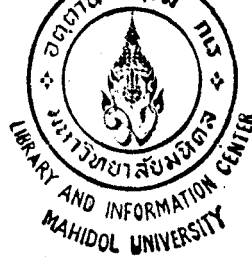


29 OCT 1999



**STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF MITOCHONDRIAL
DNA OF BLACK TIGER PRAWN (*PENAEUS MONODON*)**

TRILERT CHAICHERDSAKUL

**With compliments
of**
นันทกานตยาลัย น. นันทก

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1999

ISBN 974-662-858-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
T829D
1999

43122 c.2



3936096 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

KEY WORDS : MITOCHONDRIAL GENOME / SEQUENCE /
PENAEUS MONODON / INVERTEBRATE

TRILERT CHAICHERDSAKUL: STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF
MITOCHONDRIAL DNA OF BLACK TIGER PRAWN (*PENAEUS MONODON*).
THESIS ADVISORS: BURACHAI SONTHAYANON Ph.D., SAKOL PANYIM Ph.D.
100 P. ISBN 974-662-858-5

This work involved partial characterization of mitochondrial DNA from black tiger prawn, *Penaeus monodon*. Mitochondria were prepared from abdominal and pleopod muscles. Mitochondrial DNA was purified by EtBr-CsCl ultracentrifugation and electroelution. DNA was partially digested by *Sau* 3AI, and cloned into pBluescript SK (-) and pUC 19 vectors. Random DNA clones were picked and subjected to automated DNA sequencing. DNA sequences were then subjected to GenBank databank searches by BLAST program at NCBI. In the first set of experiments, 17 clones with 38-52 % sequence identity to mtDNA of *Drosophila melanogaster* and other related organisms could be identified by GAP and BESTFIT programs in the GCG package, as well as by ClustalW. The data indicated that the 17 clones might not be genuine mtDNA clones but, more likely, were genomic DNA clones of the prawn. In later experiments, 3 additional clones (PMTC018, PMTC019 and PMTC020) gave better match to known mitochondrial genes. When compared with mtDNA of *Drosophila melanogaster*, clone PMTC018, with a size of 945 bp, matched cytochrome oxidase subunit I gene at 70.4 % sequence identity; clone PMTC019, with a size of 744 bp, matched cytochrome *b* gene at 74.7 % identity; and clone PMTC020, with a size of 900 bp, matched 16S rRNA gene at 48.3 % identity. The 3 additional clones also matched corresponding gene sequences of other higher eukaryotes with 70-90 % nucleotide sequence identities. This indicated that the 3 clones were of genuine mtDNA from the black tiger prawn.

3936096 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

ไตรเลิศ ชัยจิตสกุล : การศึกษาคุณลักษณะดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรียจากกุ้งกุลาดำ
Penaeus monodon (STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF MITOCHONDRIAL
DNA OF BLACK TIGER PRAWN (*PENAEUS MONODOM*) คณะกรรมการควบคุมวิทยา
นิพนธ์: บวรชัย สนธยานนท์ Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม Ph.D. 100 หน้า ISBN 974-662-858-5

การศึกษานี้ศึกษาคุณลักษณะ DNA เป็นส่วนๆของไมโทคอนเดรียจากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). ไมโทคอนเดรียเตรียมจากกล้ามเนื้อและกล้ามเนื้อบริเวณขาว่ายน้ำของกุ้ง จากนั้นผ่านขบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี EtBr-CsCl ultracentrifugation และ electroelution. DNA ถูกตัดให้เป็นส่วนๆโดย *Sau3AI* และทำการโคลนชิ้นส่วนของ DNA เข้า pBluescript SK(-) หรือ pUC 19 vector. โคลนนี้ได้ถูกคัดเลือกรูปแบบส้อมหลังจากตรวจสอบ DNA ในเซลล์เรียบร้อยแล้ว ชิ้นส่วน DNA เหล่านี้ถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสจากส่วนปลาย 5' และ 3' โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสโดยอัตโนมัติของ PE. Applied Biosystem (ABI PRISM model 377) โดยใช้ dye-terminator chemistry. ข้อมูลของลำดับเบสถูกนำมาตรวจสอบโดยใช้ BLAST โปรแกรม. ในช่วงแรก, 17 โคลนได้ถูกนำมาตรวจสอบโดยโปรแกรมต่างๆใน GCG package และซ้ำอีกด้วย Clustal W โปรแกรมโดยใช้ database ของ mitochondrial genome ที่สัมพันธ์กัน พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับเบส 38-52 %. ข้อมูลเหล่านี้อาจกล่าวได้ว่าไม่ใช่ mtDNA โคลนแต่เหมือนกับ DNA ใน genomic มากกว่าในกุ้ง. ในความพยายามครั้งหลัง, พบว่ามี 3 โคลนที่เพิ่มเติม (PMTC018, PMTC019 และ PMTC020) ที่เชื่อว่าเป็นยีนในไมโทคอนเดรียและได้รับคัดเลือกมาหาลำดับเบสทั้งสายพบว่า โคลน PMTC018 มีความยาว 945 เบสและเป็นยีน cytochrome oxidase subunit I, PMTC019 มีความยาว 744 เบสและเป็นยีน cytochrome *b* และ PMTC020 มีความยาว 900 เบสและเป็นยีน 16S rRNA และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับ genome ใน *Drosophila melanogaster* พบว่ามีความเหมือนกัน 70.4 %, 74.7 % และ 48.3 % ตามลำดับ มากกว่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับ gene sequence ในสิ่งมีชีวิตที่สูงขึ้น พบว่ามีความเหมือนกันในช่วง 70-90 %. ข้อมูลนี้จึงเชื่อได้ว่า 3 โคลนเป็นยีนของ mitochondrial DNA ในกุ้งกุลาดำ.