THE DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY FOR DETECTION OF VIRAL INFECTION IN SHRIMP

SORASAK INTORASOOT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การพัฒนาการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง
(THE DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY FOR DETECTION OF VIRAL INFECTION IN SHRIMP)

สรศักดิ์ อินทรสูต 4637809 PYBS/D
ปร.ด (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์, Ph.D, Hiroyuki Tanaka, Ph.D, Yukihiro Shoyama, Ph.D

บทคัดย่อ

การระบาดของโรคจากเชื้อไวรัสเป็นสาเหตุสำคัญของการสูญเสียรายได้ในการเลี้ยงกุ้งของหลายประเทศ ในประเทศไทย โรคตัวแดงดวงขาวและโรคหัวเหลืองซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส White spot syndrome virus (WSSV) และ Yellow head virus (YHV) เป็นสาเหตุสำคัญของการระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากกุ้งที่ติดเชื้อไม่สามารถรักษาได้และยังไม่มีวัคซีนที่เหมาะสม วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือจะเป็นกลยุทธ์ที่มีประโยชน์อย่างมากต่อการควบคุมการติดเชื้อไวรัสในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง วิธีการตรวจโดยอาศัยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนบนเชื้อไวรัสจึงได้ถูกพัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด IgM ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเปลือก (gp116) ของไวรัส YHVได้ถูกคัดเลือกด้วยการทำเซลล์ลูกผสมระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคไวรัส YHV และยีนของแอนติบอดีในส่วน Variable ของ Light chain และ Heavy chain จากเซลล์ลูกผสมที่ได้ถูกนำมาเชื่อมต่อเป็น Single chain variable fragment (scFv) โดยให้มีการแสดงออกในแบคทีเรีย ความไวและความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและ scFv ได้ถูกประเมินด้วยวิธี ELISA, Dot blotting และ Western blot analysis เมื่อใช้ YHV บริสุทธิ์เป็นแอนติเจนสำหรับวิธี Indirect ELISA และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีพร้อมกับ scFv เป็นตัวตรวจสอบพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อไวรัส YHV ได้ถึงระดับต่ำที่สุดที่ 50 และ 45 นาโนกรัม และพบว่า scFV สามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ 24 ชั่วโมงหลังจากการฉีดเชื้อ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อไวรัสชนิดอื่น ค่าคงที่ของการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (K_A) ของโมโนโคลนอล และ scFV มีค่าประมาณ $1.42 \pm 0.72 \times 10^9$ และ $3.34 \pm 0.38 \times 10^8$ l/mol ตามลำดับ

ยีน VP28 ที่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัส WSSV ถูกเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR และเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ซึ่งแสดงออกในแบคทีเรีย เมื่อนำโคลนที่คัดเลือกไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์จากที่เคยมีรายงานใน GenBank อยู่ 2 ตำแหน่งคือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 114 (จาก A เป็น T) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 434 (จาก C เป็น T) จากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้มีการแปลรหัสกรดอะมิโนเปลี่ยนไปในตำแหน่งที่ 38 จากกรดกลูตามิกเป็นวาลีน และตำแหน่งที่ 145 จากโปรลีนเป็นลิวซีน ตามลำดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจากเซลล์ม้ามของหนู ซึ่งถูกกระตุ้นด้วนโปรตีน VP28 บริสุทธิ์ จากการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมด้วย Western blotting พบว่า 3 โคลนซึ่งผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน VP28 บริสุทธิ์และสามารถจับได้กับอนุภาคไวรัส WSSV ได้ถูกคัดเลือกและหนึ่งในนั้น (โคลน W10C9) ได้ถูกนำไปศึกษาต่อ ค่า K_A มีค่าประมาณ $2.32 \pm 0.38 \times 10^8$ l/mol การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าสามารถตรวจหาปริมาณของโปรตีน VP28 บริสุทธิ์และจากอนุภาคไวรัส WSSV ได้ที่ระดับต่ำที่สุดที่ 65 และ 300 นาโนกรัม ตามลำดับ

98 หน้า

THE DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY FOR DETECTION OF VIRAL INFECTION IN SHRIMP

SORASAK INTORASOOT 4637809 PYBS/D

Ph.D (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISOR: WICHET LEELAMANIT, Ph.D (Biochemistry and Molecular Biology), HIROYUKI TANAKA, Ph.D, YUKIHIRO SHOYAMA, Ph.D.

ABSTRACT

The outbreak of the several viral diseases has caused serious losses of shrimp aquaculture in many countries. In Thailand, White spot syndrome virus (WSSV) and Yellow head virus (YHV) are the major viruses that cause the pandemics with catastrophic loss in culture shrimp. Because of the inability to cure these diseases, the rapid and reliable detection methods may be the most useful strategies for controlling virus infection in shrimp farms. On that basis, antibody-based assay was developed in this study.

IgM subtype monoclonal antibody specific to YHV gp116 envelop glycoprotein was selected after the fusion of myeloma cells and mouse splenocytes administered by the purified YHV. Single chain variable fragment (scFv) was constructed from hybridomas and characterized for its properties. The sensitivity and specificity of monoclonal and scFv antibodies were demonstrated by ELISA, dot blotting and Western blot analysis. The detection limit of parent monoclonal antibody and scFv antibody analyzed with indirect ELISA were 50 and 45 ng of purified YHV, respectively. Moreover, dot-blot assays revealed that scFv antibody could detect YHV-infected shrimp at 24 h post-infection and also showed specific binding to YHV without cross reaction to other viruses tested. Binding affinity constant (K_A) of monoclonal and scFv antibodies was calculated to be $1.42 \pm 0.72 \times 10^9$ and $3.34 \pm 0.38 \times 10^8$ l/mol, respectively

The VP28 complete gene encoded the envelope protein of WSSV was amplified with PCR and cloned into pET28a expression vector. Two nucleotide changes obtained from sequencing, A114T and C434T, leading to missense mutations, E38V and P145L respectively, were identified. Monoclonal antibody was produced from mouse immunized with purified rVP28. Three hybridomas producing antibodies specific to both rVP28 and VP28 protein of WSSV analyzed by Western blotting were selected and one of these (clone W10C9) was characterized. Antibody subtyping indicated that W10C9 was IgG_{2a} kappa light chain. The K_A was calculated to be $2.32 \pm 0.38 \times 10^8$ l/mol. The detection limit analyzed by indirect ELISA was 65 ng for rVP28 and 300 ng for purified WSSV.

KEY WORDS: WHITE SPOT SYNDROME VIRUS/ YELLOW HEAD VIRUS/ SINGLE CHAIN VARIABLE FRAGMENT/ HYBRIDOMA

98 pp.