

ISSN 0866 708X

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIETNAMESE ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

TẠP CHÍ

KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

Tập 49 - số 4

2011

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH VỚI KHÁNG NGUYÊN POLYHEDRIN CỦA MONODON BACULOVIRUS (MBV) TRÊN CHUỘT BALB/c

Nguyễn Thị Giang An^{1,2}, Đỗ Khắc Hiếu², Đồng Văn Quyền², Đỗ Thị Thảo²,
Đình Duy Kháng²

¹Trường Đại học Vinh

²Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Toà soạn ngày: 10/11/2010

1. MỞ ĐẦU

Monodon baculovirus (MBV) là virus nhiễm tế bào gan tụy của các loài tôm nuôi [17]. Chúng ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa thức ăn trong cơ thể, dẫn đến làm chậm quá trình sinh trưởng của tôm, gây còi cọc. Kết quả nghiên cứu ở Việt Nam cho thấy, tại các tỉnh ven biển miền Trung có khoảng 70% tôm Post, 90% tôm thịt và 60 - 70% tôm bố mẹ nhiễm MBV [5, 9]. MBV được phát hiện đầu tiên ở loài tôm sú chuyển từ Đài Loan sang Mexico [18] và sau đó được công bố ở nhiều nước khác như Thái lan [10], một số vùng ở châu Á [17], Australia [19], Ấn Độ [21]. Từ năm 1994, Việt Nam cũng đã có các nghiên cứu khảo sát về loại virus này trên tôm [5, 9]. Virus này nhiễm vào tất cả các giai đoạn phát triển của tôm từ ấu trùng đến trưởng thành. Khi nghiên cứu về đặc điểm lan truyền của MBV, Paynter et al. (1992) đã khẳng định rằng virus này có khả năng lây nhiễm đa dạng nên tôm nuôi khó có thể tránh được sự xâm nhiễm của chúng [20].

Các nghiên cứu gần đây cho thấy khi xâm nhập vào cơ thể vật chủ, MBV tấn công vào tổ chức gan tụy và hình thành thể ẩn, trong đó protein chính của thể ẩn là polyhedrin. Polyhedrin (polh) là loại protein tinh thể đặc trưng cho virus thuộc họ *Baculoviridae*. Ở MBV, polyhedrin có khối lượng phân tử khoảng 58 kDa, đóng vai trò như chất nền bao quanh thể ẩn để bảo vệ 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 [3]. Polyhedrin là kháng nguyên quan trọng tạo đáp ứng miễn dịch của virus, do đó chúng thường được sử dụng như dấu ấn của sự lây nhiễm MBV.

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 [10], hoặc bằng phương pháp hóa nhuộm mô với hematoxylin và eosin (H&E) [1]. Các kỹ thuật sinh học phân tử và miễn dịch học cũng được áp dụng trong việc chẩn đoán bệnh ở tôm như phương pháp PCR, Nested PCR [2, 8, 12, 14], ELISA [14]. Năm 2005, Satidkanikul đã tạo được kháng thể kháng polyhedrin trong thể ẩn của MBV [22]. Boonsanongchokying (2006) đã bước đầu nghiên cứu và sản xuất kháng thể đơn dòng kháng polyhedrin của MBV ở Thái Lan [7]. Chaivisuthangkura (2008) cũng đã tiến hành giải trình tự gen và biểu hiện thành công protein polyhedrin tái tổ hợp [6]. Các nhà nghiên cứu ở Việt Nam cũng đã bước đầu tách dòng và giải trình tự gen đoạn DNA đặc hiệu cho MBV [8]. MBV là virus rất dễ biến đổi về mặt di

truyền do đó việc sử dụng các kit chẩn đoán ngoại nhập có thể sẽ không cho kết quả chính xác với các chủng MBV gây bệnh trên tôm nuôi Việt Nam. Với mục tiêu nghiên cứu sản xuất kháng thể kháng polyhedrin của MBV trên cơ sở kháng nguyên polh có nguồn gốc từ chủng virus gây bệnh trên tôm nuôi Việt Nam, chúng tôi đã tinh chế polh tự nhiên từ tôm nhiễm MBV và polh tái tổ hợp biểu hiện trong *E. coli* và sử dụng để gây miễn dịch cho chuột thuần chủng BALB/c. Đây là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tạo kháng thể đơn dòng kháng polh làm nguyên liệu để phát triển kit chẩn đoán MBV lây nhiễm trên tôm nuôi.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Mẫu tôm Post larvae được Trung tâm giống hải sản Quốc gia Vũng tàu cung cấp. Chuột thuần chủng dòng BALB/c do phòng Thử nghiệm sinh học Viện CNSH cung cấp. Taq polymerase, T4 ligase, X-gal, IPTG và thang DNA 1 kb do Fermentas cung cấp. ProBond™ Nickel-Chelating Resin từ Invitrogen. Màng PVDF từ Millipore. Sữa gầy (skim milk), complete freund's adjuvant, incomplete freund's adjuvant, cộng hợp kháng IgG chuột gắn HRP từ Sigma.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tinh chế polyhedrin tự nhiên từ mẫu tôm bệnh

Mẫu tôm bệnh MBV (không bị nhiễm các loại virus khác sau khi đã kiểm tra và khẳng định bằng phương pháp PCR, hóa mô miễn dịch và soi tươi) được sử dụng cho nghiên cứu. Lấy khoảng 5000 tôm post larvae nhiễm MBV làm choáng bằng nước đá, rồi chuyển vào trong cốc chứa 50 ml nước cất, dùng bơm tiêm 50 ml không có kim tiêm đẩy pitong để nghiền tôm vào một cái cốc để trên đá. Việc nghiền tôm bằng cách này được lặp đi lặp lại nhiều lần. Dịch nghiền được lọc 2 lần qua màng 100 µm Nitex-mesh, li tâm ở 4000 g trong 20 phút ở 4°C thu cặn, hòa cặn trong TN buffer (0,01 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 7,4) và đưa lên thang Urografin phân vùng liên tục (từ 20 – 60%) và li tâm siêu tốc ở 120.000 g trong 16 giờ ở 4°C. Sau khi li tâm, dùng bơm tiêm có kim thu nhận các băng và hòa vào đệm TN. Li tâm thu cặn ở 120.000 g trong 2 giờ ở 4°C, hòa cặn với một lượng nhỏ đệm TN, bảo quản ở -20° C.

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

Nhỏ mỗi giọt mẫu polyhedrin tinh chế trên mỗi tấm lưới đồng với Formvar carbon (Electron Microscopy Sciences, PA, USA). Sau khoảng 10 phút dịch lọc lắng xuống, chất dịch thừa được lấy bớt bằng giấy thấm đặt lên phần mép của vi, sau khi vi được sấy khô, nhỏ một giọt dung dịch thuốc nhuộm (2% phosphotungstic acid trong nước cất, pH 7,4) lên vi để khoảng 1 phút, sau đó lấy dịch thừa ở phần mép vi bằng giấy thấm [13]. Kiểm tra sự có mặt của polyhedrin trên kính hiển vi điện tử TEM (Hitachi H-600, Japan). Kiểm tra polyhedrin sau tinh chế bằng điện di biến tính SDS-PAGE theo phương pháp Laemmli 1970 [15].

2.2.3. Tổng hợp polyhedrin bằng con đường tái tổ hợp

Gen mã hóa polyherin (*polh*) của MBV có chiều dài 783bp được khuếch đại trực tiếp từ DNA genome MBV bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự gen công bố trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số EU251062 [6]. Sau khi tách dòng và xác định trình tự, gen *polh* được gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) và biến nạp vào *E. coli* chủng BL21 Star™ (DE3). Tế bào này được nuôi lắc trong môi trường LB lỏng có bổ sung Ampicilin cho đến khi

OD₆₀₀ nm đạt 0,6-1,0 thì cảm ứng bằng IPTG với nồng độ cuối cùng là 1mM. Protein tái tổ hợp được thu nhận sau 3 giờ nuôi cấy cảm ứng ở 37°C, được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamid. Protein tái tổ hợp được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) theo phương pháp mô tả của nhà sản xuất.

2.2.4. Xác định hàm lượng polyhedrin tái tổ hợp và tự nhiên trong dịch thể

Hàm lượng polh tự nhiên và tái tổ hợp trong mẫu được định lượng bằng phương pháp Bradford 1976 [4].

2.2.5. Phương pháp gây miễn dịch cho chuột

Lựa chọn 8 con chuột cái dòng BALB/c 6 tuần tuổi, chia làm 2 lô (mỗi lô 4 con), một lô được gây miễn dịch với kháng nguyên polyhedrin tự nhiên và lô còn lại được gây miễn dịch với kháng nguyên polyhedrin tái tổ hợp. Kháng nguyên được trộn đều với tá chất CFA (Completed Freund's adjuvant) theo tỷ lệ 1:1 cho lần tiêm đầu tiên. Ở những lần tiêm nhắc lại, kháng nguyên được trộn với tá chất IFA (Incompleted Freund's adjuvant) theo tỷ lệ 1:1. Chuột được tiêm dưới da 4 lần, vào các ngày 0, 7, 14 và 21. Giết chuột thu kháng thể vào ngày 10 kể từ lần tiêm cuối cùng.

2.2.6. Thu huyết thanh chuột

Dùng bơm tiêm 5 ml chọc vào hố mắt của chuột, hút máu từ từ để tránh vỡ hồng cầu. Mỗi con chuột lấy khoảng 1 ml máu. Sau đó ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ, chuyển sang tủ lạnh 4°C để 1 giờ. Thu huyết thanh, li tâm nhẹ 2000v/phút ở 4°C để loại tế bào.

2.2.7. Phương pháp Western blot

Protein của MBV được tách từ mẫu tôm bị nhiễm MBV và hòa trong Lysis Buffer (Tris HCl 20mM pH 8, NaCl 100mM). Sau đó biến tính và điện di trên gel polyacrylamid 12,5%, chuyển protein qua màng PVDF, nhuộm tạm thời trong dung dịch 0,1% Ponceau. Phủ màng bằng 5% Skim milk pha trong TTBS (Tween20-Tris-HCl Buffered Solution). Pha loãng huyết thanh chuột 500 lần trong dung dịch đệm TTBS chứa 1% skim milk và cho phản ứng với polyhedrin trên màng. Kháng thể kháng polyhedrin được phản ứng với cộng hợp kháng IgG chuột gắn enzyme Horseradish peroxidase (HRP). Ngâm màng 5-10 phút trong hỗn hợp dung dịch A gồm 30 mg chất hiện màu (HRP* colour development reagent + 10 ml metanol lạnh) và dung dịch B (30 ml H₂O₂ 30% + 50 ml TBS) trong bóng tối và đọc kết quả.

2.2.8. Phương pháp ELISA

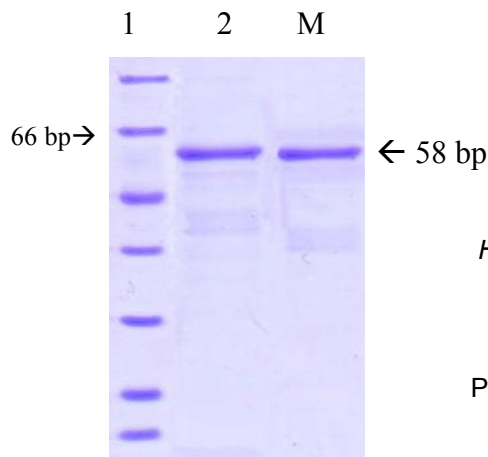
ELISA được thực hiện theo Liddell và Cryer, 1993. Theo đó, kháng nguyên được pha loãng ở nồng độ 250 ng/ml trong carbomate coating buffer (100 µl/ giếng) và ủ bản 1 giờ ở 37°C. Sau đó bản ủ được rửa bằng Washing buffer (Phosphate- buffered saline-PBS bổ sung 0,05 tween 20 và 1% skim milk). Tiếp tục bổ sung 100 µl huyết thanh chuột gây miễn dịch với polyherdin (pha loãng 1000 lần) vào từng giếng, ủ 1 giờ ở 37°C. Rửa bản và phủ kháng thể Goat-Antimouse IgG conjugate HRP (Promega cat. W4021). Cuối cùng thêm 100 µl cơ chất TMB (3,3', 5,5 – tetramethylbenzidine) ủ 1 giờ ở 37°C. Dừng phản ứng bằng 50 µl 2N H₂SO₄ và đọc kết quả ELISA ở bước sóng 450 nm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tinh chế protein polyhedrin tự nhiên từ tôm nhiễm MBV

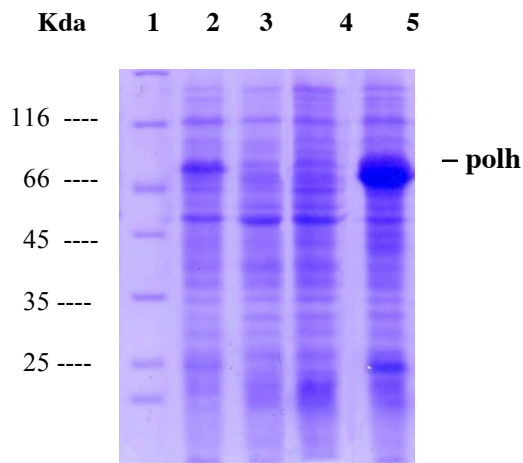
Sau khi kiểm tra và xác định mức độ nhiễm MBV và loại trừ các virus khác bằng phương pháp hóa mô miễn dịch, soi tươi và PCR, chúng tôi tiến hành tinh chế polyhedrin của MBV từ các mẫu tôm bệnh bằng ly tâm siêu tốc trong thang phân vùng Urografin liên tục từ 20% đến 70% như đã nêu trong phần phương pháp. Sau 16 giờ li tâm với tốc độ 100.000g thu được 7 phân đoạn khác nhau. Kiểm tra các phân đoạn này trên kính hiển vi điện tử TEM, chúng tôi thu được phân đoạn có các tiêu thể polyhedrin giống như mô tả của Bonami *et al.*, 1997, Satidkanikul *et al.*, 2005 và Boosanongchokying *et al.*, 2006. Polyhedrin có đường kính 20 - 23 nm, rỗng, tròn và nằm ở phân đoạn urografin 50% [3, 7, 22].

Điện di SDS-PAGE phân đoạn urografin 50% thu được bằng protein có trọng lượng phân tử khoảng 58 kDa (M 58). Kết quả này của chúng tôi phù hợp với mô tả của Bonami *et al.*, 1997 và Boosanongchokying *et al.*, 2006 [3, 22].



Hình 2. Điện di đồ SDS-PAGE phân đoạn Urografin 50%.
Marker protein chuẩn (M);
Phân đoạn có chứa polyhedrin (1, 2.)

3.2. Tổng hợp polyhedrin bằng con đường tái tổ hợp



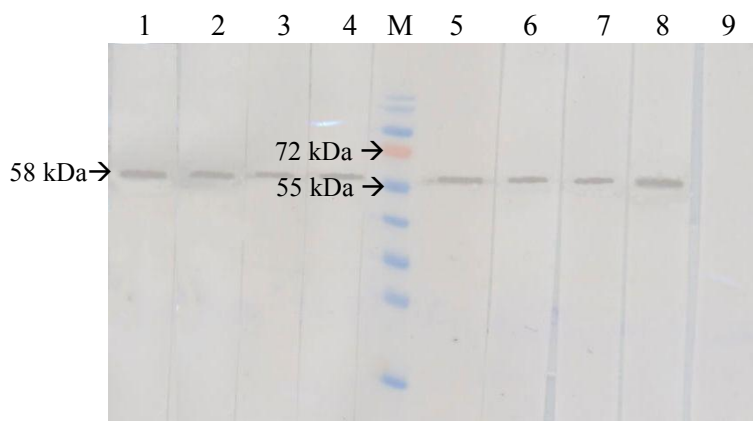
Hình 3. Kết quả kiểm tra polyhedrin tái tổ hợp tinh chế bằng điện di trên gel polyacrylamide
1: protein marker;
2: dịch phá tế bào không cảm ứng IPTG;
3: 3-4 Cảm ứng IPTG sau 1-2 giờ;
5: 3 giờ cảm ứng IPTG

Sau khi thiết kế được vector biểu hiện polyhedrin (pEpolh), pEpolh được biến nạp vào tế bào tế bào *E. coli* chủng BL21 Star™ (DE3). Một khuẩn lạc riêng rẽ được nuôi lắc trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin để biểu hiện polh tái tổ hợp. Protein polh tái tổ hợp sau khi tinh chế được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide.

Polh tái tổ hợp được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin như mô tả ở phần phương pháp và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Như vậy, bằng các con đường khác nhau chúng tôi đã tinh chế thành công protein polyhedrin tự nhiên và tái tổ hợp. Đồng thời, lượng protein polyhedrin thu được là đủ để có thể sử dụng làm kháng nguyên gây miễn dịch trên chuột BALB/c.

3.3. Kết quả gây đáp ứng miễn dịch trên chuột, kiểm tra sự có mặt và hiệu giá của kháng thể kháng polyhedrin trong huyết thanh

Nghiên cứu khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên chuột của polyhedrin được tiến hành với mục đích chọn ra chuột có đáp ứng miễn dịch tốt nhất, sản sinh được kháng thể phản ứng mạnh nhất với polyhedrin có trong tôm bị bệnh MBV để phục vụ cho việc nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng. Sau khi gây miễn dịch bằng polyhedrin tự nhiên và tái tổ hợp trên 2 lô chuột, chúng tôi tiến hành thu máu từ hốc mắt của chuột và tách chiết huyết thanh như đã nêu ở phần phương pháp. Để khẳng định chính xác kháng thể thu được này có phản ứng đặc hiệu với tôm nhiễm MBV, chúng tôi tiến hành kiểm tra khả năng tương tác giữa kháng thể trong huyết thanh chuột và polh của MBV trong tôm bằng phản ứng Western blot. Kết quả cho thấy polh tự nhiên trong tôm nhiễm MBV phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng polyhedrin tự nhiên và kháng thể kháng polyhedrin tái tổ hợp, thể hiện bởi băng có kích thước khoảng 58 kDa, tương ứng với băng của polyhedrin, trong khi đó mẫu tôm sạch bệnh không xuất hiện băng tương ứng (hình 4).



Hình 4. Lai Western blot giữa polh của tôm nhiễm MBV với huyết thanh chuột gây miễn dịch với polyhedrin tự nhiên và tái tổ hợp. M: marker protein; 1-4: chuột số 1, 2, 3 và 4 (lô 1); 5-8 chuột số 5, 6, 7 và 8 (lô 2). 9: Mẫu đối chứng âm (tôm không nhiễm bệnh)

Như vậy, từ huyết thanh của chuột thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy có sự xuất hiện của kháng thể đa dòng kháng đặc hiệu với polyhedrin tinh chế từ mẫu tôm bệnh MBV và polyhedrin tổng hợp bằng con đường tái tổ hợp. Điều đó chứng tỏ, polyhedrin tinh chế có đầy đủ đặc tính của kháng nguyên để có thể gây đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu trên chuột thí

nghiệm. Đây là yếu tố quan trọng để tạo nguồn tế bào lympho B hoạt hóa dùng trong dung hợp với tế bào myeloma để thu nhận các dòng tế bào lai hybridoma sinh kháng thể đơn dòng. Để lựa chọn chuột có đáp ứng miễn dịch tốt nhất với polyhedrin phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi đã kiểm tra hiệu giá kháng thể của mỗi con chuột bằng phương pháp ELISA. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hoạt độ kháng thể kháng polyhedrin của MBV gây bệnh ở tôm từ huyết thanh chuột đã được gây miễn dịch với polyherin

STT	Lô thí nghiệm	Mẫu kiểm tra	Liều gây miễn dịch ($\mu\text{g}/\text{con}/\text{lần}$)	Giá trị OD _{450nm}			
				Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
1	Lô 1 Tiêm KN tự nhiên	Chuột số 1.1	30	1,298	1,346	1,494	1,379 \pm 0,102
2		Chuột số 1.2	50	1,895	1,899	1,993	1,929 \pm 0,055
3		Chuột số 1.3	75	1,981	2,299	2,673	2,318 \pm 0,346
4		Chuột số 1.4	100	1,470	1,421	1,831	1,574 \pm 0,224
5	Lô 2 Tiêm KN TTH	Chuột số 2.1	30	1,199	1,347	1,489	1,345 \pm 0,145
6		Chuột số 2.2	50	1,302	1,386	1,488	1,392 \pm 0,093
7		Chuột số 2.3	75	2,014	2,087	2,134	2,078 \pm 0,060
8		Chuột số 2.4	100	1,387	1,459	1,557	1,468 \pm 0,085
9	BSA(đối chứng âm) (0,1%)			0,055	0,057	0,052	0,055 \pm 0,003

Ghi chú: OD là mật độ quang học (Optical Density)

Kết quả từ bảng 1 cho thấy khả năng đáp ứng miễn dịch của chuột với polyhedrin tự nhiên và polyhedrin tái tổ hợp rất tốt. Kháng thể kháng polh tái tổ hợp cho giá trị OD cao hơn so với giá trị OD của kháng thể kháng polh tái tổ hợp, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy việc gây đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên tự nhiên và kháng nguyên tái tổ hợp đã được thực hiện thành công trên chuột BALB/c. Liều lượng gây đáp ứng miễn dịch tốt nhất là 75 $\mu\text{g}/\text{con}/\text{lần}$. Hiệu giá kháng thể trong huyết thanh cao nhất tương ứng với khả năng đáp ứng miễn dịch tốt nhất ở chuột số 1.3 (lô 1, gây miễn dịch bằng polyhedrin tự nhiên) và chuột số 2.3 (lô 2, gây miễn dịch bằng polyhedrin tái tổ hợp). Kết quả này là cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tạo kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng polyhedrin.

4. KẾT LUẬN

Hiện nay MBV là virus gây bệnh phổ biến nhất trên tôm sú, có tốc độ lây lan rất nhanh làm suy giảm năng suất nuôi trồng tôm. Để phục vụ công việc tạo kit chẩn đoán, lần đầu tiên tại Việt Nam chúng tôi đã tinh chế thành công polyhedrin từ tôm bệnh MBV, đồng thời đã biểu hiện và tinh chế polyhedrin tái tổ hợp làm nguyên liệu để gây miễn dịch cho chuột BALB/c và lựa chọn những cá thể chuột có khả năng đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu tốt nhất. Độ đặc hiệu của kháng thể và khả năng ứng dụng để phát hiện MBV trên mẫu tôm nhiễm bệnh cũng đã được

kiểm tra thông qua phản ứng Wertern blot. Khả năng đáp ứng miễn dịch tốt nhất và hiệu giá kháng thể trong huyết thanh chuột được kiểm tra bằng ELISA. Kết quả cho thấy kháng thể trong huyết thanh chuột gây miễn dịch với polyhedrin tự nhiên và tái tổ hợp phản ứng đặc hiệu và có ái lực cao với MBV gây bệnh trên tôm. Kết quả thu được là cơ sở quan trọng cho các bước nghiên cứu tiếp theo nhằm tạo tế bào lai hybridoma sinh kháng thể đơn dòng phục vụ phát triển kit chẩn đoán MBV trên tôm nuôi.

Lời cảm ơn. Tác giả xin cảm ơn các cán bộ nghiên cứu của phòng Vi sinh vật phân tử-Viện Công nghệ sinh học và phòng thực nghiệm sinh học, đã hỗ trợ chúng tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu này. Chúng tôi cũng xin chân thành cảm ơn Lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện và thiết bị máy móc của phòng thí nghiệm trọng điểm để chúng tôi thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alday de Graindorge V, Flegel TW - Diagnosis of shimp diseases with emphasis on the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Multimedia Asia, Bangkok(1999) .
2. Belcher CR, Young PR - Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in world *Penaeus monodon* postlarvae. *J Virol Methods* 74 (1998) 21-9.
3. Bonami JR, Aubert H, Mari J, Poulos BT and Lightner DV - The polyhedra of the occluded baculoviruses of marine decapod crustacea: A unique structure, crystal organization, and proposed model. *J Struct Biol* 120 (1997)134- 45
4. Bradford MM - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.
5. Bùi Quang Tề - Bệnh của tôm nuôi và biện pháp phòng trị. Nhà xuất bản nông nghiệp, Hà Nội (2003) 50-53.
6. Chaivisuthangkura - Molecular isolation and characterization of a novel occlusion body protein gene from *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus. *Virology* 381 (2008) 261–267
7. Chumpol Boonsanongchokying - Production of Monoclonal Antibodies to Polyhedrin of *Monodon Baculovirus* (MBV) from Shrimp. *ScienceAsia* 32 (2006) 371-376
8. Đinh Thương Vân, Vũ Ngọc Bích, Đinh Duy Kháng - 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 KHHCN toàn quốc về nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống định hướng Y dược học . Học viện quân Y (2004) 491-493.
9. Đỗ Thị Hòa - Bệnh *Monodon* type baculovirus (MBV) ở tôm he. Bệnh học thủy sản. NXB Nông nghiệp(2004) tr 194-204.
10. Fegan D.F - The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in Southern Thailand. *Aquaculture* 96 (1991) 205-217.
11. Flegel, T.W - Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 258 (2006) 1–33.
12. Hà Thị Thu, Vũ Thị Ngọc Bích, Nguyễn Thu Hiền, Đinh Thương Vân - 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 Công nghệ sinh học trong nghiên cứu cơ bản hướng (2005) 124-127.
13. Haschemeyer RH, Meyer RJ - Negative staining. In:Hayat MA (ed) Principles and techniques in electron microscopy, Vol 2. Oxford University Press, Oxford, p 99–147

14. Hsu YL, Wang KH, Yang YH, Tung MC, Hu CH, Lo CF, Wang CH, Hsu T (2000) Diagnosis of *Penaeus monodon*-type baculovirus by PCR and by ELISA of occlusion bodies. *Dis Aquat Org* 40 (1970) 93–99.
15. Laemmli, U. K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
16. Liddell, J. E., and A. Cryer. - A practical guide to monoclonal antibodies. Wiley and Sons Ltd, London (1991) p188
17. Lightner DV - 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 (1996).
18. Lightner DV, Redman RM - A baculovirus-caused of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J Invertebr Pathol* 38 (1981) 299-302.
19. Owens L - Special topic review: the history of the emergence of viruses in Australian prawn aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol* 13 (1997)427–431
20. Payter, J.L., L.E Vicker and R.J.G. Lester. (1992) Experimental transmission of *Penaeus monodon*- type baculovirus (MBV), *Diseases in Asian aquaculture*. p.97-100.
21. Ramasamy P, Brennan GP - Ultrastructure and pathogenesis of *Monodon baculovirus* (Pm SNPV) in cultured larvae and natural brooders of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 184 (2000) 45-66.
22. Satidkanitkul - Synthetic peptide used to develop antibodies for detection of polyhedrin from *monodon baculovirus* (MBV). *Dis Aquat Org* 65 (2005) 79-84.
23. Sheehan DC, Hrapchak BB - Theory and practice of histotechnology, 2nd ed. Columbus, Ohio: Battelle Press (1980) .46-48.

SUMMARY

STUDY ON THE IMMUNE RESPONSE OF BALB/c MICE IMMUNIZED WITH NATIVE AND RECOMBINANT POLYHEDRIN OF MONODON BACULOVIRUS (MBV)

Monodon baculovirus (MBV) has been considered as a major causative agent in aquaculture industry shrimps and has caused severe losses for shrimp farmers. The recent diagnostic kits for MBV detection were developed based on polyhedrin (polh), the major constituent protein of occlusion bodies of MBV. It has been known that the specificity and sensitivity of the antibodies to polh (anti-polh) is a critical issue for the success of MBV diagnostic kit development. In this study we used native and recombinant polh to immunized BALB/c mice and evaluated the humoral immune response of the mice by characterization of the antibodies against these antigens. Two groups of BALB/c mice (4/each group) were injected with native polh purified from MBV-infected *Penaeus monodon* and recombinant polh purified from the recombinant *E. coli* strain, respectively. The Western blot analysis showed that these antibodies reacted specifically to the native polh from MBV-infected *Penaeus monodon*. The antibody titer of each BALB/c mouse was evaluated by ELISA using purified native polh. Based on ELISA results, the mice with highest antibody titers against the native and recombinant polh were selected. This study provides fundamental data for hybridoma cell lines creation to produce monoclonal antibodies against polh and use for MBV diagnostic kit development.

Keyword: Immune response, BALB/c mice, Polyhedrin, *Monodon Baculovirus*, ELISA, Western blot