การแยกและวิเคราะห์ลักษณะของไมโครแซเทลไลท์ดีเอ็นเอชนิดไดนิวคลีโอไทด์ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius

นางสาวชวนชม มวลประสิทธิ์พร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-717-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 6 มี.ค. 2544
I18271170

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DINUCLEOTIDE-MICROSATELLITE DNA IN *Penaeus monodon* Fabricius

Miss Chaunchom Maunpasitporn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Program of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-639-717-6

Thesis Title	ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DINUCLEOTIDE-MICROSATELLITE DNA IN PENAEUS MONODON Fabricius
By	Miss Chaunchom Maunpasitporn
Department	Biotechnology
Thesis Advisor	Anchalee Tassanakajon, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.

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

..... Dean of Graduate School

(Professor Supavat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

..... Member

(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ชวนชม มวลประสิทธิ์พร : การแยกและวิเคราะห์ลักษณะของไมโครแซเทลไลท์ดีเอ็นเอชนิดไดนิวคลีโอไทด์ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius
อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.อัญชลี ทัศนาขจร, อ. ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ
99 หน้า. ISBN 974-639-717-6

ไมโครแซเทลไลท์เป็น genetic markers ที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง จึงมีความสนใจที่จะหา genetic markers ชนิดนี้เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์กุ้งกุลาดำ โดยการแยกและวิเคราะห์ลักษณะของไมโครแซเทลไลท์ดีเอ็นเอในกุ้งกุลาดำ สร้างห้องสมุดยีน 2 แบบ ห้องสมุดยีน A ได้จากการตัดดีเอ็นเอกุ้งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I, *Rsa* I, *Hae* III และ *Hinc* II ห้องสมุดยีน B ได้จากการตัดดีเอ็นเอกุ้งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I และ *Rsa* I

จากห้องสมุดยีน A แยกได้โคลนที่ให้ผลบวกจำนวน 60 และ 225 โคลน จากโคลนที่ตรวจสอบทั้งสิ้น 5,250 และ 6,390 โคลน โดยใช้ $(CT)_{15}$ และ $(GT)_{15}$ เป็นตัวติดตาม ตามลำดับ แต่ไม่พบโคโลนีที่ให้ผลบวกเลยเมื่อใช้ $(AT)_{15}$ เป็นตัวติดตาม นำโคลนที่ให้ผลบวกกับตัวติดตาม $(CT)_n$ มาหาลำดับเบสพบไมโครแซเทลไลท์ 16 โคลน และเมื่อแบ่งเป็นชนิด พบว่ามีลักษณะเป็น perfect 2 โคลน, imperfect 12 โคลน และ compound 2 โคลน ส่วนโคลนที่ให้ผลบวกกับ $(GT)_n$ พบไมโครแซเทลไลท์จำนวน 76 โคลน แบ่งเป็น perfect 20 โคลน, imperfect 30 โคลน และ compound 26 โคลน ห้องสมุดยีน B ได้ โคลนที่ให้บวก121 โคลนจากโคลนที่ตรวจสอบ 2,400 โคลนโดยใช้ $(GT)_{12}$ เป็นตัวติดตาม พบไมโครแซเทลไลท์จำนวน 40 โคลน แบ่งได้เป็น perfect 11 โคลน, imperfect 17 โคลน และ compound 12 โคลน

จากการคำนวณพบว่าโดยเฉลี่ยในจีโนมของกุ้งกุลาดำจะพบ $(CT)_n$ และ $(GT)_n$ ในทุกๆ 164 และ 42 กิโลเบส ชนิดของไมโครแซเทลไลท์ที่พบมากคือ imperfect ใน $(CT)_n$ พบ 75.0% และ $(GT)_n$ พบ 39.5% ขนาดของไมโครแซเทลไลท์ที่พบมากที่สุดใน $(CT)_n$ คือ 12-17 และ $(GT)_n$ คือ 36-46 repeats แม้ว่าจะไม่พบโคลนที่ให้ผลบวก จากการใช้ $(AT)_{15}$ เป็นตัวติดตาม แต่เมื่อหาลำดับเบสกลับพบว่ามี $(AT)_n$ กระจายอยู่ทั้งใน $(CT)_n$ และ $(GT)_n$ ไมโครแซเทลไลท์ จากลำดับเบสของไมโครแซเทลไลท์โคลนที่ได้ นำมาออกแบบไพร์เมอร์ได้ 6 คู่ เพื่อดูความหลากหลายของไมโครแซเทลไลท์โดยเทคนิคพีซีอาร์พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ 2 คู่ ที่ให้ผลิตผล พีซีอาร์ตามที่คาดหวัง แต่ไม่สามารถนับจำนวนของอัลลีลได้อย่างชัดเจน

