LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY
28 JAN 1991

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS : A STUDY ON DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA) AND CONSTRUCTION OF DNA LIBRARIES

WATCHARIN RANGSIPANURATN

อภินันทนาการ
จาก

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1990

Copyright by Mahidol University

16415

ชื่อวิทยานิพนธ์ มัยโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลสิส : การศึกษากรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิค (ดีเอ็นเอ) และการสร้างดีเอ็นเอไลบรารี่

ผู้วิจัย วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อังคณา ฉายประเสริฐ, Dr.rer.nat.

เพทาย เย็นจิตโสมนัส, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2533

บทคัดย่อ

วัณโรคยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทย ในช่วงระยะ 3 ทศวรรษที่ผ่านมามีความพยายามอย่างมากที่จะควบคุมโรคนี้ แต่ยังไม่ประสพความสำเร็จในการลดอุบัติการของโรคเท่าที่ควร เนื่องจากปัญหาหลายประการ ปัญหาหนึ่งเกิดจากความยากในการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค เพราะวิธีมาตราฐานซึ่งใช้ตรวจเชื้อมีความไวน้อย งานวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้เป็นความพยายามที่จะพัฒนาวิธีตรวจเชื้อวัณโรคด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อวัณโรคทำได้ค่อนข้างยาก งานวิจัยนี้จึงทดลองเปรียบเทียบวิธีเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค 2 วิธี วิธีแรกทำให้เซลล์แตกโดยวิธีเอนไซม์และวิธีที่สองทำให้เซลล์แตกโดยแรงกระแทก ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาทำการตรวจในเบื้องต้นเพื่อหาพลาสมิดที่อาจจะควบคุมคุณสมบัติการดื้อยาของเชื้อซึ่งปรากฏว่าตรวจไม่พบ ดีเอ็นเอไลบรารี่ของเชื้อวัณโรคถูกสร้างขึ้นโดยการตัด และสอดชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคเข้าไว้ในดีเอ็นเอพาหะ pBR322 ที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดเฉพาะ BamHI หรือ PstI ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ถูกนำเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ K-12 SF8 เพื่อเพิ่มจำนวนชุด กลุ่มเซลล์ที่เกิดขึ้น ซึ่งมีดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคในขนาดที่สามารถตรวจพบได้ถูกสอดอยู่ในดีเอ็นเอ

Copyright by Mahidol University

พาหะประเมินว่ามีจำนวน 5,000 โคลนสำหรับการใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะ BamHI และ 12,000 โคลนสำหรับการใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะ PstI การคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอลูกผสมซึ่งอาจจะใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ ได้กระทำโดยการใช้ดีเอ็นเอรวมของเชื้อวัณโรคติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีฟอสฟอรัส-32 เป็นดีเอ็นเอสำหรับตรวจย้อนกลับ สามารถคัดเลือกได้โคลนที่ต้องการ 2 กลุ่ม ดีเอ็นเอลูกผสมซึ่งสกัดมาจากทั้งสองโคลนได้ถูกนำมาทดสอบความไวและความจำเพาะในการใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบเทียบกับการใช้ดีเอ็นเอรวมจากเชื้อวัณโรค ผลปรากฏว่าดีเอ็นเอตรวจสอบทั้ง 3 ชนิด มีความจำเพาะสูงในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่น อย่างไรก็ตามความไวของการตรวจยังต่ำเกินกว่าที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยทั่วไปได้ จากการใช้ดีเอ็นเอลูกผสมทั้งสองตัวเป็นดีเอ็นเอตรวจสอบในการศึกษาดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อวัณโรคด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่นแบบเซาเทอร์น ผลปรากฏว่ามีดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคหลายขนาดที่ตรวจพบพร้อมกันด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบทั้งสองตัวนี้ ซึ่งเป็นไปได้ว่าดีเอ็นเอตรวจสอบทั้งคู่จำเพาะต่อการตรวจดีเอ็นเอส่วนที่ซ้ำ ๆ กันของเชื้อวัณโรค และดีเอ็นเอที่ถูกสอดอยู่ในดีเอ็นเอพาหะเป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอที่ซ้ำ ๆ กันนี้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Mycobacterium tuberculosis : A Study on Deoxyribonucleic Acid (DNA) and Construction of DNA Libraries

Name Watcharin Rangsipanuratn

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Angkana Chaiprasert , Dr.rer.nat.

Pa-thai Yenchitsomanus , Ph.D.

Date of Graduation 28 February B.E. 2533 (1990)

ABSTRACT

Tuberculosis is a disease which is still considered to be a major global health problem, especially in developing countries. This disease is also prevalent among Thai people. In spite of the considerable efforts that have been made to control the disease in the last three decades, the reduction of the global incidence was not obviously observed. There are several problems encountered in controlling this disease. One of them is the difficulty in performing diagnosis of the mycobacterial infection. The current diagnostic procedures are lacking their sensitivities. This study is an attempt to develop a diagnostic method using deoxyribonucleic acid (DNA)-probe technology. Mycobacterial DNAs were isolated from the genomes of Mycobacterium tuberculosis by two comparative methods : the enzymatic lytic and the modified physically rupturing procedures. The DNAs obtained were initially checked whether they contained a plasmid that might determine the drug-resistant property. The result was negative.

Copyright by Mahidol University

To create recombinant DNA probes for mycobacterial identification, two genomic DNA libraries of M. tuberculosis were constructed in pBR322 vector by inserting the mycobacterial DNA fragments into the BamHI or PstI site of the plasmid and transforming them into Escherichia coli K-12 SF8. About 5,000 and 12,000 colonies obtained from the cloned BamHI and PstI libraries were found to contain recombinant plasmids with detectable fragments of the DNA inserted. Screenings for colonies containing recombinant plasmids potential to be used as the DNA probes were performed by using radioactively(^{32}P) labeled total mycobacterial -genomic-DNA. Two colonies were selected and the recombinant DNA probes (pWR6 and pWR9) were isolated to evaluate their sensitivities and specificities in comparison with the total genomic DNA probes. Both of the recombinant and the total genomic DNA probes had high specificities in hybridization with the target DNAs from M. tuberculosis. However, their sensitivies were still too low to be used in a diagnostic application. Southern blot hybridization of restriction fragments of mycobacterial genomic DNA were employed by using the recombinant DNA probes. The result showed patterns of multiple restriction-DNA fragments hybridized with the two probes. It is most likely that the two DNA probes detected genomic repetitive DNA sequences and the cloned DNA fragments might be parts of these sequences.

Copyright by Mahidol University