6	70	+	+	2500
5	MCAW8	95	+	+	1000

KẾT LUẬN

Lần đầu tiên ở Việt Nam chúng tôi đã thành công trong việc tạo các dòng tế bào lai hybridomas sản xuất kháng thể đơn dòng kháng protein kháng nguyên vỏ VP28 của WSSV trên tôm. Chúng tôi đã lựa chọn được 05 dòng tế bào lai hybridomas có khả năng sản sinh kháng thể đơn dòng có chất lượng tốt nhất kí hiệu MCAW1, MCAW2 và MCAW3, MCAW6, MCAW8 ở nồng độ kháng nguyên gây

miễn dịch là 0,1 mg/ml. Các dòng tế bào lai này đã được nhân nuôi để sử dụng làm nguồn tế bào tạo u bảng cho chuột nhằm thu lượng lớn kháng thể đơn dòng. Chúng cũng được duy trì trong nitrogen lỏng để bảo quản lâu dài. Đồng thời, chúng tôi cũng đã thu được kháng thể đơn dòng tinh sạch từ dịch nổi nuôi cấy các dòng tế bào lai nói trên mặc dù hàm lượng chưa cao, mới đạt từ 54 - 95 $\mu\text{g/l}$. Chúng tôi cũng đã kiểm tra hiệu giá kháng thể cũng như khả năng phát hiện VP28 của virus gây bệnh đốm trắng

trên mẫu phẩm tôm bệnh của các kháng thể đơn dòng thu được. Hiệu giá kháng thể đơn dòng tinh sạch thu được từ dịch nội nuôi cấy O5 dòng tế bào này đạt từ 1000 - 3500, trong đó dòng MCAW1 đạt hiệu giá cao nhất.

Chúng tôi mong muốn tiếp tục nghiên cứu quá trình gây bệnh cho chuột bằng tế bào lai có hiệu giá kháng thể cao để thu được lượng lớn kháng thể, hoàn thiện qui trình tinh sạch để có được kháng thể đơn dòng lượng lớn và chất lượng cao phục vụ cho thực tiễn sản xuất và nhiều nghiên cứu tiếp theo.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS. J.M. Pezzuto, trường Đại học Hawaii, Hoa kỳ đã giúp đỡ chúng tôi thực hiện công trình nghiên cứu này. Công trình hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Viện Công nghệ sinh học cấp cơ sở. Nghiên cứu được thực hiện có sử dụng một số trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Birch JR, Lennox ES (1995) Monoclonal antibodies: principles and applications. John Wiley & Sons.

Celis A, Dejgaard Kurt, Julio E Celis (1994) Production of mouse monoclonal antibodies. *Cell Biol* 2: 269-275.

Đinh Thương Vân, Đinh Duy Kháng, Lê Trần Bình (1999) Phát hiện virus gây hội chứng đốm trắng ở tôm bằng kỹ thuật PCR. *Kỷ yếu viện Công nghệ sinh học*: 352-354.

Đinh Thương Vân, Lê Thị Hội, Hà Thị Thu, Đinh Duy Kháng (2005) Tách dòng và biểu hiện ở *E. coli* gen mã hóa cho protein vỏ (VP26) của virus gây bệnh đốm trắng trên tôm sú ở Việt Nam. *Tạp chí Sinh học* 7(1): 53-57.

Hà Thị Thu, Đinh Duy Kháng, Đinh Thương Vân (2007) Tách dòng và biểu hiện ở *E. coli* gen mã hóa cho protein vỏ (VP28) của virus gây bệnh đốm trắng trên tôm sú ở Việt Nam. *Những vấn đề Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học sự sống*: 839-841.

Kohler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517): 495-497.

Lê Thị Hội, Đinh Thương Vân, Đinh Duy Kháng, Lê

Trần Bình (2000) Tách dòng và xác định trình tự đoạn ADN đặc hiệu của virus gây bệnh đốm trắng ở tôm sú ở Việt Nam. *Kỷ yếu viện Công nghệ sinh học*: 341-347.

Liddell EJ, Cryer A (1991) A practical guide to monoclonal antibodies. *John Wiley & Sons*.

Lightner DV (1996) Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Section 3.11. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, USA.

Marielle CW, Van Hulten MC (2002) Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus of shrimp and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *J Gen Virol* 83: 257-265.

Me C, Speir RE (1996) Monoclonal antibodies in biotechnology theoretical and practical. *Aspects Cambridge*: 92-98.

Nguyễn Mạnh Hùng (1996) Tổng quan về tình hình bệnh tôm trên thế giới và Việt Nam. *Tuyển tập các công trình nghiên cứu khoa học công nghệ thủy sản*.

Phan Thị Phụng Trang, Nguyễn Đức Hoàng, Trần Linh Thuộc (2003) Tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa protein vỏ VP28 của virus gây hội chứng đốm trắng WSSV trên tôm sú trong *E. coli*. *Tạp chí công nghệ Sinh học* 1(1): 47-55.

Sithigorngul P, Chauyuchwong P, Sithigorngul W, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Menasveta P (2000) Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis Aqua Organ* 10: 42(1).

Takahashi Y, Fukuda K, Kondo M, Chongthaleong A, Nishi K, Nishimura M, Ogata K, Shinya I, Takise K, Fujishima Y, Matsumura M (2003) Detection and prevention of WSSV infection in cultured shrimp. *Asi Aqua Mag* 25: 27-34.

Tsai JM, Wang HC, Leu JH, Hsiao HH, Wang AHJ, Kou GH, Lo CF (2004) Genomic and Proteomic Analysis of Thirty-Nine Structural Proteins of Shrimp White Spot Syndrome Virus. *J Virol* 20(78): 11360-11370.

Van Hulten MC, Westenberg M, Goodall SD, VlaK JM (2000) Identification of major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *J Virol* 2(266): 227-236.

Van Hulten MC, Witteveld TJ, Snippe M (2001) White spot syndrome virus envelope protein VP 28 is involved in the systemic infection of shrimp. *J Virol* 2(285): 228-233.

CLONING OF HYBRIDOMAS PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE VP28 OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN SHRIMP

Do Thi Thao*, Do Thi Phuong, Do Khắc Hiếu, Hà Thị Thu, Đinh Thị Thương Vân, Đinh Duy Khang, Lê Trần Bình

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Production of monoclonal antibody for early specific diagnosis of human and animal's diseases is not a new application. However, as the first case in Vietnam, we were successful in fusion and cloning of 5 clones of hybridoma which were able to produce specific monoclonal antibodies against VP28 - a viral envelope protein of WSSV in shrimp under concentration of immunogen as 0.05 mg/ml. The concentrations of the 5 monoclonal antibodies purified from supernatants of the cultured 5 clones of hybridoma ranged from 54 - 95 µg/l and working dilutions of those ranged from 1,000 - 3,500 respectively. All monoclonal antibodies showed positive results after ELISA checking on WSSV infected shrimp samples. However, those monoclonal antibodies still need to be characterized in our further research.

Keywords: *hybridomas, monoclonal antibody, myeloma, VP28, WSSV*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-38361774/84-4-38364343; E-mail: thaodo@ibt.ac.vn