

# NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG VI-RÚT GÂY BỆNH HOẠI TỬ CƠ QUAN TẠO MÁU VÀ DƯỚI VỎ (IHHNV) Ở TÔM PENAEID

Bùi Thị Bích Hằng<sup>1</sup> và Timothy W. Fleg<sup>2</sup>

## ABSTRACT

*Monoclonal antibodies (MAbs) were developed to the Infectious Hypodermal and Hematopoietic necrosis (IHHNV), an important pathogen of culture Penaeid shrimp. Dot blot, western blot and immunohistochemistry were used as standard methods to evaluate MAbs for their usefulness as rapid diagnostic tools for identification of IHHNV and as tools for further study of this virus. The results showed that the MAb demonstrated strong immunoreactivity to purified capsid GP3 protein with different sensitivities ranging from 0.1 – 0.5 x 10<sup>-3</sup> µg/µl and it also exhibited strong band to the E. Coli containing GP3-pET15b at 37kDa with dilution 1:100. Additionally, the MAb at dilution 1:10 showed strong specific binding to IHHNV inclusion bodies in gill, nerve, muscle and epithelial cells.*

**Key words:** Monoclonal antibody, dot blot, western blot, immunohistochemistry

**Title:** Development of a monoclonal antibody assay for Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) of Penaeid Shrimp

## TÓM TẮT

*Kháng thể đơn dòng của vi-rút gây bệnh hoại tử cơ quan tạo máu và dưới vỏ (IHHNV), một bệnh nguy hiểm cho tôm penaeus, đã được sản xuất. Phương pháp Dot blot, Lai western, hóa mô miễn dịch được xem là những phương pháp chuẩn để đánh giá sự tiện dụng của phương pháp chẩn đoán bệnh IHHNV ở tôm Penaeus bằng kháng thể đơn dòng. Phương pháp kháng thể đơn dòng cũng được xem như là 1 công cụ ứng dụng cho những nghiên cứu khác về IHHNV. Kháng thể đơn dòng này có thể phát hiện IHHNV ở nhạy cảm 0,1–0,5 x 10<sup>-3</sup> µg/µl GP3 protein. Đồng thời cũng thể hiện bằng đậm khi phát hiện vi khuẩn E.Coli chứa protein tái tổ hợp GP3-pET15b ở vị trí 37kDa với độ pha loãng 1:100. Hơn thế nữa, kháng thể với nồng độ 1:10 cũng cho phản ứng đặc hiệu khi bao xung quanh các thể vùi IHHNV ở nhiều bộ phận của tôm bị nhiễm IHHNV như mang, dây thần kinh, cơ và tế bào biểu bì.*

**Từ khóa:** Kháng thể đơn dòng, dot blot, lai western, hóa mô miễn dịch

## 1 GIỚI THIỆU

Nuôi tôm thâm canh hiện đang phát triển nhanh chóng và ngày càng mang nhiều lợi nhuận cho nhiều nước trên thế giới. Mặc dù vậy, rủi ro cho nghề nuôi tôm cũng không nhỏ, dịch bệnh hiện đang là một trở ngại lớn trong sự phát triển ngành nuôi tôm công nghiệp ở Việt Nam nói riêng và trên thế giới nói chung. Trong khi bệnh đốm trắng gây nguy hiểm ở tôm sú (*Penaeus monodon*) thì IHHNV là tác nhân nguy hiểm nhất ở tôm *Penaeus stylirostris* và *Penaeus vannamei*. IHHNV lần đầu tiên phát hiện vào năm 1981 ở Hawaii khi gây chết hàng loạt tôm *Penaeus stylirostris* (Lightner *et al.*, 1983). Sau đó vi-rút lan rộng đi khắp nơi như Tahiti, Florida, Texas, Islands, Israel, Panama, Costa Rica, Belize, Ecuador, Brazil, Honduras, France và Jamaica (Vega-Villasante and Puente, 1995) và gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành nuôi thủy sản ở các nước trên, tuy vi-rút này không gây chết cho tôm sú nhưng lại là một trong những tác nhân gây chậm lớn, dị hình, đặc biệt nguy hiểm cho tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) và gây chết hàng

<sup>1</sup> Bộ môn Sinh học và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Centex Shrimp, Trường Đại Học Mahidol, Thái Lan.

loại ở tôm *Penaeus stylirostris* (Flegel, 1997). Ấu trùng tôm *P. stylirostris* thường bị lây nhiễm IHHNV từ nguồn tôm bố mẹ, tuy nhiên vi-rút này không ảnh hưởng ngay trong vài tuần đầu, nó chỉ gây chết khi ấu trùng tôm đạt trọng lượng 0,05-1,0g (Lightner *et al.*, 1983). Khi tôm nhiễm bệnh, IHHNV được tìm thấy ở rất nhiều bộ phận như mang, biểu bì ruột trước, tuyến râu, dây thần kinh, ... (Lightner *et al.*, 1983). Những bộ phận này thường được sử dụng để chẩn đoán bệnh IHHNV bằng phương pháp mô bệnh học, đây là phương pháp sử dụng phổ biến nhất trong chẩn đoán bệnh thủy sản (Lightner *et al.*, 1983; Bell và Lightner, 1984) nhưng thường chỉ cho kết quả chính xác khi tôm nhiễm bệnh nặng. Phương pháp lai tại chỗ (*in situ* hybridization) cũng được phát triển để chẩn đoán bệnh IHHNV (Mari *et al.*, 1993, Jimenez *et al.*, 1999), phương pháp này nhạy và mang tính đặc hiệu cao nhưng lại cần thời gian dài để hoàn thành (2-3 ngày). Hiện nay, PCR được xem là một trong những phương pháp hiện đại, nhanh chóng và cho kết quả chính xác nhất trong chẩn đoán IHHNV (Pantoja & Lightner 2000, Tang & Lightner 2001, Dhar *et al.*, 2001). Tuy nhiên phương pháp này đòi hỏi phải có thiết bị hiện đại và người thực hiện phải được tập huấn kỹ thuật cẩn thận. Trong khi đó, kháng thể đơn dòng được ứng dụng thành công trong y học từ lâu, đặc biệt gần đây nó được sử dụng để chẩn đoán bệnh do WSSV, YHV trên tôm. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này nhằm mục đích phát triển kháng thể đơn dòng để chẩn đoán IHHNV thông qua một số phương pháp như hóa mô miễn dịch hay ELISA.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Chuẩn bị kháng nguyên

Cặp mồi GP3 F (5'- GGAATTCCATATGTGCGCCGATTCAACAA -3') và GP3 R (5'- CGCGGATCCGTTAGTATGCATAACATAACA -3') được sử dụng để khuếch đại đoạn gen GP3 của IHHNV bằng phương pháp PCR. Sản phẩm PCR sẽ được tách dòng vào vector pET15b (Novagen) tại các điểm *NdeI* và *BamHI* và biến nạp vào vi khuẩn *E. Coli* dòng BL21. Toàn bộ trình tự DNA của tổ hợp GP3-pET 15b được giải mã và so sánh với trình tự DNA của GP3 có ở ngân hàng gen (AF218266).

Vi khuẩn *E. Coli* chứa tổ hợp GP3-pET 15b plasmid được nuôi cấy trong môi trường Luria-Bertani (LB) và gây cảm ứng bởi tác nhân 1mM isopropyl\_d-thiogalactopyranoside (IPTG) trong 4 h để tạo ra protein tái tổ hợp. Toàn bộ hỗn hợp được ly tâm để loại bỏ môi trường nuôi và giữ lại phần tế bào. Tái tổ hợp protein được ly trích bằng phương pháp SDS-PAGE. Protein có kích cỡ 37KDa được quan sát khi gel acrylamid tiếp xúc với dung dịch KCl 300mM, cắt nhỏ đoạn gel chứa protein này và giữ trong dung dịch ly trích (0.1 % SDS trong dung dịch PBS) 24h, sau đó loại bỏ SDS bằng màng lọc (Centri Vap Console LABCONCO, USA). Đo nồng độ dung dịch protein trên theo phương pháp của Bradford (1976) và trữ ở -80°C.

### 2.2 Phương pháp miễn dịch

Thí nghiệm sử dụng 5 chuột cái thuộc dòng BAL/C. Kháng nguyên GP3 protein hòa với tá dược titer max theo tỉ lệ 1:1 và chích vào phần bụng dưới của chuột với liều 1ml/chuột/lần. Chuột được chích 4 lần cách mỗi hai tuần. Sau 1 tuần của lần chích thứ tư, tiến hành thu mẫu máu của chuột và kiểm tra kháng thể với IHHNV bằng phương pháp lai western và hóa mô miễn dịch. Chuột nào có nồng độ kháng thể cao sẽ được chọn để tạo kháng thể đơn dòng.

### 2.3 Sản xuất kháng thể đơn dòng

Chu trình tạo kháng thể đơn dòng theo phương pháp của Köhler và Milstein (Köhler, 1976), có điều chỉnh được miêu tả bởi Mosmann *et al.* (1979). Dòng tế bào P3X myeloma

được sử dụng trong quá trình sản xuất kháng thể đơn dòng. Sản phẩm kết hợp giữa P3X myeloma và tế bào lá lách ở chuột được nuôi trong đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng và ủ trong tủ ấm 37°C. Sau 7-10 ngày, dòng tế bào cho kết quả dương tính với IHHNV khi kiểm tra bằng phương pháp dot blot, lai western và hóa mô miễn dịch được tách dòng và nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 (Gibco) kết hợp với 10-20% huyết thanh bào thai bê (Invitrogen).

## 2.4 Phương pháp kiểm tra

### 2.4.1 SDS-Page và lai western

Vi khuẩn *E. Coli* BL21 chứa vector pET 15b và *E. Coli* BL21 chứa vector GP3-pET 15b được điện di bởi 12% SDS-Page theo phương pháp của Laemli (1970). Mẫu được điện di trong 2 giờ với nguồn điện 100V, sau đó gel được nhuộm với coomassie brilliant blue. Với phương pháp lai western, mẫu sau khi điện di bởi SDS-Page được thấm tách sang màng nitrocellulose bằng máy Transblot (Biorad), màng nitrocellulose này được ủ với kháng thể của IHHNV làm loãng với 5% Blotto (5% sữa không béo, 0,1% triton trong PBS) theo tỉ lệ 1:100, sau đó tiếp tục ủ với kháng thể GAM-HRP (BioRad) với độ loãng 1:1000 5% blotto trong 2 h. Cuối cùng màng cellulose được ngâm trong dung dịch 0,006% hydrogen peroxide, 0,03% diaminobenzidine (DAB), 0,05% cobalt chloride và PBS. Phản ứng dương tính sẽ thể hiện 1 đoạn màu nâu đen.

### 2.4.2 Hóa mô miễn dịch

Đầu của tôm nhiễm IHHNV được ngâm trong dung dịch Davidson với thời gian 24 giờ trước khi cố định trong paraffin. Mẫu được cắt thành từng lát mỏng khoảng 5-7µm và chuẩn bị cho phản ứng miễn dịch với kháng thể IHHNV (độ loãng 1:10) và GAM-HRP (tỉ lệ pha loãng với 10% huyết thanh 1: 1000) trong 5 giờ ở 37°C mỗi công đoạn. Sau đó tiếp tục ủ với 0,03% DAB, 0,006% hydrogen peroxide trong PBS khoảng 5 phút. Tiếp tục nhuộm màu với eosinY, loại bỏ nước với ethanol, rửa trong xylene và cuối cùng dán mẫu bằng permount (Sithigorn gul *et al.*, 2002). Phản ứng dương tính sẽ biểu hiện với những vết có màu nâu vàng khi quan sát dưới kính hiển vi có vật kính 40X hay 100X.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

