

**DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO
POLYHEDRIN OF MONODON BACULOVIRUS**

CHUMPHOL BOONSANONGCHOKYING

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

2005

ISBN 974-04-6211-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพลีฮีดรินของเชื้อโมโนดอนแบคคูลอไวรัสในกึ่งกลาคำ
(DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO POLYHEDRIN OF
MONODON BACULOVIRUS)

จุมพล บุญสนองโชคยิ่ง 4636282 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล, Ph.D., ไพศาล สิทธิกรกุล,
Ph.D., แสงจันทร์ เสนาปิ่น, Ph.D.

บทคัดย่อ

การสกัดโปรตีนโพลีฮีดริน (polyhedrin) ของเชื้อโมโนดอนแบคคูลอไวรัสในกึ่งกลาคำ (MBV) จากด้บบกึ่งกลาคำในระยะตัวอ่อน (post larvae, PL) โดยการปั่นตกตะกอนอย่างหนัก ด้วย 20-60% Urografin สามารถแยกแถบโปรตีนได้ที่ 50% Urografin เมื่อนำไปตรวจด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าสามารถสกัดโปรตีนโพลีฮีดรินบริสุทธิ์ที่มีอนุภาคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-23 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์หน้าหนักของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนหลักที่มีน้ำหนักประมาณ 58 กิโลดาลตัน ในงานวิจัยนี้จึงใช้โปรตีนโพลีฮีดรินบริสุทธิ์ที่สกัดได้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อใช้วินิจฉัยไวรัสบนพื้นฐานของอิมมูโนวิทยา โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มี 17 ชนิด พบว่าทั้งหมดทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 58 กิโลดาลตัน ของ MBV แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดอื่น (HPV, YHV, และ WSSV) นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบางชนิดสามารถนำมาตรวจหาโพลีฮีดรินของเชื้อโมโนดอนแบคคูลอไวรัสด้วยความไวสูงในระดับ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยวิธี dot blot และสามารถตรวจติดตามการติดเชื้อโมโนดอนแบคคูลอไวรัสในเนื้อเยื่อกึ่งกลาคำด้วยวิธี immunohistochemistry ดังนั้นการศึกษานี้ทำให้ได้วิธีในการวินิจฉัยกึ่งที่ติดเชื้อโมโนดอนแบคคูลอไวรัสด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา และคาดว่าจะสามารถนำโมโนโคลนอลที่ผลิตได้ไปเตรียมชุดตรวจสำเร็จรูปที่มีความไวเพื่อใช้ในการติดตามเชื้อโมโนดอนแบคคูลอไวรัสต่อไป

81 หน้า ISBN 974-04-6211-1

**DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO POLYHEDRIN OF
MONODON BACULOVIRUS****CHUMPHOL BOONSANONGCHOKYING 4636282 SCBT/M****M.Sc.(BIOTECHNOLOGY)****THESIS ADVISORS: TIMOTHY W. FLEGEL, Ph.D., PAISARN****SITHIGORNGUL, Ph.D., SAENGCHAN SENAPIN, Ph.D.****ABSTRACT**

Monodon baculovirus (MBV) is one member of the nucleopolyhedrosis virus (NPV) group that produces occlusion bodies that contain virions in epithelial cells of the hepatopancreas of the penaeid shrimp *Penaeus monodon*. The major constituent protein of occlusion bodies is polyhedrin. Polyhedrin protein of MBV was extracted from infected hepatopancreas of *P. monodon* post larvae using Urografin gradient ultracentrifugation. A fraction at 50% Urografin was examined by electronmicroscopy that contained purified-polyhedrin protein particles of 20-23 nm diameters. This fraction was also analyzed by SDS-PAGE and yielded a single band of purified-polyhedrin at a molecular weight of 58 kDa. Therefore, purified polyhedrin was used to produce monoclonal antibodies in order to provide an immunological tool for detection of the virus. Seventeen monoclonal antibodies were obtained and reacted with 58 kDa purified-polyhedrin MBV. All of the monoclonal antibodies were specific to MBV without cross-reactivity to other viruses (HPV, YHV, and WSSV) based on immunohistochemistry. The antibodies could be used to detect purified-polyhedrin with high sensitivity up to 0.2 µg/ml by dot blot assay. Moreover, antibodies could be used to detect MBV infection in tissue by immunohistochemistry. Therefore, this study provides an immunological tool for specific detection of MBV in infected shrimp. Further development of highly sensitive assays and convenient kits using these monoclonal antibodies for detection of MBV are in progress.

**KEY WORDS: IMMUNOHISTOCHEMISTRY/ MONODON BACULOVIRUS/
MONOCLONAL ANTIBODIES/ *PENAEUS MONODON*/
POLYHEDRIN**

81 P. ISBN 974-04-6211-1