

การตรวจสอบตัวติดตามทางพันธุกรรมที่แยกความแตกต่างของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ปกติและกุ้งกุลาต่ากันโรคไวรัส โดยเทคนิค RAPD

นางสาวพจน์ยิ่ง หุนสนธิ



สถาบันวิทยบริการ  
อุปกรณ์ทดสอบทางวิทยาศาสตร์  
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต  
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

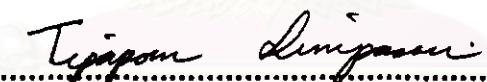
**Thesis Advisor** Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon, Ph.D

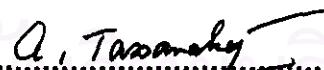
---

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

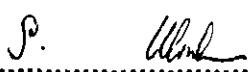
  
.....:.....Dean of Graduate School  
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

**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)

พนีญ หุนสนธิ : การตรวจหาตัวติดตามทางพันธุกรรมที่แยกความแตกต่างของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ปกติและกุ้งกุลา死จากโรคไวรัส 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.

ทำการตรวจหาแบบดีเอ็นดีให้ความแตกต่างระหว่างกุ้งกุลาต่าปากติและกุ้งกุลาต่าจากโรคไวรัสตัวแอดวงข้าวด้วยเทคนิค Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยการคัดเลือกไฟรเมอร์ที่มีลักษณะไม่ซ้ำเพาะกั้งต้น 42 ไฟรเมอร์ ซึ่งมี 26 ไฟรเมอร์ที่เหมาะสมจะนำไปตรวจหาแบบดีเอ็นดีให้ความแตกต่างระหว่างกุ้งปากติ และกุ้งทันโรค พบว่า ไฟรเมอร์ OPA-04 และ OPB-20 ให้แผนกตีอีนและพับในกุ้งปากติแต่ไม่พบในกุ้งทันโรค ก่อวาร์ดี้ ไฟรเมอร์ OPA-04 ให้แผนกตีอีนและพับประมาณ 800 เมส และ ไฟรเมอร์ OPB-20 ให้แผนกตีอีนและพับประมาณ 1,250 คู่เบส เมื่อทำการเพิ่มจำนวนกุ้งจนครบ 20 ตัว พบว่า ไฟรเมอร์ OPA-04 ยังคงพับแบบดีเอ็นดีและพับในกุ้งปากติกด้วยตัว ส่วน ไฟรเมอร์ OPB-20 พบเพียง 12 ตัว จากตัวอย่างทั้งหมด 19 ตัว (63.2 เปอร์เซนต์) และจากการนำกุ้งปากติกลุ่มนี้ เดินทางจากจังหวัด สตูล-ตรัง (เก็บตัวอย่างในปี 1997) ตราด และอ่างศิลา มาตรวจสอบด้วยไฟรเมอร์ OPA-04 ผลปรากฏว่า กุ้งจากสตูล-ตรังที่เก็บในปี 1997 ให้แผนกตีอีนและพับ 800 คู่เบส ท่านงและไม่คุณชัด สำหรับกุ้งกลุ่มนี้ไม่ปรากฏแบบดีเอ็นดี

ทำการแยกชั้นดีเอ็นดีและพับ 800 คู่เบส นำไปโคลนเข้าพลาสมิด pUC18 แล้วทราบพอร์มนเข้าสู่เซลล์แบบที่เรียกว่า DH5 $\alpha$  พบโคลนเบอร์ 28 มีชั้นดีเอ็นดีและพับ 800 คู่เบส คาดการต้องการ จากการใช้ชั้นดีเอ็นดีและพับใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนใดๆ จากลักษณะนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาทำการออกแบบไฟรเมอร์เพื่อหาวิธีการตรวจที่สามารถต่อ กุ้งกุลาต่าปากติโดยเทคนิคพีซีอาร์ พบผลิตผลพีซีอาร์ขนาด 173 คู่เบสเฉพาะในกุ้งปากติ 80 และ 15 เปอร์เซนต์จากกุ้งสตูล-ตรังที่เก็บตัวอย่างในปี 1996 และกุ้งสตูลที่เก็บตัวอย่างในปี 1997 ตามลำดับ และไม่พบในกุ้งทันโรคและกุ้งปากติกลุ่มนี้

# สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# # 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  
สาขาวิชา... ชีวเคมี  
ปีการศึกษา 2541

ถ่ายมือชื่อนิสิต พญ.นร. ชุนสันติ  
ถ่ายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อรุณรัตน์ พันพูน  
แบบเรียนที่ออกอากาศวันที่ ๒๕๖๐ ๗ ๑๙

## 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*.

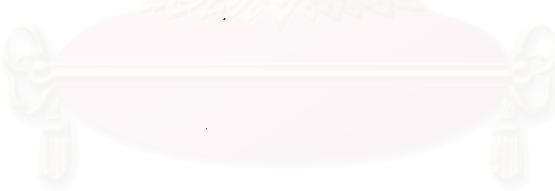
Finally, I would like to express my deepest appreciation to my parents and members of family for their unlimited love, understanding and encouragement.

Potchanee Hunsonti

## CONTENT

	PAGE
<b>THAI ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>ENGLISH ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>vi</b>
<b>CONTENT.....</b>	<b>vii</b>
<b>LIST OF TABLES.....</b>	<b>ix</b>
<b>LIST OF FIGURES.....</b>	<b>x</b>
<b>ABBREVIATIONS.....</b>	<b>xii</b>
<b>CHAPTER 1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Taxonomy of <i>Penaeus monodon</i> .....	1
1.2 Morphology.....	2
1.3 Life Cycle.....	4
1.4 Shrimp Cultured Production of Thailand.....	4
1.5 Disease of <i>P. monodon</i> 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
<b>CHAPTER 2 MATERIALS and METHODS.....</b>	<b>31</b>
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

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


  
 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 <i>P. monodon</i> .....	51

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**FIGURES****PAGE**

3.10 RAPD patterns of reamplification of 800 bp eluted fragment using the oligonucleotide primer containing <i>BamH I</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 <i>BamH I</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 <i>P. monodon</i> .....	79
3.18 Ethidium bromide stained gel showing the absence of a 173 bp PCR product in viral tolerance <i>P. monodon</i> .....	81
3.19 Ethidium bromide staining of a 173 bp product of shrimps from Satun.....	83

## LIST OF FIGURES

<b>FIGURES</b>	<b>PAGE</b>
1.1 External anatomy of <i>P. monodon</i> .....	3
1.2 Life cycle of penaeid shrimps.....	5
1.3 The YHV syndrome of infected <i>P. monodon</i> .....	12
1.4 Negatively stained YHV virions of <i>P. monodon</i> using TEM.....	14
1.5 SEMBV infected <i>P. monodon</i> 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 weight genomic DNA of <i>P. monodon</i> .....	47
3.2 Amplification patterns of <i>P. monodon</i> genomic DNA using various RAPD primers.....	53
3.3 Amplification patterns of <i>P. monodon</i> genomic DNA using the selected primer, OPA-18.....	54
3.4 RAPD patterns of normal and viral tolerance <i>P. monodon</i> using primers OPA-02 and OPA-04.....	56
3.5 RAPD patterns of normal and viral tolerance <i>P. monodon</i> using primers OPB-18 and OPB-20.....	57
3.6 RAPD patterns of normal and viral tolerance <i>P. monodon</i> using primer OPA-04.....	58
3.7 RAPD patterns of normal and viral tolerance <i>P. monodon</i> using primer OPB-20.....	59
3.8 RAPD patterns of geographically different <i>P. monodon</i> using OPA-04.....	60
3.9 Dot blot hybridization of genomic DNA of <i>P. monodn</i> 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