

VIỆN HÀN LÂM 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) 13

Số (Number) 4

2015

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
TẠP CHÍ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TẬP 13, SỐ 4 - 2015

=====

MỤC LỤC  
CONTENTS

<b>Nguyễn Thu Hiền, Nông Văn Hải, Nguyễn Huy Hoàng.</b> Giải trình tự gen thể hệ mới trong nghiên cứu di truyền bệnh tự kỷ	989-998
Next-generation sequencing technologies in genetic studies of autism spectrum disorders	
<b>Đình Hoàng Đăng Khoa, Phạm Thị Thu Hằng.</b> Hệ vi khuẩn đường ruột tôm	999-1006
Intestinal bacterial flora of shrimp	
<b>Trần Phương Thảo, Tạ Thị Bình, Nguyễn Huy Hoàng.</b> Mối tương quan giữa đa hình gen <i>AS3MT</i> và phơi nhiễm asen trước sinh	1007-1015
The association of <i>AS3MT</i> polymorphisms and prenatal arsenic exposure	
<b>Nguyễn Thị Quý, Dương Thu Hương, Đặng Thị Ngọc Hà, Lê Thị Thu Hồng, Trương Nam Hải.</b> Loại endotoxin ở Interleukin-11 người tái tổ hợp bằng ion $Ca^{2+}$ và màng Ultracel 30 kDa	1017-1023
Removal of endotoxin from recombinant human Interleukin-11 by $Ca^{2+}$ ion and Ultracel 30 kDa membrane	
<b>Lê Thị Mai Linh, Nguyễn Thị Duyên, Trịnh Quang Pháp, Nguyễn Thị Phương Anh, Phạm Văn Ty.</b> Nghiên cứu khả năng ức chế tuyến trùng <i>Meloidogyne incognita</i> trên cà phê của nấm <i>Paecilomyces javanicus</i>	1025-1029
Biological control of <i>Meloidogyne incognita</i> on coffee by <i>Paecilomyces javanicus</i>	
<b>Nguyễn Hữu Tiên, Nguyễn Ngọc Châu.</b> Hiệu lực gây chết và khả năng sinh sản của bốn chủng tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng trên sâu quy ( <i>Zophobas morio</i> )	1031-1039
The pathogenicity and reproduction of some entomopathogenic nematode strains on superworm ( <i>Zophobas morio</i> ) under laboratory condition	
<b>Nguyễn Thị Hiền, Mã Tú Lan, Võ Hồng Phượng, Nguyễn Thị Ngọc Thùy, Ngô Thanh Cường, Nguyễn Hữu Tuyển, Lê Hồng Phước.</b> Sự hiện diện của các gen gây độc của vi khuẩn <i>Aeromonas hydrophila</i> phân lập từ cá tra ( <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> )	1041-1052
The presence of virulence genes in <i>Aeromonas hydrophila</i> isolated from striped catfish ( <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> )	
<b>Nguyễn Thị Giang An, Đinh Duy Kháng, Hà Thị Thu, Đỗ Thị Thảo.</b> Phát hiện virus đốm trắng (WSSV) trên tôm bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang	1053-1059
Detection of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp based on immunofluorescence technique	
<b>Vũ Thị Thủy, Bùi Văn Thế Vinh, Hoàng Văn Cường, Dương Tấn Nhựt.</b> Ảnh hưởng của một số polyamine và tiền chất của chúng lên tần suất phát sinh và số lượng phôi vô tính cây sâm Ngọc Linh ( <i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv.) nuôi cấy <i>in vitro</i>	1061-1071
Effects of polyamines and their precursors on somatic embryogenesis of Ngọc Linh ginseng	

(*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro*

**Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Trịnh Đình Đạt, Nguyễn Thị Thanh Thủy.** Xây dựng bản đồ liên kết phân tử cho giống bông tứ bội bằng chỉ thị SSR 1073-1082

Construction of molecular linkage map for tetraploid cotton using SSR markers

**Phạm Thị Thanh Nhân, Lê Trần Bình.** Định lượng mức độ phiên mã của gen *B* (*Booster*) hoạt hóa sinh tổng hợp anthocyanin ở cây ngô nếp địa phương bị hạn 1083-1090

Quantifying the transcription levels of *B* gene (*Booster*) activating local sticky corn anthocyanin biosynthesis under drought condition

**Vũ Thị Lan, Phạm Bích Ngọc, Lê Thu Ngọc, Nguyễn Thị Hoài Thương, Trần Thu Trang, Nguyễn Văn Đoài, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình.** Nghiên cứu tạo cây khoai lang chuyển gen mang cấu trúc gen *vip2-1* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* 1091-1099

Study on *vip2-1* gene transformation into sweet potato via *Agrobacterium tumefaciens*

**Nguyễn Thị Thu Nga, Phạm Thị Thanh Nhân, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình.** Biểu hiện protein NAC2 liên quan đến khả năng chống chịu hạn của giống lạc L12 trong cây thuốc lá 1101-1106

Expression NAC2 protein related to drought tolerance from peanut varieties L12 in tobacco

**Cao Phi Bằng, Nguyễn Văn Đính.** Họ gen mã hóa cho glutamine synthetase ở cây đậu Cove (*Phaseolus vulgaris* L.) 1107-1112

The glutamine synthetase coding gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

**Vũ Quốc Luận, Trần Đình Phương, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt.** Vi nhân giống và định tính hoạt chất  $\beta$ -Sitosterol trên cây lan Kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) 1113-1125

Micropropagation and  $\beta$ -Sitosterol qualitative research on *Anoectochilus setaceus* Blume

**Hoàng Thanh Tùng, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt.** Hệ thống vi thủy canh trong nhân giống cây Cúc trắng (*Chrysanthemum morifolium*) 1127-1137

Microponic system in propagation of *Chrysanthemum morifolium*

**Lưu Thị Tâm, Lê Thị Thơm, Nguyễn Cẩm Hà, Ngô Thị Hoài Thu, Lê Hà Thu, Đặng Diễm Hồng.** Nhân tố giới hạn cho quá trình tích lũy astaxanthin trong pha 2 của vi tảo lục *Haematococcus pluvialis* ở điều kiện phòng thí nghiệm 1139-1145

Limiting factors of astaxanthin accumulation process of green microalgal *Haematococcus pluvialis* in the second phase under laboratory condition

**Nguyễn Hoàng Ngọc Phương, Đoàn Quang Nhật, Nguyễn Thị Mỹ Lan, Lê Thị Mỹ Phước, Phạm Thành Hồ.** Sinh tổng hợp bạc nano từ chủng *Fusarium oxysporum* bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt 1147-1153

Using surface culture method to facilitate the biosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*

**Hoang Anh Hoang, Le Thanh Dien.** Host range of bacteriophages IP008 and IP052 to *Escherichia coli* strains isolated in Vietnam 1155-1160

Phổ xâm nhiễm của hai thực khuẩn thể IP008 và IP052 đối với các chủng *Escherichia coli* phân lập tại Việt Nam

**Lê Thị Kim Xuyên, Đoàn Thị Thanh Hương, Hoàng Thị Minh Châu, Vũ Thị Tiến, Lê Thanh Hòa.** Xác định phân nhóm độc lực của bảy chủng virus Gumboro phân lập 1161-1167

tại Việt Nam dựa trên thành phần gen *VP2* và phân tích phá hệ

Virulence classification of seven Gumboro virus strains isolated in Vietnam based on *VP2* gene and phylogenetic analysis

**Nguyễn Lê Tuấn Anh, Ngô Khắc Huy, Nguyễn Văn Phúc, Nguyễn Đức Hoàng, Phan Thị Phượng Trang.** Tạo dòng, biểu hiện và tinh chế protein Listeriolysin O (LLO) tái tổ hợp trong *Bacillus subtilis* 1169-1176

Cloning, expression and purification of Listeriolysin O (LLO) in *Bacillus subtilis*

**Đinh Thị Thu Hằng, Nguyễn Thái Sơn, Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Thanh Việt, Triệu Thị Nguyệt, Đoàn Trọng Tuyên.** Trình tự một số gen tiêu biểu của vi khuẩn *Bacillus anthracis* phân lập ở Việt Nam 1177-1184

Complete sequence analysis of the typical genes of *Bacillus anthracis* strains isolated in Vietnam

## PHÁT HIỆN VIRUS ĐÓM TRẮNG (WSSV) TRÊN TÔM BẰNG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

Nguyễn Thị Giang An<sup>1</sup>, Đinh Duy Kháng<sup>2</sup>, Hà Thị Thu<sup>2</sup>, Đỗ Thị Thảo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Vinh

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 21.5.2015

Ngày nhận đăng: 20.12.2015

### TÓM TẮT

Virus gây bệnh đốm trắng (WSSV) thuộc họ Nimaviridae, là một trong những tác nhân virus gây tổn thất nghiêm trọng cho ngành nuôi tôm công nghiệp. Kháng nguyên VP28 - protein vỏ của virus WSSV đã được tổng hợp bằng con đường tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng (mAbs) kháng VP28 tái tổ hợp cũng đã được nghiên cứu, nhằm phục vụ cho việc tạo kit chẩn đoán sớm căn bệnh này. Tế bào lai sinh kháng thể kháng protein VP28 tái tổ hợp được đánh thức từ nitrogen lỏng, nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640. Kết quả của quá trình chọn dòng, từ 288 giếng tế bào đã lựa chọn được 143 giếng có một tế bào, trong đó có 45 giếng tế bào có khả năng sản xuất kháng thể đơn dòng. Tiếp tục chọn lọc những dòng tế bào đã cho hai dòng tế bào lai sinh kháng thể kháng VP28 có hiệu giá cao nhất, hai dòng tế bào này đã được lựa chọn để gây báng cho chuột BALB/c. Dịch báng sau khi tinh sạch thu được hàm lượng kháng thể mAbs-VP28 đạt 2,08 mg/ml. Bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang, kháng thể được tinh sạch đã có khả năng phát hiện WSSV trên tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) ở nồng độ rất thấp nhờ vào sự phát quang của hợp chất FITC. Kết quả cho thấy, nồng độ kháng thể tối thiểu để phát hiện WSSV là 0,4 µg/ml và hợp chất FITC được pha loãng 2000 lần. Kháng thể đơn dòng mAbs-VP28 cho kết quả âm tính với mẫu tôm nhiễm virus đầu vàng (YHV) và virus gây bệnh còi (MBV).

**Từ khóa:** Hybridoma, Kháng thể đơn dòng, Virus gây bệnh đốm trắng, WSSV

### MỞ ĐẦU

Virus gây hội chứng đốm trắng (White spot syndrome virus - WSSV) là một trong những virus nguy hiểm gây bệnh trên tôm. Đây là tác nhân gây thiệt hại nặng nề cho ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản trên toàn thế giới (Lightner, 1996). WSSV được phát hiện đầu tiên vào năm 1982 ở tôm *P. japonicus* nuôi tại vùng Đông Bắc Đài Loan (Chou *et al.*, 1995). Dấu hiệu lâm sàng đặc trưng của bệnh này là xuất hiện các đốm trắng đường kính khoảng 0,5 đến 2 mm ở dưới lớp vỏ của tôm (Chou *et al.*, 1995). Các triệu chứng tiếp theo là tôm bỏ ăn, lơ dờ, mất lớp vỏ kitin, chuyển màu từ phớt hồng sang màu hồng. Toàn bộ genome của WSSV đã được xác định ở Trung Quốc, Đài Loan và Thái Lan, với cấu trúc hình que, ADN sợi kép, kích thước genome khoảng 300 kb (Van Hulten *et al.*, 2001). WSSV chứa 5 protein cấu trúc chính là VP28, VP19 phần vỏ và VP26, VP24 và VP15 trong nucleocapsid (Van Hulten *et al.*, 2001). Một trong những nguyên nhân dẫn đến việc lây lan nhanh của WSSV là do phổ loài cảm nhiễm rộng, chúng có thể cảm nhiễm vào nhiều

loài vật chủ khác nhau như *P. monodon*, *P. vannamei*, *P. duorarum* và *P. setiferus* (Lightner, 1996), tôm càng xanh *Macrobrachium rosenbergii*, cua. WSSV có thể lan truyền theo chiều ngang và chiều dọc, bởi virus có thể nhiễm từ trứng sang ấu trùng, hoặc từ môi trường và vật chủ trung gian vào tôm trưởng thành. Đi cùng với nhiễm WSSV là sự đồng nhiễm các virus khác như MBV, HPV, YHV... Ở Việt Nam, WSSV cũng có khả năng bùng phát mạnh, lây lan nhanh ở các vùng nuôi tôm trọng điểm và chưa có phương pháp điều trị hữu hiệu. Do đó, việc phát hiện sớm bệnh để kịp thời xử lý nhằm giảm thiệt hại cho người nuôi tôm và nâng cao chất lượng, sản lượng tôm nuôi là một điều rất cần thiết và cấp bách.

Trong những năm gần đây, kháng thể đơn dòng kháng protein vỏ của WSSV đã được nghiên cứu thành công (Van Hulten *et al.*, 2001; Anil *et al.*, 2002; Chaivisuthangkura *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2002). Trong bài báo này, chúng tôi đã sử dụng dòng tế bào lai sinh kháng thể kháng WSSV (Đỗ Thị Thảo *et al.*, 2008) và kháng nguyên tái tổ hợp VP28 (Hà Thị Thu *et al.*, 2007) để chọn ra dòng tế bào lai có

khả năng sinh kháng thể tốt, sau đó gây báng cho chuột BALB/c (Karsten và Rudolph, 1985) để thu kháng thể với lượng lớn. Kháng thể tinh sạch có khả năng phát hiện đặc hiệu các thể vùi (inclusion body) của WSSV trên mô của tôm sú và tôm thẻ chân trắng thông qua kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### **Tạo dòng tế bào sinh kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu kháng nguyên VP28**

Các tế bào lai (hybridoma) đã được tạo ra trước đây bởi Đỗ Thị Thảo và cộng sự (2008). Các tế bào lai sinh kháng thể kháng protein VP28 tái tổ hợp được lấy ra từ nitrogen lỏng, đưa vào nước ấm 37°C. Ly tâm với tốc độ 1000 v/p trong 5 phút. Sau đó hút bỏ dịch nổi để loại Dimethyl sulfoxide (DMSO). Hòa cạn tế bào và chuyển từ từ vào môi trường nuôi cấy. Tế bào được nuôi dưỡng trong tủ ấm 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Khi tế bào phát triển khỏe mạnh, tế bào được chuyển sang nuôi cấy trong đĩa 96 giếng. 100 µl dịch nổi thu nhận từ mỗi giếng nuôi tế bào được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng đặc hiệu VP28 bằng phương pháp ELISA. Dịch nổi nào có giá trị OD<sub>450</sub> cao tức là có kháng thể kháng VP28 là giếng đó có chứa tế bào sản xuất kháng thể kháng VP28. Tế bào lai từ các giếng có hoạt tính mạnh được cấy chuyển sang phiến 24 giếng để tiếp tục nuôi cấy và tách dòng. Sau quá trình tách dòng, lựa chọn các giếng có một dòng tế bào, sinh kháng thể kháng VP28 để nhân nuôi lượng lớn, từ đó tinh sạch và kiểm tra tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng thu được.

### **Tạo báng chuột sinh kháng thể đơn dòng**

Tiêm 0,5 ml pristane vào ổ bụng của chuột BALB/c 4 tuần tuổi. Sau 14 ngày, tiếp tục tiêm dung dịch gồm 1-3x10<sup>6</sup> tế bào lai hòa tan trong PBS 0,01 M chứa ion Ca<sup>2+</sup> và Mg<sup>2+</sup> vào ổ bụng mỗi chuột. Sau khi chuột xuất hiện báng, dùng kim tiêm vô trùng thu dịch. Ly tâm dịch báng ở tốc độ 2000 v/p trong 10 phút ở 4°C, thu dịch nổi để tinh sạch kháng thể. Kháng thể được tinh sạch bằng bộ kit của Propure hãng Nunc theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Định lượng protein theo phương pháp Bradford (1976). Chia nhỏ và bảo quản ở -80°C (Ey *et al.*, 1978).

### **Phương pháp Western blot**

Kháng nguyên tái tổ hợp VP28 (Hà Thị Thu *et al.*, 2007), được 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 saline). Pha loãng kháng thể kháng VP28 đã được tinh sạch 500 lần trong dung dịch đệm TTBS chứa 1% skim milk và cho phản ứng với polyhedrin trên màng. Kháng thể kháng VP28 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% + 50 ml TBS ) trong tối và đọc kết quả.

### **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 đệm phủ giếng (carbomate coating buffer) (100 µl/giếng) và ủ ban 1 giờ ở 37°C. Sau đó bản ủ được rửa bằng đệm rửa (Washing buffer) (Phosphate- buffered saline-PBS bổ sung 0,05 tween 20 và 1% skim milk). Tiếp tục bổ sung 100 µl MAb 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. Dùng phản ứng bằng 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N và đọc kết quả ELISA ở bước sóng 450 nm.

### **Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gắn FITC**

Qui trình thí nghiệm này được thực hiện theo Key (2006) và hướng dẫn của R&D systems. Mẫu tôm được xử lý, đúc parafin theo kỹ thuật hóa mô miễn dịch. Mẫu sau khi khử parafin được khoan tròn bằng bút kị nước và rửa tiêu bản 5 phút/3 lần bằng PBS. Sau đó cố định (block) mẫu với dung dịch gồm (4% huyết thanh dê, 1% BSA, 0,4% triton X100) pha trong PBS, ủ trong 1 giờ 30 phút ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Rửa tiêu bản bằng PBS và 0,4% TX 100 trong 5 phút/ 3 lần. *Ủ kháng thể 1*: Kháng thể 1 được pha loãng trong đệm pha loãng (PBS 1x, BSA 1% và 0,3% triton X100) ủ trong 1 giờ ở 37°C hoặc qua đêm ở 4°C (trong hộp có tạo độ ẩm). Sau đó rửa 3 lần, mỗi lần 5 phút với PBS 1x có 0,3% triton X100. *Ủ kháng thể gắn FITC*: kháng thể được pha loãng với tỷ lệ 1/500, ủ trong 1 giờ, ở nhiệt độ 37 °C, tránh ánh sáng. Sau đó rửa 3 lần mỗi lần 5 phút trong PBS và 0,3% triton X100 và rửa lần cuối với PBS. Nhuộm màu nhân tế bào với 300 µm DAPI, ủ trong 2 -5 phút ở

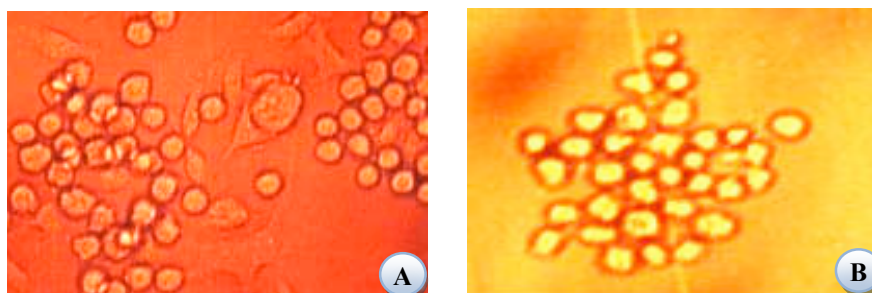
niệt độ phòng, sau đó rửa bằng PBS. Gắn tiêu bản với ProLong Gold. Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang các protein gắn kháng thể sẽ bắt màu xanh lá mạ ở bước sóng 358 - 461nm. Tiêu bản cần bọc giấy bạc cất ở từ -20°C, tránh ánh sáng.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Sàng lọc dòng tế bào sinh kháng thể đơn dòng kháng đặc hiệu kháng nguyên VP28

Tế bào lai (hybridoma) giữa tế bào myeloma với

tế bào lympho B kháng VP28 được đánh thức từ Nitrogen lỏng và nuôi trong môi trường RPMI 1640 có bổ sung 10% FBS. Sau khi phát triển ổn định, các tế bào này được kiểm tra khả năng sinh kháng thể bằng phản ứng ELISA (Hình 1A). Tuy nhiên, kháng thể do các tế bào lai sản sinh ra vẫn là kháng thể đa dòng, vì vậy cần tiến hành tách dòng tế bào. Quá trình tách dòng được thực hiện bằng phương pháp pha loãng tới hạn sao cho có 1 tế bào /giếng, kết quả thể hiện ở (Hình 1B).



