การตรวจหาตัวติดตามทางพันธุกรรมที่แยกความแตกต่างของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ปกติและกุ้งกุลาดำทนโรคไวรัส โดยเทคนิค RAPD

นางสาวพจนีย์ ทุนสนธิ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-514-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION OF GENETIC MARKER BY RAPD TO DIFFERENTIATE NORMAL AND VIRAL DISEASE TOLERANCE BLACK TIGER PRAWNS *Penaeus monodon*

Miss Potchanee Hunsonti

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-331-514-4

Thesis title	**Identification of genetic marker by RAPD to differentiate normal and viral disease tolerance black tiger prawns *Penaeus monodon***
By	**Miss Potchanee Hunsonti**
Department	**Biochemistry**
Thesis Advisor	**Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon, 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 Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis committee

.....**Chairman**

(Asst. Prof. Tipaporn Limpaseni, Ph.D)

.....**Thesis Advisor**

(Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon, Ph.D)

.....**Member**

(Asst. Prof. Vichein Rimphanitchayakit, Ph.D)

.....**Member**

(Dr. Sirawut Klinbunga, Ph.D)

การพิมพ์เผยแพร่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง

พจนีย์ หุนสนธิ : การตรวจหาตัวติดตามทางพันธุกรรมที่แยกความแตกต่างของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ปกติและกุ้งกุลาดำทนโรคไวรัส โดยเทคนิค RAPD (IDENTIFICATION OF GENETIC MARKER BY RAPD TO DIFFERENTIATE NORMAL AND VIRAL DISEASE TOLERANCE BLACK TIGER PRAWNS *Penaeus monodon*) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อัญชลี ทัศนาขจร ; 129 หน้า. ISBN 974-331-514-4.

ทำการตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งกุลาดำทนโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยการคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสไม่จำเพาะทั้งสิ้น 42 ไพรเมอร์ ซึ่งมี 26 ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจะนำไปตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างกุ้งปกติ และกุ้งทนโรค พบว่า ไพรเมอร์ OPA-04 และ OPB-20 ให้แถบดีเอ็นเอที่พบในกุ้งปกติแต่ไม่พบในกุ้งทนโรค กล่าวคือ ไพรเมอร์ OPA-04 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 เบส และ ไพรเมอร์ OPB-20 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 คู่เบส เมื่อทำการเพิ่มจำนวนกุ้งจนครบ 20 ตัว พบว่า ไพรเมอร์ OPA-04 ยังคงพบแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ในกุ้งปกติทุกตัว ส่วน ไพรเมอร์ OPB-20 พบเพียง 12 ตัว จากตัวอย่างทั้งหมด 19 ตัว (63.2 เปอร์เซนต์) และจากการนำกุ้งปกติกลุ่มอื่นๆ คือกุ้งจากจังหวัด สตูล-ตรัง (เก็บตัวอย่างในปี 1997) ตราด และอ่างศิลา มาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ OPA-04 ผลปรากฏว่า กุ้งจากสตูล-ตรังที่เก็บในปี 1997 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ที่บางและไม่คมชัด สำหรับกุ้งกลุ่มอื่นไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอนี้

ทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส นำไปโคลนเข้าพลาสมิด pUC18 แล้วทรานฟอร์มเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย DH5α พบโคลนเบอร์ 28 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ตามต้องการ จากการนำชิ้นดีเอ็นเอนี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนได้ 469 เบสและนำไปเปรียบเทียบกับยีนอื่นๆ ที่มีรายงานไว้ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนใดๆ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาวิธีการตรวจที่จำเพาะต่อกุ้งกุลาดำปกติโดยเทคนิคพีซีอาร์ พบผลิตผลพีซีอาร์ขนาด 173 คู่เบสเฉพาะในกุ้งปกติ 80 และ 15 เปอร์เซนต์จากกุ้งสตูล-ตรังที่เก็บตัวอย่างในปี 1996 และกุ้งสตูลที่เก็บตัวอย่างในปี 1997 ตามลำดับ แต่ไม่พบในกลุ่มกุ้งทนโรคและกุ้งปกติกลุ่มอื่น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต พจนีย์ หุนสนธิ
สาขาวิชา ชีวเคมี	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อัญชลี ทัศนาขจร
ปีการศึกษา 2541	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C826202 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: *Penaeus monodon* / BLACK TIGER SHRIMP / RAPD / GENETIC MARKERS / VIRAL DISEASE TOLERANCE SHRIMP
POTCHANEE HUNSONTI : IDENTIFICATION OF GENETIC MARKER BY RAPD TO DIFFERENTIATE NORMAL AND VIRAL DISEASE TOLERANCE BLACK TIGER PRAWNS *Penaeus monodon*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph.D. 129 pp. ISBN 974-331-514-4.

Genetic differentiation between normal and white spot viral tolerance shrimps was examined using Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis (RAPD). Forty-two RAPD primers were screened and 26 primers which gave resolvable and reproducible RAPD patterns were selected. Two primers, OPA-04 and OPB-20, of 26 selected arbitrary primers showed different DNA bands which found only in normal shrimps but not in viral tolerance shrimps. For OPA-04 primer, DNA band with size about 800 bp was found in all normal samples. Amplification using OPB-20 showed a DNA band with size about 1,250 bp which existed only in 12 of 19 normal shrimps (63.2 %). Amplification of other geographically separated *P. monodon* using OPA-04 primer, showed only a faint band of 800 bp in samples from Satun-Trang collected later in 1997 but not in other normal groups. This fragment was further analyzed by cloning and sequencing.

The 800 bp fragment was cloned and transformed into *E. coli* DH5α. Clone no. 28 containing the desired 800 bp fragment was isolated and partially sequenced by the ABI-PRISM automated sequencer. Four hundred and sixty nine bases (58.6 %) were sequenced and then aligned to other genes in the GenBank using BLAST program. The sequence comparisons, nucleotides and amino acids, showed no similarity to any known genes or proteins. To test specificity of this fragment using PCR technique, the specific primers were designed from nucleotides of the 800 bp fragment and PCR amplification yielded a 173 bp product. The presence of a 173 bp fragment was found 80 % and 15 % in normal samples and Satun samples (collected in 1997), respectively. In viral tolerance samples and other normal groups did not showed this PCR product.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต พจนีย์ ฮุนสันธิ

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อัญชลี ตัสสนะคาจร

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and sincere to my advisor, Dr. Anchalee Tassanakajon, for her valuable advice, encouragement and kindness throughout the course of this study. I am indebted to Dr. Vichein Rimphanitchayakit for his worthly suggestion, patient proofreading and participating in the supervisory committee.

I am also very grateful to Dr. Sirawut Klinbunga for his suggestion for cloning technique and participating in the supervisory committee. My appreciation is extended to the members of Dr. Vichai Boonsaeng laboratory for their helps and suggestions in dot blot and Southern blot hybridization techniques.

Special thanks are given to all members in 604, 617, 707, 708 and 709 laboratories, Department of Biochemistry, Chulalongkorn University, for their helps and friendships during my study.

I would like to thank the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for financial support in my study and this work. My appreciation is extended to Shrimp Culture Research Center, Charoen Pokphand group of companies for providing viral tolerance *P. monodon*.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my parents and members of family for their unlimited love, understanding and encouragement.

Potchanee Hunsonti

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

PAGE

THAI ABSTRACT.....iv
ENGLISH ABSTRACT.....v
ACKNOWLEDGEMENTS.....vi
CONTENT.....vii
LIST OF TABLES.....ix
LIST OF FIGURES.....x
ABBREVIATIONS.....xii
CHAPTER 1 INTRODUCTION.....1
1.1 Taxonomy of *Penaeus monodon*.....1
1.2 Morphology.....2
1.3 Life Cycle.....4
1.4 Shrimp Cultured Production of Thailand.....4
1.5 Disease of *P. monodon* in Thailand.....6
1.6 Application of Molecular Techniques in Fisheries and Aquacultures.....16
1.7 The Polymerase Chain Reaction (PCR) and Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Techniques.....25
CHAPTER 2 MATERIALS and METHODS.....31
2.1 Equipments.....31
2.2 Chemical Reagents.....32
2.3 Enzymes.....33
2.4 Bacterial Strains.....33
2.5 Biological Materials.....33
2.6 DNA Isolation.....34
2.7 Primer Screening and Selection.....36
2.8 Isolation and Characterization of RAPD Marker.....37
2.9 Dot Blot Hybridization.....41
2.10 Southern Blot Hybridization.....43
2.11 DNA Sequencing and Analysis.....44

2.12 PCR Amplification of DNA Fragment Specific to Normal Shrimp....45
CHAPTER 3 RESULTS....46
3.1 DNA Isolation....46
3.2 Primer Screening and Selection....46
3.3 Detection of Differentiated RAPD Patterns between Normal and Viral Tolerance *P. monodon*....55
3.4 Dot Blot Hybridization of Genomic DNA of *P. monodon*....55
3.5 Cloning of 800 bp RAPD Marker....61
3.6 DNA Sequence Analysis of the 800 bp RAPD Marker....66
3.7 Specificity Test of the 800 bp Fragment....66
CHAPTER 4 DISCUSSION....85
CHAPTER 5 CONCLUSIONS....91
REFERENCES....93
APPENDIX....105
BIOGRAPHY....129

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

TABLES **PAGE**

1.1 World culture shrimp production: 1994 –1996.....7

1.2 Thailand's quarterly shrimp harvest.....8

1.3 Viruses in Penaeid shrimp cultivation with major economic impact.....10

1.4 Summary of the findings in recent SEMBV shrimp disease outbreaks in Asia.....15

3.1 Sequences of arbitrary primers used for primer screening.....48

3.2 Sequences of selected primers used to differentiate RAPD patterns between normal and viral tolerance *P. monodon*.....51

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FIGURES **PAGE**

3.10 RAPD patterns of reamplification of 800 bp eluted fragment using the oligonucleotide primer containing *Bam*H I site.....63

3.11 Ethidium bromide staining of recombinant clones on 0.7 % agarose gel.....64

3.12 Ethidium bromide staining of recombinant plasmids digested with *Bam*H I on 1.6 % agarose gel.....65

3.13 Analysis of the 800 bp DNA fragment by Southern blot hybridization using digoxigenin-labeled probe.....67

3.14 Sequencing of the 800 bp fragment using the ABI-PRISM automated sequencer.....68

3.15 Comparision of nucleotides of the 800 bp fragment using the ABI-PRISM automated sequencer with those deposited in the GenBank.....69

3.16 Sequence and alignment of amino acids deducde from the 800 bp fragment.....73

3.17 Ethidium bromide stained gel representing a 173 bp PCR product in normal *P. monodon*.....79

3.18 Ethidium bromide stained gel showing the absence of a 173 bp PCR product in viral tolerance *P. monodon* 81

3.19 Ethidium bromide staining of a 173 bp product of shrimps from Satun.....83

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURES **PAGE**

1.1 External anatomy of *P. monodon*.....3

1.2 Life cycle of penaeid shrimps.....5

1.3 The YHV syndrome of infected *P. monodon*.....12

1.4 Negatively stained YHV virions of *P. monodon* using TEM.....14

1.5 SEMBV infected *P. monodon* with broken antennae and circumscribed whitish spots or patches in the carapace.....17

1.6 TEM of negatively stained SEMBV virions. This virions were purified by urografin density centrifugation from hemolymph samples.....18

1.7 Representation of DNA categories.....23

1.8 Diagrammatic representation of the cycles of the polymerase chain reaction (PCR).....27

3.1 Ethidium bromide stained gel showing high molecular weigth genomic DNA of *P. monodon*.....47

3.2 Amplification patterns of *P. monodon* genomic DNA using various RAPD primers.....53

3.3 Amplification patterns of *P. monodon* genomic DNA using the selected primer, OPA-18.....54

3.4 RAPD patterns of normal and viral tolerance *P. monodon* using primers OPA-02 and OPA-04.....56

3.5 RAPD patterns of normal and viral tolerance *P. monodon* using primers OPB-18 and OPB-20.....57

3.6 RAPD patterns of normal and viral tolerance *P. monodon* using primer OPA-04.....58

3.7 RAPD patterns of normal and viral tolerance *P. monodon* using primer OPB-20.....59

3.8 RAPD patterns of geographically different *P. monodon* using OPA-04.....60

3.9 Dot blot hybridization of genomic DNA of *P. monodn* using the Dig-labeled 800 bp fragment as a probe (B-G contained 2.0 µg of genomic DNA).....62

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	=	base pair
°C	=	degree celcius
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanine triphosphate
dTTP	=	deoxythymine triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
Fig	=	figure
M	=	molar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
MT	=	metric ton
mtDNA	=	mitochondrial DNA
nDNA	=	nuclear DNA
ng	=	nanogram
nm	=	nanometre
O.D.	=	optical density
PCR	=	polymerase chain reaction
ppm	=	part per million
RAPD	=	randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
sec	=	second
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย