

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4580028

ชื่อโครงการ : การค้นหายีนที่จำเพาะในเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคโดยวิธี Representational difference analysis

ชื่อนักวิจัยหลัก : ผดุงศรี วิชวานิเวศน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : scpvc@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี 10 เดือน

เชื้อแบคทีเรียพอกสไปโรชิตที่อยู่ใน genus *Leptospira* ประกอบด้วย species ที่ก่อโรคคือ *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*) และ species ที่ไม่ก่อโรคคือ *Leptospira* เชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคเป็นต้นเหตุของโรคเลปโตสไปโรสิส (Leptospirosis) หรือโรคฉี่หนู ซึ่งเป็นโรคที่ติดต่อกันจากสัตว์สู่คน (zoonosis) ที่พบได้ทั่วโลก สำหรับในประเทศไทย มีรายงานผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสประมาณ 5,000 รายต่อปี อาการของผู้ป่วยที่ติดเชื้อเลปโตสไปรา มีทั้งแบบที่ไม่มีอาการรุนแรงเป็นคล้ายไข้หวัด จนถึงแบบที่มีอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิคการทำ Representational difference analysis เข้ามาใช้ในการค้นหายีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *L. interrogans* serovar autumnalis strain L453 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสที่มีอาการรุนแรง โดยการทำ subtractive hybridization ระหว่างโครโมโซมของเชื้อ L453 กับ *L. biflexa* serovar patoc สายพันธุ์ Patoc I ผลการศึกษาครั้งนี้ได้สร้าง library ของ subtractive clone ที่มี insert ของ RDA product อยู่จำนวน 65 clone ในการนี้จากการทำ Southern blot hybridization analysis พบว่า insert DNA fragments ของ 5 subtractive clone ที่เลือกนำมาทำการทดสอบเป็น DNA fragment ที่จำเพาะในสายพันธุ์ L453 และไม่พบใน *L. biflexa* ผลการทำ DNA sequence analysis พบว่า fragment ที่ได้มี sequence similarity กับ putative lipoprotein, the outer membrane proteins ใน Rhs family protein, methyl malonyl-CoA mutase, acyl-CoA thioesterase และ putative propionyl-CoA carboxylase ของ *L. interrogans* serovar copenhageni และ serovar lai สำหรับ putative lipoprotein และ outer membrane protein ใน Rhs family protein เป็นโปรตีนที่อาจจะเกี่ยวข้องในการก่อโรค ส่วน methyl malonyl-CoA mutase, acyl-CoA thioesterase และ putative propionyl-CoA carboxylase เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องใน lipid metabolism สรุปได้ว่าเทคนิค RDA สามารถนำมาใช้ในการ identify ยีนที่จำเพาะในเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์หนึ่งที่ไม่ปรากฏอยู่ในเชื้ออีกสายพันธุ์ได้ การศึกษาขั้นต่อไปถึงบทบาทของโปรตีนเหล่านี้ อาจทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่ที่จะช่วยเพิ่มความรู้ ความเข้าใจในเรื่องของกลไกการทำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรสิสนั้นจะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกัน หรือรักษาโรคได้ในอนาคต

คำหลัก: RDA, *Leptospira*, subtractive hybridization

ABSTRACT

Project Code : MRG4580028

Project Title : Identification of genomic differences in pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* using representational difference analysis

Investigator : Padungsri Vichivanives

Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address : scpvc@mahidol.ac.th

Project Period : 2 years 10 months

Spirochetes in the genus *Leptospira* are divided into two species, the pathogenic *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*) and the free-living nonpathogenic *L. biflexa*. Pathogenic leptospires are the causative agent of leptospirosis, a worldwide zoonotic disease that is now regarded as one of the major emerging infectious diseases. In Thailand, there are about 5,000 cases of leptospirosis per year. Clinical manifestations of leptospirosis are varied ranging from a mild flu-like illness to a severe syndrome of multi-organ infection with a high mortality rate. In this study, the technique of representational difference analysis (RDA) has been employed to identify genomic differences between *L. interrogans* serovar autumnalis strain L453, isolated from a Thai patient with severe leptospirosis, and the non virulent strain, *L. biflexa* serovar patoc strain Patoc I. DNA sequences present only in the virulent strain, L453, were achieved through subtractive hybridization of genomic DNA of L453 with *L. biflexa*. A library of 65 subtractive clones containing the amplified difference products was obtained. Southern blot hybridization analyses, using the insert difference products from 5 randomly chosen clones as a probe, indicated that all inserts are unique to L453. DNA sequence analysis of those inserts showed sequence similarities to a putative lipoprotein, the outer membrane protein encoded by the *rhs* gene family, methyl malonyl-CoA mutase, acyl-CoA thioesterase and putative propionyl-CoA carboxylase of *L. interrogans* serovars copenhageni and lai. The putative lipoprotein and the outer membrane protein encoded by the *rhs* gene family are considered as potential virulence factors, whereas methyl malonyl-CoA mutase, acyl-CoA thioesterase and putative propionyl-CoA carboxylase are involved in lipid metabolism. Therefore, RDA proved effective for the identification of genomic regions unique to *L. interrogans* strain L453. Functional analysis of these gene products may provide an insight to the differences in pathogenicity in the L453 strain that causes severe disease.

Key words: RDA, *Leptospira*, subtractive hybridization