การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินสำหรับทดสอบระดับของฮอร์โมนยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งกุลาดำ

นายศิวาพร ลงยันต์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-249-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I [illegible] 17 ต.ค. 2545

PRODUCTION OF SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES TO VITELLIN AND VITELLOGENIN FOR ASSESSING GONAD INHIBITING HORMONE LEVELS IN THE GIANT TIGER PRAWN *Penaeus monodon* Fabricius

Mr. Siwaporn Longyant

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Marine Science
Department of Marine Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-334-249-4

Thesis Title	Production of specific monoclonal antibodies to vitellin and vitellogenin for assessing gonad inhibiting hormone levels in the giant tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius
By	Mr. Siwaporn Longyant
Department	Marine Science
Thesis Advisor	Professor Dr. Piamsak Menasveta
Thesis Co-advisor	Associate Professor Dr. Paisarn Sithigorngul
Thesis Co-advisor	Associate Professor Nitaya Thammapalerd

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor 's Degree

..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Lecturer Supichai Tangjaitrong, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Paisarn Sithigorngul, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Nitaya Thammapalerd, M.Sc.)

..... Member
(Associate Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Orawan Satayalai, Ph.D.)

..... Member
(Professor Uthairat Na-nakron, Ph.D.)

ศิวาพร ลงยันต์ : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินสำหรับทดสอบระดับของฮอร์โมนยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งกุลาดำ

(PRODUCTION OF SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES TO VITELLIN AND VITELLOGENIN FOR ASSESSING GONAD INHIBITING HORMONE LEVELS IN THE GIANT TIGER PRAWN *Penaeus monodon* Fabricius)

อ. ที่ปรึกษา : ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล, รศ.นิตยา ธรรมพาเลิศ, 126 หน้า. ISBN 974-334-249-4.

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อหน่วยย่อยของโปรตีนจากไข่แดงหรือไวเทลลิน (ในรังไข่) และไวเทลโลเจนิน (ในเลือด) ของกุ้งกุลาดำ ผลิตได้โดยใช้สารสกัดรังไข่จากรังไข่ที่เจริญเต็มที่ทั้งสภาพธรรมชาติและเสียสภาพธรรมชาติเป็นแอนติเจน แอนติบอดีเหล่านี้สามารถนำมาใช้ศึกษาลักษณะโมเลกุลของไวเทลลินและไวเทลโลเจนินของกุ้งชนิดนี้ได้ ไวเทลลินถูกสร้างครั้งแรกในรูปโปรตีนขนาด 74 และ 200 kD ก่อน และในระหว่างการเจริญเติบโตของรังไข่โปรตีนขนาด 200 kD จะถูกตัดเป็นโปรตีนหน่วยย่อยขนาด 104 และ 83 kD จากนั้นโปรตีนขนาด 104 kD จะถูกตัดต่อไปอีกเป็นโปรตีนขนาด 58 และ 45 kD ส่วนโปรตีนขนาด 74 kD ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ สำหรับไวเทลโลเจนินในเลือดจะพบโปรตีนขนาด 200, 104, 83 และ 74 kD แต่ไม่พบโปรตีนขนาด 58 และ 45 kD เลย

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินนั้นสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาระดับของไวเทลโลเจนินในเลือดด้วยวิธี indirect immunoperoxidase competitive ELISA เพื่อตรวจดูความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงไวเทลโลเจนินในเลือดระหว่างพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งซึ่งชักนำให้เกิดการพัฒนาของรังไข่โดยการตัดตาทั้ง 2 ข้าง พบว่าความสัมพันธ์ของระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับดัชนีของรังไข่ไม่สอดคล้องกันตลอดระยะพัฒนาการของรังไข่ ทั้งนี้เนื่องจากดัชนีของรังไข่และระดับไวเทลโลเจนินในเลือดในแต่ละระยะของพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งแต่ละตัวมีค่าความแปรปรวนสูงมาก อย่างไรก็ตามระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับระยะพัฒนาของรังไข่จะมีความสัมพันธ์กันอย่างมากโดยเฉพาะเมื่อตรวจสอบระดับไวเทลโลเจนินตลอดพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งแต่ละตัว ในกุ้งที่รังไข่อยู่ในระยะพักไม่สามารถตรวจระดับไวเทลโลเจนินได้จนกระทั่งรังไข่เริ่มต้นมีการพัฒนา ระดับของไวเทลโลเจนินจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและคงอยู่ในระดับสูงระหว่างที่รังไข่กำลังพัฒนาจนถึงระยะไข่สุก และระดับไวเทลโลเจนินจะลดลงอยู่ในระดับต่ำก่อนการวางไข่และในระยะวางไข่

จากการฉีดสารสกัดจากก้านตาให้กุ้งที่รังไข่อยู่ในระยะกำลังเจริญ พบว่าระดับไวเทลโลเจนินในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 2 ชั่วโมงและคงอยู่ในระดับสูงไม่เปลี่ยนแปลงระหว่าง 4-10 ชั่วโมง จากนั้นลดลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งการเพิ่มของระดับไวเทลโลเจนินจะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสารสกัดจากก้านตาที่ฉีดให้กุ้ง การเพิ่มของระดับไวเทลโลเจนินในเลือดหลังจากได้รับสารสกัดจากก้านตาอาจเกิดจากฮอร์โมนยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ (GIH) ชักนำให้มีการสลายตัวของไวเทลลินจากเซลล์ไข่ซึ่งคล้ายกับกรณีที่เกิดการสลายตัวของรังไข่ในกุ้งปกติเมื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการตรวจสอบฮอร์โมนยับยั้งพัฒนาการของรังไข่สามารถทำได้โดยการตรวจสอบจากการเพิ่มของระดับไวเทลโลเจนินหลังจากการฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในช่วงระยะเวลา 4-10 ชั่วโมง

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต .....ศิวาพร ลงยันต์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

3971881923 : MAJOR MARINE SCIENCE
KEY WORD: CRUSTACEAN / MONOCLONAL ANTIBODIES / *Penaeus monodon* / VITELLIN / VITELLOGENIN / GIH / VIH
SIWAPORN LONGYANT : PRODUCTION OF SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES TO VITELLIN AND VITELLOGENIN FOR ASSESSING GONAD INHIBITING HORMONE LEVELS IN THE GIANT TIGER PRAWN *Penaeus monodon* Fabricius
THESIS ADVISOR : PROF. PIAMSAK MENASVETA, Ph.D.
THESIS COADVISORS : ASSOC. PROF. PAISARN SITHIGORNGUL, Ph.D., ASSOC. PROF. NITAYA THAMMAPALERD, M.Sc.,
126 pp. ISBN 974-334-249-4.

Monoclonal antibodies (MAbs) specific to subunits of yolk proteins, vitellin (in ovary) and vitellogenin (in haemolymph), of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* were generated using ovarian extract from gravid ovaries either native or denatured forms as immunogens. These antibodies were used for molecular characterization of vitellin and vitellogenin in this prawn species. Vitellin in ovary first appears as 74 and 200 kD proteins. During maturation processes the 200 kD protein is cleaved to generate 104 and 83 kD proteins, then the 104 kD is further cleaved into 58 and 45 kD proteins while the modification of the 74 kD protein was not observed. In haemolymph, vitellogenin appears as 200, 104, 83, and 74 kD proteins, whereas the 58 and 45 kD proteins were not detected.

Indirect immunoperoxidase competitive ELISA using monoclonal antibodies specific to vitellin and vitellogenin was applied for determination of vitellogenin levels in haemolymph in order to establish the relationship of vitellogenin fluctuations in the haemolymph during ovarian development. During ovarian development of prawns induced by bilateral eye-ablation, the correlation between haemolymph vitellogenin and gonado-somatic index (or ovarian index = OI) was not clearly demonstrated, due to the high variation of ovarian index and haemolymph vitellogenin levels at each stage of ovarian development among individual prawn. However, the relationship between haemolymph vitellogenin levels and stage of ovarian development are highly correlated especially when individual prawn was used throughout the process of ovarian development. The vitellogenin levels in haemolymph was undetectable during resting stage, then sharply elevated when ovary began to develop and remained at high levels during developing to ripe stages, and fallen down to low levels before spawning and spent stages.

The results from injection of eyestalk extract into prawn with developing ovary induced by bilateral eye-ablation revealed that haemolymph vitellogenin levels elevated sharply within 2 hr, reached the maximal levels and remained unchange during 4-10 hr, and slightly declined at 24 hr. These responses were directly proportional to the injected amount of the eyestalk extract. The elevation of haemolymph vitellogenin levels after the injection of eyestalk extract may be the result of desorption of vitellin from the oocyte during the degeneration induced by gonad inhibiting hormone (GIH) which is similar to that occur in intact prawns after they were reared in captivity. Therefore, it is possible to determine the GIH activity by determining the alteration of vitellogenin levels during 4-10 hr after the application of the tested samples.

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGMENT

First I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to my major advisor : Professor Dr. Piamsak Menasveta, co-advisors : Associate Professor Dr. Paisarn Sithigorngul, and Associate Professor Nitaya Thammapalerd, for their unfailing availability whenever problems arose during all the time of the course which make work possible. Their wise guidance in the way of learning will always be grateful.

My special thanks to my committees, Dr. Suphichai Tangjaitrong, Associate Professor Dr. Somkiat Piyatiratitivorakul, Assistant Professor Dr. Orawan Satayalai and Professor Dr. Uthairat Na-nakhron, for their constructive criticisms on and corrections of my thesis.

My special thanks and deep appreciation to Dr. Parin Chaivisuthangura for his great contribution editing of my thesis.

I would like to thank Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University and Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for providing the tissue culture facilities during the first two years. And Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University for providing all instruments for my research.

I would like to thank Mr. Uthai Panchang for his kind warmest friendship help in providing prawns and place for my experiments.

My additional thanks goes to Assistant Professor Dr. Weerawan Sithigorngul and all other members of laboratory at Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Prasarnmit : Nuchanath Kasemwong, Nanthika Panchan, Duangjai Ngamsom and Piyanart Kiatsomchai for actually helping me during moments of worrisome and depression and especially Panee Chaksangchaichot for her uncountable helps and cheerfulness.

I would like to thank the Thailand Research Fund (TRF) under supervision of Professor Dr. Piamsak Menasveta for the scholarship through the first three years of my course work, and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) for supporting this project to Associate Dr. Paisarn Sithigorngul.

Finally, I reserved a special thank to my family especially my parent for their permanent love, kindness, supports, encouragement and understanding.

CONTENTS

Page

Abstract in Thai iv
Abstract in English v
Acknowledgement vi
List of Tables ix
List of Figures xi

CHAPTERS

1. Introduction 1

2. Literature
   - Biology of *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 6
   - Morphology 6
   - External morphology of reproductive system 8
   - Ovarian development 9
   - Oogenesis 10
   - Characterization of vitellin and vitellogenin in decapod crustacean 14
   - Identification of GIH and GIH assay 20

3. Monoclonal antibodies production specific to vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon*
   - Introduction 27
   - Materials and Methods 28
   - Results 39
   - Discussion 50

4. Characterization of vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon* using monoclonal antibodies specific to vitellin subunits
   - Introduction 53
   - Materials and Methods 54

CONTENTS (Cont.)

Page

Results 59
Discussion 70

5. The assessment of gonad inhibiting hormone levels in the giant *Penaeus monodon*
   Introduction 75
   Materials and Methods 76
   Results 79
   Discussion 89

6. Summary 94

References 97

Appendices
   Appendix A : Original data from experiment in chapter V 108
   Appendix B : Buffer and reagent preparation 115
   Appendix C : Reagent preparation for hybridoma production 116
   Appendix D : Buffer and solution for PAGE, SDS-PAGE and Western blot analysis 118
   Appendix E : Buffers and solution for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 124
   Appendix F : Reagent for determination of isotypes and subisotypes of monoclonal antibodies Using antibody Captured on anti-Ig antibodies 125

Biography 126

List of Tables

Table Page

2.1 Molecular mass of vitellin and vitellogenin subunits reported in decapod crustacean species 23

2.2 Vitellogenesis or gonad inhibiting hormone (VIH or GIH) reported in decapod crustacean species 26

3.1 Characterization of monoclonal antibodies specific to vitellin and vitellogenin, and range of vitellin concentrations that can be detected by the monoclonal antibodies on competitive ELISA 48

3.2 Molecular mass of vitellin subunits for six penaeid shrimp species 49

4.1 Specificity of monoclonal antibodies tested by dot-blot and Western blot analyses obtained from this study (b) and compared to previous study (a) 67

4.2 Vitellin subunits found in individual prawn at various stages of ovarian development 68

4.3 Molecular mass of vitellin and vitellogenin subunits reported in six penaeid shrimp species 69

5.1 Haemolymph vitellogenin concentrations and ovarian index of *P. monodon* at various stages of ovarian development 88

5.2 Comparison of three different methods for determination of GIH activity 93

List of Tables (Cont.)

