28 MAR 1990

DEVELOPMENT OF DNA PROBES FOR SENSITIVE DETECTION AND ISOLATES DIFFERENTIATION OF TRYPANOSOMA EVANSI

NAREERAT VISESHAKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1989

13930

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาตัวตรวจสอบดีเอ็นเอสำหรับการตรวจด้วยความไว และการตรวจสอบเพื่อหาความแตกต่างในเชื้อ TRYPANOSOMA EVANSI

ผู้วิจัย นารีรัตน์ วิเศษกุล

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

๑ นาย สกล พันธุ์ยิ้ม

๒ นาย ประพนธ์ วิไลรัตน์

๓ นาย ผานพ ม่วงใหญ่

วันที่สำเร็จการศึกษา ๑๐ เมษายน ๒๕๓๒

บทคัดย่อ

เชื้อ TRYPANOSOMA EVANSI เป็น โปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคในปศุสัตว์ที่ชื่อว่าโรค "เซอร่า" การติดเชื้อนี้ ทำให้สัตว์ผอมแห้ง บางรายแท้งลูก และบางรายตาย ด้วยโรคแทรกซ้อน เนื่องจากโรคนี้เป็นโรคสำคัญต่อสุขภาพของสัตว์ และเกิดความเสียหายต่อผู้เลี้ยง วิธีการตรวจหาเชื้อ TRYPANOSOMA EVANSI ในสัตว์ที่สงสัยว่าเป็นโรค จึงควรมีการพัฒนาเพื่อช่วยหรือทดแทนวิธีการในปัจจุบัน ที่ใช้การตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์, การฉีดเชื้อสู่สัตว์ทดลองและการตรวจหาทางซีรัมวิทยานั้น ยังไม่ให้ผลที่น่าพอใจ ทั้งยังไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการออกห้องที่ และไม่มีความไวพอในการตรวจหาเชื้อในเลือดของสัตว์ป่วย ดังนั้นการใช้ตัวตรวจสอบดีเอ็นเอ จึงถูกพัฒนาขึ้นช่วยในการตรวจด้วยวิธีปัจจุบันที่ใช้อยู่ และตัวตรวจสอบดีเอ็นเอยังช่วยวิเคราะห์จำแนก ISOLATES ของเชื้อนี้ด้วย

DNA LIBRARY ของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ EcoRI ในเชื้อ T.evansi NpI ISOLATE ถูกสร้างขึ้นเพื่อหาชิ้นที่เป็น REPETITIVE DNA และมีความจำเพาะต่อเชื้อนี้ เท่านั้น recombinant pTec.6 ถูกเลือกจาก ๕๗๕ recombinant เพื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบ pTec.6 เป็น recombinant ที่มีชิ้น ดีเอ็นเอ ขนาด 6.5 kb แทรกอยู่ใน ดีเอ็นเอพาหะ pUN121 ดีเอ็นเอชิ้นนี้เมื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบที่ติดฉลากด้วย 32P-dATP ให้สัญญาณเข้มที่สุด คือสามารถตรวจหาเชื้อต่ำสุดที่ 1000 เซลล์ และกับปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดที่ 62.5 pg นอกจากนี้ pTec.6 ยังไม่เกิดสัญญาณกับ ดีเอ็นเอ ของ วัว, ควาย และจาก เชื้ออื่นๆได้แก่ เชื้อ BABESIA BOVISและเชื้อ TRYPANOSOMA THEILERI

Copyright by Mahidol University

นอกจากนี้ kinetoplast DNA ของ เชื้อ T. evansi PS ISOLATE ยัง ถูกนำมาเป็นตัวตรวจสอบ โดยการ clone เข้าดีเอ็นเอพาหะ pUC 12 ก่อนนำมาเป็นตัวตรวจสอบแล้วติดฉลากด้วย 32P-dATP ผลปรากฏว่า พบจำนวนของ kDNA ในแต่ละ ISOLATE ไม่เท่ากัน และ kDNA ของเชื้อนี้มีมากกว่าหนึ่งชนิด ทำให้ตัวตรวจสอบบอกจำนวนเชื้อได้ไม่แน่นอน

เนื่องจากในปัจจุบันนี้ ยังไม่มีวิธีใดที่จะจำแนกความแตกต่างของเชื้อนี้ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้โรคนี้มีอาการของโรคแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ดังนั้น DNA LIBRARY ของเชื้อ T. evansi NpII ISOLATE ที่ตัดด้วย Sau 3AI ได้ถูกสร้างขึ้นโดยใช้ pUC 12 เป็นพาหะ และ pTec.21 ถูกเลือกจาก LIBRARY นี้มาเป็นตัวตรวจสอบ pTec.21 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 122 bp แทรกอยู่ และถูกหาลำดับเบสในสายแล้ว

ผลของการใช้ pTec.21 เป็นตัวตรวจสอบต่อ ISOLATES ต่างๆสามารถให้ Restriction Fragment Length Polymophisms (RFLPs) ต่อ HhaI Southern Hybridization ได้ และพบความแตกต่างแล้ว ๑๐ รูปแบบจาก ๑๔ ISOLATES

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Development of DNA probes for sensitive detection and isolates differentation of Trypanosoma evansi

Name Nareerat Viseshakul

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

1. Sakol Panyim, Ph.D.
2. Prapon Wilairat, Ph.D.
3. Manop Moungyai, Dr. Med. Vet.

Date of Graduation 11 April B.E. 2532 (1989)

ABSTRACT

Trypanosoma evansi is known to be parasitic protozoa that causes disease in livestocks called "Surra". T. evansi infection causes emaciation in animals . Due to Surra that plays an important role in animal health, methods for parasite detection should be developed. The classical medthods of microscopic observation of parasite in blood stream, mouse inoculation and serological assays are not reliable enough to carry on in intensive animal industry of today . DNA probe hybridization method is therefore developed for T. evansi identification and characterisation.

EcoRI genomic DNA library of T.evansi Npl isolate was screened for repetitive DNA fragment that specific for only T.evansi. From 575 recombinants there was pTec.6, of 6.5 kb insert in pUN121 vector which performed the most strong positive nucleic acid hybridization. As little as 62.5 pg DNA or 10^3 parasites was detectable by Dot-blot hybridization with pTec.6 and no cross hybridization was found in Cow DNA, Buffaloe DNA and other two blood parasites DNA.

Copyright by Mahidol University

kDNA was also constructed to be sensitive probe candidates. It was found to have variation in term of copy number in individual isolates.

No method that can charaterize T. evansi for its subspecies. The strain differentiation probe was constructed. Sua3AI NpII isolate DNA library was screened for specific DNA fragment. pTec.21 of 122 bp insert exhibited subspecies specific DNA fragment that gave Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) in Southern hybridization of HhaI digested DNA. The pattern was distinguishable among isolates. So far, there were ten different RFLP patterns from 14 isolates.

Copyright by Mahidol University