

5 AUG 2002



**DETECTION OF ADP-RIBOSYLTRANSFERASE (ARR) GENE IN
MYCOBACTERIA**

CHULABHA TULLATUN

๒

ศุภมาสัทธาการ

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

2002

ISBN 974-04-1979-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
C559de

2002

c.2

Copyright by Mahidol University

4237354 SIMI/M : MAJOR: MICROBIOLOGY; M.Sc. (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : RIBOSYLATION/ARR/MYCOBACTERIA/RIFAMPICIN
RESISTANCE

CHULABHA TULLATUN: DETECTION OF RIFAMPICIN ADP-RIBOSYLTRANSFERASE (ARR) GENE IN MYCOBACTERIA. THESIS ADVISORS: SUPORN FOONGLADDA, D.V.M., Ph.D., ANGKANA CHAIPRASERT, Dr.rer.nat., THERDSAK PRAMMANANAN, Dr.rer.biol.hum. 103 p.ISBN 974-04-1979-8.

Ribosylation is found to be one of the most important mechanisms involving rifampicin resistance in rapidly growing mycobacteria. The gene responsible for this ability, *arr*, has been found in *Mycobacterium smegmatis* DSM 43756. Beside *arr*, a new rifampicin resistant gene, *arr-2*, has been reported in *Pseudomonas aeruginosa* PaTh2 isolated in Thailand. This study aimed to demonstrate and characterize the *arr*-like gene in some *Mycobacterium* spp. in Thailand.

A total of 340 mycobacterial isolates (from *M. aurum*, *M. austroafricanum*, *M. bovis*, *M. chelonae*, *M. duvalii*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. microti*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. tuberculosis*, *M. ulcerans*, and *M. vaccae*) were screened for *arr* by PCR using a specific primer. The PCR products were found in *M. smegmatis* DSM 43756, *M. smegmatis* ATCC 14468, *M. aurum* MNC 979, 34 out of 35 clinical isolates of *M. chelonae*, and 8 out of 13 clinical isolates of *M. fortuitum*. The PCR product sequence of *M. aurum* MNC 979 showed 98% identity with the *arr* gene of *M. smegmatis* DSM 43756. The *arr*-like sequence were detected in *M. chelonae* KU 3004 and *M. fortuitum* SPT 7339 with 48.59% and 51.57% identity to the *arr* gene of *M. smegmatis* DSM 43756, respectively.

In order to localize the *arr* gene in *M. smegmatis* DSM 43756, *M. chelonae* and *M. fortuitum*, mycobacterial genomic DNA was digested with *Bam*HI restriction endonuclease before blotting. By using *arr* PCR product of *M. smegmatis* DSM 43756 as a specific probe, the hybridized bands of *M. smegmatis* DSM 43756, *M. chelonae* KU 3004 and *M. fortuitum* SPT 7339 were >12, 12 and 1.1 kb, respectively. Along with using the PCR product of *M. chelonae* KU 3004 as a specific probe, the hybridized bands of *M. chelonae* 3 strains (isolation number KU 2504, KU 3001, and KU 3004) were 8, 9 and 10 kb. Accompanying using the PCR product of *M. fortuitum* SPT 7339 as a specific probe, the hybridized bands of *M. fortuitum* 2 strains (isolation number SPT 490 and SPT 7339) were 5 and 6 kb.

DNA fragments near 1.1 kb fragment of *M. fortuitum* SPT 7339 were ligated with pSO246 and subsequently transformed to *Escherichia coli* DH5 α by electroporation. The rifampicin resistance clone was picked for phenotypic testing. *E. coli* that had been transformed with the recombinant plasmid showed rifampicin resistance up to 8 times higher than that shown by untransformed *E. coli*. The nucleotide sequence of this *M. fortuitum* SPT 7339 fragment was 1184 bp long. Comparison of this sequence to the DNA sequence deposited in Genbank at translation level by TBLASTX program revealed that the nucleotide sequence from 58-231 (174 bp) encode amino acid sequence which 36% (21/58) homologous to putative drug efflux protein of *Streptomyces coelicolor* cosmid BAC17F8.

The gene fragment as demonstrated in this study, did not have nucleotide sequence homologous to that of *arr*. However, this rifampicin resistant gene should be further studied for its resistant mechanism.

4237354 SIMI/M สาขาวิชา: จุลชีววิทยา; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: การตรวจหาไรแฟมพิซิน เอดีพี ไรโบซิลทรานสเฟอเรส (เออาร์อาร์) ยีนในเชื้อมัยโคแบคทีเรีย (DETECTION OF RIFAMPICIN ADP-RIBOSYLTRANSFERASE (ARR) GENE IN MYCOBACTERIA) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุกร พึ่งถัดดา, D.V.M., Ph.D., อังคณา นายประเสริฐ, Dr.rer.nat., เทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์, Dr.rer.biol.hum. 103 หน้า ISBN 974-04-1979-8.

Ribosylation เป็นวิธีการสำคัญวิธีการหนึ่งในการทำให้เชื้อกลุ่ม mycobacteria ที่เจริญเติบโตเร็วคือยา rifampicin ยีนที่ควบคุมขบวนการนี้คือ *arr* พบยีนนี้ในเชื้อ *Mycobacterium smegmatis* DSM 43756 นอกเหนือจาก *arr* แล้ว ยังพบยีน *arr-2* ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PaTh2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย

ในการศึกษาเชื้อ mycobacteria ทั้งหมด 340 สายพันธุ์ (จาก *M. aurum*, *M. austroafricanum*, *M. bovis*, *M. chelonae*, *M. duvalii*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. microti*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. tuberculosis*, *M. ulcerans*, และ *M. vaccae*) ได้ทำการตรวจกรองหา *arr* โดยวิธี PCR ด้วย primer ที่จำเพาะ พบ PCR products ในเชื้อ *M. smegmatis* DSM 43756, *M. smegmatis* ATCC 14468, *M. aurum* MNC 979, 34 ใน 35 สายพันธุ์ของเชื้อ *M. chelonae*, และ 8 ใน 13 สายพันธุ์ของเชื้อ *M. fortuitum* ลำดับ nucleotide จาก PCR product ของ *M. aurum* MNC 979 มีความคล้ายคลึงกันกับ *arr* gene ของ *M. smegmatis* DSM 43756 ถึง 98% ส่วนลำดับ nucleotide จาก PCR products ของ *M. chelonae* KU 3004 และ *M. fortuitum* SPT 7339 มีความคล้ายคลึงกันกับ *arr* gene ของ *M. smegmatis* DSM 43756 48.59% และ 51.57% ตามลำดับ

เพื่อตรวจหาตำแหน่งของ *arr* ยีนในเชื้อ *M. smegmatis*, *M. chelonae* และ *M. fortuitum* จึงนำดีเอ็นเอของเชื้อ mycobacteria มาตัดด้วยเอนไซม์ BamHI ก่อนนำไปทำ blotting เมื่อใช้ PCR product ของ *M. smegmatis* DSM 43756 เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ พบแถบดีเอ็นเอที่ถูกไฮบริดจ์ของเชื้อ *M. smegmatis* DSM 43756, *M. chelonae* KU 3004 และ *M. fortuitum* SPT 7339 ที่ตำแหน่ง >12, 12 และ 1.1 kb ตามลำดับ เมื่อใช้ PCR product ของ *M. chelonae* เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ พบแถบดีเอ็นเอที่ถูกไฮบริดจ์ของเชื้อ *M. chelonae* สามสายพันธุ์ (KU 2504, KU 3001, KU3004) ที่ตำแหน่ง 8,9 และ 10 kb เมื่อใช้ PCR product ของ *M. fortuitum* SPT 7339 เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ พบแถบดีเอ็นเอที่ถูกไฮบริดจ์ของเชื้อ *M. fortuitum* สองสายพันธุ์ (SPT 490, SPT 7339) ที่ตำแหน่ง 5 และ 6 kb

นำดีเอ็นเอของ *M. fortuitum* SPT 7339 บริเวณ 1.1 kb มาเชื่อมต่อกับ pSO246 แล้ว transform เข้าใน *Escherichia coli* DH5 α โดยวิธี electroporation ได้โคลนที่คือยาไรแฟมพิซินมาทดสอบคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ พบว่า *E. coli* ที่ได้รับ recombinant plasmid สามารถคือยาไรแฟมพิซินสูงกว่า *E. coli* ที่ไม่ได้รับพลาสมิดถึงแปดเท่า ลำดับ nucleotide ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *M. fortuitum* SPT 7339 นี้มีความยาว 1184 bp จากการเปรียบเทียบลำดับ nucleotide นี้กับข้อมูลใน Genbank ที่ translation level ด้วยโปรแกรม TBLASTX พบว่าลำดับ nucleotide ที่ตำแหน่ง 58-231 (174 bp) ให้ลำดับกรดอะมิโนเข้ากันได้กับ putative drug efflux protein ของ *Streptomyces coelicolor* cosmid BAC17F8 36% (21/58) ชิ้นส่วนของยีนที่ตรวจพบในการศึกษานี้ไม่มีลำดับ nucleotide ที่คล้ายคลึงกับ *arr* แต่ทำให้มีการคือยา rifampicin ในแบคทีเรียที่ถูก transform วิธีการคือยาของยีนนี้ควรได้มีการศึกษาต่อไป