

การศึกษาตำแหน่งของทรานสโปซอนบนจีโนมของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

สายพันธุ์ที่ไวต่อยากลุ่มแมโครไลด์

Study of transposon localization on genome of macrolide-susceptible *Mycobacterium tuberculosis*

H37Rv mutants

รุ่งอรุณ สุขสำราญ (Rungaroon Suksamran)* เทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์ (Therdsak Prammananan)**

สารดี วาฤทธิ์ (Saradee Wari) ** ศรีัญญา พันธุ์พุกภัย (Saranya Phunpruch)***

บทคัดย่อ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ในการกลายพันธุ์เชื้อวัณโรคโดยการแทรกทรานสโปซอน Tn5 เข้าไปในจีโนมของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ คือ Tn77 และ Tn196 มีความไวต่อยากลุ่มแมโครไลด์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาตำแหน่งของยีนที่มีการแทรกของทรานสโปซอนของเชื้อสายพันธุ์กลายดังกล่าว จากการทำ Genome walking โดยใช้ชุด DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit พบว่าทรานสโปซอน Tn5 ได้เข้าไปแทรกบนจีโนมของเชื้อสายพันธุ์กลาย Tn77 และ Tn196 ในตำแหน่งของยีน Rv0470A และยีน *ksgA* ตามลำดับ ซึ่งยีน Rv0470A ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ ในขณะที่ยีน *ksgA* ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไดเมทิลอะดีโนซีนทรานสเฟอเรส โดยคาดว่ายีนทั้งสองน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านยาในกลุ่มแมโครไลด์ของเชื้อวัณโรค

ABSTRACT

In the previous work, two macrolide-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mutants, Tn77 and Tn196 were found from the insertion of Tn5 transposon in the genome of *M. tuberculosis* H37Rv. This work aims to study the Tn5 transposon localization on the genome of these mutants by Genome walking using DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit. It was found that Rv0470A and *ksgA* were inserted by Tn5 transposon on genome of mutants Tn77 and Tn196, respectively. Rv0470A encodes a hypothetical protein whereas *ksgA* codes for dimethyladenosine transferase. It was proposed that both genes might be involved in macrolide resistance in *M. tuberculosis*.

คำสำคัญ : เชื้อวัณโรค ทรานสโปซอน แมโครไลด์

Key Words : *Mycobacterium tuberculosis*, Transposon, Macrolide

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

** นักวิจัย ห้องปฏิบัติการวิจัยวัณโรค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่เกิดจากโรคติดเชื้อเป็นอันดับต้นๆ ของประชากรโลก จากรายงานขององค์การอนามัยโลกพบว่า ในปัจจุบันมีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ปีละประมาณ 8 ล้านคนและในจำนวนนี้เป็นผู้ป่วยระยะแพร่เชื้อถึง 3.9 ล้านคน โดยวัณโรคคร่าชีวิตประชากรปีละประมาณ 1.7 ล้านคน สำหรับประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรคประมาณปีละ 91,000 ราย และในจำนวนนี้เป็นผู้ป่วยระยะแพร่เชื้อประมาณ 41,000 ราย โดยจัดอยู่ในอันดับที่ 18 ของประเทศที่มีผู้ป่วยวัณโรคมก (WHO report, 2007)

วัณโรคสามารถรักษาได้ด้วยการใช้ยาต้านวัณโรค ได้แก่ กลุ่มยาหลัก (First-line drug) และกลุ่มยาสำรอง (Second-line drug) แต่หากการรักษาขาดความต่อเนื่อง อาจทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาจนไม่สามารถใช้ยาเดิมได้อีก ซึ่งมีรายงานการพบเชื้อสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อยาต้านวัณโรคคือ เชื้อวัณโรคคือยาหลายขนาน (Multidrug-Resistant Tuberculosis) ที่ดื้อต่อยาต้านวัณโรคในกลุ่มยาหลักคือ ไอโซไนอาซิด (Isoniazid) และ ไรแฟมปีซิน (Rifampicin) และเชื้อวัณโรคคือยาเกือบทุกขนาน (Extensively Drug-Resistant Tuberculosis) ซึ่งเป็นเชื้อวัณโรคคือยาหลายขนานที่ยังดื้อต่อยาในกลุ่มยาสำรองคือ ฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolones) และยาที่ใช้ฉีดหนึ่งในสามชนิดนี้ ได้แก่ อมิคาซิน (Amikacin) กานามัยซิน (Kanamycin) หรือ คาปริโอไมซิน (Capreomycin) นอกจากนี้ยังมีรายงานยืนยันว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อสายพันธุ์คือยาเกือบทุกขนานร้อยละ 98 จะเสียชีวิตโดยเฉลี่ยภายใน 16 วันหลังจากที่ตรวจพบว่าเป็นวัณโรค (CDC, 2006) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้หลายประเทศหันมาให้ความสนใจกับปัญหาวัณโรค องค์การอนามัยโลกจึงได้จัดการ

ประชุมหารืออย่างเร่งด่วนเพื่อหามาตรการรับมือกับปัญหานี้ รวมถึงเกิดความพยายามของหลายหน่วยงานในการคิดค้นยาต้านวัณโรคชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์กับเชื้อดื้อยาและไม่ทำให้เกิดการกลับมาเป็นวัณโรคอีก

M. tuberculosis จัดอยู่ในกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย (Mycobacteria) ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้มักต้านทานต่อสารเคมีและยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการฆ่าเชื้อโดยทั่วไป อันเนื่องมาจากเชื้อเหล่านี้มีองค์ประกอบของโครงสร้างผนังเซลล์เป็นสารประเภทไขมันอยู่สูง ทำให้มีคุณสมบัติเป็นเชื้อเลือกผ่าน สารที่ละลายในน้ำไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ยกเว้นสารที่สามารถละลายได้ในไขมัน ซึ่งผนังเซลล์ของมัยโคแบคทีเรียนี้จัดเป็นปัจจัยสำคัญต่อการดื้อการต้านทานตามธรรมชาติ (Jarlier และ Nikaido, 1994) จึงทำให้มียาปฏิชีวนะเพียงไม่กี่กลุ่มที่สามารถใช้ต้านเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียได้ ซึ่งหากเป็นเชื้อมัยโคแบคทีเรียกลุ่มก่อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis* complex หรือ MTC) จะใช้ยาต้านวัณโรคกลุ่มยาหลักดังที่ได้กล่าวไป แต่หากเป็นโรคติดเชื้อจากมัยโคแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ก่อวัณโรค (Nontuberculous mycobacteria หรือ NTM) จะใช้ยากลุ่มอื่น เช่น ยากลุ่มแมโครไลด์ (Macrolide) ได้แก่ ยาอาซิโทรไมซิน (Azithromycin) และยาคลาริโทรไมซิน (Clarithromycin) (Nash, 2003)

ยาในกลุ่มแมโครไลด์ออกฤทธิ์โดยจะเข้าไปจับกับ 23S rRNA ใน large subunit ของไรโบโซม และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย (Hansen และคณะ, 2002) ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์ได้ดีกับเชื้อกลุ่ม NTM แต่กลับไม่มีฤทธิ์กับเชื้อ MTC เนื่องมาจากเชื้อกลุ่มนี้คือต่อยากลุ่มแมโครไลด์โดยธรรมชาติ (Hoffner และคณะ, 1997) จากความแตกต่างในการดื้อยาของเชื้อสองกลุ่มนี้ Buriánková และคณะ (2004) จึงทำการเปรียบเทียบความ

แตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้งสองกลุ่ม เพื่อศึกษาหาขึ้นที่เป็นสาเหตุให้เกิดการต้านต่อยา กลุ่มแมโครไลด์ของเชื้อกลุ่ม MTC โดยพบว่าเชื้อ กลุ่ม MTC มีเอ็นที่ผลิตโปรตีน Erm (methyltransferase) ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการเมทิลเลชัน (methylation) ในบริเวณตำแหน่งจับของยาที่ 23S rRNA ทำให้ยาไม่สามารถจับกับเป้าหมายและออกฤทธิ์ได้ ส่งผลให้เชื่อนั้นดื้อต่อยา อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการพบเชื้อวัณโรคคือยาหลายขนานที่แยกได้จากผู้ป่วยมีความไวกับยาในกลุ่มแมโครไลด์แตกต่างจากเชื้อวัณโรคทั่วไปที่ดื้อต่อยากลุ่มนี้ และไม่พบความผิดปกติของยีนที่กำหนดเอนไซม์ Erm ในเชื้อที่ไวต่อยาเหล่านี้ (ข้อมูลยังไม่ได้ตีพิมพ์) คณะผู้วิจัยคาดว่า การที่เชื้อไวต่อยากลุ่มแมโครไลด์นี้ น่าจะเกิดจากกลไกอื่นที่ยังไม่มีรายงานในเชื้อวัณโรค

ปัจจุบันในการศึกษาถึงกลไกการต้านยาของเชื่อนิยมใช้วิธีที่ทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์ โดยการใช้เทคนิคยับยั้งการทำงานของยีนซึ่งเรียกว่า gene knockout แล้วคัดเลือกลักษณะของเชื้อกลายพันธุ์ที่น่าสนใจมาทำการศึกษาด้านหน้าที่ของยีนที่ถูกยับยั้งนั้น โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์จะใช้ชิ้นส่วนยีนที่ไม่ทำงานแล้วแต่มีบริเวณคัดเลือก (selective marker) เช่น ชิ้นส่วนยีนทรานสโปซอน Tn5 ซึ่งมีบริเวณคัดเลือกคือยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินนำมาทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคทรานสโปซอนมิวตาเจเนซิส (transposon mutagenesis) (EZ-Tn5™ <KAN-2> Transposon, Epicentre, USA) เช่นเดียวกับในงานวิจัยนี้ซึ่งได้นำเชื้อวัณโรคสายพันธุ์กลาย *M. tuberculosis* H37Rv ที่ผ่านการทำทรานสโปซอนมิวตาเจเนซิสแล้วได้เชื้อที่มีลักษณะไวต่อยากลุ่มแมโครไลด์ ได้แก่ ยาลา-ริโทรมัยซิน สองสายพันธุ์คือ Tn77 และ Tn196 มาศึกษาหาขึ้นที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการดื้อหรือไวต่อ

ยาในกลุ่มแมโครไลด์ ซึ่งหากทราบถึงตำแหน่งการแทรกของชิ้นส่วนทรานสโปซอน และทราบหน้าที่ของยีนที่ถูกทรานสโปซอนเข้าไปแทรกนั้นอาจนำไปสู่การค้นพบกลไกการดื้อต่อยากลุ่มแมโครไลด์ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในเชื้อวัณโรค และอาจนำไปสู่การพัฒนาต้านวัณโรคชนิดใหม่ได้

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สายพันธุ์ลินทรีที่ใช้และสภาวะการเจริญ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธุ์กลายที่ไวต่อยากลุ่มแมโครไลด์ Tn77 และ Tn196 บนอาหารแข็ง Middlebrook7H10 (Becton Dickinson, USA) ที่เติม Oleic Acid Albumin Dextrose Complex (Becton Dickinson, USA) ร้อยละ 10 และมียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) (Becton Dickinson, USA) โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง

2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

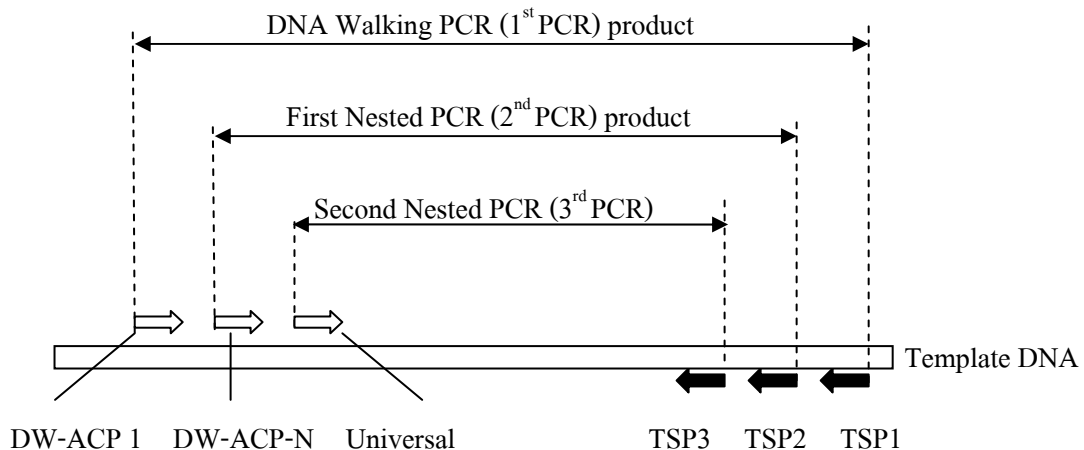
การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอดัดแปลงมาจากวิธีของ van Soolingen และคณะ (1991) โดยนำเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธุ์กลาย Tn77 และ Tn196 ที่เจริญบนอาหารแข็ง Middlebrook7H10 มากระจายในสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 7.5 ที่ประกอบด้วย Tris 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง กระจายเซลล์ในสารละลาย Tris-EDTA-Tween-lysozyme พีเอช 8.0 ปริมาตร 400

ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย Tris 10 มิลลิโมลาร์ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ Tween 80 ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร และ Lysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายโปรตีนเนสเค (Proteinase K) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate) เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น นำสารละลายไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเติมสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย CTAB เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร (ที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นขึ้นและลง จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย chloroform-isoamylalcohol (อัตราส่วนปริมาตร 24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอดเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนใสด้านบนที่มีสารละลายดีเอ็นเอมาเติมสารละลาย chloroform-isoamylalcohol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง จากนั้นแยกส่วนใสด้านบนที่ได้ไปเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตร และเติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99.8 โดยปริมาตร ที่เย็นจัด ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10

นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ให้แห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 7.5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วย่อย RNA โดยการเติมเอนไซม์ RNaseA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. การทำ Genome Walking

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาศึกษาตำแหน่งที่ทรานสโปซอนเข้าแทรกโดยเทคนิค Genome Walking โดยใช้ชุด DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit (Seegene, Korea) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่อยู่ถัดจากบริเวณของทรานสโปซอนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction หรือ PCR) จำนวน 3 ครั้ง (รูปที่ 1) โดยใช้ไพรเมอร์ของชุด Kit ซึ่งประกอบไปด้วยไพรเมอร์ 3 ตัว คือ DW-ACP 1 (5'-ACP-AGGTC-3'), DW-ACP-N (5'-ACPN-GGTC-3') และ Universal (5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGA-3') ซึ่งจะใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสคู่กับไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับบริเวณของทรานสโปซอน Tn5 (Target Specific Primer หรือ TSP) ไพรเมอร์ที่ออกแบบในงานวิจัยมี 3 ตัว คือ TSP1 (5'-GCCAGTTTAGTCTGACCATC-3'), TSP2 (5'-GGCGCATCGGGCTTCCCATACAAT-3') และ TSP3 (5'-ATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCC-3') โดยใช้ปฏิกิริยาและสภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามคำแนะนำในคู่มือของชุด DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit



รูปที่ 1 การทำ Genome Walking โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่อยู่ถัดจากบริเวณทรานสโพซอนจำนวน 3 ครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับทรานสโพซอนคู่กับไพรเมอร์ของชุด DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit โดย TSP1 ใช้คู่กับ DW-ACP 1, TSP2 ใช้คู่กับ DW-ACP-N และ TSP3 ใช้คู่กับ Universal primer

4. การโคลนผลิตภัณฑ์ PCR

นำผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ครั้งที่ 3 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทดสอบ QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 80 นาโนกรัม ไปเชื่อมต่อกับ TA cloning vector pDrive (Qiagen, Germany) 50 นาโนกรัม ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต จากนั้นทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ competent cell *E. coli* DH5α แล้วคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนทบนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และ X-gal (5-Bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการคัดเลือกโคโลนีแบบ blue-white screening นำโคโลนีที่มีสีขาวมาเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย QIAprep® Spin Miniprep

Kit (Qiagen, Germany) แล้วตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

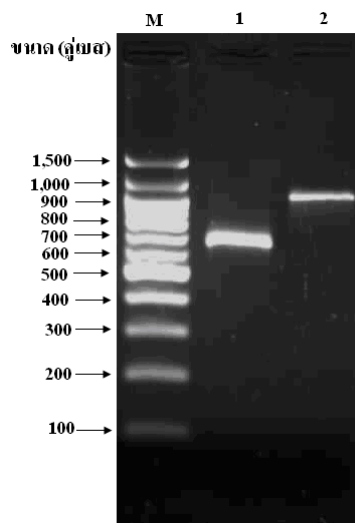
5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งพลาสมิดดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ T7 ที่บริษัท First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับของ *M. tuberculosis* H37Rv (Accession No. AL123456) จากฐานข้อมูลของธนาคารยีน

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการทำ Genome Walking โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธุ์กลาย Tn77 และ Tn196 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ของยีนที่ถูกแทรกด้วยทรานสโพซอน Tn5 จำนวน 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ใช้คู่ไพรเมอร์ DW-ACP 1 และ TSP1 นำผลผลิตที่

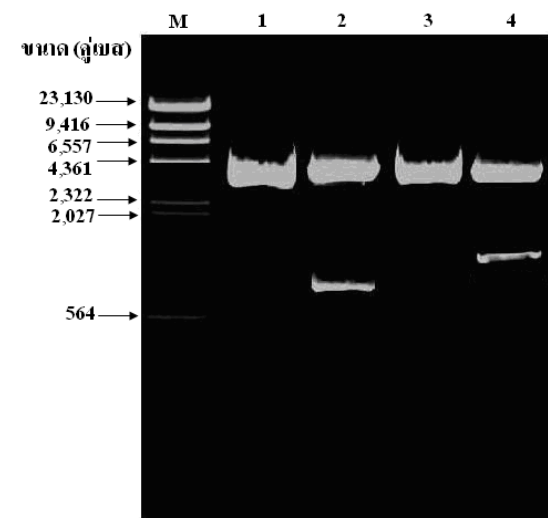
ได้มาทำ PCR ในครั้งที่ 2 กับคู่ไพรเมอร์ DW-ACP-N และ TSP2 นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ครั้งที่ 2 มาทำ PCR ในครั้งที่ 3 กับคู่ไพรเมอร์ Universal และ TSP3 พบว่าได้ผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดประมาณ 700 และ 900 คู่เบส เมื่อใช้จิโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์กลาย Tn77 และ Tn196 ตามลำดับ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลผลิต PCR ครั้งที่ 3 ที่ได้จากการทำ Genome Walking โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ถูกแทรกด้วยทรานสโปซอน เมื่อใช้จิโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธุ์กลาย Tn77 (lane 1) และ Tn196 (lane 2) (lane M คือ 100 bp DNA Ladder (Promega, USA))

จากการนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ และเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pDrive จากนั้นทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์โฮสต์ *E. coli* DH5 α และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีสีขาวและเจริญบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน X-gal และ IPTG มาเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอพบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบใน lane ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ pTn77 และ

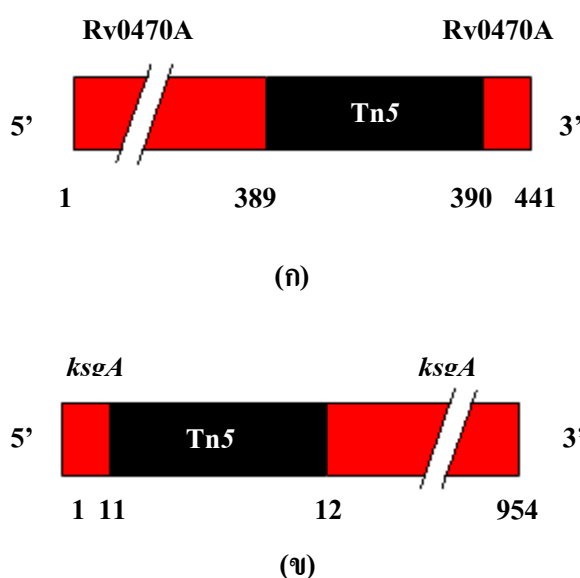
pTn196 ซึ่งเกิดจากการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์กลาย Tn77 และ Tn196 ตามลำดับ (รูปที่ 3) และเมื่อวิเคราะห์ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดีเอ็นเอ pTn77 และ pTn196 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือแถบดีเอ็นเอของเวกเตอร์ pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบสและแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส และ 900 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 3) จากนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดีเอ็นเอ pTn77 และ pTn196 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



รูปที่ 3 ผลการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิดดีเอ็นเอ pTn77 (lane 1) และ pTn196 (lane 3) และภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (lane 2 และ 4) (lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจ λ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (Invitrogen, USA))

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ไม่แสดงข้อมูล) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในธนาคารยีน (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv (Accession No. AL123456)

พบว่า ตำแหน่งที่ทรานสโปซอน Tn5 เข้าไปแทรกบนจีโนมของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธุ์กลาย Tn77 และ Tn196 คือบริเวณระหว่างเบสตำแหน่งที่ 389-390 ของยีน Rv0470A และตำแหน่งที่ 11-12 ของยีน *ksgA* ตามลำดับ(รูปที่ 4) โดยยีน Rv0470A ซึ่งมีขนาด 441 คู่เบส เป็นยีนที่ถอดและแปลรหัสให้โปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (Hypothetical protein) ในขณะที่ยีน *ksgA* ซึ่งมีขนาด 954 คู่เบส เป็นยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนกลุ่มเมทิลทรานสเฟอเรส (Methyltransferase) ที่ชื่อว่า ไดเมทิลอะดีโนซีน ทรานสเฟอเรส (Dimethyladenosine transferase)



รูปที่ 4 ตำแหน่งที่ทรานสโปซอน Tn5 เข้าไปแทรกบนจีโนมของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธุ์กลาย Tn77 (ก) และ Tn196 (ข)

จากการนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ถอดรหัสจากยีน Rv0470A ที่ไม่ทราบหน้าที่ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Protein Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blastp>)

พบว่าโปรตีนกลุ่มนี้ที่พบในเชื้อกลุ่มมัคโคแบคทีเรียเป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ แต่มีลักษณะคล้ายกับโปรตีนกลุ่ม UbiA prenyl transferase ของเชื้อ *Acidothermus cellulolyticus* และ *gamma proteobacterium* ซึ่งพบว่าเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ของมัคโคแบคทีเรียนั้นมีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อเลือกผ่านเนื่องมาจากองค์ประกอบของโครงสร้างเซลล์ส่วนใหญ่เป็นไขมัน แต่อย่างไรก็ตาม การที่ยีนบริเวณนี้ถูกยับยั้งอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ยาสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าปกติและส่งผลให้เชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธุ์กลาย Tn77 แสดงออกโดยการไวต่อยาคลาริโทรมัซิน ซึ่งต้องทำการพิสูจน์ต่อไป

โปรตีน KsgA หรือ Dimethyladenosine transferase ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *ksgA* ซึ่งมีรายงานว่ากรกลายพันธุ์ของยีนบริเวณนี้ทำให้เชื้อ *Bacillus subtilis* และ *E. coli* คื้อต่อยาคาซูกามัยซิน (Kasugamycin) (Ochi และคณะ, 2009) ซึ่งเป็นยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycoside) โดยมีรายงานถึงกลไกการทำงานของยานี้คือ จะไปกระตุ้นให้เกิดการแยกกันของ tMet-tRNA ที่จับกับบริเวณ 30S ของไรโบโซม ระหว่างกระบวนการแปลรหัสในช่วงแรก (initial translation) (Schuwirth และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ Formenoy และคณะ (1994) พบว่า กลไกการต้านยานี้เกิดจากการกลายพันธุ์บริเวณ 16S rRNA สาเหตุเนื่องมาจากโปรตีน KsgA ที่ทำหน้าที่ในการย้ายหมู่เมทิลระหว่างเบสอะดีนีนตำแหน่ง A1518 และ A1519 ในบริเวณ 16S rRNA ทำให้บริเวณนี้เปลี่ยนรูปร่างเกิดลักษณะเป็นลูป (hairpin loop) ซึ่งบริเวณนี้เองที่เกิดการเชื่อมต่อกับปลาย 5' ของ mRNA ซึ่งมี

ผลต่อกลไกการแปลรหัส ดังนั้นหากเกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำหน้าที่ผลิตโปรตีน KsgA นี้ อาจส่งผลทำให้ไม่สามารถแปลรหัสได้ แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาในระดับโครงสร้างและวิถีทางชีวเคมียืนยันว่า กลไกการทำงานของยาคูสมายซิน เกิดขึ้นที่บริเวณรอยต่อของ rRNA และบริเวณ E และ P site ของไรโบโซมมากกว่า (Schluenzen และคณะ, 2006) แม้จะมีรายงานว่ายีนนี้ทำให้เกิดกระบวนการเมทิลเลชันของ 16S rRNA แต่การศึกษาเหล่านี้ทำในเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ยังไม่มีการศึกษาในยีนนี้โดยละเอียดในเชื้อวัณโรคซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ายีนนี้อาจทำให้เกิดกระบวนการเมทิลเลชันที่อื่นได้อีก หรืออาจทำหน้าที่อื่นในเชื้อวัณโรค นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาความเกี่ยวข้องของยีนนี้กับยากลุ่มแมโครไลด์ที่เป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นและมีคุณค่าที่จะศึกษาต่อไปถึงหน้าที่และความสัมพันธ์ของยีนนี้กับการดื้อต่อยากลุ่มแมโครไลด์ในเชื้อวัณโรค

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองพบว่า ตำแหน่งการแทรกของทรานสโปซอน Tn5 บนจีโนมของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธุ์กลาย Tn77 และ Tn196 คือบริเวณระหว่างเบสตำแหน่งที่ 389-390 ของยีน Rv0470A และบริเวณระหว่างเบสตำแหน่งที่ 11-12 ของยีน *ksgA* ตามลำดับ ซึ่งยีน Rv0470A ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ ในขณะที่ยีน *ksgA* ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไดเมทิลอะดีโนซีนทรานสเฟอเรส โดยคาดว่ายีนทั้งสองน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านยาในกลุ่มแมโครไลด์ของเชื้อวัณโรค

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน Rv0470A และยีน *ksgA* เพื่อดูผลที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาคูสมายซินรวมถึงยากลุ่มแมโครไลด์ชนิดอื่น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก “สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สัญญารับทุนเลขที่ TGIST01-50-004”

เอกสารอ้างอิง

- Buriánková, K., Doucet-Populaire, F., Dorson, O., Gondran, A., Ghnassia, J. C., Weiser, J., and Pernodet, J. L. 2004. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48(1): 143-150.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2006. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55:301-305.
- Formenoy, L. J., Cunningham, P. R., Nurse, K., Pleij, C. W., and Ofengand, J. 1994. Methylation of the conserved A1518-A1519 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA by the *ksgA* methyltransferase is influenced by methylations around the similarly conserved U1512-G1523 base pair in the 3' terminal hairpin. *Biochimie* 76:1123-1128.

- Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., and Steitz, T. A. 2002. The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell.* 10:117–128.
- Hoffner, S. E., Gezelius, L. and Liljequist, B. O. 1997. In-vitro activity of fluorinated quinolones and macrolides against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:885–888.
- Jarlier, V., and Nikaido, H. 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* 123:11–18.
- Nash, K. A. 2003. Intrinsic macrolide resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel *erm* gene, *erm* (38) *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47(10): 3053-3060.
- Ochi, K., Kim, J. Y., Tanaka, Y., Wang, G., Masuda, K., Nanamiya, H., Okamoto, S., Tokuyama, S., Adachi, Y. and Kawamura, F. 2009. Inactivation of KsgA, a 16S rRNA methyltransferase, causes vigorous emergence of mutants with high-level kasugamycin resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53(1): 193-201.
- Schlunzen, F., Takemoto, C., Wilson, D.N., Kaminishi, T., Harms, J. M., Hanawa-Suetsugu, K., Szaflarski, W., Kawazoe, M., Shirouzu, M., Nierhaus, K. H., Yokoyama, S. and Fucini, P. 2006. The antibiotic kasugamycin mimics mRNA nucleotides to destabilize tRNA binding and inhibit canonical translation initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:871-878.
- Schuwirth, B. S., Day, J. M., Hau, C. W., Janssen, G. R., Dahlberg, A. E., Cate, J. H., and Vila-Sanjurjo, A. 2006. Structural analysis of kasugamycin inhibition of translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(10): 879-886.
- van Soolingen, D., Hermans, P. W., de Haas, P. E., Soll, D. R., and van Embden, J. D. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29(11):2578-2586.
- WHO report. 2007. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376)