

การตรวจสอบลักษณะไมโครซัทเทลไลท์ดีเอ็นเอในจีโนมของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

นางสาวอมรรัตน์ ทิพย์ถาวรนุกูล



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-291-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE DNA IN GIANT
TIGER PRAWN *Penaeus monodon* GENOME**

Miss Amornrat Tiptawonnukul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

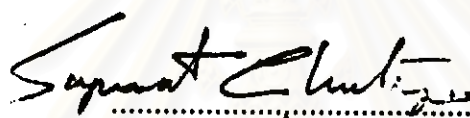
Chulalongkorn University

Academic Year 1996

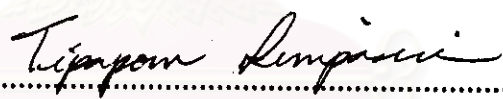
ISBN 974-636-291-7


Thesis Title Characterization of Microsatellite DNA in Giant Tiger
 Prawn *Penaeus monodon* Genome
By Miss Amornrat Tiptawonnukul
Department Biochemistry
Thesis Advisor Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon, Ph.D
Thesis Co-advisor Asst. Prof. Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D

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

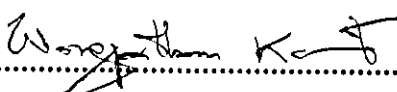

.....Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee


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


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


.....Thesis Co-advisor
(Asst. Prof. Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D)


.....Member
(Wongpathom Kamonrat, Ph.D)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

อมรรัตน์ ทิพย์ถาวรณกุล : การตรวจสอบลักษณะไมโครแซทเทลโลด์ดีเอ็นเอในจีโนมของกุ้ง
กุลาดำ *Penaeus monodon* (CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE DNA IN
GIANT TIGER PRAWN *Penaeus monodon* GENOME) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อัญชลี
ทัศนางจร. อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ , 123 หน้า. ISBN 974-636-291-7.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและวิเคราะห์ลักษณะไมโครแซทเทลโลด์ดีเอ็นเอในจีโนมของ
กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* และพัฒนา genetic markers เพื่อประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่นการศึกษา
พันธุศาสตร์ประชากร การคัดพันธุ์ และการทำแผนที่จีโนม เป็นต้น

ไมโครแซทเทลโลด์ในกุ้งกุลาดำจำนวน 131 ลำดับ ได้ถูกแยกและวิเคราะห์จากห้องสมุดจีน
โดยการคัดเลือกด้วยดีเอ็นเอติดตาม (GT)₁₅ และได้จำแนกชนิดของไมโครแซทเทลโลด์ออกเป็น perfect,
imperfect และ compound repeats ชนิดของไมโครแซทเทลโลด์ที่พบมากที่สุดคือ imperfect repeats ด้วย
สัดส่วน 51.9 เปอร์เซ็นต์ จาก (GT)_n ไมโครแซทเทลโลด์ที่แยกได้ 97 ลำดับ นำมาคำนวณความถี่ในจีโนม
พบว่าโดยเฉลี่ยระยะห่างระหว่าง (GT)_n ไมโครแซทเทลโลด์เท่ากับ 92.8 กิโลเบส ความยาวของไมโครแซท
เทลโลด์ที่พบโดยทั่วไปมีขนาดอยู่ระหว่าง 30-35 repeat ได้ทำการออกแบบ PCR ไพร์เมอร์จากลำดับที่อยู่
รอยล้อมไมโครแซทเทลโลด์ จำนวน 7 คู่ โดยที่ 2 คู่เป็น (AT)_n ไมโครแซทเทลโลด์ และ 5 คู่เป็น (GT)_n
ไมโครแซทเทลโลด์ จากการทดสอบในกุ้งกุลาดำ 8 ตัวจากกันตรังในทะเลอันดามัน และ อ่างศิลาในอ่าว
ไทย ด้วยวิธี PCR พบว่า ไพร์เมอร์จำนวน 3 คู่คือ Pmo 18, Pmo 386 และ Pmo 14 ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดตาม
ที่คาดไว้ นอกนั้นให้ผลิตภัณฑ์ไม่เป็นไปตามที่คาดหมาย และพบว่าไมโครแซทเทลโลด์ที่ตำแหน่ง Pmo 18
และ Pmo 386 มีความหลากหลายสูง จึงมีศักยภาพที่จะใช้จำแนกพันธุกรรมในกุ้งกุลาดำได้ดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชิวเคมี
สาขาวิชา ชิวเคมี
ปีการศึกษา 2539

ลายมือชื่อนิสิต อมรรัตน์ ทิพย์ถาวรณกุล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อัญชลี ทัศนางจร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิเชียร ริมพณิชยกิจ

** C625904 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: *Penaeus monodon* / MICROSATELLITE DNA

AMORNRAT TIPTAWONNUKUL : CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE DNA IN GIANT TIGER PRAWN *Penaeus monodon* GENOME. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. VICHIEEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D. 123 pp. ISBN 974-636-291-7.

This research had the objectives to isolate and characterize microsatellites in the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, genome and to develop genetic markers for use in various applications including population genetic studies, selective breeding and genome mapping etc.

