- 5 OCT 2000

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A GENOMIC DNA FRAGMENT AND A cDNA ENCODING Pem-CMG2, A PEPTIDE IN CHH/MIH/GIH FAMILY OF *Penaeus monodon*

PONGPAT KIATPRASERT

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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 2000

ISBN 974-664-518-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

45485 C.2

4036152 MBMG/M : MAJOR : MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING ; M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
KEY WORDS : *Penaeus monodon,* PEPTIDE HORMONE, CHH/MIH/GIH, cDNA, GENOMIC DNA, INTRON, EXON

PONGPAT KIATPRASERT : MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A GENOMIC DNA FRAGMENT AND A cDNA ENCODING Pem-CMG2, A PEPTIDE IN CHH/MIH/GIH FAMILY OF *Penaeus monodon.* THESIS ADVISORS : APINUNT UDOMKIT, Ph.D., BURACHAI SONTHAYANON, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D. 95 P. ISBN 974-664-518-8

The crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH) and gonad-inhibiting hormone (GIH) are the members of peptide hormone family that are synthesized in the X-organ-sinus gland complex located in the optic ganglia of the eyestalks of crustaceans. A number of physiological processes in crustaceans, in particular, growth and reproduction, is known to be regulated by this group of peptide hormones. In this study, attention was drawn to clone and characterize both the gene and the cDNA encoding *Pem-CMG*2, a member of the CHH/MIH/GIH family from black tiger prawns (*Penaeus monodon*).

Total RNA from a single pair of eyestalk of *P. monodon* was used as a template for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Specific primer was designed from the nucleotide sequence of the previously cloned 5'RACE fragment, starting at the start codon for Pem-CMG2. This specific primer was used in combination with PM1 primer that primed the 3' end of cDNA to amplify an open reading frame encoding the Pem-CMG2 peptide. Sequence analysis of several recombinant clones revealed the presence of a 381 bp open reading frame. This open reading frame encoded a precursor peptide that consisted of 127 amino acids. The precursor peptide included 51 amino acids leader peptide, in combination with a putative processing site, KR and the mature peptide that comprised 74 amino acid residues. The mature Pem-CMG2 peptide shared a high degree of homology to those of the CHH/MIH/GIH family from several crustaceans and exhibited all characteristics of this hormone family. The PCR-based genomic DNA amplification was employed in order to clone the genomic fragment encoding Pem-CMG2. This genomic fragment spaned 1,274 bp and consisted of three exons and two introns. The exon-intron boundary of this genomic fragment of *P. monodon* also follows the 'GT-AG rule' for the spilce donor and acceptor. The first intron separated the signal peptide coding region and the second intron interrupted the coding sequence for the mature peptide. This is consistent with the primary structure of the genes encoding MIH in *Charybdis feriatus* and the CHH-like peptide in *Metapenaeus ensis* that have recently been characterized. However, this is in contrast to the primary structure of the gene for Pem-CMG of *P.monodon* that contained only one intron which separated the coding sequence for the mature peptide. The nucleotide sequences of the cDNA and the genomic DNA of Pem-CMG2 cloned in this study were different at four positions, three of them changed the encoded amino acids. This suggested that the cDNA probably was not transcribed from this genomic fragment, but from another related gene copy.

Copyright by Mahidol University

036152 MBMG/M : สาขาวิชา : อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ : วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

พงศ์ภัทร เกียรติประเสริฐ : การโคลน และการศึกษาลักษณะของชิ้น genomic DNAและ cDNA ที่สร้างเปปไทด์ฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIHของกุ้งกุลาดำ (Pem-CMG2) (MOLECULAR CLONNING AND CHARACTERIZATION OF A GENOMIC FRAGMENT AND A cDNA ENCODING Pem-CMG2, A PEPTIDE IN CHH/MIH/GIH FAMILY OF *Penaeus monodon*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D., บุรชัย สนธยานนท์, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.
95 หน้า ISBN 974-664-518-8

Crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt inhibiting hormone (MIH) และ gonad inhibiting hormone (GIH) เป็นกลุ่มของเปปไทด์ฮอร์โมนซึ่งสร้างมาจากเซลล์ประสาทหลั่งสารของ X-organ sinus gland ซึ่งพบได้ภายในก้านตาของสิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชียน ขบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาหลายด้านของครัสเตเชียนต่างก็ถูกควบคุมโดยเปปไทด์ฮอร์โมนกลุ่มนี้ โดยเฉพาะในด้านการเจริญเติบโตและ การสืบพันธุ์

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการโคลนและศึกษาลักษณะของยีน และชิ้น cDNA ที่สร้างฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH (Pem-CMG2) จากกุ้งกุลาดำโดยใช้ total RNAซึ่งสกัดจากก้านตาหนึ่งคู่ ของกุ้งกุลาดำเป็น template สำหรับปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะที่ถูกออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ start codon ของชิ้น 5'RACE ซึ่งเก็บรหัสสำหรับเปปไทด์ CMG2 ซึ่งถูกทำการโคลนมาแล้วก่อนหน้านี้ และไพร์เมอร์ PM1 ทางปลาย 3' ของ cDNA ในการเพิ่มจำนวนชิ้น cDNA สำหรับ Pem-CMG2 ซึ่งมี open reading frame ความยาว 381 นิวคลีโอไทด์ และถอดรหัสเป็นสารเปปไทด์ตั้งต้นความยาว 127 กรดอะมิโน ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโนสำหรับ leader เปปไทด์ จำนวน 51 ตัว กรดอะมิโนที่เป็น processing site (KR) และ กรดอะมิโนที่เป็น mature เปปไทด์มี 74 ตัว ลำดับกรดอะมิโนของ Pem-CMG2 มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จากครัสเตเชียนชนิดอื่น รวมถึงลักษณะจำเพาะต่างๆของฮอร์โมนในกลุ่มนี้ด้วย การเพิ่มจำนวนของ genomic DNA โดยปฏิกิริยา PCR ได้ถูกใช้นำมาทำการโคลนยีนสำหรับPem-CMG2 ของกุ้งกุลาดำ ชิ้น genomic DNA มีขนาด 1,274 นิวคลีโอไทด์ และประกอบด้วย 3 exons และ 2 introns โดยขอบเขตที่กำหนด exon และ intron ของยีนนี้ของกุ้งกุลาดำเป็นไปตามกฎ GT-AG สำหรับ splice donor และ splice acceptor โดย intron ตัวที่หนึ่งแยกส่วน leader เปปไทด์ออกจากกัน ขณะที่ intron ตัวที่สองแยกลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับ mature เปปไทด์ออกจากกัน โครงสร้างของยีนสำหรับ Pem-CMG2 ที่มี 2 introns นี้ มีลักษณะเหมือนกับยีนสำหรับ MIH ของ *Charybdis feriatus* และ CHH ของ *Metapenaeus ensis* แต่แตกต่างจากยีนสำหรับ Pem-CMG เปปไทด์ ของกุ้งกุลาดำ ที่มีเพียง 1 intron ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น cDNA และ genomic DNA สำหรับ Pem-CMG2 เปปไทด์ที่โคลนได้ มีความแตกต่างกัน 4 ตำแหน่ง ซึ่งทำให้ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไป 3 ตำแหน่ง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า cDNA ที่โคลนได้ไม่ได้สร้างมาจากชิ้น genomic DNA นี้ แต่สร้างมาจาก gene อื่นในกลุ่มเดียวกันที่มีความคล้ายคลึงกันมาก

Copyright by Mahidol University