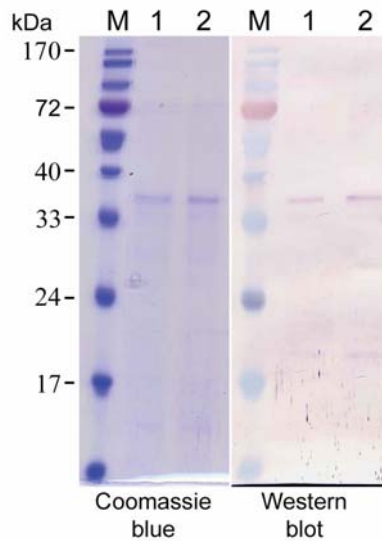
Vector chứa ADN GP3 được ly trích và giải trình tự ADN. Kết quả cho thấy tổ hợp GP3-pET 15b chứa 1137 bp và giải mã 379 amino acid. So sánh trình tự tổ hợp GP3-pET 15b và gen GP3 của IHHNV ở ngân hàng gen bằng chương trình CLUSTAL W 1.82 thể hiện sự giống nhau đến 96% (Hình 1).

Trong thí nghiệm này tái tổ hợp protein GP3 được biểu hiện ở *E. Coli* BL21 sau 4 giờ chịu tác động bởi tác nhân cảm ứng IPTG 1mM trong điều kiện 37°C, 250 vòng/phút. Kết quả lai western đã cho thấy protein này tồn tại ở vị trí 37KDa như dự đoán, tuy nhiên không có sự khác nhau giữa tế bào cảm ứng và tế bào không cảm ứng theo phương pháp SDS-Page. Điều này cũng có nghĩa protein này có thể biểu hiện nhưng chỉ với 1 lượng giới hạn. Một nghiên cứu khác cũng báo cáo rằng khi biểu hiện protein VP19 của vi-rút đốm trắng ở tôm sú cũng gặp khó khăn và không biểu hiện được protein VP19 (Parin, 2005). Mặc dù vậy kết quả này không gây trở ngại cho quá trình ly trích protein cũng như không ảnh hưởng đến kết quả gây miễn dịch trên chuột.

GP3 protein được ly trích bằng phương pháp SDS-Page, sau khi kiểm tra protein bằng phương pháp lai western và điện di gel acrylamide, kết quả cho thấy chỉ tồn tại 1 dải băng tại vị trí 37KDa (Hình 2). Điều này cho thấy protein đạt độ tinh khiết cao. Nồng độ protein cũng được xác định là 1.07mg/ml và trữ ở -80°C.

GP3database	-----MCADSTRASPRKRSRRDAHNE	22
pET15b-GP3merge	VDVIPSRIFCLTLRRRYTMGS SHHHHHSSGLVPRGSHMCADSTRSSPRKRSRRDAHNE	60
	*****;*****	
GP3database	EEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIHI TFQTTRRYFEFDAANDGNFDGKNLYCLPLHWMNLY	82
pET15b-GP3merge	EEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIHI TFQTTRRYFEFDAANDGNFDGKNLYCLPLHWMNLY	120
	*****	
GP3database	LYGLKSSDSSATETQRYKMKVKSMMKTYGKVKHKAGVVMHSMVPLMKDLKVS GGTSFETLT	142
pET15b-GP3merge	LYGLKSSDSSATETQRYKMKVKSMMKTYGKVKHKAGVVMHSMVPLMKDLKVS GGTSFETLT	180
	*****	
GP3database	FTDTPYLEIFKDTTGLHNQLS TKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQ	202
pET15b-GP3merge	FTDTPYLEIFKDTTGLHNQLATKEADVTLAKWIQDPQLVTVQSTAANYEDPIQQFGFMEQ	240
	*****;*****;*****	
GP3database	MRTGDRKAYTIHGDTRNHWYGGEIPTTGPTFI PKWGGQMKWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQ	262
pET15b-GP3merge	MRTGDRKAYTIHGDTRNHWYGGEIPTTGPTFI PKWGGQMKWDKPSIGNLVYPADHHTNDWQ	300
	*****;*****;*****	
GP3database	QIFMRMSPKGPNGDELKLGCRVQADFFLHLEVRLPQQGCVASLGMQLYLVHPCTGQLNK	322
pET15b-GP3merge	QIFMRMSPKGPNGDELKLGCRVQADFFLNLEVRLPQQGCVS LGMQLYLVHPCTGQLNR	360
	*****;*****;*****;*****;	
GP3database	CYIMHTN-----	329
pET15b-GP3merge	CYVMHTN-----	379
	**:*	

Hình 1: So sánh trình tự của tổ hợp GP3-pET 15b và GP3 gen của IHHNV ở ngân hàng gen (AF218266)



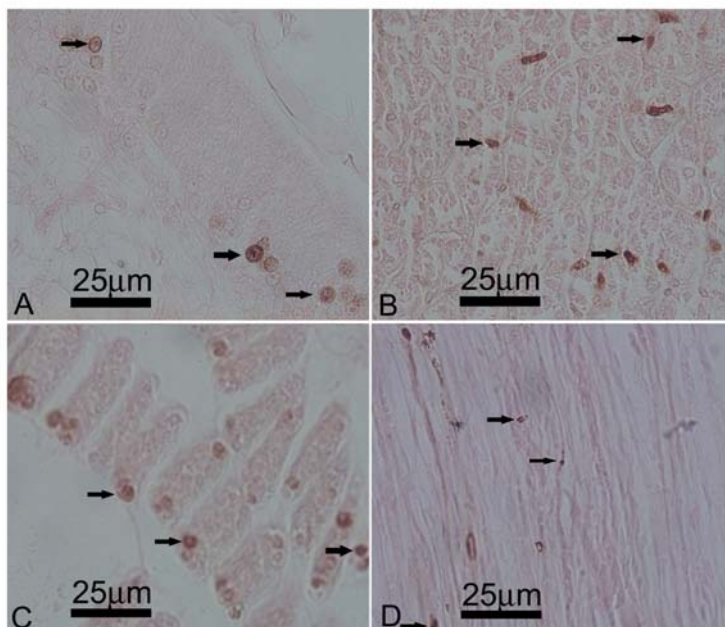
Hình 2: Protein GP3 tại vị trí 37KDa. M = dấu protein, 1&2= Protein GP3

Sau khi tạo phản ứng miễn dịch ở chuột bằng kháng nguyên GP3 protein, kháng thể đa dòng tồn tại trong máu của tất cả chuột đều cho phản ứng dương tính mạnh và đặc hiệu với IHHNV. Trong số đó, chuột số 4 cho kết quả tốt nhất và đã được chọn để sản xuất kháng thể đơn dòng.

Thí nghiệm được tiến hành với hai mươi đĩa nuôi tế bào 96 giếng. Sau 10 ngày thí nghiệm, tiến hành kiểm tra tế bào bằng phương pháp dot blot, 100 tế bào cho thấy có phản ứng dương tính với IHHNV, sau khi tiếp tục kiểm tra bởi phương pháp lai western và hóa mô miễn dịch, tế bào số 82 được chọn để tiếp tục phát triển kháng thể với số lượng lớn. Sau 2 tuần phát triển, kháng thể đơn dòng được kiểm tra 1 lần nữa. Kết quả dot blot cho thấy kháng thể đơn dòng (ký hiệu MAb-1) có thể phát hiện GP3 protein trong khoảng

nhạy cảm  $0.1-0.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Bằng phương pháp lai western, có thể kết luận rằng MAb-1 phát hiện được GP3-pET 15b trong *E. Coli* ở nồng độ pha loãng 1 %. Cuối cùng, MAb-1 với nồng độ pha loãng 10 % phản ứng dương tính với mẫu tôm nhiễm bệnh IHHNV theo phương pháp hóa mô miễn dịch. Kết quả cho thấy kháng thể đơn dòng bao xung quanh các thể vùi của IHHNV ở mang, dây thần kinh, tế bào cơ và tế bào biểu bì ở tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) nhiễm IHHNV (Hình 3).

Kháng thể này cũng được kiểm tra phản ứng với 1 số loại vi-rút khác như HPV, MBV, WSSV và YHV nhưng không thể hiện bất cứ phản ứng nào. Điều này chứng tỏ kháng thể trên chỉ phản ứng đặc hiệu với duy nhất IHHNV.



**Hình 3:** Kháng thể đơn dòng bao quanh các thể vùi của IHHNV ở tế bào biểu bì (A), tế bào cơ (B), mang (C), và dây thần kinh (D) ở tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) nhiễm IHHNV

#### 4 KẾT LUẬN

Tất cả những kết quả thể hiện ở trên cho thấy, kháng thể đơn dòng đặc hiệu của IHHNV đã được sản xuất thành công. Kết quả này sẽ là một cơ sở vững chắc để phát triển bộ kit chẩn đoán nhanh bệnh IHHNV, có thể sử dụng rộng rãi cho các hộ nuôi tôm với giá thành rẻ và cho kết quả chính xác cao.

#### CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành cảm ơn tiến sĩ Seangchan Senapin - Centex Shrimp, Trường Đại Học Mahidol; và Phó giáo sư Paisarn Sithigorngul - Trường Đại Học Srinakarinwirot, Thái Lan đã tận tình đóng góp ý kiến cũng như hướng dẫn kỹ thuật trong suốt quá trình thực hiện thí nghiệm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bell TA, DV. Lightner, 1984. IHNV virus: Infectivity and Pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 38: 185-194.
- Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Dhar AK, MM. Roux and KR. Klimpel, 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J Clin Microbiol* 39:2835-2845.
- Flegel, T. W., 1997. Special topic review: Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 433-442.
- Jimenez, R., R. Barniol, L. De Barniol, and M. Machuca, 1999. Infection of IHNV virus in two species of cultured penaeid shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *Liopenaeus stylirostris* (Stimpson) in Ecuador during El Niño 1997-98. *Aquaculture Research* 30: 695-705.
- Köhler G and C. Milstein, 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Laemli UK., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lightner, A. V., E. M. Redman, and T. A. Bell, 1983. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis, a newly recognized virus of Penaeid shrimp. *J. Invert. Pathol* 42, 62-70.
- Mari J, JR, Bonami and D. Lightner, 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J Gen Virol* 74:2637-2643.
- Mosmann T.R. and B. M. Longenecker, 1979. Nomenclature for chicken MHC (B) antigens defined by monoclonal antibodies. *Immunogenetics* 13:25-28
- Pantoja CR, DV. Lightner, 2000. A non-destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 39:177-182.
- Parin C, P. Phiromsak, T. Nitaya, R. Sombat, L. Siwaporn, S. Weerawan and S. Paisarn, 2006. Development of a polyclonal antibody specific to VP19 envelope protein of white spot syndrome virus (WSSV) using a recombinant protein preparation. *Journal of Virological Methods* 133:180-184
- Sithigorngul P, S. Rukpratanporn, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and P. Menasveta, 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 49: 71-76.
- Tang KF, DV. Lightner, 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis Aquat Org* 44:79-85.
- Vega-Villasante, F., and M. E. Puente, 1995. A review of viral diseases of cultured shrimp. *Preventive Veterinary Medicine* 17: 271-282.