DIFFERENTIATION OF *MYCOBACTERIUM* SPECIES BY RESTRICTION ENZYME ANALYSIS OF AMPLIFIED 16S-23S RIBOSOMAL DNA SPACER SEQUENCES

POONPILAS LAPPAYAWICHIT

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1995

Copyright by Mahidol University

32717

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยก species ของเชื้อ *Mycobacterium* โดยการเพิ่มจำนวน 16S rDNA-23S rDNA spacer ด้วยวิธี Polymerase chain reaction แล้วตัดด้วย Restriction enzyme
ผู้วิจัย	พูนพิลาส ลัภยวิจิตร
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์, M.D. สมศักดิ์ เหรียญทอง, M.Sc. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D. Eng.
วันที่สำเร็จการศึกษา	4 พฤษภาคม พ.ศ. 2538

บทคัดย่อ

เชื้อใน genus *Mycobacterium* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์มาก เนื่องจากเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่สำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยถึงตายได้และยังพบได้ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการระบาดของเชื้อ human immuno-deficiency virus (HIV) เกิดขึ้น พบว่ามีการเพิ่มจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้มากขึ้น นอกจากนี้เชื้อ mycobacteria บาง species มีการดื้อต่อยาที่ใช้รักษาเกือบทั้งหมดและการรักษายังขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละ species อีกด้วย ดังนั้นห้องปฏิบัติการทางวัณโรคจึงต้องวิเคราะห์ให้ทราบ species ที่แท้จริงของเชื้อ โดยทั่วไปการวิเคราะห์ species ของเชื้อ mycobacteria นิยมใช้วิธีทางชีวเคมีซึ่งยุ่งยากและใช้เวลานาน วิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น วิธี polymerase chain reaction (PCR) จึงได้มีการพัฒนาเพื่อนำมาใช้มากขึ้น

การศึกษานี้มุ่งที่จะพัฒนาวิธีการแยก species ของเชื้อ mycobacteria โดยวิธี PCR เพิ่มจำนวนส่วน spacer ที่อยู่ระหว่าง 16S rDNA และ 23S rDNA gene ซึ่งมีผู้รายงานว่าสามารถใช้แยก species ของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆได้ การศึกษานี้ได้ทำการเพิ่ม

Copyright by Mahidol University

จำนวนส่วนของ 16S rDNA-23S rDNA spacer ของเชื้อ mycobacteria 19 species จำนวน 102 strains พบว่าสามารถแยกเชื้อ rapid-growing mycobacteria ออกจาก slow-growing mycobacteria ได้ โดยพบว่าส่วนของ spacer sequence ที่เพิ่มจำนวนขึ้นของ rapid-growing mycobacteria มีขนาดประมาณ 420 ถึง 520 bp ส่วนของ slow-growing mycobacteria มีขนาดประมาณ 325 ถึง 370 bp หลังจากทำการตัดด้วย restriction enzymes (*Hae*III และ *Bst*XI หรือ *Msp*I) พบว่า สามารถแยกเชื้อ mycobacteria ได้ทุก species ยกเว้นเชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex นอกจากนี้ ได้ทำการออกแบบ DNA ตรวจสอบ (probe) จำนวน 4 probes เป็น probes ที่ได้จากการตัดชิ้นส่วน spacer ที่ทำการเพิ่มจำนวนขึ้นด้วย restriction enzyme ให้ได้เฉพาะส่วนที่เป็น spacer เท่านั้นจำนวน 2 probes คือ MT164 และ MV158 ซึ่งได้มาจาก spacer sequences ของเชื้อ *M. tuberculosis* และ *M. avium* ตามลำดับ ส่วนอีก 2 probes คือ MV21 และ MI23 ได้จากการคัดเลือกส่วนของ spacer sequences ของเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ที่มีความแตกต่างจาก spacer sequences ของเชื้อ *Mycobacterium* species อื่น ๆ พบว่า MT164 และ MV158 สามารถเกิด cross-hybridization กับเชื้อ *Mycobacterium* species อื่นได้ ส่วน MV21 และ MI23 พบว่ามีความจำเพาะ ต่อเชื้อ *M. avium* และ *M. intracellulare* ตามลำดับ

วิธีการแยก species ของเชื้อ *Mycobacterium* โดยการเพิ่มจำนวน 16S-23S rDNA spacer ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แล้วตัดด้วย restriction enzyme ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ทั้งยังสามารถพัฒนาไปใช้ในการตรวจแยกเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยได้ โดยการหา primers คู่ใหม่ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อใน genus *Mycobacterium* นอกจากนี้ 16S-23S rDNA spacer น่าจะเหมาะที่จะนำมาใช้พัฒนาเป็น probes ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Mycobacterium* species ต่าง ๆ ได้อีกด้วย

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Differentiation of *Mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences
Name	Poonpilas Lappayawichit
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee	
	Prasit Palittapongarnpim, M.D.
	Somsak Rienthong, M.Sc.
	Watanalai Panbangred, D. Eng.
Date of Graduation	4 May B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

Mycobacterium species are a group of medically important bacteria, which are major causes of morbidity and mortality around the world, especially since the spread of the human immunodeficiency virus (HIV) world wide. In Thailand, tuberculosis is still the leading cause of death among infectious diseases. Some species of *Mycobacterium* are always resistant to most antituberculous drugs and the effective treatment depends on each species. Therefore identification of mycobacteria to the species level is important. In general, the differentiation of *Mycobacterium* species is done by time-consuming biochemical tests. Recently molecular techniques such as the polymerase chain reaction (PCR) has been developed in several micro-biological laboratories for the rapid differentiation of mycobacterial species.

This study aimed to develop the PCR technique to differentiate *Mycobacterium* species by amplifying the spacer sequences between 16S rDNA and 23S rDNA gene which has been shown to be species-specific in

Copyright by Mahidol University

many microorganisms. 102 strains of mycobacteria belonging to 19 species of the genus *Mycobacterium* were studied. The rapid-growing mycobacteria could be differentiated from the slow-growing mycobacteria by the presence of the amplified products of 420 to 520 bp and 325 to 370 bp in length respectively. Further digestion of the amplified products with restriction enzymes (*Hae*III and *Bst*XI or *Msp*I) enabled differentiation of almost all species studied except *M. tuberculosis* complex.

In addition, four probes have been developed. Two probes, MT164 and MV158, were derived from digestion of the amplified products of *M. tuberculosis* and *M. avium* respectively with restriction enzymes to get rid of the 16S rDNA and 23S rDNA sequences. The other two probes, MV21 and MI23, were selected from the highly variable regions within spacer sequences of *M. avium* and *M. intracellulare* respectively. The MT164 and MV158 probes showed cross-hybridization with some other mycobacterial species. Whereas MV21 and MI23 probes were highly specific for *M. avium* and *M. intracellulare*, respectively.

The differentiation of the *Mycobacterium* species by the polymerase chain reaction (PCR) amplification of the 16S-23S rDNA spacer sequence and restriction enzyme analysis is a simple and rapid method. In the future, this method can be developed in a clinical setting for identifying *Mycobacterium* species directly from patient specimens by searching for a new pair of primers which is specific to genus *Mycobacterium*. Moreover the 16S-23S rDNA spacer may be an useful target for the development of *Mycobacterium* species-specific probe.

Copyright by Mahidol University