

การระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมออสโมลาริตีในกิ้งกูดดำ *Penaeus monodon*



นางสาวสุนมา อุดมเลิศปรีชา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN OSMOREGULATION
OF THE BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon***

Miss Suchonma Udomlertpreecha

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

Faculty of Science

Chulalongkorn University


Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University


491794

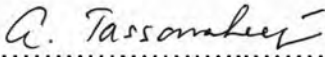
Thesis Title IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN
OSMOREGULATION OF THE BLACK TIGER SHRIMP
Penaeus monodon
By Miss Suchonma Udomlertpreecha
Field of Study Biotechnology
Thesis Advisor Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.
Thesis Co-advisor Siriporn Pongsomboon, Ph.D.

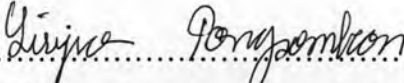
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree


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


Thesis Committee


..... Chairman
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Siriporn Pongsomboon, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)


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

ศุขมา อุดมเลิศปรีชา : การระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมออสโมลาริตีในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN OSMOREGULATION OF THE BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.อัญชลี ทศนาขจร, อ. ที่ปรึกษาร่วม ดร.สิริพร พงษ์สมบุรณ์ , 145 หน้า.

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค Differential Display PCR (DD-PCR) ในการระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมออสโมลาริตีในต่อมแอนเทนนาอล, เอพิโพไคท์ และเหงือก ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับความเครียดจากความเค็มของน้ำ โดยนำคู่ไพรเมอร์ oligo-dT และ arbitrary จำนวน 26 คู่ มาทำการตรวจสอบหาชิ้นที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างกุ้งกลุ่มควบคุมคือ กุ้งที่เลี้ยงที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน และกุ้งกลุ่มที่ได้รับความเครียดคือ กุ้งที่เลี้ยงในระดับความเค็มที่ 3 และ 40 ส่วนในพัน เป็นระยะเวลา 6, 24 ชั่วโมง และ 2 สัปดาห์ พบแถบ cDNA ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันทั้งหมด 97 แถบ ซึ่งมาจากไพรเมอร์ 17 คู่ นำแถบ cDNA เหล่านี้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วทำการโคลน cDNA ที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์ ทำการสุ่มเลือกโคลนและนำไปหาลำดับเบสบางส่วน จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของโคลนที่ได้พบว่า มี 129 แถบที่มีลำดับเบสไม่เหมือนกัน เมื่อนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่า มี 37 แถบที่มีลำดับเบสคล้ายกับยีนที่มีรายงานแล้ว โดย 22 แถบมีความคล้ายกับยีนที่ทราบหน้าที่, 6 แถบมีความคล้ายกับ ribosomal protein และ 9 แถบมีความคล้ายกับ hypothetical protein โดยในการศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกยีนที่น่าสนใจได้แก่ carbonic anhydrase, corin isoform 2, sarcolemmal associated protein 2, NIMA-family kinase Nek 7, karyopherin alpha 4, vacuolar protein sorting 18, CHK1 checkpoint, Rps 16 protein, integrin alpha, มี 5 ยีนที่มีความคล้ายกับ hypothetical proteins และ 9 ยีนซึ่งเป็นยีนที่ไม่ทราบหน้าที่ ทำการยืนยันการแสดงออกของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ซึ่งพบว่า มี 21 แถบ cDNA ที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำ ลำดับกรดอะมิโนของแถบ cDNA จำนวน 8 แถบ ที่เป็นยีนที่ไม่ทราบหน้าที่และตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเค็มของน้ำ ได้นำมาทำนายโดเมนโดยใช้โปรแกรม SMART และ Kyte-Doolittle hydrophathy plots พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของแถบ cDNA S5, S114 และ S126 มีบริเวณทรานสมเมมเบรน ยีนที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลง สภาวะความเค็มของน้ำที่ได้จากการศึกษานี้ มีความเป็นไปได้ที่จะเกี่ยวข้องกับระบบการควบคุมออสโมลาริตีในกุ้งกุลาดำ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....

ปีการศึกษา.....2549.....

ลายมือชื่อ นิสิต.....ศุขมา อุดมเลิศปรีชา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อัญชลี ทศนาขจร.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....สิริพร พงษ์สมบุรณ์.....

4772521223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
 KEY WORD : *Penaeus monodon* / DIFFERENTIAL DISPLAY PCR/
 OSMOREGULATION/ SEMI-QUANTITATIVE RT-PCR
 SUCHONMA UDOMLERTPREECHA : IDENTIFICATION OF GENES
 INVOLVED IN OSMOREGULATION OF THE BLACK TIGER SHRIMP
Penaeus monodon. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. ANCHALEE
 TASSANAKAJON, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: SIRIPORN
 PONGSOMBOON, Ph.D. 145 p.

Differential Display Polymerase Chain Reaction technique (DD-PCR) was used for the identification of genes involved in osmoregulation in antennal gland, epipodite and gill tissues of the salinity stressed *Penaeus monodon*. Shrimp reared at 25 ppt salinity as a control group were transferred to 3 and 40 ppt salinities for 6, 24 h and 2 weeks (stressed groups). Parallel comparison of stress and control DD-PCR profiles derived from 26 combinations of arbitrary and oligo-dT primer were performed to identify the differentially expressed genes. A total of 97 differentially expressed bands could be identified from 17 primer combinations. These bands were successfully reamplified, cloned and sequenced. A total of 129 unique sequences were found. Homology search showed that 37 different sequences significantly matched the GenBank database. Among the matched sequences, 22, 6 and 9 gene homologues were known genes, ribosomal proteins and hypothetical proteins, respectively. Twenty-three of 129 unique sequences including carbonic anhydrase, corin isoform 2, sarcolemmal associated protein 2, NIMA-family kinase Nek 7, karyopherin alpha 4, vacuolar protein sorting 18, CHK1 checkpoint, Rps 16 protein, integrin alpha, 5 hypothetical proteins and 9 unknown gene products, were selected for confirmation of their differential expression patterns using semi-quantitative RT-PCR. The RT-PCR results confirmed that 21 out of 23 cDNA fragments were regulated by salinity stress. Eight cDNA fragments of unknown genes regulated by salinity from RT-PCR analysis were predicted for domain homologies using SMART program and Kyte-Doolittle hydropathy plots. The results showed that the encoded peptide of S5, S114 and S126 cDNA fragments contained transmembrane regions. In summary, the salinity-responsive genes that were identified from this study are potentially involved in osmoregulation of *P. monodon*.

Field of study.....Biotechnology.....
 Academic year.....2006.....

Student's signature.....Suchonma Udomlertpreecha
 Advisor's signature.....A. Tassanakajon
 Co-advisor's signature.....Siriporn Pongsomboon

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajon and my co-advisor, Dr. Siriporn Pongsomboon for their guidance, supervision, encouragement and supports throughout my study. Additional great appreciation is extended to Associate Professor Dr. Aran Incharoensakdi, Assistant Professor Dr. Supat Charoenpornwattana, and Associate Professor Dr. Vichien Rimpantitchayakit, as being the committee for my thesis.

Dr. Suwit Wuthisuthimethavee as a great asset to this work whose guidance and supports throughout the years are greatly appreciated.

Thanks as well to all of my laboratory's members. The time being in the lab will always be the bigger part in my precious memory because of all of you.

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

I wish to acknowledge contributions of the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for my financial support.

CONTENTS

	Page
Thai Abstract.....	iv
English Abstract.....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	xi
List of Figures.....	xii
List of Abbreviations.....	xiv
Chapter I Introduction.....	1
1.1 General introduction.....	1
1.2 Taxonomy of <i>Penaeus monodon</i>	3
1.3 Morphology	4
1.4 Distribution.....	8
1.5 Life cycle.....	8
1.6 Osmoregulation of crustaceans.....	9
1.7 Mechanisms of osmoregulation.....	12
1.7.1 Free amino acids (FAAs).....	12
1.7.2 Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH).....	13
1.7.3 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	13
1.7.4 Carbonic anhydrase (CA).....	14
1.8 Osmoregulatory organs.....	14
1.9 Significance of osmoregulation mechanism in the black tiger shrimp.....	16
1.10. Differential Display PCR (DD-PCR).....	17
1.11 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)...	19
1.12 Prediction of domain proteins.....	21
1.13 Objectives of the thesis.....	22

	Page
Chapter II Material and Methods.....	23
2.1 Materials.....	23
2.1.1 Equipments.....	23
2.1.2 Chemicals and Reagents.....	24
2.1.3 Bacterial strains.....	26
2.1.4 Kits.....	26
2.1.5 Enzymes.....	26
2.2 Shrimp samples.....	27
2.3 Sample collection and total RNA preparation.....	27
2.4 Formaldehyde – agarose gel electrophoresis.....	28
2.5 DNase treatment of the total RNA samples.....	29
2.6 First-stranded cDNA synthesis.....	30
2.7 Differential Display PCR amplification.....	30
2.8 Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.....	34
2.8.1 Preparation of glass plate.....	34
2.8.2 Preparation of denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.....	34
2.8.3 Electrophoresis.....	35
2.9 Silver staining.....	35
2.10 Isolation of differentially expressed bands.....	36
2.11 Reamplification of the cDNA bands.....	36
2.12 Elution of DNA from agarose gel.....	36
2.13 Ligation of PCR product to vector.....	37
2.14 Transformation of the ligation product to <i>E.coli</i> host cells.....	39
2.15 Preparation of competent cell.....	39
2.16 Detection of recombinant clone by colony PCR.....	40
2.17 Plasmid extraction.....	40

	Page
2.18 DNA sequencing and data analysis.....	41
2.19 Expression confirmation of cDNA fragments of interest by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	42
2.19.1 PT-PCR amplification.....	42
2.19.2 Gel electrophoresis and quantitative analysis.....	43
2.20 Identification of domain proteins from unknown gene sequences.....	44
Chapter III Results.....	45
3.1 Tissues and total RNA preparation.....	45
3.2 Identification of functionally relevant genes controlling osmorality in <i>P. monodon</i> by using Differential Display PCR (DD-PCR).....	45
3.2.1 Differential Display PCR (DD-PCR) profiles.....	45
3.2.2 Reamplification and sequence analysis of differentially expressed bands.....	54
3.2 Confirmation of cDNA fragments of interest by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	57
3.3.1 Determination of condition parameters.....	57
3.3.2 Semi-quantitative RT-PCR.....	64
3.3.3 Identification of domain protein from unknown gene sequences.....	72
Chapter IV Discussions.....	78
4.1 Tissues for identification of genes controlling osmorality in <i>P. monodon</i>	78
4.2 Identification of functionally relevant genes controlling osmorality in <i>P. monodon</i> by using Differential Display PCR (DD-PCR).....	79

	Page
4.3 Analysis of expression by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)	81
4.3.1 RT-PCR technique for analysis of gene expression.....	81
4.3.2 Expression analysis of interested cDNA fragments and the possible function in osmoregulation under salinity stress....	83
Chapter V Conclusions.....	92
References.....	94
Appendices.....	116
Biography.....	145

LIST OF TABLES

	Page
Table 1.1 Thailand's exports of <i>P. monodon</i> in various countries...	1
Table 2.1 Differential Display primers* ; oligo(dT) (T) primers and arbitrary (P) primers	33
Table 3.1 Changes in mRNA level of differential display bands identified in the osmoregulation organs of salinity stressed <i>P. monodon</i>	49
Table 3.2 Gene specific primers for semi-quantitative RT-PCR	58
Table 3.3 Optimal conditions of gene specific primers for semi-quantitative RT-PCR.....	63
Table. 3.4 Relative expression patterns of group I determined by semi-quantitative RT-PCR	66
Table. 3.5 Relative expression patterns of group II determined by semi-quantitative RT-PCR.....	67
Table. 3.6 Relative expression patterns of group III determined by semi-quantitative RT-PCR.....	68
Table. 3.7 Relative expression patterns of group IV determined by semi-quantitative RT-PCR.....	69
Table. 3.8 Relative expression patterns of group V determined by semi-quantitative RT-PCR.....	70
Table. 3.9 Relative expression patterns of group VI determined by semi-quantitative RT-PCR.....	71

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1.1 The shrimp production in Thailand between 2002 to 2006 and the prediction in 2007.....	3
Figure 1.2 Lateral view of the external morphology of <i>Penaeus monodon</i>	7
Figure 1.3 Lateral view of the internal anatomy of a female <i>Penaeus monodon</i>	7
Figure 1.4 The life cycle of <i>Penaeus monodon</i>	9
Figure 1.5 Illustration of the synthetic way of the haemolymph osmoregulation in aquatic crustaceans.....	10
Figure 1.6 Illustration of differential display polymerase chain reaction (DD-PCR) to identify differentially expressed genes.....	18
Figure 1.7 Overview of the RT-PCR technique.....	20
Figure 2.1 Overview of the Delta Differential Display protocol....	32
Figure 2.2 The circular map of the pGEM®-T Easy vector showing sequence reference points (a) and the linear map showing promotor and multiple cloning sites (b).....	38
Figure 3.1 Total RNA isolated from antennal gland, epipodite and gill of control shrimp.....	47
Figure 3.2 A differential display PCR profile of salinity stressed shrimps.	48
Figure 3.3 Reamplification products of eluted DD-PCR bands with corresponding primer pairs.	56

	Page
Figure 3.4 Semi-quantitative RT-PCR of salinity stressed <i>P. monodon</i> showing examples of up- (a1, a2), down- (b1, b2), and no change (c1, c2) of gene expression.....	65
Figure 3.5 Kyte and Doolittle hydrophobicity/hydrophilicity plot analysis of predicted amino acid sequences from S5 cDNA sequence (a) and S56 cDNA sequence (b).....	73
Figure 3.6 Kyte and Doolittle hydrophobicity/hydrophilicity plot analysis of predicted amino acid sequences from S71 cDNA sequence (c) and S111 cDNA sequence (d).....	74
Figure 3.7 Kyte and Doolittle hydrophobicity/hydrophilicity plot analysis of predicted amino acid sequences from S112 cDNA sequence (e) and S114 cDNA sequence (f).....	75
Figure 3.8 Kyte and Doolittle hydrophobicity/hydrophilicity plot analysis of predicted amino acid sequences from S118 cDNA sequence (g) and S126 cDNA sequence (h).....	76
Figure 3.9 Kyte and Doolittle hydrophobicity/hydrophilicity plot analysis of predicted amino acid sequences from S129 cDNA sequence (i).....	77

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pair
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
DD-PCR	differential display PCR
DEPC	diethylpyrocarbonate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
dTTP	deoxythymidine triphosphate
EtBr	ethidium bromide
kb	kilobase
M	molar
mg	milligram
MgCl ₂	magnesium chloride
ml	millilitre
mM	millimolar
MT	metric ton
ng	nanogram
nm	nanometre
O.D.	optical density
oC	degree Celcius
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque forming unit
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse transcription
µg	microgram
µl	microlitre
µM	micromolar