การผันแปรของไมโตคอนเดรียดีเอนเอ ในกุ้งก้ามกราม (Macrobrachium rosenbergii de Man)

นาย ปัญจา ใยถาวร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2532

ISBN 974-576-996-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015981
I17516109

MITOCHONDRIAL DNA VARIATION IN GIANT FRESHWATER PRAWN (*Macrobrachium rosenbergii* de Man)

Mr. Panja Yaitavorn

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Marine Science
Chulalongkorn University
1989

ISBN 974-576-996-7

Thesis Title	Mitochondrial DNA variation in giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii de Man)
By	Mr. Panja Yaitavorn
Department	Marine Science
Thesis Advisor	Associate Professor Sakol Panyim, Ph.D. Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D. Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman
(Professor Twesukdi Piyakarnchana, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Sakol Panyim, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Sanha Panichajakul,Ph.D.)

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

.....Member
(Assistant Professor Somkait Piyatiratitivorakul,Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ปัญจา ใยถาวร : การผันแปรของไมโตคอนเดรียดีเอนเอในกุ้งก้ามกราม (Macrobrachium rosenbergii de Man) (Mitochondrial DNA variation in giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii de Man) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ล่กล พันธุ์ยิ้ม รศ.ดร. สัณห์ พณิชย์กุล ค. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต 119 หน้า ISBN 974-576-996-7

ได้ทำการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรกุ้งก้ามกราม (Macrobrachium rosenbergii de Man) เพื่อจำแนกกลุ่มประชากรกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำต่าง ๆ ของประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ความผันแปรของไมโตคอนเดรียดีเอนเอ (mtDNA) ได้ทำการสกัด mtDNA จากตับ-ตับอ่อนของกุ้งก้ามกราม และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sau 3Al จะได้ชิ้น mtDNA สายสั้น ๆ ขนาดประมาณ 0.2 - 2.0 kb แล้วนำชิ้น mtDNA เหล่านี้ไปต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC12 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ Bam Hl หลังจากได้พลาสมิดสายผสมแล้ว ได้นำพลาสมิดสายผสมเหล่านี้เข้าสู่แบคทีเรีย E. coli JM107 การคัดเลือกพลาสมิดสายผสมโดยวิธี Colony hybridization และ Southern blot hybridization ได้พลาสมิดสายผสม 51 ชนิด จึงเลือกพลาสมิดสายผสมที่แสดงความจำเพาะสูงมาใช้เป็นตัวติดตามเพื่อวิเคราะห์ความผันแปรของ mtDNA ในกุ้งก้ามกรามต่อไป ปรากฏว่าพลาสมิดสายผสมหมายเลข 1 สามารถจำแนกกุ้งก้ามกรามออกได้เป็น 2 กลุ่มประชากรซึ่งมีถิ่นที่อยู่ที่แตกต่างกันทางภูมิศาสตร์ โดยจะแสดงความแตกต่างของขนาดชิ้น mtDNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) ระหว่างกุ้งก้ามกรามจากแม่น้ำบางปะกงและแม่น้ำกระบุรี เมื่อทำ Southern blot hybridization ด้วยพลาสมิดสายผสมหมายเลข 1 กุ้งก้ามกรามจากแม่น้ำบางปะกงจะแสดงแถบเข้มที่ 1.1 kb. ส่วนกุ้งก้ามกรามจากแม่น้ำกระบุรีจะแสดงแถบเข้มที่ 0.7 kb. กุ้งก้ามกรามจากฟาร์มกุ้งก้ามทองจะแสดงแถบเข้มเหมือนกุ้งก้ามกรามจากแม่น้ำบางปะกง

พลาสมิดสายผสมหมายเลข 1 มีชิ้น mtDNA ขนาด 1.1 kb. และมีตำแหน่งของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Rsa 1, Hha 1, Hae lll และ Bst Ul ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล
สาขาวิชา ชีววิทยาทางทะเล
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต ปัญจา ใยถาวร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผันแปรของไมโตคอนเดรียดีเอนเอในกุ้งก้ามกราม (Macrobrachium rosenbergii de Man)
ชื่อนิสิต	นาย ปัญจา ใยถาวร
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม
	รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล
	ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
ปีการศึกษา	2532

