

21 JUL 2000



**cDNA LIBRARY CONSTRUCTION AND NUCLEOTIDE
SEQUENCE CHARACTERIZATION OF SELECTED cDNA
CLONES FROM HEMOCYTES OF BLACK TIGER SHRIMP
(PENAEUS MONODON)**

JANTANA WONGSANTICHON

อภินันท์นาถการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

2000
ISBN 974-664-391-6

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
J35C

2000

44998 e-2

4036147 MBMG/M : MAJOR : MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING; M. Sc. (MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING)

KEY WORDS : *PENAEUS MONODON* / cDNA LIBRARY/ ESTs/ SHRIMP / CRUSTACEA

JANTANA WONGSANTICHON: cDNA LIBRARY CONSTRUCTION AND NUCLEOTIDE SEQUENCE CHARACTERIZATION OF SELECTED cDNA CLONES FROM HEMOCYTES OF BLACK TIGER SHRIMP (*PENAEUS MONODON*). THESIS ADVISORS : BURACHAI SONTHAYANON Ph.D., APINUNT UDOMKIT Ph.D., SAKOL PANYIM Ph.D. 110 p. ISBN 974-664-391-6

Shrimp aquaculture are facing devastating viral and bacterial diseases while molecular information regarding crustacean genes in defense mechanism is unavailable. To quickly obtain gene sequences which are expressed in phagocytic cells of the black tiger shrimp, cDNA libraries were constructed and random clones picked up for 5' sequence determination. Directional lambda ZAPII-based cDNA libraries were constructed from mRNA of hemocytes of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). A few hundred randomly selected plaques were excised into pBluescript phagemids. Each clone was subjected to automated DNA sequencing using dye terminator chemistry. BLAST programs were used to search for sequence similarity with those from online databases. From the first cDNA library, out of 67 ESTs, 32 (48 %) were identified to be of mitochondrial genes, 5 (8 %) were of ribosomal protein genes, 3 (4 %) were of other genes, and 11 (16 %) did not match existing gene data. From the second cDNA library constructed from a larger amount of mRNA, a set of 194 ESTs was determined and analyzed. 123 (64 %) clones showed sequence similarity to previously identified genes and ESTs of many species, 71 (36 %) clones showed no sequence similarity to those of any genes. Frequently found EST identities were mitochondrial genes (14 %), ribosomal proteins (6 %), actin (5 %), and serine proteinase inhibitors (3 %). Several DNA clones for proteins involved in defense mechanism such as serine proteinase inhibitors, and peroxinectin were also found. These two genes were of interest for their involvement in the prophenoloxidase activating system. Some ESTs for protein in signal transduction pathway such as Ran and serine/threonine kinase were also found. In total, over 216 DNA sequences, some complete, have been submitted to Genbank database. The EST data set from our hemocyte cDNA libraries should serve as useful basic information for many fields of biological researches and applications.

4036147 MBMG/M : สาขาวิชา : อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ; วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

จันทนา วงศ์สันติชน : การสร้างห้องสมุด cDNA และการศึกษาลักษณะลำดับรหัสเบสของบรรดา cDNA clone ที่แยกมาได้จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (cDNA LIBRARY CONSTRUCTION AND NUCLEOTIDE SEQUENCE CHARACTERIZATION OF SELECTED cDNA CLONES FROM HEMOCYTES OF BLACK TIGER SHRIMP, *PENAEUS MONODON*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : บุรชัย สนธยานนท์, Ph.D., อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D. 110 หน้า ISBN 974-664-691-6

การเพาะเลี้ยงกุ้งกำลังเผชิญกับความเสียหายหนักจากโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย ในขณะที่ข้อมูลของยีนใน Crustacean ที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันยังไม่มี เพื่อให้เราได้บรรดาลำดับรหัสเบสของยีนที่แสดงออกในเซลล์ที่จับกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) อย่างรวดเร็ว จึงได้สร้างห้องสมุด cDNA ขึ้น และสุ่มเลือกโคลนเพื่อวิเคราะห์ลำดับรหัสจากปลายด้าน 5' cDNA library ซึ่งอาศัยพาหะ Lambda ZAP II ได้ถูกสร้างขึ้นจาก mRNA ของเม็ดเลือดจากกุ้งกุลาดำ เมื่อทำการคัดเลือก plaques แบบสุ่มและตัดออกมาเป็น pBluescript phagemids โคลนหลายร้อยตัวถูกนำไปหาลำดับรหัสเบสโดยใช้ dye-terminator chemistry ผ่านเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ เมื่อนำรหัสที่ได้ไปเทียบหาความเหมือนกับลำดับรหัสเบสเท่าที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Online โดยใช้โปรแกรม BLAST ชนิดต่างๆ ผลการวิเคราะห์ ESTs จำนวน 67 โคลนจากห้องสมุดแรก พบเอกลักษณ์ดังนี้ คือ Mitochondrial gene 48 %, Ribosomal protein 8 %, ยีนอื่นๆ 4 %, และ 16 % ไม่สามารถระบุได้ ผลการวิเคราะห์ ESTs จำนวน 194 โคลนจากห้องสมุด cDNA ที่สองที่สร้างจาก mRNA ปริมาณสูงกว่า 64 % พบความเหมือนของลำดับรหัสเบสกับยีนหรือ ESTs จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ และ 36 % ไม่ปรากฏความเหมือนกับยีนใดๆ เอกลักษณ์ที่พบบ่อย คือ Mitochondrial gene 14 %, Ribosomal protein 6 %, Actin 5 %, และ Serine proteinase inhibitor 3 % โดยพบโคลนที่เป็นโปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันด้วย เช่น Serine proteinase inhibitors และ Peroxinectin ซึ่งสองยีนนี้มีความน่าสนใจเพราะเกี่ยวข้องกับ Prophenoloxidase activating system นอกจากนี้ยังพบรหัสเอกลักษณ์ EST ที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction pathway เช่น Ran และ Serine/threonine kinase โดยภาพรวมแล้วข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ 216 ชิ้น ได้ถูกส่งเข้าฐานข้อมูล Genbank ข้อมูล EST จากห้องสมุด cDNA ของเราเหล่านี้เชื่อว่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ต่อไป