

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIETNAM ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN 1811-4989

TẠP CHÍ

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Tập (Volume) 9 Số (Number) 3 2011

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
TẠP CHÍ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TẬP 9, SỐ 3 - 2011

=====

MỤC LỤC

CONTENTS

Dương Tấn Nhựt, Trần Trọng Tuấn, Trần Thanh Vân K. Một số nhân tố ảnh hưởng đến quá trình ra hoa <i>in vitro</i> The influences of some factors on <i>in vitro</i> flowering	265-290
Bạch Thị Như Quỳnh, Lê Phương Hằng, Nguyễn Thị Phương, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Quang Anh, Đồng Văn Quyền, Lê Văn Phũng, Đinh Duy Kháng. Biểu hiện gen mã hóa protein GP120 của HIV-1 phân type CRF01_AE và ứng dụng để phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh bệnh nhân Expression of the extracellular region of HIV-1 envelop GP120 glycoprotein from HIV-1 subtype CRF01_AE and its application for detection of anti-HIV antibody in patient's sera	291-296
Đoàn Nguyên Vũ, Phạm Trần Hương Trinh, Nguyễn Thị Nhật Uyên, Tô Minh Quân, Phan Kim Ngọc, Trần Lê Bảo Hà, Nguyễn Thị Thu, Đặng Vũ Ngọc Mai, Hoàng Đạo Bảo Trâm, Hoàng Tử Hùng, Trịnh Thị Trúc Ly. Nuôi cấy tế bào gốc từ tủy răng người Culture of human dental pulp stem cells	297-301
Trinh Tat Cuong, Phan Tuan Nghia, Nguyen Quang Huy, Vu Tien Chinh, Luong Hoang Viet. The role of toll-like receptor (TLR) 2 in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv-induced generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) Vai trò của thụ thể TLR2 đối với quá trình tạo ra gốc tự do oxy hóa bởi vi khuẩn lao (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv)	303-308
Nguyễn Thị Giang An, Hà Thị Thu, Đinh Duy Kháng, Đinh Thương Vân. Tinh chế protein polyhedrin của <i>Monodon baculovirus</i> (MBV) gây bệnh trên tôm sú (<i>Penaeus monodon</i>) Purification of polyhedrin protein of <i>Monodon baculovirus</i> which causes disease in prawn (<i>Penaeus monodon</i>)	309-315
Hoàng Xuân Chiến, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Trực, Trần Xuân Tình, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt. Nghiên cứu một số yếu tố tạo củ sâm Ngọc Linh (<i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv.) <i>in vitro</i> và xác định hàm lượng saponin trong cây tạo từ củ trồng thử nghiệm ở núi Ngọc Linh Effect of some factors to <i>in vitro</i> microrhizome formation (<i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv.) and determination of plantlet saponin content in Ngọc Linh mountain	317-331
Nguyễn Thị Hải Yến, Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu, Lê Trần Bình. Tạo dòng cà chua PT18 kháng bệnh xoắn vàng lá do virus bằng kỹ thuật RNAi Development of tomato PT18 plants resistant to tomato yellow leaf curl virus by RNAi technology	333-340
Huỳnh Thị Thu Huệ, Lê Thị Nguyên Bình, Nguyễn Thị Tình, Bùi Thị Tuyết, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải. Phân lập Sus1 promoter từ cây ngô và thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen mã hóa <i>cryIA(c)</i> dưới sự điều khiển của Sus1 promoter	341-347

- Isolation of Sus1 promoter from maize and construction of a plant transformation vector containing Sus1 promoter and *cryIA(c)* gene
- Vũ Thị Thu Thủy, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Tâm, Nguyễn Vũ Thanh Thanh.** 349-356
 Chọn lọc dòng biến dị chịu mất nước và chiếu xạ ở cây lạc (*Arachis hypogaea* L.)
- Selection of somatic variations which resistant to dehydration and radiation of peanut (*Arachis hypogaea* L.)
- Nguyễn Thanh Ngọc, Lê Phương Hoàng Anh, Lê Thị Thu Hồng, Vũ Văn Lợi, Phạm Thị Bích Hợp, Trương Nam Hải.** 357-363
 Biểu hiện gen laccase của *Cerrena unicolor* đã được cải biến mã di truyền trong nấm men *Pichia pastoris*
- Expression of a codon optimized gene encoding *Cerrena unicolor* laccase in *Pichia pastoris*
- Nguyễn Quang Huy, Lê Minh Nhật, Vương Cát Khánh, Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thước.** 365-372
 Bước đầu khảo sát và lên men thu nhận hG-CSF dạng thể vùi không điển hình trong tế bào *E. coli* ở quy mô bình lên men 1 lít
- Initial investigation and fermentative extraction of non-classical inclusion body of G-CSF in *E. coli* in 1 l-fermentor
- Le Thi Nguyen Binh, Susanne Engelmann, Nong Van Hai, Michael Hecker.** 373-390
 Gene expression analysis of *Staphylococcus aureus* under heat stress
- Phân tích sự biểu hiện gen của *Staphylococcus aureus* sau xử lý sốc nhiệt
- Đỗ Thị Tuyên, Lê Đình Quyền, Quyền Đình Thi, Nguyễn Ngọc Dũng.** 391-396
 Tinh sạch protein có hoạt tính kháng nấm từ chủng *Bacillus subtilis* XL62
- Purification of an antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain XL62

