การระบุเครื่องหมายสนิปที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

นางสาวศิริธร จานพูม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

IDENTIFICATION OF GROWTH-RELATED SNP MARKERS IN THE GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*

Miss Sirithorn Janpoom

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 2012

Thesis Title	IDENTIFICATION OF GROWTH-RELATED SNP MARKERS IN THE GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*
By	Miss Sirithorn Janpoom
Field of Study	Biotechnology
Thesis Advisor	Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Bavornlak Khamnamtong, Ph.D.

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

S. Hannongbua
..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Thaithaworn Lirdwitayaprasit, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

B. Khamnamtong
..... Thesis Co-advisor
(Bavornlak Khamnamtong, Ph.D.)

Chanpen Chanchao
..... Examiner
(Associate Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.)

Amorntip Muangprom
..... External Examiner
(Amorntip Muangprom, Ph.D.)

ศิริธร จานพูม : การระบุเครื่องหมายสนิปที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*.
(IDENTIFICATION OF GROWTH-RELATED SNP MARKERS IN THE GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*)
อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. บวรลักษณ์ คำน้ำทอง, 140 หน้า.

ตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของจีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตของกุ้งกุลาดำ ประกอบด้วย *calponin1* (*PmCnn1*) *cyclin C* (*PmCyC*) และ *cdc25* (*PmCdc25*) ในกุ้งวัยรุ่นอายุสามเดือน (BUM03 และ SNP3A) และอายุ 5 เดือน (PM05) ด้วยวิธี PCR-SSCP พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบ SSCP ของจีน *PmCnn1*, *PmCyC* และ *PmCdc25* กับปัจจัยการเติบโตของกุ้งกุลาดำ (น้ำหนักตัว, ความยาว, น้ำหนักตับ และค่าดัชนีของตับ) ในกลุ่มตัวอย่าง SNP3A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกุ้งวัยรุ่นที่มีรูปแบบ SSCP แบบที่ I และ II ของจีน $PmCnn1_{530}$ มีน้ำหนักตัวและความยาวเฉลี่ยมากกว่ากุ้งรูปแบบที่ III ($N = 156$, $P < 0.05$) สำหรับจีน *PmCyC* พบรูปแบบ SSCP จำนวนสามรูปแบบ โดยกุ้งวัยรุ่นซึ่งมี SSCP รูปแบบที่ II พบว่ามีน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับเฉลี่ยมากกว่ากุ้ง ที่มีรูปแบบ SSCP แบบที่ I และ III อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($N = 145$, $P < 0.05$) นอกจากนั้นยังพบว่ากุ้ง SNP3A ที่มีรูปแบบ SSCP แบบที่ I ของจีน *PmCdc25* มีน้ำหนักตัว ความยาว และน้ำหนักตับเฉลี่ยมากกว่า กุ้งที่มี SSCP รูปแบบที่ II ($N = 144$, $P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบ SSCP ของจีน $PmCnn1_{425}$ กับ น้ำหนักตัวและความยาวเฉลี่ยของกุ้ง BUM03

เมื่อนำตัวแทนของแต่ละรูปแบบ SSCP ของทั้งสามจีนดังกล่าวในกุ้งวัยรุ่นSNP3A มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบสนิปจำนวน 6 ตำแหน่งที่บริเวณ intron ในจีน $PmCnn1_{530}$ มีความสัมพันธ์กับปัจจัยการเติบโตของกุ้งวัยรุ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสนิปของจีนดังกล่าวกับลักษณะการเติบโตของกุ้งพบว่าสนิป $G/G_{209}T/T_{210}$ $-/-_{212}-/-_{213}C/C_{218}G/G_{240}$ และสนิป $G/A_{209}T/A_{210}-/G_{212}-/T_{213}C/T_{218}G/A_{240}$ ซึ่งพบในกุ้งที่มี SSCP รูปแบบที่ I และ II จะพบว่ามีน้ำหนักตัว ความยาวและน้ำหนักตับเฉลี่ยมากกว่ากุ้งที่มีสนิปเป็น $A/A_{209}A/A_{210}G/G_{212}T/T_{213}T/T_{218}A/A_{240}$ ซึ่งพบในกุ้งที่มี SSCP รูปแบบที่ III สำหรับจีน *PmCyC* พบสนิปทั้งหมดจำนวนห้าตำแหน่ง โดยสามตำแหน่ง (A/G_{31}, G/A_{379}, และ T/C_{382}) เป็นสนิปที่เกิดบริเวณ exon แต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน ส่วนอีกสองตำแหน่ง (T/C_{134} และ T/C_{188}) เป็นสนิปที่เกิดบริเวณ intron โดยกุ้งที่มีสนิปเป็น $G/G_{31}C/T_{134}C/C_{188}A/A_{379}C/C_{382}$ ซึ่งพบในกุ้งที่มีรูปแบบ SSCP แบบที่ II พบว่าเติบโตเร็วกว่ากุ้งที่มีสนิปเป็น $A/A_{31}C/C_{134}T/T_{188}G/G_{379}T_{382}$ และ $A/G_{31}C/T_{134}T/C_{188}G/A_{379}T/C_{382}$ ซึ่งพบในกุ้งที่มีรูปแบบ SSCP แบบที่ I และ III ตามลำดับ สำหรับจีน *PmCdc25* นั้นพบสนิปแค่เพียงหนึ่งตำแหน่ง (A/C_{243}) โดยกุ้งที่มีสนิปเป็น A/C_{243} นั้นพบว่ามีน้ำหนักตัว ความยาวและน้ำหนักตับ เฉลี่ยมากกว่ากุ้งที่มีสนิปเป็น C/C_{243} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสนิปอย่างง่ายโดยจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน $PmCnn1_{530}$ และ *PmCdc25* พบว่าสนิปของจีนดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี PCR-RFLP

เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของจีน *PmCnn1* และ *PmCdc25* mRNA ในตับของกุ้งวัยรุ่น SNP3A ด้วยวิธี quantitative real-time PCR พบว่าระดับการแสดงออกของจีน *PmCnn1* ของกุ้งที่มีรูปแบบ SSCP แบบที่ III มีระดับการแสดงออกของจีนสูงกว่ากุ้งที่มีรูปแบบ SSCP แบบที่ Iและ II อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับระดับการแสดงออกของจีน *PmCdc25* นั้นพบว่ากุ้งที่มีรูปแบบ SSCP แบบที่ I นั้นมีระดับการแสดงออกของจีนสูงกว่ากุ้งที่มีรูปแบบ SSCP แบบที่ II อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของจีน *PmCyC* พบว่ามีความยาว 1443 bp มี ORF ยาว 804 bp สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มี 267 กรดอะมิโน นอกจากนี้สร้างโปรตีนลูกผสมของ PmCnn1 และผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีของ rPmCnn1 ดังกล่าว

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....ศิริธร จานพูม.....
ปีการศึกษา.....2555..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....บวรลักษณ์ คำน้ำทอง.....

5372473723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS : *Penaeus monodon* / SNP / PCR-SSCP / POLYMORPHISM

SIRITHORN JANPOOM: IDENTIFICATION OF GROWTH-RELATED SNP MARKERS IN THE GIANT TIGER SHRIMP *Penaeus monodon.*
ADVISOR: PROF. PIAMSAK MENASVETA, Ph.D.
CO-ADVISOR: BAVORNLAK KHAMNAMTONG, Ph.D., 140 pp.

Polymorphism of growth-related genes; *calponin1* (*PmCnn1*), *cyclin C* (*PmCyC*) and *cdc25* (*PmCdc25*) in 3- (BUM03 and SNP3A) and 5-month-old (PM05) juveniles of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) were identified by polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis. Relationships between SSCP patterns and growth parameters (average body weight, BW; total length, TL; hepatopancreatic weight, HPW and/or hepatosomatic index, HSI) of the examined shrimp were examined. In the SNP3A sample, shrimp carrying SSCP patterns I and II of $PmCnn1_{530}$ (primers Cnn1-F/R) had a greater average BW and TL than those exhibiting pattern III ($N = 156$, $P < 0.05$). Likewise, juveniles shrimp carrying SSCP pattern II of *PmCyC* possessed a significantly greater average BW and HPW than those of shrimp carrying patterns I and III ($N = 145$, $P < 0.05$). For *PmCdc25*, the BW, TL and HPW of shrimp carrying SSCP pattern I was significantly greater than those of shrimp carrying SSCP pattern II ($N = 144$, $P < 0.05$). Moreover, significant relationships between SSCP patterns of $PmCnn1_{425}$ and average BW and TL were found in the BUM03 sample ($P < 0.05$).

Nucleotide sequences of cloned $PmCnn1_{530}$, *PmCyC* and *PmCdc25* gene segments of representative individuals carrying each SSCP genotype were determined. Six intronic SNPs of $PmCnn1_{530}$ were significantly related with growth parameters. Of these, shrimp with each of $G/G_{209}T/T_{210}\text{-}/\text{-}_{212}\text{-}/\text{-}_{213}C/C_{218}G/G_{240}$ (SSCP pattern I) and each of $(G/A)_{209}(T/A)_{210}(\text{-}/G)_{212}(\text{-}/T)_{213}(C/T)_{218}(G/A)_{240}$ (SSCP pattern II) had a greater average BW, TL and HPW than those with each of $A/A_{209}A/A_{210}G/G_{212}T/T_{213}T/T_{218}A/T_{240}$ (SSCP pattern III). For *PmCyC*, three exonic (A/G_{31}, G/A_{379}, and T/C_{382}) and two intronic (T/C_{134} and T/C_{188}) SNPs corresponding to SSCP pattern I, II and III were observed, respectively. Each SNP of shrimp with SSCP pattern II: $G/G_{31}C/T_{134}C/C_{188}A/A_{379}C/C_{382}$ had a significantly greater average growth parameters (except HSI) than those with each SNP of shrimp found in SSCP pattern I: $A/A_{31}C/C_{134}T/T_{188}G/G_{379}T/T_{382}$ and III: $A/G_{31}C/T_{134}T/C_{188}G/A_{379}T/C_{382}$. Only one SNP ($A/C_{243}$) was found in *PmCdc25* for which shrimp exhibiting A/C_{243} had a significantly greater average BW, TL and HPW ($P < 0.05$) than those carrying C/C_{243}. Simplification of SNP detection of $PmCnn1_{530}$ and *PmCdc25* gene segments was successfully developed based on PCR-RFLP.

The relative expression level of *PmCnn1* and *PmCdc25* in hepatopancreas of juvenile shrimp (SNP3A) carrying different SSCP pattern were significantly different ($P < 0.05$). The expression level of *PmCnn1* in shrimp exhibiting SSCP pattern III was significantly greater than those exhibiting pattern I and II ($P < 0.05$) while the expression level of *PmCdc25* in shrimp exhibiting SSCP pattern I was significantly greater than those exhibiting genotypes II ($P < 0.05$).

The full-length cDNA of *PmCyC* was successfully characterized. It was 1443 bp in length containing and ORF of 804 bp corresponding to a polypeptide of 267 amino acids. Moreover, recombinant PmCnn1 protein was successfully expressed as the soluble protein in *E.coli*. The polyclonal antibody against rPmCnn1 was successfully produced in rabbit.

Field of Study : .... Biotechnology..... Student's Signature.....
Academic Year : .....2012..... Advisor's Signature.....
Co-advisor's Signature.....

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my deepest sense of gratitude to my advisor Professor Dr. Piamsak Menasveta and my co-advisors, Dr. Bavornlak Khamnamtong for their great help, guidance, encouragement, valuable suggestion and supports throughout my study.

My gratitude is also extended to Associate Professor Dr. Thaithaworn Lirdwitayaprasit, Associate Professor Dr. Chanpen Chanchao and Dr. Amorntip Muangprom who serve as thesis committees for their recommendations and useful suggestions.

I would like to acknowledge to Aquatic Molecular Genetics and Biotechnology Laboratory (AAMG) and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) for providing facilities, Thailand Graduate institute of Science and Technology (TGIST) for my studentship.

I would like to thank, particularly to Drs. Sirawut Klinbunga and Sittiruk Roytrakul for valuable suggestions and encouragements and many thank to my beloved friends in the laboratory; Mr. Sayan Prakobpetch, Miss Pacharaporn Angthong, Miss Natechanok Thamniemdee, Miss Sasithorn Petkon, Miss Kanchana Sittikhankeaw, Miss Witchulada Talakhun, Miss Mahattanee Phinyo, Miss Sirikan Prasertluk, Miss Parichart Chumtong and Miss Patchari Yocawibun for their help during my study. I would also like to thank all my friends at Medical Science of Naresuan University and program in Biotechnology, Chulalongkorn University for friendships.

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

CONTENTS

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

Page

Page

LIST OF FIGURES

Page

Page

Page

Page

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pair
°C	degree celsius
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
HCl	hydrochloric acid
IPTG	isopropyl-thiogalactoside
M	Molar
$MgCl_2$	magnesium chloride
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar
ng	nanogram
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonucleic acid
RNase A	Ribonuclease A
rpm	revolutions per minute
RT	reverse transcription
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tris	tris (hydroxyl methyl) aminomethane
µg	microgram
µl	microliter
µM	micromolar
UV	ultraviolet