


การพัฒนาการวิเคราะห์ไมโครเซตเทคโนโลยีดีเอ็นเอโดยใช้ไพรมอร์ไทด์เพื่อศึกษา
การแปรผันของยีนในนกยูงไทย



นางสาววารีย์ วุฒิวិถัยการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5531-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE DNA
ANALYSIS USING CHICKEN DERIVED PRIMERS FOR
STUDYING GENE VARIATION IN GREEN PEA FOWL**



Miss Waree Wutthivikaikan

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science**


Chulalongkorn University

Academic Year 2003


ISBN 974-17-5531-7

Thesis title Development of microsatellite DNA analysis using chicken
derived primers for studying gene variation in green peafowl
By Miss Waree Wutthivikaikan
Field of study Biotechnology
Thesis Advisor Associate Professor Wina Meckwichai


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



.....Dean of Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

Thesis Committee


.....Chairman
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Associate Professor Wina Meckwichai, M.Sc.)


.....Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)


.....Member
(Supat Chareonpornwattana, Ph.D.)

วาริ วุฒิวิทย์การ : การพัฒนาการวิเคราะห์ไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ไก่เพื่อศึกษาการแปรผันของยีนในนกยูงไทย (DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE DNA ANALYSIS USING CHICKEN DERIVED PRIMERS FOR STUDYING GENE VARIATION IN GREEN PEAFOWL) อ. ที่ปรึกษา : รศ. วิณา เมฆวิชัย 201 หน้า. ISBN. 974-17-5531-7

นกยูงไทยหรือนกยูงเขียว (*Pavo muticus imperator*) จัดเป็นสัตว์ป่าหายากใกล้สูญพันธุ์ของไทย เนื่องจากจำนวนประชากรที่ลดลง การใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสม เช่น ไมโครแซตเทลไลท์ สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับประชากรเพื่อใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในการจัดการวางแผนนกยูงอย่างมีประสิทธิภาพในระยะยาว ในการวิจัยนี้ดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้เพิ่มปริมาณไมโครแซตเทลไลท์จากนกยูงไทยถูกสกัดจากหยดเลือดแห้งจากสถานีวิจัยและเพาะพันธุ์สัตว์ป่าและสกัดจากขนที่เก็บได้จากแหล่งธรรมชาติ โดยพบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากหยดเลือดแห้งคือ วิธีสกัดจาก QIAamp® kit และจากโคนขนคือ วิธี Chelex® นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความเสื่อมสภาพของตัวอย่างหยดเลือดแห้งที่เก็บในเคสซิเคเตอร์นาน 3.5 ปี พบว่ายังสามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในขณะที่หยดเลือดแห้งที่เก็บในเคสซิเคเตอร์นาน 10 ปีไม่สามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซตเทลไลท์ได้ การเพิ่มปริมาณไมโครแซตเทลไลท์ ข้ามสายพันธุ์ในนกยูงไทยโดยการใช้ไพรเมอร์จากไก่ 23 คู่ นั้นพบว่าเมื่อปรับภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว ไพรเมอร์จากไก่ 14 คู่ (60.86%) สามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซตเทลไลท์ได้ ไพรเมอร์ไก่เพียง 2 คู่เท่านั้น (ADL23 and HUI2 primers) (8.70%) ที่ให้อัลลีลที่มีความแตกต่างกัน พบชุดซ้ำแบบ (CA)₄TA(CA)₂ ที่ตำแหน่งไมโครแซตเทลไลท์ ADL23 ในนกยูงไทยเพศเมียจากสถานีเพาะพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง และพบชุดซ้ำแบบ (A)_n ในนกยูงไทยเพศผู้และเพศเมียจากสถานีเพาะพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว ส่วนในไมโครแซตเทลไลท์ตำแหน่ง LEI80 พบชุดซ้ำแบบ (CA)₇ และในไมโครแซตเทลไลท์ตำแหน่ง HUI2 พบชุดซ้ำแบบ (CA)₅GA ในนกยูงไทยเพศผู้จากสถานีเพาะพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว เมื่อทำ Touchdown PCR สามารถลดอัลลีลที่ไม่จำเพาะ (non-specific bands) ในตำแหน่ง HUI2 ลงได้ นอกจากนี้ยังพบพอลิมอร์ฟิซึมในนกยูงจาก 7 แหล่ง (5 แหล่งจากธรรมชาติและ 2 แหล่งจากสถานีเพาะพันธุ์) ในกรณีของ RAPD พบเพียง ไพรเมอร์ 2 ไพรเมอร์ (ไพรเมอร์ 1 และ 13) จากการตรวจสอบไพรเมอร์ทั้งหมด 60 ไพรเมอร์นั้นให้อัลลีลที่มีความแตกต่าง ถึงกระนั้นก็ตามไพรเมอร์ 1 ยังคงให้ความแตกต่าง อัลลีลในระดับต่ำเมื่อศึกษาจากนกยูงไทย 7 แหล่ง

ภาควิชา.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372407023: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS: *Pavo muticus imperator*/ microsatellite/ RAPD/ chicken

WAREE WUTTHIVIKAIKAN : DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE
DNA ANALYSIS USING CHICKEN DERIVED PRIMERS FOR STUDYING
GENE VARIATION IN GREEN PEAFOWL. THESIS ADVISOR: ASSOC.
PROF. WINA MECKWICHAI, M. Sc., 201 pp.
ISBN 974-17-5531-7

Green peafowl (*Pavo muticus imperator*) was classified as an endangered species reflected from small population size in Thailand. The great variability in the number of repeats of microsatellite renders these markers suitable in genetic population study. Thus, microsatellite was used to investigate the genetic variation in critical for effective long-term management of natural populations. In this study, DNA templates from green peafowl for microsatellite amplification were extracted from collected bloodstains from wildlife and breeding stations and collected feathers from natural sources and the suitable DNA extraction method from bloodstain and feather specimens were QIAamp[®] kit and Chelex[®] method, respectively. For detecting degraded DNA samples, the 3.5-year-old bloodstain samples stored in a desiccator could give amplified PCR products, but the 10-year-old bloodstain samples could not give amplified PCR products. The cross-species amplification in green peafowl was developed by using 23 chicken primers. In optimal PCR condition, 14 primers (60.86%) could be successfully amplify PCR product, only 2 primers (ADL23 and HUI2) (8.70%) gave allelic polymorphism and the microsatellite motif of the female green peafowl in Phattalung wildlife research and breeding station at the ADL23 locus found to be (CA)₄TA(CA)₂ and at the same locus, (A)_n motif found in male and female green peafowl in Khao Soi Dao wildlife research and breeding station. At the LEI80 locus, (CA)₇ motif was found in male green peafowl in Khao Soi Dao wildlife research and breeding station. The (CA)₅GA motif was found at the HUI2 locus from male green peafowl in Khao Soi Dao wildlife research and breeding station. Touchdown PCR could reduce non-specific bands in the HUI2 locus and the high allelic polymorphism was found in green peafowl from 7 sites (5 from natural sources and 2 from breeding stations) at the HUI2 locus. In the case of RAPD, only 2 primers (the primer 1 and 13) from 60 screened primers showed genetic polymorphism. However, the primer 1 gave low allelic polymorphism in green peafowl from 7 sites.

Department.....-.....Student's signature.....*Waree Wuthivikaikan*
Field of study.....Biotechnology.....Advisor's signature.....*Wina Meckwichai*
Academic year.....2003.....Co-advisor's signature.....-.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my appreciation and gratitude to Associate Professor Wina Meckwichai, my impressive advisor for her encouragement and helpful guidance throughout this thesis.

My appreciation is also passed to Professor Dr. Siriwat Wonsiri, Associate Professor Siriporn Sittipraneed and Dr. Supat Chareonpornwattana for serving as thesis committee, for their available comments and also suggestions.

My special thanks are also extended to Dr. Jessada Denduangboripant for his encouragement, English correction and help on RAPD primer in this thesis.

I am really thankful to all my friends and sisters of the Biochemistry and Biology Department especially in R756, R618, R619, CBCB and bird gang for their helps in the laboratory and friendships that help me enjoy and happy through out my study.

This Thesis would not have been completed without Dr. Siriporn Pongsomboon, Dr. Premruethai Supungul, Miss kunlaya somboonwiwat, Miss Prapaipit Srimawong for worthy technique guidance in the laboratory and Miss Pattra Plubcharoensook, Miss Sirilak Arrathrakorn, Mr. Kobchai worapimpong for their techniques to stay in the wild and collect the feathers from the forest and Mr. Thiti Sukapan, Miss Sudthida Sudhtharmvilai for useful information of green peafowls at Khao Soi Dao wildlife research and breeding station and Mr. Ekarin Acchakunwisut for his understating, helping and encouragement extended throughout my study. I would like to send my deeply gratitude to them for everything during this study.

This research was supported by the Graduate school fund of Chulalongkorn University and Program of Biotechnology.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents and younger sister for their encouragement, unlimited love, care, and support throughout my life.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II: LITERATURE REVIEWS.....	9
CHAPTER III: MATERIALS AND METHODS.....	36
CHAPTER IV: RESULTS.....	67
CHAPTER V: DISCUSSIONS.....	128
CHAPTER VI: CONCLUSIONS.....	144
REFERENCES.....	146
APPENDICES.....	160
BIOGRAPHY.....	201

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Tables

	Page
CHAPTER III	
Table 3.1	Characteristics of all selected <i>Gallus gallus</i> microsatellite-flanking PCR primers.....53
Table 3.2	Annealing temperatures screened for each microsatellite primer loci.....57
CHAPTER IV	
Table 4.1	The ratio of OD _{260/280} and DNA concentration from blood specimens in three extraction methods.....74
Table 4.2	Optimal preincubation temperatures and times chosen for 23 microsatellite loci.....80
Table 4.3	Optimal annealing temperature chosen for 23 microsatellite primer loci82
Table 4.4	Optimal magnesium chloride concentration chosen for 23 microsatellite primer loci.....82
Table 4.5	Optimal of forward and reverse primers concentration chosen for 23 microsatellite loci.....86
Table 4.6	Optimized values of PCR components for 23 microsatellite loci92
Table 4.7	Optimized values of PCR profiles for 23 microsatellite loci93
Table 4.8	Amount and percentage of four microsatellite loci types.....102
Table 4.9	Concentration of each composition in RAPD-PCR reaction.....126

List of Tables (cont.)

	Page
CHAPTER III	
Table 4.10	Amount and percentages of 3 RAPD-PCR result types.....126
CHAPTER V	
Table 5.1	Level above which various solvents inhibit PCR.....135
Table 5.2	Overview details of DNA isolated protocols.....137



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

	Page
CHAPTER I	
Figure 1.1 Peafowl illustrations and peafowls were mentioned in many ways.....	2
Figure 1.2 Some reasons of declination of green peafowl population and peafowls in natural zoo.....	4
CHAPTER II	
Figure 2.1 Indian peafowl and green peafowl.....	11
Figure 2.2 Green peafowl (<i>Pavo muticus</i>).....	14
Figure 2.3 Distribution of the <i>Pavo</i> sp.....	16
Figure 2.4 Distribution of green peafowl (<i>Pavo muticus</i>) from Red Data Book.....	17
Figure 2.5 Mitochondrial genome of birds	27
Figure 2.6 Microsatellite DNA and flanking region.....	51
CHAPTER III	
Figure 3.1 Map of Thailand illustrating sample collection sites of <i>Pavo muticus imperator</i>	40
Figure 3.2 Location of <i>Pavo muticus imperator</i> in natural resources.....	41
Figure 3.3 Location of <i>Pavo muticus imperator</i> in Khao Soi Dao wildlife research and breeding station.....	42
Figure 3.4 Collected samples from <i>Pavo muticus imperator</i>	43
Figure 3.5 Temperature profile for all RAPD primers.....	65

List of Figures (cont.)

	Page
CHAPTER IV	
Figure 4.1	X-section at calamus of <i>Pavo muticus</i> feather by SEM.....68
Figure 4.2	L-section of <i>Pavo muticus</i> feather by SEM.....69
Figure 4.3	High magnification (x 2,000) of follicular layer in <i>Pavo muticus</i> feather by SEM.....70
Figure 4.4	Extracted genomic DNA from bloodstain and feather of <i>Pavo muticus</i>72
Figure 4.5	Extracted genomic DNA extraction and PCR product from blood specimens of <i>P. muticus</i> in two period.....76
Figure 4.6	Effects of short-term collection to genomic DNA extraction From blood specimen.....77
Figure 4.7	PCR products amplified form the ADL23 locus at various DNA template.....79
Figure 4.8	PCR products from the HUI12 locus at various annealing Temperatures.....83
Figure 4.9	PCR products from the ADL23 locus at various magnesium Concentrations.....84
Figure 4.10	PCR products from the ADL 102 locus at various primer concentrations87
Figure 4.11	PCR products from the MCW 305 locus at various dNTP concentrations89

List of Figures (cont.)

	Page
CHAPTER IV	
Figure 4.12 PCR products from the ADL 102 locus at various dNTP concentrations	90
Figure 4.13 PCR products amplified from the ADL 181 locus under the optimal PCR condition with an annealing temperature at 48 ⁰ C....	94
Figure 4.14 PCR products amplified from the ADL1021 locus under the optimal PCR condition with an annealing temperature at 47 ⁰ C....	95
Figure 4.15 PCR products amplified from the LEI80 locus under the Optimal PCR condition with an annealing temperature at 55 ⁰ C....	96
Figure 4.16 PCR products amplified from the HUI 2 locus under the Optimal PCR condition with an annealing temperature at 55 ⁰ C....	97
Figure 4.17 PCR products amplified from the ADL 23 locus under the Optimal PCR condition with an annealing temperature at 55 ⁰ C....	98
Figure 4.18 Touchdown PCR and normal PCR products amplified From the HUI2 locus.....	100
Figure 4.19 Selected PCR products of the ADL 23 locus for sequencing	108
Figure 4.20 The multiple alignment of the DNA sequences of PCR products at the ADL 23 locus.....	109
Figure 4.21 The multiple alignment of the DNA sequences of PCR products at the ADL 23 locus.....	110
Figure 4.22 Selected microsatellite PCR products of the LEI 80 locus and the HUI2 locus.....	111

List of Figures (cont.)

	Page
CHAPTER IV	
Figure 4.23 The multiple alignment of the DNA sequences of PCR products at the LEI80 locus.....	112
Figure 4.24 The multiple alignment of the DNA sequences of PCR products at the HUI2 locus.....	114
Figure 4.25 Alleles distribution of the ADL 23locus under optimal PCR condition with an annealing temperature at 55 ⁰ C.....	115
Figure 4.26 Alleles distribution of the HUI 2 locus under optimal PCR condition with an annealing temperature at 55 ⁰ C.....	116
Figure 4.27 Percentages of optimized annealing temperature, component concentrations and preincubation times of 23 microsatellite loci screened on <i>Pavo muticus</i>	127
Figure 4.28 RAPD-PCR product patterns from different template sources....	120
Figure 4.29 RAPD-PCR product patterns resulted from varoius template concentrations.....	121
Figure 4.30 RAPD-PCR product patterns from primer number 1.....	124
Figure 4.31 RAPD-PCR product patterns from primer number 13.....	125
Figure 4.32 Ghost bands RAPD-PCR from primer number 6.....	127

List of Abbreviations

AgNO ₃	silver nitrate
°C	degree celsius
µg	microgram
µl	microlitre
µM	micromolar
bp	base pair
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
dTTP	deoxythymidine triphosphate
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (disodium salt)
EtBr	ethidium bromide
kb	kilobase pair
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
mmol	millimole
ng	nanogram
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
RAPD	random amplified polymorphic DNA
rpm	revolutions per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
s	second
TBE	tris-boric-ethylene diamine tetraacetic acid
TE	tris EDTA
Tris	tris(hydroxy methyl)aminomethane