Hình 1. Tế bào lai được đánh thức từ Nitro lỏng (A) Tế bào đơn dòng sau 7 ngày nuôi cấy (B).

Bảng 1. Giá trị OD<sub>450nm</sub> trong các giếng nuôi cấy.

TT	Đĩa V1		Đĩa V2		Đĩa V3	
	Ký hiệu giếng	OD <sub>450nm</sub>	Ký hiệu giếng	OD <sub>450nm</sub>	Ký hiệu giếng	OD <sub>450nm</sub>
1	P1A1	0,928 ± 0,072	P2A1	<b>1,692 ± 0,053</b>	P3A3	0,843 ± 0,046
2	P1A1	1,397 ± 0,042	P2A3	1,043 ± 0,031	P3B3	<b>1,633 ± 0,079</b>
3	P1A2	0,875 ± 0,082	P2A6	0,843 ± 0,042	P3B4	0,842 ± 0,075
4	P1C2	0,968 ± 0,113	P2D4	<b>1,685 ± 0,596</b>	P3C4	0,685 ± 0,048
5	P1D3	0,856 ± 0,054	P2D6	0,598 ± 0,088	P3C6	0,588 ± 0,030
6	P1D5	1,193 ± 0,149	P2G2	1,263 ± 0,058	P3D7	1,273 ± 0,025
7	P1D6	0,849 ± 0,025	P2G7	0,879 ± 0,067	P3E7	0,878 ± 0,102
8	P1E7	0,086 ± 0,120	P2E8	1,045 ± 0,063	P3E8	1,049 ± 0,031
9	P1F7	1,297 ± 0,091	P2E9	0,749 ± 0,161	P3F8	0,694 ± 0,042
10	P1G7	0,849 ± 0,052	P2F10	1,332 ± 0,103	P3F10	1,342 ± 0,103
11	P1G8	<b>1,852 ± 0,024</b>	P2F11	0,627 ± 0,092	P3G10	0,576 ± 0,043
12	P1G10	1,174 ± 0,104	P2G11	<b>1,683 ± 0,123</b>	P3G12	1,193 ± 0,112
13	P1H2	1,056 ± 0,064	<b>P2G12</b>	<b>2,085 ± 0,101</b>	P3H1	1,085 ± 0,001
14	P1H10	0,986 ± 0,086	P2H1	<b>1,522 ± 0,072</b>	<b>P3H4</b>	<b>2,185 ± 0,021</b>
15	P1H12	<b>1,808 ± 0,119</b>	P2H6	<b>1,504 ± 0,073</b>	P3H9	0,504 ± 0,063
16	ĐC âm	<b>0,051 ± 0,001</b>	ĐC âm	<b>0,049 ± 0,001</b>	ĐC âm	<b>0,062 ± 0,001</b>

**Ghi chú:** Các giếng được mã hoá bằng tên của giếng kèm theo số của đĩa thí nghiệm, ví dụ P1F7 đĩa thí nghiệm số 1 và giếng được kiểm tra là giếng F7.

Kết quả tách dòng cho thấy, trong 288 giếng thì 143 giếng có 1 tế bào/giếng chiếm tỉ lệ 49,65%. Các giếng có 1 cụm tế bào tiếp tục được nhân nuôi và thu

dịch nổi, sử dụng phương pháp ELISA để kiểm tra khả năng sinh kháng thể đơn dòng kháng VP28 của các giếng có 1 dòng tế bào/ giếng. Kết quả cho thấy,

trong tổng số 143 giếng có 45 giếng với giá trị OD<sub>450nm</sub> > 0,5 chiếm tỉ lệ 31,46% (thí nghiệm được lặp lại 3 lần).

Từ 45 dòng tế bào đã được lựa chọn, tiếp tục nuôi cấy và kiểm tra giá trị OD<sub>450nm</sub> để sàng lọc ra 10 dòng tế bào có khả năng sinh kháng thể đơn dòng kháng VP28 tốt nhất (Bảng 1). Cấy chuyển 10 dòng tế bào để lựa chọn 2 dòng tế bào có giá trị OD cao nhất, tương ứng sinh kháng thể đơn dòng tốt nhất. Kết quả 2 dòng tế bào P2G12 và P3H4 đã được lựa chọn.

### Sản xuất kháng thể đơn dòng kháng VP28 với lượng lớn

Có thể nói, kháng thể đơn dòng thu được từ dịch nuôi cấy thường rất tinh sạch, tuy nhiên, hàm lượng của chúng là rất thấp và nếu sử dụng để sản xuất các kit chẩn đoán thì không khả thi do giá thành rất cao. Trong khi đó, nếu sử dụng tế bào lai để gây bệnh trên chuột thì lượng kháng thể đơn dòng thu được thường cao gấp 100 – 1000 lần so với trong dịch nuôi cấy (Karsten và Rudolph, 1985). Do đó, từ kết quả nghiên cứu *in vitro*, 10 chuột thí nghiệm dòng BALB/c được tiến hành gây bệnh bằng

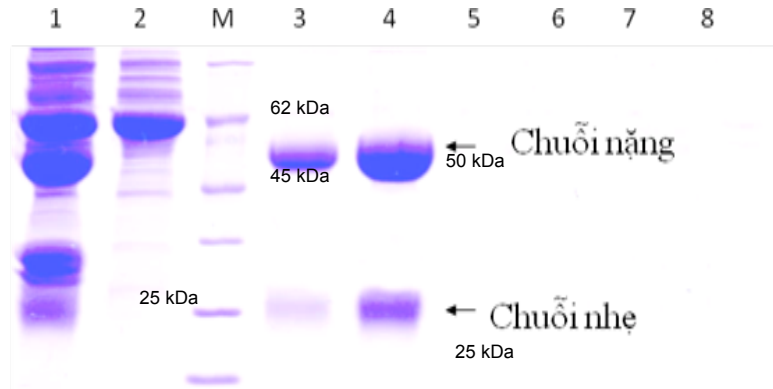
tế bào lai VP28 (theo Liddel và Cryer, 1993). Kết quả cho thấy có 5 chuột xuất hiện bệnh và thu được 36 ml. Dịch này được bảo quản ở 4°C trong 24h và sau đó thực hiện quá trình tinh sạch kháng thể.

### Tinh sạch kháng thể đơn dòng kháng VP28

Quá trình tinh sạch kháng thể đơn dòng được thực hiện theo kit tinh sạch kháng thể Propur kit của hãng Nunc. Theo đó, dịch bệnh được pha loãng 2 lần bằng đệm PBS pH 7. Sau quá trình tinh sạch thu được 52,92 ml kháng thể. Các sản phẩm này được điện di kiểm tra bằng SDS-PAGE, kết quả thể hiện ở hình 2.

Trên hình 2 cho thấy, trên đường 3 và 4 xuất hiện 2 băng kháng 50 kDa và 25 kDa tương ứng với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Điều này chứng tỏ, kháng thể đã được tinh chế nằm ở phân đoạn 1 và 2 (tương đương với mẫu trên đường 3 và 4). Hàm lượng kháng thể có trong dịch tinh sạch đã được xác định bằng phương pháp Bradford với nồng độ là 2,08 mg/ml.

Như vậy, lượng MAb-VP28 có trong 52,92 ml dịch bệnh tinh sạch là 110,07 mg.



**Hình 2.** Điện di đồ tinh chế kháng thể kháng VP28. 1: Dịch bệnh trước tinh chế; 2: Dịch qua cột; 3,4: các phân đoạn có kháng thể; 5 - 8 phân đoạn không có kháng thể.

### Phát hiện virus đốm trắng (WSSV) bằng phản ứng miễn dịch huỳnh quang (IFC)

#### Khảo sát nồng độ kháng thể

Kháng thể đơn dòng kháng VP28 (MAbs-VP28) sau khi tinh sạch và đưa về nồng độ 1 mg/ml, tiếp tục pha loãng ở nhiều nồng độ khác nhau và kiểm tra hiệu

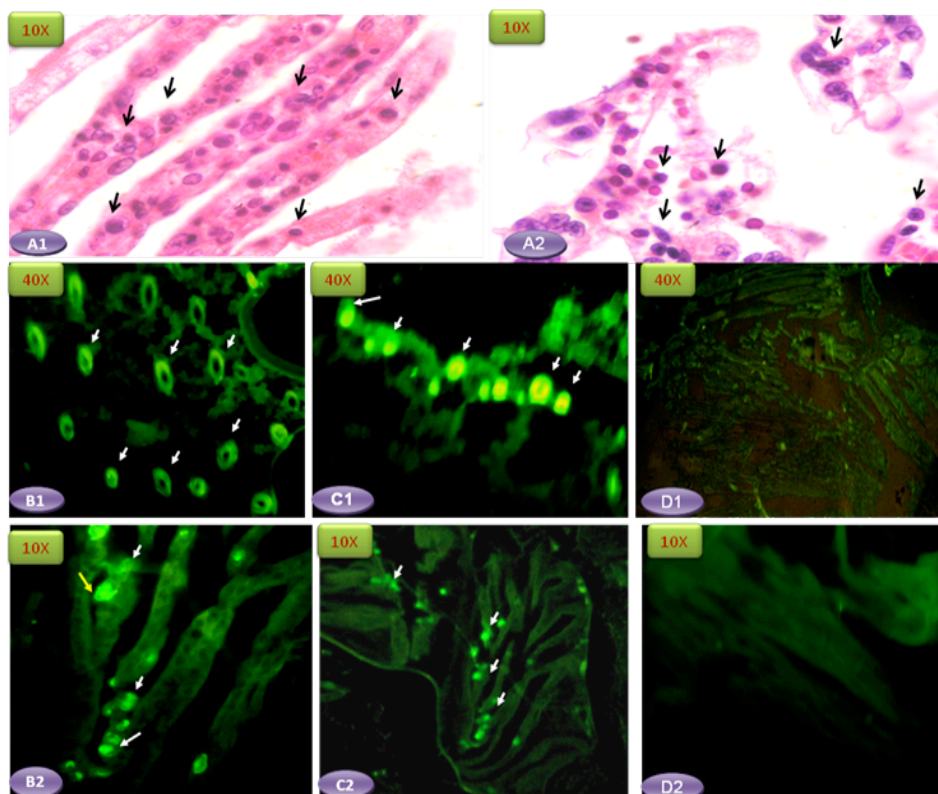
giá kháng. Kết quả phân tích hiệu giá kháng thể trong phản ứng Dotblot và ELISA cho thấy, hiệu giá kháng thể là 1 µg/ml. Từ kết quả này, trong IFC nồng độ mAb ban đầu được lựa chọn là 1 µg/ml (1X), sau đó kháng thể tiếp tục được pha loãng ở các nồng độ khác nhau để kiểm tra kết quả phản ứng. Từ bảng 2 cho thấy nồng độ kháng thể tối ưu để phát hiện WSSV là 0,5 µg/ml (2X).



**Bảng 2.** Kiểm tra kết quả các mẫu tôm nhiễm WSSV bằng IHC và IFC.

Thứ tự	Ký hiệu mẫu	PCR	Hóa mô	Miễn dịch huỳnh quang									
				Nồng độ mAb					Nồng độ FITC				
				1X	1,5X	2X	2,5X	3X	500	1000	1500	2000	2500
1	1683	+	++	+	+	+	-	-	++	++	++	+	-
2	1787	+	+	+	+	+	-	-	++	++	++	+	-
3	1661	+	+++	+++	+++	+++	-	-	++	++	+	+	-
4	1781	+	+	+	+	+	-	-	++	++	++	+	-
5	1536	+	+	+	+	+	-	-	++	++	++	+	-
6	1786	+	+	+	+	+	-	-	++	++	++	+	-
7	1318	+	+	+	+	+	-	-	++	++	+	+	-
8	1769	+	+	+	+	+	-	-	++	++	++	+	-
9	7568	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1764	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Chú thích X:** Pha loãng 1000 lần; (-) mức độ cảm nhiễm 0%; (+): trên 30%; (++): từ 30% -60%; (+++): trên 60% ).



**Hình 3.** Mô gan tụy tôm nhuộm IFC với mAb kháng VP28. A1): Lát cắt mô của đầu tôm sú nhiễm WSSV nhuộm HE; (A2): Lát cắt tổ chức lympho tôm tách tôm thẻ chân trắng nhiễm WSSV nhuộm HE. (B1): Lát cắt tổ chức lympho tôm sú nhiễm WSSV nhuộm IFC – MAbVP28; (B2): Lát cắt mang tôm sú WSSV nhuộm IFC- MAbVP28; (C1): Lát cắt lympho tôm thẻ nhiễm WSSV nhuộm IFC - MAbVP28 ; (C2): Lát cắt đầu tôm thẻ chân trắng nhiễm WSSV nhuộm IFC - MAbVP28; (D1): Lát cắt gan tụy tôm sú nhiễm MBV nhuộm IFC- MAbVP28 ; (B1): Lát cắt đầu tôm thẻ chân trắng nhiễm YHV nhuộm IFC- MAbVP28. **Chú thích:** Mũi tên chỉ thể vùi của WSSV; X chỉ độ phóng đại, 10X: 100 lần; 40X: 400 lần.

### **Khảo sát nồng độ chất hiển thị màu trong IFC**

Trong phản ứng IFC ngoài nồng độ kháng thể, nồng độ chất hiển màu cũng có vai trò rất quan trọng, bởi đây là những yếu tố có thể tạo nên hiện tượng dương tính hoặc âm tính giả. Vì vậy, nồng độ FITC cũng được khảo sát để tìm ra điều kiện tối ưu (Bảng 2).

Kết quả trong phản ứng IFC, hợp chất FITC khi pha loãng từ 500 -1500 lần tỷ lệ bắt màu nền rất cao, nồng độ FITC thích hợp nhất để thể ẩn có thể quan sát rõ là nồng độ pha loãng 2000 lần. Còn ở nồng độ 2500 thể vùi không xuất hiện.

### **Phát hiện virus đốm trắng trên tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*)**

Sau khi khảo sát nồng độ kháng thể và nồng độ hợp chất FITC tối ưu, tiến hành ứng dụng sinh phẩm này nhằm phát hiện WSSV trên tôm sú và tôm thẻ chân trắng. Các lát cắt của tôm nhiễm WSSV được xử lý và gắn với kháng thể đơn dòng kháng VP28 ở nồng độ 0,5 µg/ml và hợp chất FITC với nồng độ pha loãng 2000 lần so với nồng độ gốc ban đầu (Hình 3).

Kết quả hình 3 cho thấy các thể vùi bắt màu với hợp chất phát quang FITC sáng màu xanh lá mạ. Hình ảnh này cũng cho thấy nơi virus khu trú tập trung nhiều nhất là ở phần mang (Hình B1 và B2) và tổ chức lympho (Hình C1 và C2). Kháng thể đơn dòng kháng VP28 có khả năng phát hiện virus gây bệnh đốm trắng (WSSV) trên cả tôm sú và tôm thẻ chân trắng. Kết quả hình D1 và D2 cho thấy kháng thể đơn dòng này không phản ứng với mẫu tôm nhiễm MBV và YHV.

