- 5 OCT 2001

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

USING A MARKER ON FLAGELLIN GENE SEQUENCE FOR PCR-BASED DIRECT DETECTION OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS* FROM SOIL

PIAMNUKUL KRASAO

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2001

ISBN 974-04-0441-3

TH
P979U
2001

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY
Copyright by Mahidol University

4036421 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* / *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS* / FLAGELLIN GENE

PIAMNUKUL KRASAO : USING A MARKER ON FLAGELLIN GENE SEQUENCE FOR PCR-BASED DIRECT DETECTION OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS* FROM SOIL. THESIS ADVISORS : SUMALEE TUNGPRADABKUL, Ph.D., MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D., MONGKOL KUNAKORN, M.D.
70 p. ISBN 974-04-0441-3

Melioidosis is an infectious disease caused by *Burkholderia pseudomallei*. In the natural environment, especially in soil and water, *Burkholderia pseudomallei* exists as a virulent and a non-virulent microorganism. In 1998, the non-virulent one has been classified as a new species named *Burkholderia thailandensis*. *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* species can be found together in soil and water. The variable regions of flagellin genes of these two species have a 15-bp difference in size. This region can be used as a marker to differentiate organisms from each other by the PCR method using the same PCR primers followed by electrophoresis on 3% agarose gel. In this study, the stability of the variable regions of flagellin genes after 10 passages of these two organisms had been assessed. The organisms were cultured on four different media : Ashdown's selective media agar, nutrient agar, Luria-bertani agar, and minimal media agar for ten passages. The organisms from each passage were analyzed for the stability of the flagellin gene marker by PCR method.

The results showed that the variable regions of flagellin genes were detected in all passages. However, the amplification efficiency of *B. pseudomallei,* which had longer variable region of the flagellin gene, was 10 times lower than that of *B. thailandensis.* Moreover, the PCR technique was able to detect both *Burkholderia* species presented in soil by addition of BSA into PCR reaction mixture. The present study demonstrated that the virulent and non-virulent strains of Burkholderia could be distinguished by PCR amplification at the variable regions of flagellin genes.

Copyright by Mahidol University

4036421 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท. ม. (ชีวเคมี)

เปี่ยมนุกูล กระเสาร์ : การใช้ยีนแฟลกจิลินแยกความแตกต่างของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และ *Burkholderia thailandensis* โดยวิธีพีซีอาร์ในการวิเคราะห์เชื้อในดินโดยตรง (USING A MARKER ON FLAGELLIN GENE SEQUENCE FOR PCR-BASED DIRECT DETECTION OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS* FROM SOIL) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สุมาลี ตั้งประดับกุล Ph.D., มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล Ph.D., มงคล คุณากร M.D. 70 หน้า. ISBN 974-04-0441-3

เมลิออยโดสิส (Melioidosis) เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ทั้งในดินและในน้ำ มีทั้งชนิดที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคซึ่งต่อมาในปี คศ.1998 ได้มีการจัดแยกชนิดที่ไม่ก่อโรคออกมาเป็น species ใหม่คือ *Burkhloderia thailandensis* เชื้อทั้งสองชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในแหล่งดินหรือแหล่งน้ำเช่นเดียวกัน ยีนแฟลกจิลินบริเวณที่แปรปรวนของเชื้อ 2 ชนิดนี้มีขนาดแตกต่างกันอยู่ 15 เบส ซึ่งสามารถใช้คุณสมบัติดังกล่าวมาแยกเชื้อจากกันได้โดยวิธีพีซีอาร์ โดยสามารถใช้ primer คู่เดียวกันในการเพิ่มจำนวนยีนและแยกความแตกต่างของขนาดของยีนได้บน 3% agarose gel งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความเสถียรของยีนแฟลกจิลินบริเวณที่แปรปรวน โดยการนำเชื้อทั้งสองชนิดมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ Ashdown's selective media agar, nutrient agar, Luria-bertani agar, และ minimal media agar เป็นเวลานาน 10 passages แล้วจึงนำไปทดสอบความเสถียรของยีนแฟลกจิลินโดยวิธีพีซีอาร์พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดมีความเสถียรของยีนแฟลกจิลินบริเวณที่แปรปรวนโดยสามารถตรวจวัดได้ทั้ง 10 passages นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งมีขนาดของยีนแฟลกจิลินยาวกว่า มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์น้อยกว่าเชื้อ *Burkhloderia thailandensis* การตรวจหายีนแฟลกจิลินของเชื้อทั้ง 2 ชนิดโดยตรงจากดินโดยวิธีพีซีอาร์สามารถทำได้โดยการใส่ Bovine serum albumin ลงไปในปฏิกิริยา การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีพีซีอาร์สามารถแยกเชื้อชนิดที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคจากขนาดของยีนแฟลกจิลินบริเวณที่แปรปรวนที่แตกต่างกันได้

Copyright by Mahidol University