

**MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION
OF A PUTATIVE SEROTONIN RECEPTOR cDNA FROM
BLACK TIGER PRAWN (PENAEUS MONODON)**

YAOWALUCK ROSHORM

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003**

**ISBN 974-04-3898-9
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การโคลนนิ่ง cDNA ของตัวรับ 5-HT จากกุ้งกุลาดำ (MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE SEROTONIN RECEPTOR cDNA FROM BLACK TIGER PRAWN (*PENAEUS MONODON*))

เยาวลักษณ์ รสหอม 4436427 MBMG/M

วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เฉลิมพร องค์กร โสภณ, Ph.D, กุศล ภูชนกิจ, Ph.D,

Duncan R. Smith, Ph.D.

บทคัดย่อ

ซีโรโทนิน (serotonin, 5-HT) เป็นสารสื่อประสาทที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญของรังไข่และการวางไข่ของกุ้งในกลุ่ม penaeid ซีโรโทนินสามารถแสดงบทบาทสำคัญเหล่านี้ได้โดยการจับกับตัวรับของมัน (5-HT receptor) ซึ่งส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม G-protein coupled receptor การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลน cDNA สายสมบูรณ์ ของตัวรับ 5-HT จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งแม่พันธุ์และกุ้งตัวเล็ก โดยในขั้นแรกได้ทำการสกัด total RNA จากรังไข่ระยะที่สามของกุ้งแม่พันธุ์และจากสมองและปมประสาทส่วนอกของกุ้งตัวเล็ก จากนั้นจึงทำการสร้างสาย cDNA สายแรกด้วยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ oligo(dT) primer แล้วทำการสร้างและเพิ่มจำนวนขึ้น cDNA สายคู่ด้วยกระบวนการ PCR amplification โดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบมาจากตำแหน่งอนุรักษ์ของตัวรับ 5-HT กลุ่มที่หนึ่งของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จากนั้นจึงทำการสร้างและเพิ่มจำนวนขึ้น cDNA ในบริเวณด้านปลาย 3' และ 5' ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) ผลการศึกษาพบว่าชิ้น cDNA ของตัวรับ 5-HT มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2282 - 2291 ตัว ซึ่งแปรผันตามจำนวนซ้ำของ GGC ชิ้น cDNA นี้ให้ open reading frame ที่มีความยาว 1764-1773 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งถอดรหัสให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 588 - 591 ตัว เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าลำดับกรดอะมิโนนี้มีความเหมือนกับตัวรับ 5-HT มากที่สุดโดยเฉพาะตัวรับ 5-HT ในกลุ่มที่ 1 ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จากการวิเคราะห์พบว่าลำดับกรดอะมิโนนี้มีลักษณะต่างๆ ของตัวรับ 5-HT ที่เป็น G-protein coupled receptor การศึกษาการแสดงออกของยีนนี้โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่ศึกษา แต่แสดงออกมากที่สุดที่รังไข่ จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าตัวรับ 5-HT นี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสืบพันธุ์ของกุ้ง

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE SEROTONIN RECEPTOR cDNA FROM BLACK TIGER PRAWN (PENAEUS MONODON)

YAOWALUCK ROSHORM 4436427 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHALERMPORN ONGVARRASOPONE, Ph.D., KUSOL POOTANAKIT, Ph.D., DUNCAN R. SMITH, Ph.D.

ABSTRACT

Serotonin (5-HT, 5-hydroxytryptamine) is a neurotransmitter that plays an important role in stimulating ovarian maturation and spawning in penaeid prawns. Serotonin modulates its various physiological functions by interacting with different 5-HT receptors, most of which are G-protein coupled receptors. The objectives of this project are to isolate the full-length cDNA of a putative 5-HT receptor from *Penaeus monodon* and to determine differential mRNA expression of this 5-HT receptor in various tissues of a female wild broodstock and juvenile prawns. Total RNAs isolated from an ovary (stage III) of the wild broodstock and brain and thoracic ganglia of juvenile black tiger prawns were reverse transcribed by using an oligo(dT) primer. The putative 5-HT receptor cDNA was then amplified by using two degenerate primers corresponding to the conserved amino acid sequences of invertebrate 5-HT₁ receptors. Next, sequences in the 3' and 5' ends were isolated by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) strategy. From this study a full-length cDNA of 2282-2291 nucleotides varying to the number of GGC repeat was obtained. It presented one long open reading frame of 1764-1773 nucleotides encoding a protein of 588-591 amino acids. The blast result in Genbank database showed high amino acid sequence identities to 5-HT receptors, especially invertebrate 5-HT₁ receptors. Sequence analysis revealed the characteristics of G-protein coupled 5-HT receptors. Tissue distribution study by RT-PCR technique revealed that this receptor is expressed in various tissues of *P. monodon*. However, it is expressed at the highest level in the ovary, suggesting that this 5-HT receptor may be involved in the reproduction process of the black tiger prawn.

KEY WORDS: SEROTONIN / NEUROTRANSMITTER / 5-HT RECEPTOR / G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR / PENAEUS MONODON

168 P. ISBN 974-04-3898-9