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรกุ้งก้ามกราม (Macrobrachium rosenbergii de Man) เพื่อจำแนกกลุ่มประชากรกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำต่าง ๆ ของประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ความผันแปรของไมโตคอนเดรียดีเอนเอ (mtDNA) ได้ทำการสกัด mtDNA จากตับ-ตับอ่อนของกุ้งก้ามกราม และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sau 3A1 จะได้ชิ้น mtDNA สายสั้น ๆ ขนาดประมาณ 0.2-2.0 kb แล้วนำชิ้น mtDNA เหล่านี้ไปต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC12 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ Bam H1 หลังจากได้พลาสมิดสายผสมแล้ว ได้นำพลาสมิดสายผสมเหล่านี้เข้าสู่แบคทีเรีย E. coli JM107 การคัดเลือกพลาสมิดสายผสมโดยวิธี Colony hybridization และ Southern blot hybridization ได้พลาสมิดสายผสม 51 ชนิด จึงเลือกพลาสมิดสายผสมที่แสดงความจำเพาะสูงมาใช้เป็นตัวติดตามเพื่อวิเคราะห์ความผันแปรของ mtDNA ในกุ้งก้ามกรามต่อไป ปรากฏว่าพลาสมิดสายผสมหมายเลข 1 สามารถจำแนกกุ้งก้ามกรามออกได้เป็น 2 กลุ่มประชากรซึ่งมีถิ่นที่อยู่ที่แตกต่างกันทาง -

ภูมิศาสตร์ โดยจะแสดงความแตกต่างของขนาดชิ้น mtDNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) ระหว่างกุ้งก้ามกรามจากแม่น้ำบางปะกงและแม่น้ำกระบุรี เมื่อทำ Southern blot hybridization ด้วยพลาสมิดสายผสมหมายเลข 1 กุ้งก้ามกรามจากแม่น้ำบางปะกงจะแสดงแถบเข้มที่ 1.1 kb. ส่วนกุ้งก้ามกรามจากแม่น้ำกระบุรีจะแสดงแถบเข้มที่ 0.7 kb. กุ้งก้ามกรามจากฟาร์มกุ้งก้ามทองจะแสดงแถบเข้มเหมือนกุ้งก้ามกรามจากแม่น้ำบางปะกง

พลาสมิดสายผสมหมายเลข 1 มีชิ้น mtDNA ขนาด 1.1 kb. และมีตำแหน่งของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Rsa 1, Hha 1, Hae 111 และ Bst U1 ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

PANJA YAITAVORN : MITOCHONDRIAL DNA VARIATION IN GIANT FRESHWATER PRAWN (MACROBRACHIUM ROSENBERGII DE MAN). THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SAKOL PANYIM, ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, PROF. PIAMSAK MENASVETA, Ed.D. 119 pp. ISBN 974-576-996-7.

A study on genetic variation in natural population of giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii de Man) was undertaken. The objective was to identify races of the prawn in different locations of Thailand. The study was base on analysis of mitochondria DNA (mtDNA) variation. The mtDNA was isolated from hepatopancreas of prawns and cut with restriction enzyme, Sau 3Al to generate DNA fragments ranging from 0.2-2.0 kb. These DNA fragments were cloned into vector pUCl2 at Bam Hl site and transformed into E. coli strain JM 107. After colony hybridization and Southern blot hybridization, fifty-one recombinant clones were obtained. These clones were further selected for strongly hybridized signal with α-^{32}P dATP labelled mtDNA, and used as probes to analyze mtDNA variation in prawns. The recombinant DNA No 1 could distinguish these prawns to two geographic populations. It showed significant difference in restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern of mtDNA between prawn from Kraburi River and Bangpakong River by Southern blot hybridization with recombinant DNA No 1. The prawns from Bangpakong River showed strong discrete band at 1.1 kb. but the prawns from Kraburi River showed the band at about 0.7 kb. By using this clone, RFLP pattern of Bangpakong River was similar to that from Kung Kam Thong Farm.

The recombinant DNA No 1 had inserted fragment about 1.1 kb. and had restriction endonuclease sites for Rsa 1, Hha 1, Hae lll and Bst Ul.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล
สาขาวิชา ชีววิทยาทางทะเล
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต ปัญจา ไยทาวร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Thesis Title	Mitochondrial DNA variation in giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii de Man)
Name	Mr. Panja Yaitavorn
Thesis Advisor	Associate Professor Sakol Panyim, Ph.D. Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D. Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.
Department	Marine Science
Academic Year	1989

Abstract

A study on genetic variation in natural population of giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii de Man) was undertaken. The objective was to identify races of the prawn in different locations of Thailand. The study was based on analysis of mitochondria DNA (mtDNA) variation. The mtDNA was isolated from hepatopancreas of prawns and cut with restriction enzyme, Sau 3A1 to generate DNA fragments ranging from 0.2-2.0 kb. These DNA fragments were cloned into vector pUC12 at Bam H1 site and transformed into E. coli strain JM 107. After colony hybridization and Southern blot hybridization, fifty-one recombinant clones were obtained. These clones were further selected for strongly hybridized signal with α-^{32}P dATP labelled mtDNA, and used as probes to analyze mtDNA variation in prawns. The recombinant DNA No 1 could distinguish these prawns to two geographic populations. It showed significant difference in

restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern of mtDNA between prawn from Kraburi River and Bangpakong River by Southern blot hybridization with recombinant DNA No 1. The prawns from Bangpakong River showed strong discrete band at 1.1 kb. but the prawns from Kraburi River showed the band at about 0.7 kb. By using this clone, RFLP pattern of Bangpakong River was similar to that from Kung Kam Thong Farm.

The recombinant DNA No 1 had inserted fragment about 1.1 kb. and had restriction endonuclease sites for Rsa 1, Hha 1, Hae 111 and Bst U1.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acknowledgements

I would like to express my sincere and deepest gratitude to my advisor, Dr. Sakol Panyim, and my co-advisor, Dr. Sanha Panichjakul and Dr. Piamsak Menasveta, for their supervision, valuable advice, encouragement and supports throughout this thesis.

I am very thankful to Dr. Somkeit Piyatherathitivarakul for his helpful and suggestion during the preparation of this thesis. Special thanks to Dr. Padermsak Jarayabhand for his constructive comments and criticisms.

My sincere appreciation to Miss Piengchan Rajkulchai for her suggestion, to Mr. Sukid Yasothornsrikul for his helpful advice. Thanks for all members at B. 309 and B. 315 for their helps, collaborations and sharing ideas during my work at the laboratory.

I would like to thank the Center of Molecular Genetics and Genetic Enginerring, Mahidol University for supporting all necessary facilities throughout this thesis.

Finally, I wish to express my deepest appreciation to my parents, Mr. Prayoon and Mrs. Jiemjit Yaitavorn for their unlimited love, continuous helps, encouragement and understanding throughout my studies.

This research was supported by The Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology and in parts by the Graduate School, Chulalongkorn University.

Content

Page

Abstract in Thai..... A

Abstract in English..... C

Acknowledgements..... E

List of Tables..... G

List of Figures..... H

Chapter

1 Introduction..... 1

2 Materials and Methods..... 9

3 Results..... 41

4 Discussion.....101

5 Summary.....109

References.....110

Vita.....119

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of tables

Table		Page
1	Size and Structure of mtDNA in some organism...	6
2	10x buffer for restriction enzyme digestion....	21
3	Restriction endonuclease enzyme used in this study.....	22

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figure		Page
1	Physical map of vector pUC12	24
2	Cloning strategy of mtDNA fragments of Macrobrachium rosenbergii in E. coli.....	27
3	Method of transfer DNA from agarose gel to nitrocellulose or nylon membrane (southern blot)	38
4	The crude mitochondria pellet was isolated by differential centrifugation	42
5	The purified mitochondria was isolated by sucrose gradient centrifugation	43
6	Kinetic of enzyme succinate dehydrogenase	45
7	A photograph under UV wavelength of the centrifuge tube showed band of DNA which was extracted by Cesium Chloride-Ethidium bromide gradient method	48
8	(A) Ethidium bromide staining pattern of two band DNA which was extracted by Cesium Chloride-Ethidium bromide gradient method and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis (B) Ethidium bromide staining pattern of two band DNA which was digested with various restriction enzymes and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis	50

