



20 JUN 1995

A STUDY ON THE 16S rRNA GENE
OF
Mycobacterium tuberculosis

KLAI-UPSORN S. PONGRAPEEPORN

๒



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1995

Copyright by Mahidol University

32256

ลักษณะอาการคล้ายคลึงกับเชื้อในกลุ่มของเชื้อวัณโรค และมักพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่นในผู้ป่วยเอดส์ จากการใช้ Primer หลายคู่ (Multiplex PCR) ในการตรวจวิเคราะห์พบว่าเชื้อมัคโคแบคทีเรียเหล่านี้ ให้ผลหลังพีซีอาร์แตกต่างกัน สามารถแยกจากกันได้ ยกเว้น *M. tuberculosis*, *M. bovis* และ *M. bovis* BCG ซึ่งให้ผลเหมือนกัน แยกจากกันไม่ได้ มัยโคแบคทีเรียอื่นและแบคทีเรียอื่นให้ผลที่แตกต่างไปโดยสิ้นเชิง เมื่อใช้เทคนิคเดียวกันตรวจ เพราะฉะนั้น จากการศึกษาเบื้องต้น การใช้เทคนิคนี้ในการตรวจเชื้อมัคโคแบคทีเรียก่อโรคข้างต้น จึงน่าจะเป็นไปได้ แต่ยังคงต้องปรับปรุงความไวของเทคนิค เพื่อให้นำไปใช้ตรวจตัวอย่างจากผู้ป่วยได้โดยตรง นอกจากนี้ยังได้มีการนำยีนของ 16S rRNA มาใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ (DNA probe) หาจำนวนชุดของยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA operon) ในโครโมโซมของมัคโคแบคทีเรียด้วยวิธีไฮบริดเซชันแบบดีออบลิทและแบบเซาเทอร์น พบว่ามัคโคแบคทีเรียในกลุ่มโตเร็วมียีนของยีนนี้เป็นสองเท่าของมัคโคแบคทีเรียที่โตช้า และมัคโคแบคทีเรียที่โตช้า น่าจะมียีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA operon) เพียงชุดเดียวในโครโมโซม ในขณะที่มัคโคแบคทีเรียที่โตเร็วควรมียีนเหล่านี้เป็นสองชุดในโครโมโซม ดังที่เคยมีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้

Thesis Title A Study on the 16S rRNA Gene of *Mycobacterium tuberculosis*

Name Klai-upsom S. Pongrapeeporn

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Sakol	Panyim, Ph.D.
Angkana	Chaiprasert, Dr. rer. nat.
Pa-Thai	Yenchitsomanus, Ph.D.

Date of Graduation 30 December B.E. 2537 (1994)

Abstract

This study was an attempt to investigate 16S rRNA gene of mycobacterium species. The aim of this investigation was to explore the possibility to employ this gene for development of a rapid identification method for *M. tuberculosis* and some other pathogenic mycobacteria. The gene (~1.5 kb) of *M. tuberculosis* was amplified from 1 reference strain, 8 Thai isolates and 4 other species of *M. tuberculosis* complex(*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, and *M. microti*) using polymerase chain reaction (PCR). The amplified products were subsequently subjected to direct sequencing. These sequence data together with the previously published ones indicated that the coding region of this gene was highly conserved. Oligonucleotide primers have been designed from both coding and noncoding regions of the gene and used as an identification approach in multiplex PCR. *M. kansasii* and *M. avium* which also cause pulmonary infection were included in this assay. The results indicated that these species could be distinguished from each other by specific amplification patterns with the exception of *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. bovis* BCG which possessed their own common patterns. Furthermore, the 16S rRNA gene of *M. tuberculosis* was radioactively labeled by PCR and used as a hybridization probe to examine the copy number of rRNA operon in mycobacterium species. This probe was hybridized to mycobacterial DNAs which were immobilized on nitrocellulose or nylon membrane by dot blotting and Southern techniques. Dot blot hybridization revealed that rapid - growing mycobacteria possessed two times more copies of rRNA gene than slow - growing mycobacteria. Southern analysis of Pst I - digested DNA supported this possibility and also suggested that slow - growing mycobacteria contained one copy of rRNA gene, and thus one rRNA operon, whereas rapid - growing species contained two copies of this gene, and thus two rRNA operon, in their chromosome, as previously reported by other investigators.