TINH CHẾ PROTEIN POLYHEDRIN CỦA *MONODON BACULOVIRUS* (MBV) GÂY BỆNH TRÊN TÔM SÚ (*PENAEUS MONODON*)

Nguyễn Thị Giang An¹, Hà Thị Thu², Đinh Duy Kháng², Đinh Thương Vân²

¹Trường Đại học Vinh

²Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Monodon baculovirus (MBV) là thành viên của nhóm virus nucleopolyhedrosis (NPV). Khi MBV xâm nhiễm vào tôm, chúng hình thành thể ẩn (occlusion body) trong gan, tụy của cơ thể vật chủ. Protein chính của thể ẩn (OB) là polyhedrin. Đây là protein nền, bao bọc hạt virus, giúp virus tồn tại ngoài môi trường. Khi tôm nhiễm MBV kết hợp bội nhiễm với các virus khác hoặc gặp điều kiện môi trường không thuận lợi, MBV sẽ phát triển mạnh và lây lan rất nhanh làm tôm phát triển chậm hoặc sẽ chết hàng loạt. Tinh chế polyhedrin được tiến hành trên tôm post larva sau khi gây nhiễm MBV ở mức độ cao. Kiểm tra bằng phương pháp soi tươi, nhuộm Malachite 0,5% và hóa mô: nhuộm với Hematoxylin và Eosin để đánh giá mức độ xuất hiện của thể ẩn trong gan tụy, sau đó kiểm tra lô tôm chắc chắn nhiễm MBV mà không nhiễm các virus khác như WSSV, IHHNV, YHV... bằng phương pháp PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Chọn những lô tôm post larva (PL 10) nhiễm bệnh nặng, li tâm siêu tốc trong Urografin gradient nồng độ từ 20 - 70%, các phân đoạn của li tâm siêu tốc được chọn lựa và được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử (TEM). Dưới kính hiển vi điện tử, virion của virus MBV có thể hình que, chiều dài khoảng 298 nm, đường kính khoảng 69,8 nm. Polyhedrin là những thể hình cầu có kích thước từ 20 - 23 nm. Điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide cho thấy khối lượng phân tử của polyhedrin là 58 kDa. Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Bradford là 2,25 mg/ml. Chúng tôi sử dụng protein thu được để gây miễn dịch cho chuột với mục đích sản xuất kháng thể đơn dòng phục vụ cho việc tạo kit chẩn đoán nhanh MBV.

Từ khóa: *Monodon baculovirus* (MBV), Polyhedrin, tinh chế protein, tôm sú, virus

MỞ ĐẦU

Monodon baculovirus (MBV) là virus thuộc họ *Baculoviridae*, vật chất di truyền là DNA xoắn kép với khối lượng phân tử 80 - 100x10⁶ Da (Lightner, Redman, 1981). Tôm bị nhiễm MBV thường giảm đáng kể tốc độ sinh trưởng, gan tụy chuyển sang màu vàng nhạt đến màu nâu, dẫn đến làm giảm năng suất nuôi trồng tôm (Bùi Quang Tê, 2004). Đây là bệnh phổ biến ở tôm, tuy độc lực của virus không cao, nhưng khi nhiễm vào *P. monodon* chúng làm tăng mức độ bội nhiễm các loại virus khác như WSSV, IHHNV, TSV, YHV... sẽ gây chết hàng loạt (tỷ lệ chết có thể lên tới trên 90%) (Flegel *et al.*, 1999). MBV được Lightner và Redman phát hiện lần đầu tiên ở vào năm 1981, sau đó ở Thái Lan (Fegan *et al.*, 1991), một số nơi khác ở châu Á (Lightner, 1996), Australia (Vickers, 1997), Ấn Độ (Manivannan *et al.*, 2004), Việt Nam (Bùi Quang Tê, 1994). Virus này nhiễm vào tất cả các giai đoạn từ ấu trùng đến trưởng thành. Khi xâm nhập vào cơ thể vật chủ, chúng tấn công vào tổ chức gan tụy và hình thành thể ẩn (Occlusion bodies). Con đường vector truyền bệnh của virus thường qua phân, thức ăn,

nguồn nước và tôm mẹ nhiễm bệnh (Payter 1992). Polyhedrin là loại protein tinh thể đặc trưng của virus thuộc họ *Baculoviridae*. Khối lượng phân tử của polyhedrin khoảng 58 kDa (Bonami *et al.*, 1997) và có vai trò như chất nền bảo vệ vỏ của virion, giữ cho hạt virus ổn định trong điều kiện biến đổi của môi trường, tránh được sự phân giải của các enzym từ gan tụy.

Hiện nay, việc chẩn đoán MBV đã được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau, nhưng phương pháp đơn giản và dùng khá phổ biến là phát hiện thể ẩn (OB) trong mô gan tụy của tôm bằng cách ép dịch tôm post larvae rồi nhuộm xanh malachite 0,05% và quan sát dưới kính hiển vi điện tử (Fegan *et al.*, 1991). Để đánh giá mức độ cảm nhiễm thường được kiểm tra bằng cách cắt lát mô và nhuộm với hematoxylin và eosin (H&E) (Alday de Graindorge, Flegel, 1999). Các kỹ thuật sinh học phân tử cũng được áp dụng trong việc chẩn đoán như phương pháp PCR (polymerase chain reaction) (Belcher, Young, 1998, Hà thị Thu, 2005). Tuy nhiên, việc xét nghiệm này phụ thuộc nhiều vào thiết bị, hoá chất và kinh nghiệm của kỹ thuật viên, đồng

thời chi phí cao. Boonsanongchokying (2006) đã bước đầu nghiên cứu và sản xuất kháng thể đơn dòng kháng polyhedrin của MBV ở Thái Lan. Đinh Thương Vân (2005), Mari, Lightner (1993) cũng đã tiến hành giải trình tự gen đặc hiệu cho MBV và Chaivisuthangkura 2008 đã biểu hiện thành công protein polyhedrin tái tổ hợp. Để nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng kháng polyhedrin của MBV nhằm phục vụ cho công việc chẩn đoán chính xác và nhanh chóng MBV, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tinh chế protein polyhedrin của MBV từ tôm bị nhiễm virus, sử dụng protein này như một kháng nguyên phục vụ cho việc tạo kháng thể đơn dòng (Mab) kháng MBV trên tôm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Mẫu tôm Post larvae được Trung tâm Giống hải sản Quốc gia Vũng Tàu cung cấp

Phương pháp

Sàng lọc MBV bằng kỹ thuật nhuộm mẫu tươi

Mỗi ao nuôi lấy khoảng 30 - 50 con tôm ở giai đoạn sau ấu trùng post larvae (PL) 10 - 15 ngày, đặt lên lam kính, nhỏ một giọt nước biển để mẫu không bị khô, dùng 2 kim nhọn, kim bên trái giữ phần mắt và anten, kim bên phải đặt lên đốt bụng thứ nhất, từ từ tách phần ngực ra khỏi phần bụng, gan tụy lộ ra ngoài, nhỏ 1 giọt Malachite green 0,5% lên phần gan tụy, dùng lamel đặt lên và quan sát dưới kính hiển vi.

Xác định mức độ nhiễm MBV ở tôm và quan sát thể ẩn trong gan tụy tôm bằng kỹ thuật nhuộm mẫu cắt mô tế bào

Tôm post larvae đang ở tình trạng hấp hối được xử lý trong dung dịch Davision và cồn 50% trong 24 đến 72 h. Sau đó tiến hành xử lý mẫu trong cồn 70%, cồn 90%, cồn tuyệt đối, chloroform và Parafin. Tiếp đến đúc mẫu trong khuôn inox, cắt mẫu bằng máy cắt lạnh Microtome với lát cắt 5 - 6 μm , cố định mẫu trên lam kính, nhuộm mẫu (Sheehan, Hrapchak, 1980) bằng thuốc nhuộm Hematoxylin và Eosin, quan sát mẫu và xác định mức độ nhiễm bệnh và tổn thương của gan tụy dưới kính hiển vi quang học.

Xác định MBV và virus khác bằng PCR

Tách chiết DNA từ mô gan tụy bằng kit của Bioneer

Nghiên tôm trong ống Eppendorf 1,5 ml với 200

μl Binding buffer (GC), bổ sung 20 μl Protease K, ủ 60°C trong 10 phút, bổ sung 100 μl Isopropanol, chuyển dịch lên cột Binding 2 ml, ly tâm loại dịch. Rửa cột bằng Washing buffer 1, Washing buffer 2, đẩy mẫu bằng H₂O vô trùng. Ủ 5 - 10 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm lần cuối thu dịch nội.

Đoạn DNA đặc hiệu của MBV được khuếch đại bằng PCR. Sử dụng 2 μl DNA từ dịch tách chiết (khoảng 50 - 100 ng) để làm khuôn cho phản ứng PCR.