9 Ethidium bromide staining pattern of mtDNA which was extracted by rapid alkaline method from crude mitochondria and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis 51

10 Ethidium bromide staining pattern of mtDNA which was extracted by rapid alkaline method from purified mitochondria and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis 52

11 Ethidium bromide staining pattern of mtDNA which was extracted by phenol extraction from crude mitochondria and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis 53

12 Ethidium bromide staining pattern of mtDNA which was extracted by phenol extraction from purified mitochondria and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis 54

13 Ethidium bromide staining pattern of mtDNA which was digested with some restriction enzymes and analyzed on 1.2% agarose gel electrophoresis 56

14 Two sample filters from autoradiogram of first colony hybridization with nick-translated mtDNA probe 60

15 Autoradiogram of second colony hybridization of 51 recombinant colonies with nick-translated mtDNA probe 62

16 Ethidium bromide staining pattern of recombinant DNA which was extracted by rapid alkaline method and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis 63

17 Ethidium bromide staining pattern of

recombinant DNA which was extracted by rapid alkaline method and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis 64

18 (A) Ethidium bromide staining pattern of recombinant DNA which was digested with Eco R1 and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated mtDNA probe 66

19 (A) Ethidium bromide staining pattern of recombinant DNA which was digested with Eco R1 and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated mtDNA probe 68

20 (A) Ethidium bromide staining pattern of recombinant DNA which was digested with Eco R1 and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated mtDNA probe 70

21 (A) Ethidium bromide staining pattern of recombinant DNA which was digested with Eco R1 and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated mtDNA probe 72

22 (A) Ethidium bromide staining pattern of recombinant DNA which was digested with Eco R1/Xba 1 and analyzed on 1.2% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated mtDNA probe 74

23 (A) Ethidium bromide staining pattern of mtDNA which was digested with various restriction enzymes and analyzed on 1.2% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated probe 1
(C) Autoradiogram of rehybridization from filter in panel (B) with nick-translated probe 45 77

24 (A) Ethidium bromide staining pattern of extracted mtDNA from each individual which was digested with Sau 3A1 and analyzed on 1.5% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated probe 1 and probe 45 79

25 (A) Ethidium bromide staining pattern of extracted mtDNA from each individual which was digested with Sau 3A1 and analyzed on 1.2% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated probe 1 81

26 (A) Ethidium bromide staining pattern of extracted mtDNA from each individual and analyzed on 0.7% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated probe 1 84

27 (A) Ethidium bromide staining pattern of extracted mtDNA from individual prawn of Bangpakong River which was digested with Sau 3A1 and analyzed on 1.2% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated probe 1 86

28 (A) Ethidium bromide staining pattern of extracted mtDNA from individual prawn of Bangpakong River which was digested with Sau 3A1 and analyzed on 1.2% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated probe 1 88

29 (A) Ethidium bromide staining pattern of extracted mtDNA from individual prawn of Kraburi River which was digested with Sau 3A1 and analyzed on 1.2% agarose gel electrophoresis
(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated probe 1 90

30 (A) Ethidium bromide staining pattern of

extracted mtDNA from individual prawn of Kraburi River which was digested with Sau 3A1 and analyzed on 1.2% agarose gel electrophoresis

(B) Autoradiogram of southern blot hybridization from gel in panel (A) with nick-translated probe 1 92

31 Ethidium bromide staining pattern of probe 1 which was digested with six nucleotide recognition restriction enzymes 95

32 Ethidium bromide staining pattern of probe 1 which was digested with four nucleotide recognition restriction enzymes 97

33 Ethidium bromide staining pattern of probe 1 which was double digested with restriction enzymes 99

34 The restriction map of probe 1 oriented in pUC12 starting from Bam H1 restriction site .. 100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย