

27 JUL 2001



**MOLECULAR CLONING AND SEQUENCING OF cDNA's  
OF BLACK TIGER SHRIMP HAEMOCTYES**

**CHUTIMA THEPPARIT**

อภินันท์นาการ

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**

**2001**

**ISBN 974-665-927-8**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH

C564m

2001

Copyright by Mahidol University

4136310 MBMG/M : MAJOR : MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING; M.Sc. (MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING)

**KEY WORDS** : *Penaeus monodon* / RT-PCR / CLONING

**CHUTIMA THEPPARIT : MOLECULAR CLONING AND SEQUENCING OF cDNA's OF BLACK TIGER SHRIMP HAEMOCYTES. THESIS ADVISORS: BURACHAI SONTAYANON, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D., APINUNT UDOMKIT, Ph.D. 111 p. ISBN 974-665-927-8**

The black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) is an economically important organism for several countries in Asia and the Pacific, including Thailand, which is the world's number one shrimp exporter. Exportation of frozen shrimp brings an annual income of two billion US dollars to Thailand. Outbreak of diseases is a major cause of shrimp mortality and economic losses. In order to gain a better understanding of the molecular basis of shrimp defense mechanisms, this study aims to obtain cDNA clones relevant to this function.

In this study, we used RT-PCR and touch-down PCR to clone partial cDNA fragments from shrimp haemocytes, the major cell type involved in eliminating invading pathogens. In addition, degenerate primers were designed from a conserved Rel-coding domain of NF- $\kappa$ B sequences of humans, mice, and *D. melanogaster*. This pair of primers was unsuccessful in amplifying a Rel-coding domain sequence from shrimp. However, during cloning attempts, we found other shrimp cDNA sequences that showed highly conserved sequences related to known proteins of other eukaryotes including 14-3-3-like protein, Innexin, and  $\alpha$ -tubulin. More than one type of each sequence was found. 14-3-3 protein is a known multifunctional protein with a marked role in signal transduction. Additionally, we found two clones that might be related to the immune response, namely clones for hemolectin and a thiolester-motif containing protein (complement-like protein) as well as other clones of uncertain identities. The results of this research suggest that the clones for hemolectin and the thiolester-motif containing protein be investigated further for their roles in the shrimp immunity.

4136310 MBMG/M : สาขาวิชา: อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์; วท.ม.

(อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

ชุตินา เทพฤทธิ์ : การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น cDNA ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ (MOLECULAR CLONING AND SEQUENCING OF cDNA'S OF BLACK TIGER SHRIMP HAEMOCYTES) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : บุษัช สมนยานนท์ Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D., อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D. 111 หน้า ISBN 974-665-927-8

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญสำหรับหลายประเทศทั้งในแถบเอเชียและแปซิฟิกรวมทั้งประเทศไทยซึ่งเป็นผู้ส่งออกกุ้งอันดับหนึ่งของโลก การส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งนํารายได้เข้าสู่ประเทศไทยในแต่ละปีเป็นจำนวนกว่าสองพันล้านเหรียญสหรัฐ ปัญหาการแพร่ระบาดของโรคติดต่อในกุ้งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายและการลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วและนำมาซึ่งความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาล เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งในระดับโมเลกุล การวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษา cDNA ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำการทดลองโคลน DNA fragment โดยวิธี RT-PCR และ touch-down PCR จาก RNA ที่สกัดจากเซลล์เม็ดเลือดซึ่งเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน ในการวิจัยได้ออกแบบ degenerate primers หนึ่งคู่จากบริเวณที่มีการอนุรักษ์รหัสที่เรียกว่า Rel homology domain (RHD) ของรหัสยีนกลุ่ม NF- $\kappa$ B จากคน (*Homo sapiens*) หนู (*Mus musculus*) และแมลงหวี่ (*D. melanogaster*) พบว่าการใช้ degenerate primer ดังกล่าวยังไม่สามารถ amplify Rel-coding domain sequence จากกุ้งกุลาดำได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ได้พบโคลนอื่น ๆ ซึ่งมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนบางชนิดใน eukaryotes ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ 14-3-3-like protein, Innexin,  $\alpha$ -tubulin 14-3-3-like protein เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการ signal transduction นอกจากนี้ยังพบ cDNA โคลน อีก 2 ชนิด ซึ่งอาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ hemolectin และ thiolester-motif containing protein (complement-like protein) และโคลนอื่น ๆ ที่ยังไม่ทราบเอกลักษณ์แน่ชัด ผลการทดลองนี้ชี้แนะว่าโคลนของ hemolectin และ thiolester-motif containing protein น่าจะมีการวิจัยต่อไป เพื่อศึกษาถึงบทบาทที่แน่ชัดต่อความต้านทานของเชื้อโรคในกุ้ง