One hundred and thirty one microsatellites were isolated and characterized from partial genomic libraries of the giant tiger prawn (*P. monodon*) by screening with an oligonucleotide probe (GT)₁₅. These microsatellites were classified as perfect, imperfect and compound repeats. With 51.9%, imperfect repeats were the predominant category of microsatellites in *P. monodon* genome found in this study. A total of 97 (GT)_n microsatellites were isolated and the frequency of the (GT)_n repeats in the genome was estimated. The average distance between neighbouring (GT)_n microsatellites was 92.8 kb. The most common size class in all categories contained sequences between 30-35 repeats in length. PCR primers were designed from the unique flanking sequences of 7 microsatellites, 2 pairs for (AT)_n and 5 pairs for (GT)_n microsatellites. By testing 8 individual prawns from Kruntung, the Andaman Sea and Angsila, the Gulf of Thailand with the PCR amplification, it was found that 3 of 7 microsatellite primer sets, namely, Pmo 18, Pmo 386 and Pmo 14, produced fragments whose sizes were in the expected range, the others gave nonspecific amplifications. Two microsatellite loci, Pmo 18 and Pmo 386, yielded scorable PCR products and showed high level of polymorphism indicating their potential use in DNA typing of *P. monodon*.

ภาควิชา.....ชีวเคมี

สาขาวิชา.....ชีวเคมี

ปีการศึกษา.....2539

ลายมือชื่อนิสิต.....*Amornrat Tiptawonnukul*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*Asst. Prof. Vichieen Rimphanitchayakit*



ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my appreciation to my supervisor, Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajon, for her encouragement, insightful suggestions and comments she made on the thesis. I would like to thank Assistant Professor Dr. Vichien Rimphanitchayakit for his suggestions and thorough review on the thesis, Assistant Professor Dr. Tipaporn Limpaseni for her review on the thesis, Dr. Wongpathom Kamonrat for his support and critical review on the thesis.

I would like to thank Dr. Roger W. Doyle for his contribution in the microsatellite development training. I would like to thank Dr. Doug Cook for providing abundant and invaluable assistance in developing microsatellite PCR primers as well as helpful discussion and suggestions on laboratory techniques. I also thank Branimir for providing assistance in sequencing techniques.

I thank Siriporn, Potjane, Premruthai, Chuanchom and other colleagues for providing a friendly atmosphere in our lab. I also thank Surachai Lipiwattanakarn for his help on my thesis.

I gratefully thank my family for their support, encouragement and understanding throughout my study.

This thesis was supported by grants from National Science and Technology Development Agency (NSTDA) and Thailand Research Fund (TRF).

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
TABLE OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
LIST OF ABBREVIATIONS	xvi
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
General Introduction	1
1. Taxonomy of <i>P. monodon</i>	3
2. Distribution	3
Exploitation	7
Morphometric Variation Studies	10
Genetic Markers	10
1. Allozyme	11

2. Mitochondria DNA	12
3. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)	13
3.1 Minisatellites	13
3.2 Microsatellites	15
II MATERIALS AND METHODS	20
Animal and Tissues Preparation	20
Giant Tiger Prawn DNA Extraction	21
Agarose Gel Electrophoresis	23
Restriction Endonuclease Digestion of <i>P. monodon</i> Genomic DNA	23
Construction of <i>P. monodon</i> Genomic Library	24
1. Preparation of chromosomal DNA for cloning	24
2. Ligation	25
3. Transformation	26
3.1. CaCl ₂ method	26
3.2. Electroporation procedure	27
3.2.1 Preparation of host cells	27
3.2.2. Electrotransformation	27
Screening of the Library for Microsatellite DNA	28
Preparation of Plasmid DNA for Sequencing	30
DNA Sequencing and Primer Design	31

	PCR Amplification of Microsatellite Loci	34
III	RESULTS	39
	Giant Tiger Prawn DNA Extraction	39
	Preparation of Giant Tiger Prawn Genomic DNA for Cloning	39
	Library Construction and Screening	42
	Characterization of Microsatellites	44
	1. Type of microsatellite arrays found in <i>P. monodon</i>	44
	2. Distribution of (GT/CA) _n sequence	48
	3. Characteristics of the isolated (GT/AC) _n microsatellites.....	53
	Primer Design, Optimal PCR Conditions and Variability of Microsatellite Loci	57
	Pmo 1 locus	59
	Pmo 2 locus	59
	Pmo 62 locus	64
	Pmo 380 locus	64
	Pmo 18 locus	64
	Pmo 386 locus	69
	Pmo 14 locus	77
IV	DISCUSSION	85
V	CONCLUSIONS	96
	REFERENCES	97

APPENDIX	116
BIOGRAPHY	123



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 World Cultured Shrimp Production from aquaculture sector (1,000MT, live weight)	2
2.1 Components of the sequencing mixes	34
3.1 Perfect microsatellites in <i>P. monodon</i> genome	46
3.2 Imperfect microsatellites in <i>P. monodon</i> genome	46
3.3 Compound microsatellites in <i>P. monodon</i> genome	47
3.4 Average distance in kb between (GT) _n microsatellites in genome of invertebrate, various fish and mammal species compared to giant tiger prawn	54
3.5 Percentage of different categories and sizes of (GT) _n microsatellites in honey bee, human, pig, Atlantic salmon, rainbow trout and Atlantic cod compared with giant tiger prawn genome	56
3.6 Nucleotide sequences of <i>P. monodon</i> microsatellites and primers for amplification of loci by PCR	58
3.7 Microsatellite variation of Pmo 18 locus in 8 individual prawns	71
3.8 Optimization of PCR conditions for Pmo 386 locus	72
3.9 Microsatellite variation of Pmo 386 locus in 19 individual prawns	76
3.10 Optimization of PCR conditions for Pmo 14 locus	80

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Geographic distribution of <i>P. monodon</i> in Indo-West Pacific region	4
1.2 The life cycle of the giant tiger prawn, <i>P. monodon</i> , with stages in different habitats	6
3.1 Ethidium bromide staining of extracted DNA from <i>P. monodon</i> pleopods	40
3.2 Ethidium bromide staining patterns of one individual <i>P. monodon</i> DNA separately digested with various 4 restriction enzymes	41
3.3 Ethidium bromide staining of the recovery yield of genomic DNA fragments of 300 to 700 bp from low melting agarose gel	43
3.4 Autoradiographs of colony hybridization screening for microsatellites from <i>P. monodon</i> genomic library with a ³² P-labeled (GT) ₁₅ oligonucleotide probe	45
3.5 DNA sequences of perfect microsatellites	49
3.6 DNA sequences of imperfect microsatellites	50
3.7 DNA sequences of compound microsatellites	51
3.8 DNA sequence of a false positive clone	52
3.9 Frequency of different size classes of the longest uninterrupted (GT/AC) _n microsatellite arrays from <i>P. monodon</i>	55
3.10 PCR amplification patterns of Pmo 1 locus from eight individual <i>P. monodon</i> DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at 51°C for the initial annealing temperature under the standard PCR condition	60

- 3.11 PCR amplification patterns of Pmo 1 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at the annealing temperature of 53°C and varying the concentrations of Tween20 in PCR amplifications by using labeled forward primer 61
- 3.12 PCR amplification patterns of Pmo 2 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at 53°C for the initial annealing temperature under the standard PCR condition 62
- 3.13 PCR amplification patterns of Pmo 2 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at the annealing temperature of 58°C under the standard PCR condition 63
- 3.14 PCR amplification patterns of Pmo 62 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at 55°C for the initial annealing temperature under the standard PCR condition 65
- 3.15 PCR amplification patterns of Pmo 62 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at 2 different annealing temperatures under the standard PCR condition by using labeled reverse primer 66
- 3.16 PCR amplification patterns of Pmo 380 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8 : from Angsila, the Gulf of Thailand) at 55°C for the initial annealing temperature under the standard PCR condition 67
- 3.17 PCR amplification patterns of Pmo 380 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at the annealing temperature of 53°C under the standard PCR condition 68

- 3.18 PCR amplification patterns of Pmo 18 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at the annealing temperature of 55°C under the standard PCR condition 70
- 3.19 PCR amplification patterns of Pmo 386 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at two annealing temperatures, 47°C and 45°C, under the standard PCR condition 73
- 3.20 PCR amplification patterns of Pmo 386 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at various annealing temperatures with or without Tween20 74
- 3.21 PCR amplification patterns of Pmo 386 locus from 23 individual *P. monodon* DNA (2, 14-16: from Kruntrung, the Andaman sea; 5-7, 9-13: from Angsila, the Gulf of Thailand; 17-22: from Trat, the Gulf of Thailand and 23-27: from Indonesia) under the optimal PCR conditions 75
- 3.22 PCR amplification patterns of Pmo 14 locus from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) at the initial annealing temperature of 57°C under the standard PCR condition 81
- 3.23 PCR amplification patterns of locus Pmo 14 from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) by using labeled reverse primer at the annealing temperature of 57°C 82
- 3.24 PCR amplification patterns of locus Pmo 14 from eight individual *P. monodon* DNA (1-4: from Kruntrung, the Andaman sea and 5-8: from Angsila, the Gulf of Thailand) by using labeled reverse primer at the annealing temperature of 52°C 83

- 3.25 PCR amplification patterns of Pmo 14 locus from 24 individual *P. monodon* DNA (2-4, 15-18: from Kruntrung, the Andaman sea; 5-14: from Angsila, the Gulf of Thailand and 19-25: from Trat, the Gulf of Thailand) at annealing temperature of 52°C by using labeled reverse primer with 50% decreasing of either unlabeled reverse or forward primer and 15 mM MgCl₂ 84



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	Degree Celsius
μl	Microliter (10^{-6} liter)
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
CaCl ₂	Calcium chloride
ddH ₂ O	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	Milliliter (10^{-3} liter)
MT	Metric Tonnes
mtDNA	Mitochondria 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
SSC	Salt sodium citrate
T _a	Annealing temperature of each primer
T _A	Annealing temperature for reaction
TE	Tris EDTA
Tris	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
V	Volt
VNTR	Variable number of tandem repeats

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย