

การถ่ายยีนส์เร่งการเจริญเติบโตเข้าสู่ไขงของปลาอุกอูย (*Clarias macrocephalus*)
ที่ไ้รับการผสมแล้วโดยวิธีไมโครอินเจคชัน



นางสาวสุรินทร บุญอนันธนสาร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-359-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I/6453492

TRANSFER OF GROWTH HORMONE GENE INTO FERTILIZED EGG OF
CATFISH, *Clarias macrocephalus*, BY MICROINJECTION

Miss Surintorn Boonanuntasarn



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-359-8



Thesis Title Transfer of Growth Hormone Gene into Fertilized Egg of
Catfish, *Clarias macrocephalus*, by Microinjection

By Miss Surintorn Boonanuntanasarn

Program Biotechnology


Thesis Advisor Assistant Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D.
Professor Sakol Panyim, Ph.D.
Professor Piamsak Menasveta. Ph.D.

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

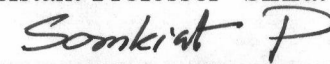


.....Dean of Graduate School
(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

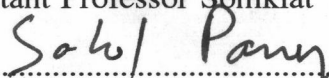
Thesis Committee




..... Chairman
(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)




..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D.)



..... Thesis Co-advisor
(Professor Sakol Panyim, Ph.D.)



..... Thesis Co-advisor
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)



..... Member
(Voranop Viyakarn, Ph.D.)

C426567 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: MICROINJECTION / TRANSGENIC FISH / CATFISH

SURINTORN BOONANUNTANASARN : TRANSFER OF GROWTH HORMONE GENE INTO

FERTILIZED EGG OF CATFISH, *Clarias macrocephalus*, BY MICROINJECTION. THESIS

ADVISOR : ASSIST. PROF SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D., PROF.SAKOL PANYIM, Ph.D.
AND PROF. PIAMSAK MENASVETA, Ph.D. 150 pp. ISBN 974-632-359-8

Transfer of Growth Hormone gene into fertilized egg of catfish, *Clarias macrocephalus* Gunther., by microinjection was carried out with four objectives, 1) to compare the survival rate of microinjected egg and the control (uninjected egg), 2) to compare the growth rate between fish derived from microinjected embryos and the control, 3) to detect the introduced gene in fish blood and 4) to detect the introduced gene in various tissues of injected fish.

Plasmid pXGH 5 containing the human growth hormone gene (hGH) fused to the promoter mouse metallothionein-I (mMT-I) was prepared and linearized with BamH I digestion. Microinjection of the plasmid solution about 240 pl containing 10^6 copies, was carried out into the germinal disc of fertilized egg of catfish at three developmental stages, i.e. one-cell stage, two-cell stage and four-cell stage, at 25 °C. The hatching rates of these eggs were 25.91 ± 23.00 %, 29.71 ± 29.45 % and 30.94 ± 30.22 %, respectively, which was not significantly different. When compared with the control group (40.67 ± 20.76 %), all three stages microinjected eggs were significantly lower ($P < 0.05$). The survival rates at one month old-fry derived from one-cell stage, two-cell stage, four-cell stage and control were 52.02 ± 19.81 %, 46.67 ± 30.49 %, 35.51 ± 34.13 % and 53.61 ± 22.30 %, respectively, which was not significantly different.

In comparing the growth rate between fish derived from microinjected egg and the control of the same spawner was performed by rearing in cages at the same densities. Only growth rate of fish, derived from one-cell microinjected egg was significantly higher than the control ($P < 0.05$). While growth rate of fish derived from two-cell microinjected egg was higher than the control, and growth rate of fish derived from four-cell stage microinjected egg was similar to the control.

Detection of the introduced gene in microinjected fish blood was carried out by using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, a practical method for amplifying the fragment of hGH at 186 bp in size. It was found that the integration rate of introduced gene in one-cell stage, two-cell stage, and four-cell stage microinjected fish was 5.05 % (5 of 99 samples), 6.45 % (2 of 31 samples) and 8.5 % (1 of 12 samples), respectively.

Detection of the introduced gene in various tissues of microinjected fish was performed by genomic DNA extraction and dot blot hybridization. The result found mosaicism in various tissues of fish, derived from all stages of microinjected eggs. This study found that embryonic developmental stage of yellow walking catfish at one-cell and two-cell stages were appropriate stages for gene transferring by microinjection.

ภาควิชา.....

ลายมือชื่อนิติ.....

สาขาวิชา..... เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา..... 2537.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



สุรินทร์ บุญอนันตสนสาร : การถ่ายยีนส์เร่งการเจริญเติบโตเข้าสู่ไข่ของปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่ได้รับการผสมแล้วโดยวิธีไมโครอินเจกชัน (TRANSFER OF GROWTH HORMONE GENE INTO FERTILIZED EGG OF CATFISH, *Clarias macrocephalus*, BY MICROINJECTION) อ.ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิตวรกุล ศ.ดร.สกล พันธุ์ยิ้ม และ ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต, 150 หน้า.

ISBN 974-632-359-8

การถ่ายยีนส์เร่งการเจริญเติบโตเข้าสู่ไข่ของปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Gunther.) ที่ได้รับการผสมแล้วโดยวิธีไมโครอินเจกชันมี 4 จุดประสงค์ คือ 1) เปรียบเทียบอัตราการรอด ระหว่างลูกปลาที่ได้รับการถ่ายยีนส์และกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนส์) 2) เปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างปลาที่ได้รับการถ่ายยีนส์และกลุ่มควบคุม 3) ตรวจสอบยีนส์ที่ถ่ายเข้าไปในเลือดปลา และ 4) ตรวจสอบยีนส์ที่ถ่ายเข้าไปในอวัยวะต่าง ๆ ของปลา

เตรียมพลาสมิด pXGH 5 ซึ่งประกอบด้วยส่วนของยีนส์เร่งการเจริญเติบโต (hGH) ต่อกับส่วนของโปรโมเตอร์ (mMT-I) ทำให้พลาสมิดอยู่ในรูปเส้นตรง (linearized form) โดยย่อยด้วยเอนไซม์ BamH I ไมโครอินเจกชันสารละลายพลาสมิดจำนวน 10^6 copies ปริมาตร 240 พิโคลิตร เข้าสู่ germinal disc ของไข่ปลาดุกอุยที่ได้รับการผสมแล้ว 3 ระยะ ได้แก่ ระยะ 1 เซลล์ ระยะ 2 เซลล์ และ ระยะ 4 เซลล์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไข่มีอัตราการฟักเท่ากับ 25.91 ± 23.00 %, 29.71 ± 29.45 % และ 30.94 ± 30.22 % ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 40.67 ± 20.76 % พบว่าอัตราการฟักของไข่ปลากลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีนส์ทั้ง 3 ระยะ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อัตราการรอดที่อายุ 1 เดือนของลูกปลาที่ได้รับการถ่ายยีนส์ที่ระยะ 1 เซลล์ ระยะ 2 เซลล์ ระยะ 4 เซลล์ และกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 52.02 ± 19.81 %, 46.67 ± 30.49 %, 35.51 ± 34.13 % และ 53.61 ± 22.30 % ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของปลากลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีนส์กับกลุ่มควบคุมในแม่ปลาเดียวกัน โดยเลี้ยงปลาในกระชัง ให้มีความหนาแน่นเท่ากัน พบว่าปลาที่ได้รับการถ่ายยีนส์ที่ระยะ 1 เซลล์ และระยะ 2 เซลล์ มีการเจริญเติบโตสูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนปลาที่ได้รับการถ่ายยีนส์ที่ระยะ 4 เซลล์ มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามมีเพียงอัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีนส์ที่ระยะ 1 เซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ทำการตรวจหา ยีนส์ที่ถ่ายเข้าไปในเลือดปลา โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในยีนส์เร่งการเจริญเติบโตของคน ซึ่งมีขนาด 186 คู่เบส ร่วมกับไฮบริไดเซชัน พบว่าอัตราของยีนส์ที่ถ่ายเข้าไปเชื่อมกับโครโมโซมของปลาที่ทำการถ่ายยีนส์ ที่ ระยะ 1 เซลล์ ระยะ 2 เซลล์ และ ระยะ 4 เซลล์ มีค่าเท่ากับ 5.05 % (5 ใน 99 ตัวอย่าง), 6.45 % (2 ใน 31 ตัวอย่าง) และ 8.45 % (1 ใน 12 ตัวอย่าง) ตามลำดับ

ตรวจหา ยีนส์ที่ถ่ายเข้าไปในอวัยวะต่าง ๆ ของปลา โดยสกัดดีเอ็นเอ และทำ dot blot hybridization พบว่าเกิด mosaic ในแต่ละอวัยวะของปลา และพบที่ทุกอวัยวะของไข่ปลาที่ทำการถ่ายยีนส์ จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าระยะพัฒนาการของตัวอ่อนปลาดุกอุยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนส์โดยวิธีไมโครอินเจกชัน คือ ระยะ 1 เซลล์ และ ระยะ 2 เซลล์

ภาควิชา
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ
ปีการศึกษา2537.....

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisors, Dr. Somkiat Piyatiratitivorakul and Dr. Sakol Panyim, for give me a chance to do this thesis with their encouragement, kindness, supervision and valuable instruction throughout this work. I am indepted to Dr. Piamsak Menasveta my co-advisor, for his constructive comments and support throughout this work. And also very grateful to Dr. voranop Viyakarn and Dr. Sirirat Rengpipat for their worthy suggestion and discussion. My acknowledgement is also expressed to Dr. Charoeng Nitithamyong and Dr. Sumalee Tungpradubkul for their patients proofreading of this thesis.

I would like to thank you Mr. Saree Donnua for his valuable helps, Miss Plearnpis Luxananil, Mrs. Piengjan Songthayanont, Mr. Boonhiang Promdonkroy, Miss Saradee Varich and all members in room B.309 and B.315, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, for their friendships and their helps during my study. My appreciation is extended to all members in Marine Biotechnology Research Unit, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

This research was supported by the National Center for genetic Engineering and Biotechnology, Ministry of Science, Technology and Environment.

Finally, I am extremely grateful to my parents for give me the warmest life with their love

Surintorn Boonanuntanasarn



TABLE OF CONTENTS

	Page
English Abstract.....	iv
Thai Abstract.....	v
Acknowledgments.....	vi
List of Tables.....	viii
List of Figures.....	ix
List of Abbreviations.....	xiii
Chapters	
I. Introduction.....	1
II. Materials and Methods.....	26
III. Results.....	58
IV. Discussion.....	104
V. Summary and recommendation.....	122
References.....	126
Appendices.....	139
Biography.....	150

LIST OF TABLES

Table	Page
1 Dosage and latency period for each hormone uses to induce spawning of <i>C. macrocephalus</i>	7
2 General formula for restriction enzyme buffer.....	33
3 Restriction enzyme with their recognition sequences and optimal condition of the buffer salt.....	33
4 DNA fragment of pXGH 5 when cut with restriction endonuclease.....	62
5 Duration time taken and flow rate of microinjection at various amount of TE buffer at nitrogen gas pressure 2000 hpa.....	62
6 The hatching rate of eggs and the survival rate of fryies.....	65
7 The estimated slope of growth rate of microinjected fish and control	66
8 Stage of microinjected egg obtaining the successful of gene transfer.....	95
9 Detection of the introduced gene in various tissues of fish, which was microinjected at various stage of development...	103

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Matured yellow walking catfish, <i>Clarias macrocephalus</i>	5
2 The genital organs of yellow walking catfish.....	5
3 The schematic diagram of the polymerase chain reaction (PCR).....	25
4 The physical map of plasmid pXGH 5.....	28
5 DNA sequence of human Growth Hormone gene (hGH); <u>underlines</u> indicate sequences of PCR primers and their annealing position.....	29
6 DNA sequence of <i>P. sutchi</i> Growth Hormone gene (cDNA); <u>underlines</u> indicate sequences of PCR primers of 150 bp fragment and their annealing position.....	30
7 The workplace for microinjection.....	37
8 Microinjection of the foreign gene into one-cell stage fertilized egg of catfish.....	40
9 Microinjection of the foreign gene into two-cell stage fertilized egg of catfish.....	40
10 Microinjection of the foreign gene into four-cell stage fertilized egg of catfish.....	41
11 The microneedle (about $0.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ of diameter) driving plasmid solution.....	41
12 Rearing cage of microinjected and control fish of the same spawner.....	43
13 The blood sampling from the caudal vessels.....	46

Figure	Page
14 Gel analysis of plasmid pXGH 5 digested with restriction enzymes.....	59
15 Gel analysis of linearized plasmid pXGH 5.....	60
16 The linear regression of estimated growth rate of microinjected fish at one cell stage and control.....	67
17 The linear regression of estimated growth rate of microinjected fish at two cell stage and control.....	68
18 The linear regression of estimated growth rate of microinjected fish at four cell stage and control.....	69
19 Picture of catfish at age 105 days.....	70
20 Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis of 186 bp PCR amplification product from the designed primers.....	72
21 Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis of DNA patterns from blood cell preparations.....	77
22 Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis of 186 bp PCR product amplified in various volume of blood and lysis solution.....	78
23 Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis of 186 bp PCR product amplified in various primer concentrations ; at annealing temperature 50 ⁰ C.....	79
24 Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis of 186 bp PCR product amplified in various primer concentrations ; at annealing temperature 55 ⁰ C	80

Figure	Page	
25	Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis of 186 bp PCR product amplified in various primer concentrations; annealing temperature at 55 °C for 15 sec, extension temperature at 72 °C for 15 sec; at 1 µmole primers concentration.....	81
26	Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis of 186 bp PCR product amplified in various primer concentrations; annealing temperature at 55 °C for 15 sec, extension temperature at 72 °C for 15 sec; at 0.1 µmole primers concentration.....	82
27	Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis of heparins effect on PCR detection.....	83
28	Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis of amplification in heparinized human blood by using hGH gene primers	87
29	The fragment of 186 bp from human blood amplification.....	88
30	Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis of 150 bp PCR product amplified from heparinized fish blood by using <i>P. sutchi</i> growth hormone gene primers.....	89
31	Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis for detection of the introduced gene in one-cell stage microinjected fish blood by PCR	90

Figure	Page
32 Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis for detection of the introduced gene in two-cell stage microinjected fish blood by PCR	91
33 Ethidium bromide staining of 2.5 % agarose gel electrophoresis for detection of the introduced gene in four-cell stage microinjected fish blood by PCR	92
34 Dot blot and hybridization of PCR product from microinjected fish blood with digoxigenin labelled pXGH 5 plasmid.....	93
35 PCR products from detection of fish blood.....	94
36 Ethidium bromide staining of 0.7 % agarose gel electrophoresis of high molecular weight DNA patterns from fish blood.....	98
37 Dot blot and hybridization of genomic DNA from fish blood with digoxigenin labelled pXGH 5 plasmid.....	99
38 Ethidium bromide staining of 0.7 % agarose gel electrophoresis of genomic DNA patterns from various tissues of alive fish.....	100
39 Ethidium bromide staining of 0.7 % agarose gel electrophoresis of genomic DNA patterns from various tissues of died fish.....	101
40 Dot blot and hybridization with digoxigenin labelled pXGH 5 plasmid of genomic DNA from various tissues.....	102
41 The abnormal fish derived from microinjected egg.....	121

LIST OF ABBREVIATIONS

AMPPD	=	3-(2' spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3'' phosphoryloxy) phenyl-1,2-dioxetane disodium salt
bp	=	Base pair
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree celcius
dATP	=	Deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	=	Deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	=	Deoxythymidine 5'-triphosphate
dNTP	=	dATP, dCTP, dGTP and dTTP
DNA	=	Deoxyribonucleid acid
g	=	Centrifugation force
EDTA	=	Ethylenediamine tetraacetic acid
hr	=	hour
IU	=	International Unit
Kb	=	Kilobase pair
l	=	Liters
M	=	Molar
m	=	10^{-3}
MgCl_2	=	Magnesium chloride
min	=	minute
NaCl	=	Sodium chloride
NBT	=	Nitroblue tetrasolium
n	=	10^{-9}

OD	=	Optical density
p	=	10^{-12}
rpm	=	Revolution per minute
sec	=	second
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
U	=	unit
μ	=	10^{-6}
w/v	=	Weight/volume
X-phosphate	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