### **KẾT LUẬN**

Qua nghiên cứu kháng thể đơn dòng kháng WSSV, chúng tôi đã chọn lọc thành công 2 dòng tế bào lai P2G12 và P3H4 sản xuất kháng thể đơn dòng kháng VP28 - một protein vỏ của WSSV. Hàm lượng kháng thể thu được trong dịch báng là 2,08 mg/ml và nồng độ kháng thể tối thiểu để phát hiện WSSV trên mô bằng phương pháp miễn dịch miễn huỳnh quang (IFC) là 0,5 µg/ml với sự pha loãng hợp chất FITC là 2000 lần. Kháng thể đơn dòng kháng protein vỏ VP28 của WSSV có khả năng phát hiện WSSV một cách đặc hiệu trên cả tôm sú và tôm thẻ chân trắng.

**Lời cảm ơn:** Nhóm đề tài xin chân thành cảm ơn phòng Vi sinh phân tử, phòng Thử nghiệm sinh học và bệnh viện 103 đã tạo điều kiện giúp đỡ chúng tôi về thiết bị và kinh phí trong quá trình thực hiện các nghiên cứu này.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Anil TM, Shankar KM, Mohan CV (2002) Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. *Dis Aquat Org* 51: 67-65.

Chaivisuthangkura P, Tangkhabuanbutra J, Longyant S, Sithigorngul W, Rukpratanporn S, Menasveta P and Sithigorngul P (2004) Monoclonal antibodies against a truncated vira envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. *ScienceAsia* 30: 359-363.

Chou HY, CY Huang, CH Wang, HC Chiang and CF Lo (1995) Pathogenicity of a baculovirus infection causing White Spot Syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org* 23: 165-173.

Đỗ Thị Thảo, Đỗ Thị Phương, Đỗ Khắc Hiếu, Hà Thị Thu, Đinh Thương Vân, Đinh Duy Kháng, Lê Trần Bình (2008) Tạo dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng protein vỏ vp28 của virus gây bệnh đốm trắng trên tôm sú. *Tạp chí công nghệ sinh học* 6(2): 203-208.

Lightner DV (1996) (Ed.) A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World aquaculture society, Baton rouge, LA, USA.

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

Huang R, Y Xie, J Zhang, Z Shi (2005) A novel envelope protein involved in white spot syndrome virus infection. *J Gen Virol* 86: 1357–1361.

Karsten U, Rudolph M (1985) Monoclonal antibodies against tumor associated antigens: Mycoplasma as a major technical abstacle and its possible circumvention by azaserine selection medium. *Arch Geschwulstforsch* 55: 305-310.

Key M (2006) *Immunohistochemical staining methods, fourth edition*, Dako, Carpinteria, California

Liddell EJ, Cryer A (1991) *A practical guide to monoclonal antibodies*. Department of Biochemistry, University of Wales College of Cardiff, UK.

Liu W, Wang YT, Tian DS, Yin ZC, Kwang J (2002) Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp

by means of monoclonal antibodies (mAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). *Dis Aquat Org* 49: 11-18.  
Van Hulten MCW, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N,

Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, and Vlak JM (2001). White spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7-22.

## **DETECTION OF WHITE SPOT VIRUS (WSSV) IN SHRIMP BASED ON IMMUNOFLUORESCENCE TECHNIQUE**

**Nguyen Thị Giang An<sup>1, ✉</sup>, Dinh Duy Khang<sup>2</sup>, Ha Thi Thu<sup>2</sup>, Do Thi Thao<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Vinh University*

<sup>2</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### **SUMMARY**

White spot syndrome virus (WSSV), a member of a virus family Nimaviridae, has caused enormous economic loss in the shrimp farming industry. VP28 Antigen protein of WSSV was synthesized by recombination, monoclonal antibodies (mAbs) against recombinant VP28 have been investigated, in order to produce a test kit to detect quickly and accurately the shrimp WSSV. Hybridoma cell which produces an antibody resisting against recombinated VP28 protein is awaken by liquid Nitrogen and cultered in RPMI 1640 enviroment. The results of the selection process, from 288 cell wells, pointed out 143 single-cell wells, in which 45 wells can produce monoclonal antibodies. Continueing being choosen from given cells, two hybrid cell lines producing the highest VP28-antibody titer have been selected to induce ascites fluid in BALB/c mice. After purifying from ascites fluid, mAbs-VP28 monoclonal antibodies were obtained at 2.08 mg/ml concentration. Through immunofluorescence assay, the purified antibodies showed the ability to detect the WSSV at low concentration in *Penaeus monodon* and *Penaeus vannamei* tissues using immunofluorescence with FITC compound. The results could be obtained at the minimized concentration of antibodies of 0.5 µg/ml and FITC compound at 2000 times diluted. MAbs-VP28 monoclonal antibodies showed negative result in test for yellow head virus (YHV) and monodon baculovirus (MBV) infection in shrimp.

**Keywords:** *Hybridoma, Monoclonal antibodies, White spot syndrome virus, WSSV*

---

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