CLONING, EXPRESSION AND POLYCLONAL ANTIBODIES PRODUCTION AGAINST RECOMBINANT VP19 ENVELOPE AND VP26 CAPSID PROTEINS OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) IN BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*)

PHIROMSAK PHATTANAPAIJITKUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005

ISBN 974-04-6102-6
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การโคลน การแสดงออกและการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนเปลือกVP19และโปรตีนแคปซิด VP26ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (CLONING, EXPRESSION AND POLYCLONAL ANTIBODIES PRODUCTION AGAINST RECOMBINANT VP19 ENVELOPE AND VP26 CAPSID PROTEINS OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) IN BLACK TIGER SHRIMP, *PENAEUS MONODON*

ภิรมย์ศักดิ์ พัฒนไพจิตต์กุล 4537238 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: นิตยา ธรรมพาเลิศ, M.Sc., ไพศาล สิทธิกรกุล, Ph.D.,

ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร, Ph.D., ศิวาพร ลงยันต์, Ph.D., สมชัย อวเกียรติ, M.Sc.

บทคัดย่อ

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) เป็นสาเหตุหลักของโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ *(P. monodon*) ซึ่งพบการแพร่กระจายของโรคดังกล่าวในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วโลก ไวรัสชนิดนี้ถูกค้นพบในปี 1980 และพบการแพร่ระบาดอย่างรุนแรงในประเทศไทยในปี 1990 โดยสามารถติดต่อได้หลายช่องทางทั้งจากพ่อแม่พันธุ์และ สัตว์ที่ติดเชื้อสู่กุ้งโดยตรง การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในช่วงเริ่มแรกของการเพาะเลี้ยงเป็นวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัสชนิดนี้อย่างได้ผล การศึกษานี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณยีนโครงสร้างของโปรตีนส่วนเปลือก (VP19) ของไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยนำมาโคลนเข้าสู่ expression vector pMAL-C2 และนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 และสามารถสร้างโปรตีน MBP-VP19 ขนาด 55.5 kDa สำหรับยีนของโปรตีนส่วนแคปซิด (VP26) ของไวรัสชนิดนี้ที่อยู่ในรูปของ 6xHis-VP26 ได้ถูกนำมาใช้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเช่นกัน การเตรียม recombinant protein โดยอาศัยแบคทีเรีย *E. coli* สามารถผลิตโปรตีนปริมาณ 10 mg / l โปรตีนทั้งสองนี้เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตัดและสกัดโปรตีนจากแถบของ SDS-PAGE พบว่ามีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งเมื่อนำไปฉีดให้หนูขาวสำหรับการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีได้ โดยทำการตรวจสอบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนของไวรัสด้วยวิธี Western blot และ immunohistochemistry โดยโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวทั้งในรูปธรรมชาติและรูปที่เสียสภาพ นอกจากนี้ยังคาดว่าจะสามารถใช้ MBP-VP19 และ 6xHis-VP 26 ที่ผลิตได้ไปทดสอบความเป็นวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และในอนาคตสามารถนำ recombinant proteinsไปผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่เพิ่มความไวในการตรวจสอบไวรัส ควบคู่กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วน VP28 ที่มีอยู่แล้วโดยใช้วิธีทางอิมมิวโนวิทยาที่หลากหลายเช่น strip test หรือ ELISA ได้

69 หน้า. ISBN 974-04-6102-6

CLONING, EXPRESSION AND POLYCLONAL ANTIBODIES PRODUCTION AGAINST RECOMBINANT VP19 ENVELOPE AND VP26 CAPSID PROTEINS OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) IN BLACK TIGER SHRIMP, *PENAEUS MONODON*

PHIROMSAK PHATTANAPAIJITKUN 4537238 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: NITAYA THAMMAPALERD, M.Sc., PAISARN SITHIGORNGUL, Ph.D., PARIN CHAIVISUTHANGKURA, Ph.D., SIWAPORN LONGYANT, Ph.D., SOMCHAI AWAKAIRT, M.Sc.

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is the causative agent of white spot syndrome in black tiger shrimp (*P. monodon*) cultured worldwide, including Thailand. This virus was first reported in the 1980s, but major epidemics in Thailand were reported in the 1990s. WSSV transmission can occur both horizontally and vertically. Early detection of WSSV in infected *P. monodon* is an effective way to control WSSV epidemics in shrimp culture. The objective of this study was to produce polyclonal antibodies (PAbs) to detect white spot syndrome virus. Structural gene of envelope protein VP19 was cloned into expression vector (pMAL-C2) and expressed in *E. coli* (BL21) as a fusion protein, MBP-VP19 with a M.W. of 55.5 kDa. For WSSV capsid protein VP26, fusion protein with 6-histidine tag, 6 x His- VP 26, was used to generate polyclonal antibodies. The bacterial expression system allowed the production of 10 mg of purified recombinant proteins per liter of bacterial culture. Both recombinant proteins were used to immunize Swiss albino mice to produce polyclonal antibody. The WSSV-specific polyclonal antibodies were characterized by Western blot and immunohistochemistry and detected WSSV in both native and denatured forms. The MBP-VP19 and 6xhis-VP 26 proteins obtained from this project are useful for future vaccine development to prevent WSSV infection in shrimp farms. The recombinant protein will be used to produce monoclonal antibodies (MAbs) and used together with previous WSSV VP28 MAb to confirm and increase detection sensitivity in various immunoassays, including a simple immuno-based test kit (strip- test) and ELISA.

KEY WORDS; WHITE SPOT SYNDROME VIRUS / RECOMBINANT PROTEINS, VP19, VP26 / PABS-MABS / IMMUNOHISTOCHEMISTRY / PENAEUS MONODON

69 P. ISBN 974-04-6102-6