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต ชวนชม มวลประสิทธิ์พร
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C 827355 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: *Penaeus monodon* / Microsatellite DNA

CHAUNCHOM MAUNPASITPORN : ISOLATION AND CHARACTERZATION OF DINUCLEOTIDE-MICROSATELLITE DNA IN *Penaeus monodon* Fabricius. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph.D. THESIS COADVISOR : ASST. PROF. VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D. 99 pp. ISBN 974-639-717-6

Microsatellites have emerged as an important source of genetic markers for eukaryotic genomes. In this study, dinucleotide microsatellite sequences were isolated and characterized from the genome of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. Two partial genomic libraries; Library A from digestion of *P. monodon* genomic DNA with restriction enzmes, *Alu* I, *Rsa* I, *Hae* III and *Hinc* II and Library B from digestion with restriction enzymes, *Ala* I and *Rsa* I were constructed. For the Library A, 60 and 225 positive recombinants form 5,250 and 6,390 olones were found after screening with $(CT)_{15}$ and $(GT)_{15}$ probes, respectively, but no positive recombinants clones were found when $(AT)_{15}$ probe was used. Nucleotide sequencing of 16 $(CT)_n$ revealed 2 perfect, 12 imperfect and 2 compound microsatellites and of 76 $(GT)_n$, 20 perfect, 30 imperfect and 26 compound microsatellites were found. Library B, 121 out of 2,400 colonies were positive when hybridized with $(GT)_{16}$ probes and 40 clones contained microsatellites. From these clones, 11 perfect, 17 imperfect and 12 compound microsatellites were found.

On average, $(CT)_n$ and $(GT)_n$ microsatellites occur every 164 and 42 kb. The predominant category of *P. monodon* $(CT)_n$ and $(GT)_n$ was imperfect repeats; 75% and 39.5%, respectively. The most common size class was an array of 12-17 repeats for $(CT)_n$ and that of 36-46 repeats for $(GT)_n$. Although, positive recombinant clones were not found using $(AT)_{15}$ probes but the repeats of $(AT)_n$ were found with $(CT)_n$ and $(GT)_n$ microsatellites. Among 6 pairs of microsatellite primers surveyed, two produced expected PCR product but alleles were ambiguously scored.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต ชวเชษม มาลปัยสิถชัพร

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Acknowledgments

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajon for her guidance, supervision, encouragement and supports throughout my study.

I am very grateful to Assistance Professor Dr. Vichien Rimphanitchayakit for his great helps, guidances, and suggestions in laboratory techniques. I am also very thankful to Assistance Professor Dr. Tipaporn Limpaseni for her recommendation. The special thanks are also extended to Dr. Sirawut Klinbunga for his helps. I am very grateful to everybody of Hematology in Chulalongkorn Hospital And to Miss Arissara Puangmalee, Miss Warisa Tangjringjai, Miss Nadthanan Phusri, Miss Tanaporn Verapaditsin., Miss Kanniga Kadgangam, Miss Rungnapha Phasook, Miss Doungporn Srihanuntawong and Mr. Surachai Leephitakrat. Thanks are also expressed to and all my friends for the Biochemistry and Biotechnology department especially in R707, R708 and R709 for their helps in the laboratory and friendships that help me enjoy and happy through out my study. Collaboration and kindness the help me enjoy and happy throughout my study.

I am grateful to The Nasional Science and Technology Development Agency of Thailand (NSTDA).

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my mother and members of my family for their love, care, understanding and encouragement. extended throughout my study.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LISH OF TABLES x