Table Page

1A The accuracy of competitive ELISA for determination of vitellogenin content in 2 haemolymph samples 108

2A Haemolymph vitellogenin levels of individual *P. monodon* at various stages of ovarian development 109

3A The haemolymph vitellogenin levels after eye ablation in *P. monodon* 112

4A Alteration of haemolymph vitellogenin levels in eye-ablated *P. monodon* after injection with 300 μl saline/prawn at 2-24 hr 113

5A Alteration of haemolymph vitellogenin levels in eye-ablated *P. monodon* after injection with extract from 3 eyestalks/prawn at 2-24 hr 113

6A Alteration of haemolymph vitellogenin levels in eye-ablated *P. monodon* after injection with extract from 2, 1 and 1/2 eyestalks/prawn at 2-10 hr 114

1D Preparation of separating gel and stacking gel 120

List of Figures

Figure Page

2.1 The giant tiger prawn, *Penaeus monodon* 7

2.2 Lateral view of giant tiger prawn, *Penaeus monodon* 7

2.3 External genitalia of male, petasma and female, thelycum of *Penaeus monodon* 8

3.1 Diagram of hybridoma production 33

3.2 Diagram of ELISA for screening method 34

3.3 Diagram of dot-blotting for screening method 35

3.4 Diagram of Western blot analysis for characterization of monoclonal antibodies 36

3.5 Diagram of competitive ELISA for determination of haemolymphvitellogenin levels 37

3.6 Diagram of sandwich ELISA for determination of antibody isotype and subisotype 38

3.7 Double immunodiffusion of five mouse anti-vitellin antisera against *P. monodon* ovarian extract (O), and male (M) and female (F) haemolymph 42

3.8 Screening results of monoclonal antibodies by dot-blot 43

List of Figures (Cont.)

Figure Page

3.9 PAGE and immunoblot analysis of *P. monodon* ovarian extract 44

3.10 SDS-PAGE and immunoblot analysis of *P. monodon* ovarian extract, female haemolymph and male haemolymph 45

3.11 SDS-PAGE and immunoblot analysis of isolated proteins from; PAGE-glycolipoprotein band, immunoprecipitation of ovarian extract and immunoprecipitation of female haemolymph 46

3.12 Competitive ELISA of PMV-11 (1), 15 (2), 22 (3) and 64 (4) monoclonal antibodies with various antigens; ovarian extract, female haemolymph, and male haemolymph 47

4.1 Screening results of 20 monoclonal antibodies by dot-blot against native and denatured antigens 62

4.2 Screening results of monoclonal antibodies by dot-blot against each vitellin subunit and the oocyte specific protein 63

4.3 PAGE and immunoblot analysis of *P. monodon* ovarian extract 64

4.4 SDS-PAGE and immunoblot analysis of *P. monodon* ovarian extract and female haemolymph 65

4.5 SDS-PAGE and immunoblot analysis of *P. monodon* ovarian extract prepared from different stages of development 66

List of Figures (Cont.)

Figure Page

5.1 Validation of specificity and sensitivity of competitive ELISA for determination of vitellogenin using combination of four monoclonal antibodies specific to each vitellin subunits 81

5.2 Haemolymph vitellogenin levels from individual prawn at different stages of ovarian development were compared with ovarian index 82

5.3 Comparison of average ovarian index and haemolymph vitellogenin levels at different stages of ovarian development 83

5.4 The relationship between haemolymph vitellogenin levels and ovarian development indicated by time after eye-ablation 84

5.5 Alteration of haemolymph vitellogenin levels during 0 to 24 hr after injection of eyestalk extract (3 eyestalks/prawn) or saline 85

5.6 Alteration of haemolymph vitellogenin levels during 0 to 10 hrs after injection of various doses of eyestalk extract or saline 86

5.7 Alteration of haemolymph vitellogenin levels at 4 hr after injection of various doses of eyestalk extract or saline 87