

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินสำหรับ  
ทดสอบระดับของฮอร์โมนยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ในกึ่งกุลาดำ



นายศิวพร ลงยันต์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-249-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

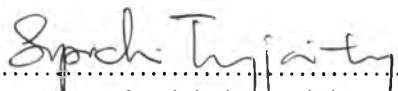
Thesis Title                      Production of specific monoclonal antibodies to vitellin and vitellogenin for assessing gonad inhibiting hormone levels in the giant tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius  
By                                      Mr. Siwaporn Longyant  
Department                 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

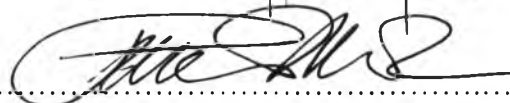
---

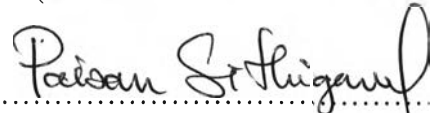
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor 's Degree

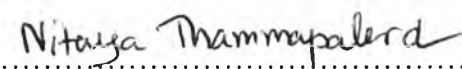
  
..... Dean of Faculty of Science  
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

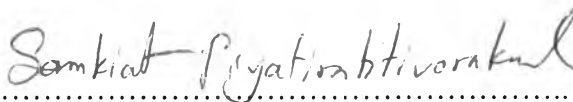
#### THESIS COMMITTEE

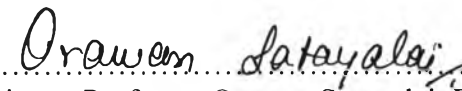
  
..... Chairman  
(Lecturer Supichai Tangjaitrong, Ph.D.)


  
..... 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 : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนิน สำหรับทดสอบระดับของฮอร์โมนยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งกุลาดำ

(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 เมณะเศวต, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล, รศ.นิตยา ธรรมพาลีศ, 126 หน้า. ISBN 974-334-249-4.

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อหน่วยย่อยของโปรตีนจากไข่แดงหรือไวเทลลิน (ในรังไข่) และไวเทลโลเจนิน (ในเลือด) ของกุ้งกุลาดำ ผลิตได้โดยใช้สารสกัดรังไข่จากกุ้งที่เจริญเต็มที่ทั้งสภาพธรรมชาติและเสียสภาพธรรมชาติเป็นแอนติเจน 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 เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงไวเทลโลเจนินในเลือดระหว่างพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งซึ่งชักนำให้เกิดการพัฒนาของรังไข่โดยการตัดตาทั้ง 2 ข้าง พบว่าความสัมพันธ์ของระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับดัชนีของรังไข่ไม่สอดคล้องกันตลอดระยะพัฒนาการของรังไข่ ทั้งนี้เนื่องจากดัชนีของรังไข่และระดับไวเทลโลเจนินในเลือดในแต่ละระยะของพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งแต่ละตัวมีค่าความแปรปรวนสูงมาก อย่างไรก็ตามระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับระยะพัฒนาการของรังไข่จะมีความสัมพันธ์กันอย่างมากโดยเฉพาะเมื่อตรวจสอบระดับไวเทลโลเจนินตลอดพัฒนาการของรังไข่ในกุ้งแต่ละตัว ในกุ้งที่รังไข่อยู่ในระยะพักไม่สามารถตรวจระดับไวเทลโลเจนินได้จนกระทั่งรังไข่เริ่มต้นมีการพัฒนา ระดับของไวเทลโลเจนินจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและคงอยู่ในระดับสูงระหว่างที่รังไข่กำลังพัฒนาจนถึงระยะไข่สุก และระดับไวเทลโลเจนินจะลดลงอยู่ในระดับต่ำก่อนการวางไข่และในระยะวางไข่

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

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล  
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล  
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต ..... ศิวาพร ลงยันต์ .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... มิถุนา ธรรมพาลีศ .....

# # 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

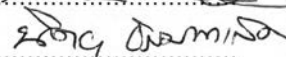
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล

ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต ..... ศิวาพร กองพันธ์ .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  .....

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
<b>CHAPTERS</b>	
1. Introduction .....	1
2. Literature	
Biology of <i>Penaeus monodon</i> 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 <i>Penaeus monodon</i>	
Introduction .....	27
Materials and Methods .....	28
Results .....	39
Discussion .....	50
4. Characterization of vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn <i>Penaeus monodon</i> 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 <i>Penaeus monodon</i>	
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 <i>P. monodon</i> 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 <i>P. monodon</i> at various stages of ovarian development .....	109
3A	The haemolymph vitellogenin levels after eye ablation in <i>P. monodon</i> .....	112
4A	Alteration of haemolymph vitellogenin levels in eye-ablated <i>P. monodon</i> after injection with 300 µl saline/prawn at 2-24 hr .....	113
5A	Alteration of haemolymph vitellogenin levels in eye-ablated <i>P. monodon</i> after injection with extract from 3 eyestalks/prawn at 2-24 hr .....	113
6A	Alteration of haemolymph vitellogenin levels in eye-ablated <i>P. monodon</i> 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, <i>Penaeus monodon</i> .....	7
2.2 Lateral view of giant tiger prawn, <i>Penaeus monodon</i> .....	7
2.3 External genitalia of male, petasma and female, thelycum of <i>Penaeus monodon</i> .....	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 <i>P. monodon</i> 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 <i>P. monodon</i> ovarian extract .....	44
3.10 SDS-PAGE and immunoblot analysis of <i>P. monodon</i> 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 <i>P. monodon</i> ovarian extract .....	64
4.4 SDS-PAGE and immunoblot analysis of <i>P. monodon</i> ovarian extract and female haemolymph .....	65
4.5 SDS-PAGE and immunoblot analysis of <i>P. monodon</i> 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