LISH OF FIGURES xii

LISH OF ABBREVIATIONS xv

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

General Introduction 1

Distribution 2

Exploitation 4

Morphometric Variation Studies 7

Genetic Markers 9

1. Allozyme 9

2. Mitochondria DNA 10

3. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) 11

3.1 Satellites 12

3.2 Minisatellites 12

3.3 Microsatellites 13

II MATERIALS AND METHODS 18

Chemicals and Materials 18

1. Samples 20

2. DNA extraction 20

3. Agarose Gel Electrophoresis 22

4. Measurement of DNA Concentration 22
5. Construction of Genomic Libraries from *P.monodon* 23
5.1 Library A 23
5.1.1 Preparation of DNA framents for cloning 23
5.1.2 Ligation 24
5.1.3 Transformation 24
5.1.3.1 $CaCl_2$ method 24
5.1.3.2 Electroporation 25
5.1.3.2.1 Preparation of host cells 25
5.1.3.2.2 Electrotransformation 26
5.2 Library B 26
6. Screening of microsatellite DNA using colony hybridization 27
6.1 Colony blotting 27
6.2 End-labeling of the oligonucleotide $(CT)_{15}$ and $(GT)_{15}$ probes 27
6.3 Prehybridization and Hybridization 28
7 Characterization of microsatellite-containing clones by DNA sequencing 29
7.1 Preparation of plasmid DNA template for sequencing 29
7.2 Sequencing method 29
8 Polymorphism of *P.monodon* microsatellites 31
8.1 Primer design 31
8.2 Amplification of microsatellite loci through PCR 31
8.3 Preparation of the M13 sequencing marker 34
8.4 Electrophoretic analysis of amplified microsatellite DNA 35
III RESULTS 36
3.1 Giant tiger shrimp DNA extraction 36
3.2 Preparation of Restricted DNA fragments for cloning 36
3.3 Library construction and screening 40

3.3.1 Library A 40
3.3.2 Library B 40
3.4 Characterization of microsatellites in *P.monodon* 40
3.4.1 Type of microsatellite arrays from library A 40
3.4.2 Type of microsatellite arrays from library B 46
3.4.3 Distribution of microsatellite sequences 48
3.4.3.1 Distribution of (CT/AG)n sequence 48
3.4.3.2 Distribution of (GT/CA)n sequence 48
3.4.3.3 Repeat lengths 49
3.5 Polymorphism of microsatellites in *P.monodon* 53
IV DISCUSSION 75
V CONCLUSIONS 79
REFERENCE 80
APPENDIX 92
BIOGRAPHY 99

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LISH OF TABLES

Table **page**

1.1 Shrimp production from fisheries and aquaculture sectors and culture area in Thailand....3

1.2 World Cultured Shrimp Production : 1994-1996....4

2.1 Components of the sequencing mixes....32

3.1 Perfect microsatellites isolated from Library A using $(CT)_{15}$ as a probe....42

3.2 Imperfect microsatellites isolated from Library A using $(CT)_{15}$ as a probe....43

3.3 Compound microsatellites isolated from Library A using $(CT)_{15}$ as a probe...43

3.4 Perfect microsatellites isolated from Library A using $(GT)_{15}$ as a probe....43

3.5 Imperfect microsatellites isolated from Library A using $(GT)_{15}$ as a probe 43

3.6 Compound microsatellites isolated from Library A using $(GT)_{15}$ as a probe...44

3.7 Perfect microsatellites isolated from Library B using $(GT)_{15}$ as a probe 46

3.8 Imperfect microsatellites isolated from Library B using $(GT)_{15}$ as a probe....46

3.9 Compound microsatellites isolated from Library B using $(GT)_{15}$ as a probe ...47

3.10 Average distance in kb between (CT)n and (GT)n microsatellites in genome of invertebrate, various fish and mammal species compared to tiger prawn....51

3.11 Percentage of different categories and sizees of (CT)n and (GT)n microsatellites in honey bee, human, pig, Atlantic salmon, rainbow trout and Atlantic cod compared with giant tiger prawn genome....51

3.12 Nucleotide sequences of *P.monodon* microsatellite primers for amplification of loci by PCR from Library A....53

3.13 Nucleotide sequences of *P.monodon* microsatellite primers for amplification of loci by PCR from Library B....53

3.14 Optimization of PCR conditions for Pmo 195 locus....63

3.15 Microsatellite variation of Pmo195 locus in 24 unrelated individual prawn 64
3.16 Optimization of PCR conditions for Pmo 519 locus 71
3.17 Microsatellite variation of Pmo195 locus in 10 unrelated individual prawn 71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure **page**

1.1 Geographic distribution of *P.monodon* in Indo-West Pacific region 5

1.2 The life cycle of the giant tiger prawn, *P.monodon*, with stages in different abitat.....6

1.3 Lateral view of *P.monodon* showing important parts.....8

3.1 Ethidium bromide staining of extracted DNA from *P.monodon* pleopods ...37

3.2 Ethidium bromide staining patterns of one individual *P.monodon* DNA separately digested with restrition enzymes 38

3.3 Ethidium bromide staining of the recovered DNA fragments of 300-700 bp from low melting agarose el.....39

3.4 Autoradiographs of colony hybridization screening for microsatellites from *P.monodon* genomic library A 41

3.5 DNA sequences of perfect, imperfect and compound microsatellites 43

3.6 Frequency of different size classes of the longest uninterrupted (CT/AG)n microsatellite arrays from *P.monodon* from library A 50