Các cặp mồi được sử dụng để chẩn đoán virus khác của mẫu tôm nhiễm MBV (Bảng 1).

Tinh chế polyhedrin

Sử dụng mẫu tôm nhiễm MBV và đã được xác định không bị nhiễm các virus khác, lấy khoảng 5000 tôm post larva nhiễm MBV làm choáng bằng nước đá, sau đó chuyển vào trong cốc chứa 50 ml nước cất, chuyển hoàn toàn hỗn hợp ấu trùng tôm vào trong syringe 50 ml không có kim tiêm, dùng pitong đẩy và nghiền hỗn hợp tôm vào một cái cốc để trên đá. Việc nghiền nát bằng cách này được lặp đi lặp lại 10 lần nhanh liên tiếp. Dịch nghiền được lọc 2 lần qua màng 100 μm Nitex-mesh, li tâm ở 4000 g trong 20 phút ở 4°C để thu cặn, cặn được hòa tan trong TN buffer (0,01 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 7,4). Đưa cặn đã hòa trong đệm TN lên thang Urografin phân vùng liên tục (từ 20 - 60%). Thang phân vùng Urografin được li tâm siêu tốc ở 120000 g trong 16 h ở 4°C. Dùng kim hút các băng, băng chứa polyhedrin hòa vào đệm TN. Li tâm làm lắng cặn 2 lần ở 120000 g trong 2 h ở 4°C, hòa cặn với một lượng nhỏ đệm TN, bảo quản ở -20°C.

Hàm lượng Protein trong mẫu được định lượng bằng phương pháp Bradford 1976 (BioRad protein assay kit, BioRad Corp., Hercules, CA, USA).

Kiểm tra các phân đoạn có chứa polyhedrin và virus trên kính hiển vi điện tử

Nhỏ mỗi giọt mẫu của các băng trên mỗi tấm lưới đồng với Formvar carbon (Electron Microscopy Sciences, PA, USA). Sau khoảng 10 phút dịch lọc lắng xuống, những chất dịch thừa được lấy bớt bởi giấy thấm đặt phần mép của vi, sau khi vi được sấy khô, nhỏ một dung dịch thuốc nhuộm (2% phosphotungstic acid trong nước cất, pH 7,4) lên vi để khoảng 1 phút sau đó lấy dịch thừa bằng giấy thấm ở phần mép vi làm khô nhanh theo (Haschemeyer, Meyer 1970). Sau đó kiểm tra sự có mặt của protein polyhedrin và những phần của virus

trên kính hiển vi điện tử TEM.

Xác định khối lượng phân tử của MBV bằng

điện di SDS-PAGE trên gel polyarylamid theo phương pháp Laemmli 1970.

Bảng 1. Các thông số và trình tự các cặp mồi.

Virus	Tên primer	Trình tự	Kích thước sản phẩm (bp)	Nhiệt độ bắt cặp (°C)
Monodon Baculo Virus	MBVF	5'CGCGTCTGCGATACTTCATC 3'	573	53
	MBVR	5'AAGGGATGTAAAGAAAGCTACGA3'		
YHV Yellow Head Virus	YHVF	5'CGTCCC GGCAATTGTGAT3'	273	60
	YHVR	5'CCAGTGACGTTTCGATGCAATA3'		
HPV Hepatopancreatic parvovirus	HPVF	5'ACACTCAGCCTCTACCTTGT3'	441	60
	HPVR	5'GCATTACAAGAGCCAAGCAG3'		
Whitespot Syndrom Virus	WSSVF1	5'ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG3'	1441	53
	WSSVR1	5'TTATGCGGGTGTAAATGTTCTTACGA3'	941	
	WSSVF2	5'GTAAGTCCCTTCCATCCTCCA3'		
	WSSVR2	5'TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT 3'		
Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis	IHHNVR	5' ATC GGTGCA CTC GGA 3'	365	44
	IHHNVF	5'TCGTACTGGCTGTTC ATC3 '		
Taura Syndrom Virus	TSVR	5'TCAATGAGAGCTTGGTCC3'	550	49
	TSVF	5'AAGTAGACAGCCGCGCTT3'		

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xét nghiệm mẫu tôm bị nhiễm MBV

Mẫu tôm được xét nghiệm nhanh bằng phương pháp soi tươi nhuộm Malachite green 0,5% để lựa chọn những mẫu nghi ngờ nhiễm MBV. Trên kính hiển vi quang học với vật kính 40X (Hình 1) cho thấy những tế bào bình thường bắt màu đậm với malachite green 0,5%, các tế bào nhiễm MBV có nhân trương to, bên trong nhân có từ 1 đến nhiều thể ẩn hình cầu không bắt màu hoặc bắt màu ít, sáng rõ và lấp lánh.

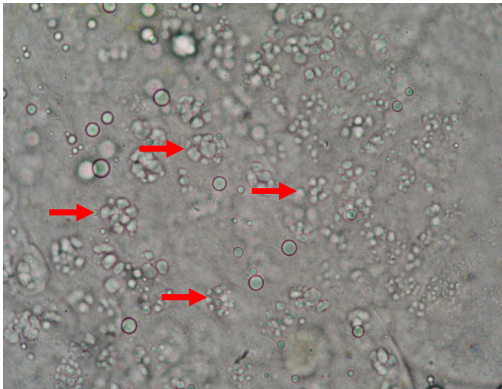
Các mẫu tôm sau khi soi tươi nghi ngờ nhiễm MBV được tiến hành xác định mức độ nhiễm MBV bằng kỹ thuật hoá mô nhuộm với thuốc nhuộm Haematoxylin và Eosin. Dưới vật kính bội giác có độ phóng đại 100 – 400 lần (Hình 2) cho thấy, nhân tế bào bắt màu xanh tím, tế bào chất bắt màu hồng, các thể ẩn bắt màu đỏ đồng đều. Trong nhân tế bào có một đến nhiều thể ẩn được hình thành, các thể ẩn chiếm trọn phần lớn cấu trúc của nhân tế bào làm cho khối tế bào chất co cụm, các hoạt động sinh lý của tế bào bị ngưng trệ dẫn đến tế bào bị phá huỷ hoàn toàn. Quan sát trên các tiêu bản chúng tôi nhận thấy thể ẩn tồn tại 2 dạng, một dạng có nhiều thể ẩn trong một tế bào và một dạng chỉ có một thể

ẩn lớn chiếm trọn kích thước của tế bào. Một số hình ảnh còn cho thấy khi virus bung ra để lại trên tế bào gan tụy một khối rỗng, lúc này không dưới kính hiển vi không thấy thể ẩn trong cấu trúc tế bào. Chính vì thế nên dễ có kết quả âm tính với MBV. Theo nghiên cứu của Ramasamy (2000) khi MBV xâm nhiễm vào cơ thể của tôm, chúng khu trú và hình thành thể ẩn trong nhân. Quá trình xâm nhiễm vào tế bào được chia làm 3 giai đoạn. Giai đoạn đầu thể ẩn chưa hình thành, chất nhiễm sắc tích tụ, virus đi vào nhân tế bào. Giai đoạn 2 nhân trương phồng kích thước tế bào tăng lên gấp 3 lần, trao đổi chất tế bào bị rối loạn và giai đoạn 3 thể ẩn bung ra, giải phóng theo phân ra ngoài môi trường làm tăng khả năng lan truyền bệnh trong đàn. Mức độ cảm nhiễm virus được đánh giá 3 mức (Bùi Quang Tê 1994). Mức độ thấp (+) là tổng số nhân tế bào gan tụy có thể ẩn <30%, mức độ trung bình (++) tổng số nhân tế bào gan tụy có thể ẩn từ 30-60%, mức độ cao (+++) tổng số thể ẩn trong nhân tế bào >60% (tỷ lệ cảm nhiễm bệnh còn được đánh giá trên tổng số tôm được kiểm tra). Trên hình 1 và 2 có thể đánh giá mức độ nhiễm MBV ở mức (++) . Để tinh chế được polyhedrin với hàm lượng lớn, chúng tôi chỉ chọn những mẫu tôm có mức độ cảm nhiễm (++) trở lên.

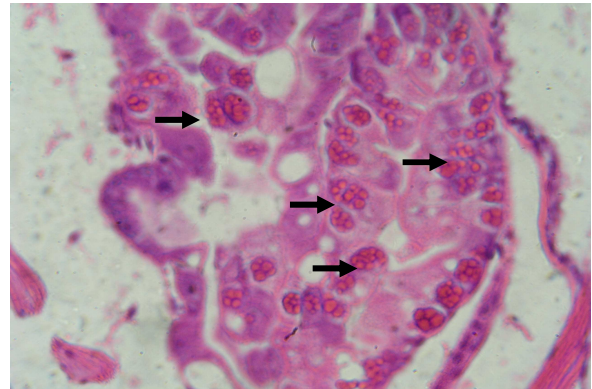
Để khẳng định chắc chắn mẫu tôm thu được

nhiễm MBV, chúng tôi tiến hành xét nghiệm bằng kỹ thuật PCR. Kết quả trên bảng điện di cho thấy những mẫu tôm bị nhiễm MBV và chứng dương đều có kích thước 573 bp, đúng bằng kích thước của MBV trên thang DNA chuẩn. Song song với việc

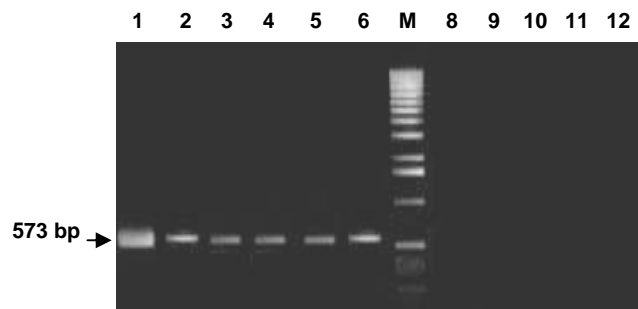
xác định tôm nhiễm MBV chúng tôi tiến hành loại trừ mẫu tôm nhiễm các virus khác như WSSV, IHNV, TSV, YHV, HPV cũng bằng kỹ thuật PCR. Kết quả cho thấy các mẫu tôm này đều âm tính với các virus trên (Hình 3).



Hình 1. Mẫu tôm nhiễm MBV xuất hiện thể ẩn được nhuộm malachite 0,5%, mũi tên chỉ thể ẩn được hình thành trong nhân tế bào gan tụy.



Hình 2. Mẫu tôm nhiễm MBV xuất hiện thể ẩn bằng kỹ thuật nhuộm mẫu cắt mô tế bào và nhuộm H&E



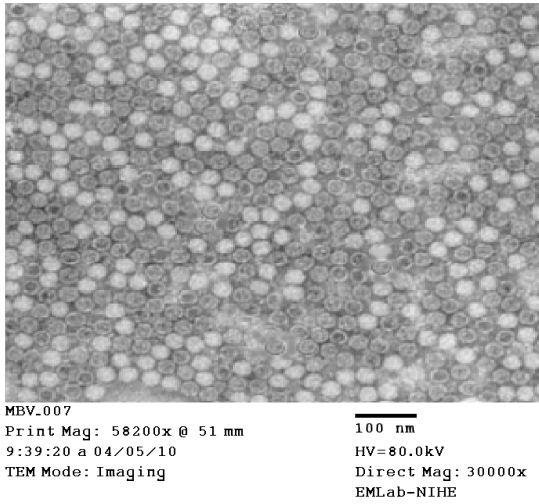
Hình 3. Điện di sản phẩm PCR kiểm tra với cặp mồi MBV, WSSV, YHV, IHNV, TSV. ĐC1 mẫu chứng dương với MBV; ĐC: 2 – 6. các mẫu dương tính với bệnh MBV; ĐC: 8 - 12: Mẫu âm tính với bệnh MBV, WSSV, YHV, IHNV và TSV; ĐC 7: thang DNA chuẩn 1 kb.

Tinh chế protein polyhedrin và virion của MBV

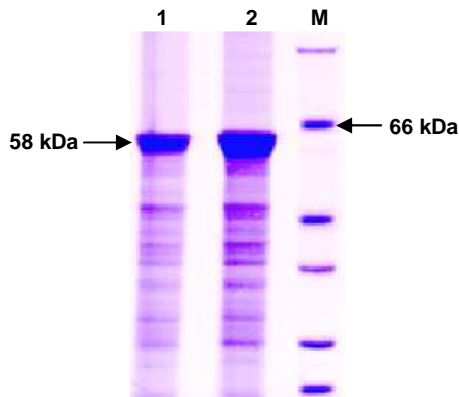
Sau khi kiểm tra và xác định mức độ tôm nhiễm MBV, tiến hành tinh chế protein polyhedrin và virion của MBV bằng ly tâm siêu tốc trong môi trường Urografin gradien từ 20 đến 70%. Sau 16 h li tâm với tốc độ 100000 g, chúng tôi thu được các các 7 băng (fraction) khác nhau.

Kiểm tra các phân đoạn này trên kính hiển vi điện tử

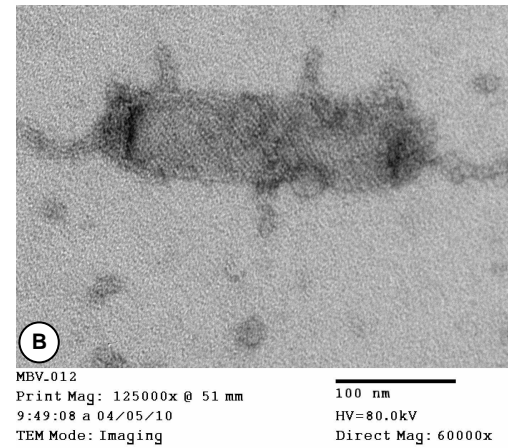
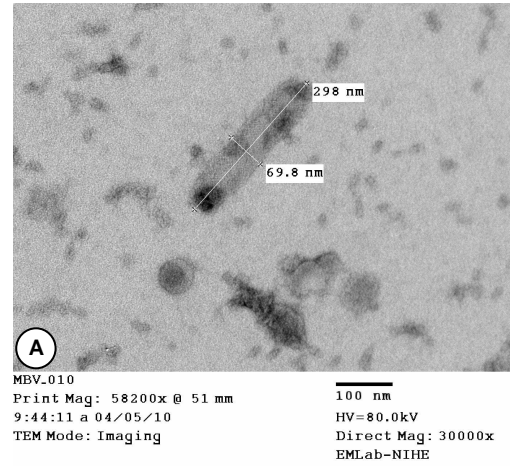
(Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương) cho thấy, những tiểu thể có đường kính 20 - 23 nm, rỗng, tròn giống như mô tả về tiểu thể polyhedrin của MBV do Bonami *et al.*, 1997 và nằm ở phân đoạn urografin 50% (Hình 4). Kiểm tra ở phân đoạn urografin 30% chúng tôi thấy cấu trúc virion của virus có chiều dài 298nm và đường kính 69,8 nm, các virus này ở dạng hình que bẹt mặt có các roi dài (Hình 5) kết quả này phù hợp với công bố của Lightner, 1996.



Hình 4. Protein polyhedrin thu được từ phân đoạn Urografin 50%.



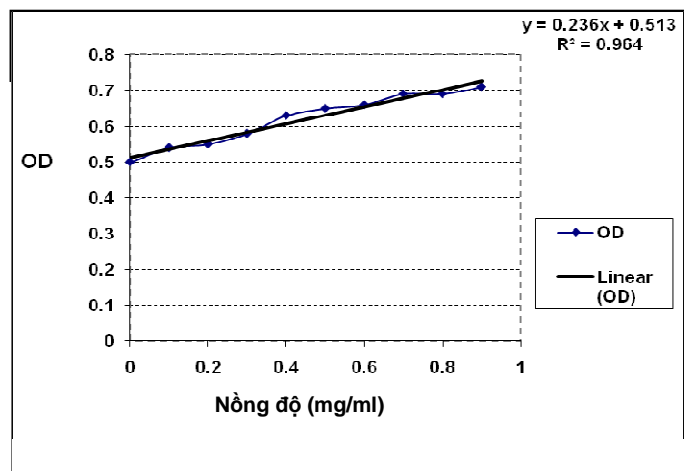
Hình 6. Protein polyhedrin sau tinh chế được kiểm tra trên gel acrylamid 12%. M: Thang Protein chuẩn (Fermentas); 1-2: Protein tinh chế.



Hình 5. Kiểm tra virion của MBV trên kính hiển vi điện tử. A- Độ phóng đại 30000 X, B- Độ phóng đại 60000 X.

Bảng 2. Định lượng hàm lượng protein polyhedrin có trong mẫu tinh chế.

Thứ tự mẫu	BSA (mg/ml)	OD _{595nm}
1	0	0,50
2	0,1	0,54
3	0,2	0,55
4	0,3	0,58
5	0,4	0,63
6	0,5	0,65
7	0,6	0,66
8	0,7	0,69
9	0,8	0,69
10	0,9	0,71
polyhedrin		0,566



Hình 7. Đồ thị đường chuẩn BSA.

Điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide của phân đoạn urografin 50% thu được bằng protein có khối lượng phân tử khoảng 58 kDa (M 58). Kích thước này phù hợp với mô tả của Bonami *et al.*, 1997, Linghtner *et al.*, 1996, Boosanongchokying *et al.*, 2006.

Hàm lượng protein có trong mẫu thu được đánh giá bằng phương pháp Bradford trên máy ELISA. Kết quả cho thấy lượng protein có trong mẫu là 2,25 mg/ml và toàn bộ lượng protein thu được là 200 ml (Bảng 2, Hình 7). Với lượng protein thu được này, chúng tôi sẽ sử dụng làm kháng nguyên gây miễn dịch cho các nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN

Mẫu tôm để tinh chế polyhedrin đã được kiểm tra nhiễm MBV bằng cả hai phương pháp soi mô và PCR, sau khi loại trừ các virus khác như IHHNV, WSSV, YHV, HPV và TSV.

Bước đầu đã tinh chế được polyhedrin, có kích thước khoảng 20 - 23 nm, có khối lượng phân tử khoảng 58 kDa. Virion của MBV có đường kính 59,8 nm chiều dài 298 nm. Lượng protein polyhedrin thu được từ tôm post lavar nhiễm MBV là 200 ml với 450 mg.

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

Alday de Graindorge V, Flegel TW (1999) Diagnosis of shimp diseases with emphasis on the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Multimedia Asia, Bangkok.

Belcher CR, Young PR (1998) Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in world *Penaeus monodon* postlarvae. *J Virol Methods* 74: 21-29.

Bonami JR, Aubert H, Mari J, Poulos BT and Lightner DV (1997) The polyhedra of the occluded baculoviruses of marine decapod crustacea: A unique structure, crystal organization, and proposed model. *J Struct Biol* 120: 134-145.

Boosanongchokying C (2006) Production of Monoclonal Antibodies to Polyhedrin of Monodon Baculovirus (MBV)

from Shrimp. *ScienceAsia* 32: 371-376.

Bùi Quang Tề (1994) Báo cáo khảo sát bệnh *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) của tôm sú nuôi các tỉnh phía Nam.

Chaivisuthangkura P (2008) Molecular isolation and characterization of a novel occlusion body protein gene from *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus. *Virology* 381: 261-267.

Đình Thương Vân, Vũ Ngọc Bích, Đình Duy Kháng (2004) Tách dòng và xác định trình tự đoạn AND đặc hiệu của virus gây bệnh còi (MBV - *Monodon Baculovirus*) trên tôm sú Việt Nam. *Báo cáo hội nghị toàn quốc: nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống định hướng Y dược học. Học viện quân Y*: 491-493.

Fegan DF (1991) The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in Southern Thailand. *Aquaculture* 96: 205-217.

Flegel TW (1999) Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 174: 197-206.

Hà Thị Thu, Vũ Thị Ngọc Bích, Nguyễn Thu Hiền, Đình Thương Vân (2005). Sử dụng kỹ thuật Multiplex để xác định đồng thời virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV) và virus gây bệnh còi (MBV) trên tôm sú (*Penaeus monodon*) ở Việt Nam. *Báo cáo khoa học, Hội nghị toàn quốc 2005 Công nghệ sinh học trong nghiên cứu cơ bản*: 124-127.

Lightner DV (1996) In: *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp*. (Edited by Lightner DV), The World of Aquaculture Society; Baton Rouge, LA.

Lightner DV, Redman RM (1981) A baculovirus-caused of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J Invertebr Patho* 38: 299-302.

Mari J, Lightner DV (1993) Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV = MBV). *Dis Aquat Org* 16: 207-215.

Payter JL, Vicker LE, Lester RJG (1992) Experimental transmission of *Penaeus monodon*- type baculovirus (MBV), *Dis Asi Aquacult*: 97-100.

Ramasamy P, Brennan GP (2000) Ultrastructure and pathogenesis of *Monodon baculovirus* (Pm SNPV) in cultural larvae and natural brooders of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 184: 45-66.

Vickers JE, Webb R, Young PR (2000) *Monodon baculovirus* from Australia ultrastructural observation. *Dis Aquat Org* 39: 169-176.

PURIFICATION OF POLYHEDRIN PROTEIN OF *MONODON BACULOVIRUS* WHICH CAUSES DISEASE IN PRAWN (*PENAEUS MONODON*)

Nguyen Thi Giang An¹, Ha Thi Thu², Dinh Duy Khang², Dinh Thuong Van^{2,*}

¹Vinh University

²Institute of Biotechnology

SUMMARY

Monodon baculovirus (MBV) is a member of the nucleopolyhedrosis virus group (NPV). After infecting shrimps, they form occlusion bodies (OB) containing virions in epithelial cells of the hepatopancreas of the penaeid shrimp *Penaeus monodon*. The main protein of the OB is polyhedral. It is the formation protein protecting the virus survival within the host body. MBV only develop fully when shrimps containing MBV infected with other virus or living under unfavourable environment. This virus when developed will spread very quickly which cause slow growth massive death in shrimp. MBV genome has not yet decoded. Also, none of the gene of MBV have been studied to obtain expression of recombinant proteins, thus, all studies on production of monoclonal antibodies MBV resistance were monoclonal antibody production Polyhedrin MBV resistance. In the present study, polyhedrin - the major constituent protein of occlusion bodies of MBV was extracted from the infected hepatopancreas of *P. monodon* post larvae and partially purified using continuous gradient of 20 - 70% Urografin and ultracentrifugation. Using Hematoxylin and Eosin dying process to analyze level of OB in hepatopancreas of the shrimps. After that, PCR methods with specialized primers are used to check for MBV infection without other virus presence such as WSSV, IHHNV, YHV, etc. Highly infected post larvae shrimp sample are then analyzed using ultracentrifugation in 20 - 70% Urografin. Every stage of the process is identified and checked with electron microscope (TEM). Under electron microscope (TEM), the virions of the virus were rod-shaped, 298 nm in length and 69.8 nm in diameter. The spherical polyhedrin was approximately 20 - 23 nm in diameter single protein band as analyzed by SDS-PAGE with a molecular mass of 58 kDa corresponding to the previously published size of MBV polyhedrin. Polyhedrin protein content in the solution obtained was ~2.25% as measured by Bradford assay.

Keywords: *Monodon baculovirus*, *MVB*, *Penaeus monodon*, *polyhedrin*, *shrimps*

* Author for correspondence: Tel: 84-903446766; E-mail: thuongvanibt@gmail.com