3.7 Frequency of different size classes of the longest uninterrupted (GT/AG)n microsatellite arrays from *P.monodon* from library A.....50

3.8 Frequency of different size classes of the longest uninterrupted (GT/AG)n microsatellite arrays from *P.monodon* from library B 51

3.9 The nucleotide sequences of the microsatellite clone, Pmo 131 locus and the primers designed from the flanking regions 54

3.10 PCR amplification patterns of Pmo 131 locus from six unrelated individual *P. monodon* DNA 51°C annealing temperature under the standard PCR conditions. The M13 sequencing ladder was used as standard size marker 55

3.11 PCR amplification patterns of Pmo 131 locus from six unrelated individual *P. monodon* DNA 51°C annealing temperature under the standard PCR conditions. The M13 sequencing ladder was used as standard size marker 56

3.12 The nucleotide sequences of the microsatellite clone, Pmo 142 locus and the primers designed from the flanking regions 57

3.13 PCR amplification patterns of Pmo 142 locus from twelve unrelated individual P. monodon DNA at 49°C for the initial annealing temperature under the standard PCR conditions by using ^{32}P-labeled reverse primer. M13 sequencing ladder was used as standard size marker 58

3.14 The nucleotide sequences of the microsatellite clone, Pmo 195 locus and the primers designed from the flanking regions 60

3.15 PCR amplification patterns of Pmo 195 locus from 10 unrelated individual P. monodon DNA 51°C annealing temperature under the standard PCR conditions. Arrows indicated microsatellite alleles 61

3.16 PCR amplification patterns of Pmo 195 locus from 24 unrelated individual P. monodon DNA (lane 1-24) at 51°C annealing temperature under the standard PCR conditions. The M13 sequencing ladder was used as stardard size marker....62

3.17 The nucleotide sequences of the microsatellite clone, Pmo 517 locus and the primers designed from the flanking regions 65

3.18 PCR amplification patterns of Pmo 517 locus from 10 unrelated individual P. monodon DNA at 56°C for the initial annealing temperature under the standard PCR conditions....66

3.19 PCR amplification patterns of Pmo 517 locus from 12 unrelated individual *P. monodon* DNA by using ^{32}P-labeled forward primer at 51°C annealing temperature under the standard PCR conditions. The M13 sequencing ladder was used as standard size marker 67

3.20 The nucleotide sequences of the microsatellite clone, Pmo519 locus and the primers designed from the flanking regions.....69

3.21 A amplification patterns of Pmo 519 locus from 12 unrelated individual *P.monodon* DNA at 53°C annealing temperature under the standard PCR conditions. The M13 sequencing ladder was used as standard size marker 70

3.22 PCR amplification patterns of Pmo 519 locus from 10 unrelated individual *P. monodon* DNA at 55°C annealing temperature under the standard PCR conditions. The M13 sequencing ladder was used as standard size marker. An Arrow indicated microsatellite alleles.....72

3.23 The nucleotide sequences of the microsatellite clone, Pmo524 locus and the primers designed from the flanking regions.....73

3.24 PCR amplification patterns of Pmo 524 locus from 10 unrelated individual *P. monodon* DNA at 53°C for the initial annealing temperature under the standard PCR conditions 74

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	Degree celsius
µl	Microlitre (10^{-6} litre)
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
$CaCl_2$	Calcium chloride
ddH_2O	Deionized distilled water
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOF	Department of Fisheries
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (disodium salt)
HCl	Hydrochloric acid
kb	Kilobase pair (10^3 base pair)
kg	Kilogram
LB	Luria-Bertani medium
m	Meter
min	Minute
ml	Millilitre (10^{-3} litre)
MT	Metric Tonnes
mtDNA	Mitochondrial DNA
ng	Nanogram (10^{-9} gram)
O.D.	Optical Density
ppt	Part per ton
PCR	Polymerase chain reaction
Rnase	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec	Second

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SSC	Salt sodium citrate
T_A	Annealing temperaature
TE	Tris EDTA
Tris	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
V	Volt
VNTR	Variable number of tandem repeats

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย