

ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography (His-tagged protein system) ใช้วิธีการผ่าน crude extract ลงใน Immobilized Metal Affinity Chromatography column (CLONETECH laboratories) ซึ่งเอนไซม์จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการของการเกิด interaction ระหว่าง electropositive transition metals (ซึ่งอาจใช้ Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+}) กับ histidine โดยที่ธาตุที่เป็นโลหะอย่าง cobalt และ nickel มี coordination site 6 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถจับกับ electron-rich ligand เช่น histidine, tryptophan หรือ cysteine

เอนไซม์ α -IPMS ซึ่งผลิตขึ้นในรูปแบบของ His- tagged protein จะถูกแยกจาก crude extract โดยมีผลการแยกเอนไซม์บริสุทธิ์ ดังแสดงในตารางที่ 4

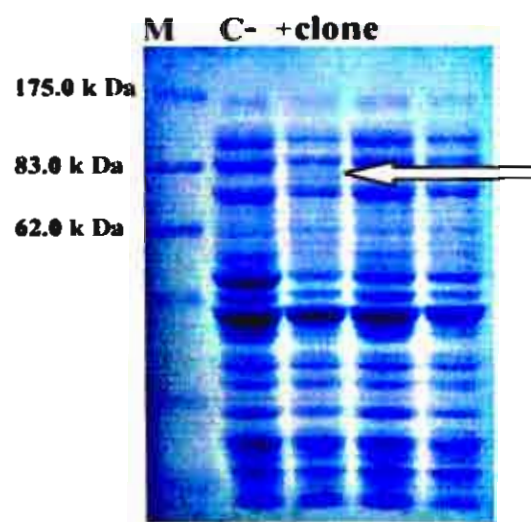
ตารางที่ 4 แสดงผลการเตรียม α -IPMS จากยีน *leuA* ปกติโดยใช้ affinity column Chromatography

Sample	Specific activity (unit/mg)	Fold purification
crude extract	0.071	1
purified enzyme	0.699	9.85

2.2 การเตรียม α -IPMS จาก mutated *leuA* gene

การเตรียม α -IPMS จาก *leuA* gene ที่ถูก mutated แล้วโดยวิธี Mutagenic PCR procedure มีขั้นตอนในการเพาะเลี้ยง recombinant clone ทำนองเดียวกับการเตรียม α -IPMS จากยีน *leuA* ปกติ และต้องทำการปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทำ protein expression ได้แก่ ความเข้มข้นของ IPTG เวลา และการหมุนเหวี่ยงเพื่อเพิ่มอากาศในขณะสร้างเอนไซม์ ผลการเตรียมเอนไซม์มีดังนี้

2.2.1 SDS-PAGE ของ mutated enzyme



Optimization of expression condition

OD₆₀₀ ~ 0.4-0.6

IPTG concⁿ 0.5 mM

Temp. 25⁰C

รูปที่ 7 SDS-PAGE ของการผลิตเอนไซม์ α -IPMS จาก mutated gene

2.2.2 Enzyme activity และผลการทำเอนไซม์บริสุทธิ์

การหา Enzyme activity ของ mutated enzyme ใช้วิธีเช่นเดียวกับการศึกษาเอนไซม์จากยีนปกติ ค่า enzyme activity และผลการทำเอนไซม์บริสุทธิ์แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการเตรียม α -IPMS จาก mutated *leuA* gene โดยใช้ affinity column Chromatography

Sample	Specific activity (unit/mg)	Fold purification
crude extract	0.048	1
purified enzyme	0.120	2.50

2.2.3 การปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับการผลิต α -IPMS จาก mutated *leuA*

การศึกษาสภาพที่เหมาะสมสำหรับ mutated *leuA* gene expression ซึ่งได้แก่การเปรียบเทียบผลของการใช้สภาวะที่ต่างกันของความเข้มข้นของ IPTG (0.5 mM, 1.0 mM) เวลา (6, 12 ชม.) การหมุนเหวี่ยงเพื่อเพิ่มอากาศขณะสร้างเอนไซม์ ทำให้สามารถสร้างเอนไซม์ได้ดีดัง แสดงในรูปที่ 8

Enzyme activity of crude cell lysate

positive clone

negative clone

control



รูปที่ 8 แสดงผลการตรวจดู Enzyme activity ของ Positive clone

3. การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ α -IPMS ที่เตรียมจากยีนปกติและ mutated gene

3.1 การหา molecular weight (MW)

3.1.1 Molecular weight ของหน่วยย่อย (subunit) ของเอนไซม์ (SDS-PAGE)

เอนไซม์ α -IPMS ที่ได้จาก mutated *leuA* gene expression และทำให้บริสุทธิ์ด้วย affinity chromatography ถูกนำมาผ่าน SDS-PAGE โดยใช้ Polyacrylamide ความเข้มข้น 10 % และตรวจดูผลโดยย้อมเจลด้วย coomassie brilliant blue ดังแสดงในรูปที่ 7 จากรูป subunit ของ mutated α -IPMS อยู่ที่ตำแหน่งประมาณ 80 kDa

3.1.2 Molecular weight ของ mutated α -IPMS โดยวิธี non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (ND-PAGE)

จากการนำ mutated α -IPMS มาผ่าน ND-PAGE ทำให้ทราบว่า mutated α -IPMS มีค่า MW ประมาณ 160 kDa และ native form ของเอนไซม์ประกอบไปด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย activity ของเอนไซม์บน Non-denaturing Polyacrylamide gel แสดงในรูปที่ 9

Non-denaturing polyacrylamide gel + Activity staining

crude cell lysate	purified enzyme	crude cell lysate
------------------------------------	----------------------------------	------------------------------------

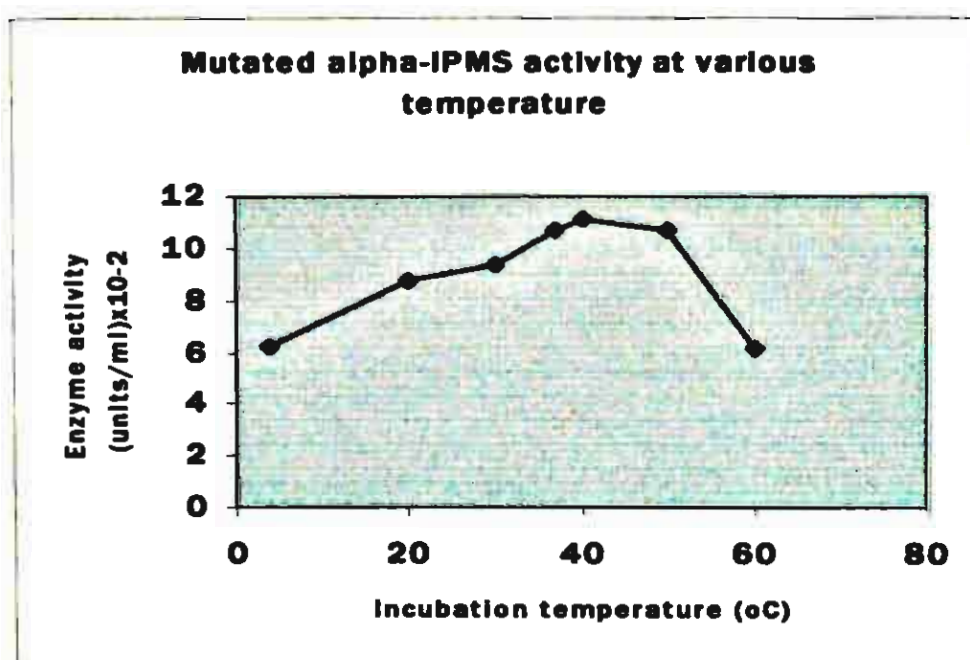


รูปที่ ๑ Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ของ affinity column purified mutated α -IPMS ตามด้วย Activity staining

3.2 ค่า Optimum temperature ของการทำงานของเอนไซม์

ค่า Optimum temperature ของการทำงานของ mutated α -IPMS ศึกษาโดยการหาค่า enzyme activity ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 4°C, 20°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C และ 60°C

ผลการศึกษาตามรูปที่ 10 แสดงให้เห็นว่าค่า optimum temperature ของการทำงานของ mutated α -IPMS คือที่อุณหภูมิ 37°C - 50°C โดยที่อุณหภูมิ 40°C ให้ค่า enzyme activity สูงสุด



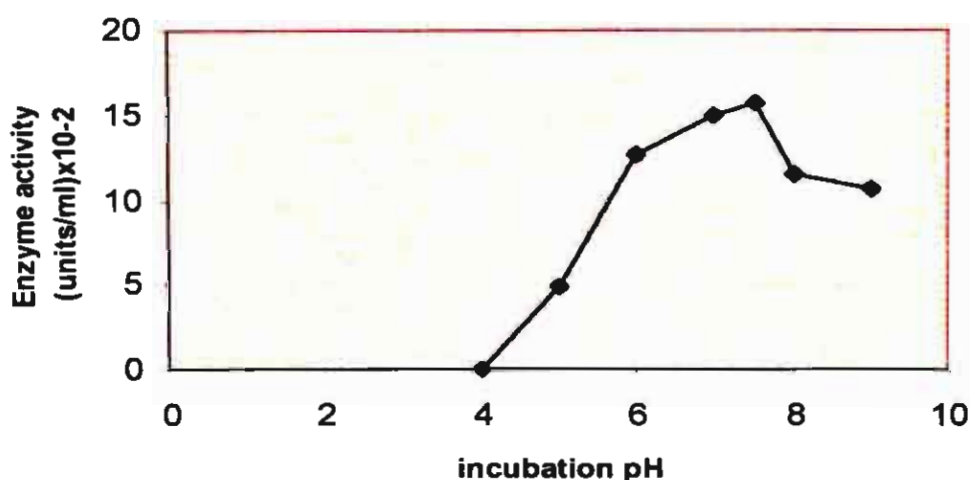
รูปที่ 10 ค่า enzyme activity ของ mutated α -IPMS เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 4°C, 20°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C และ 60°C

3.3 ค่า optimum pH ของการทำงานของเอนไซม์

ค่า optimum pH ของการทำงานของ mutated α -IPMS ศึกษาโดยการหาค่า enzyme activity ที่ pH ต่าง ๆ ได้แก่ pH 4, 6, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9

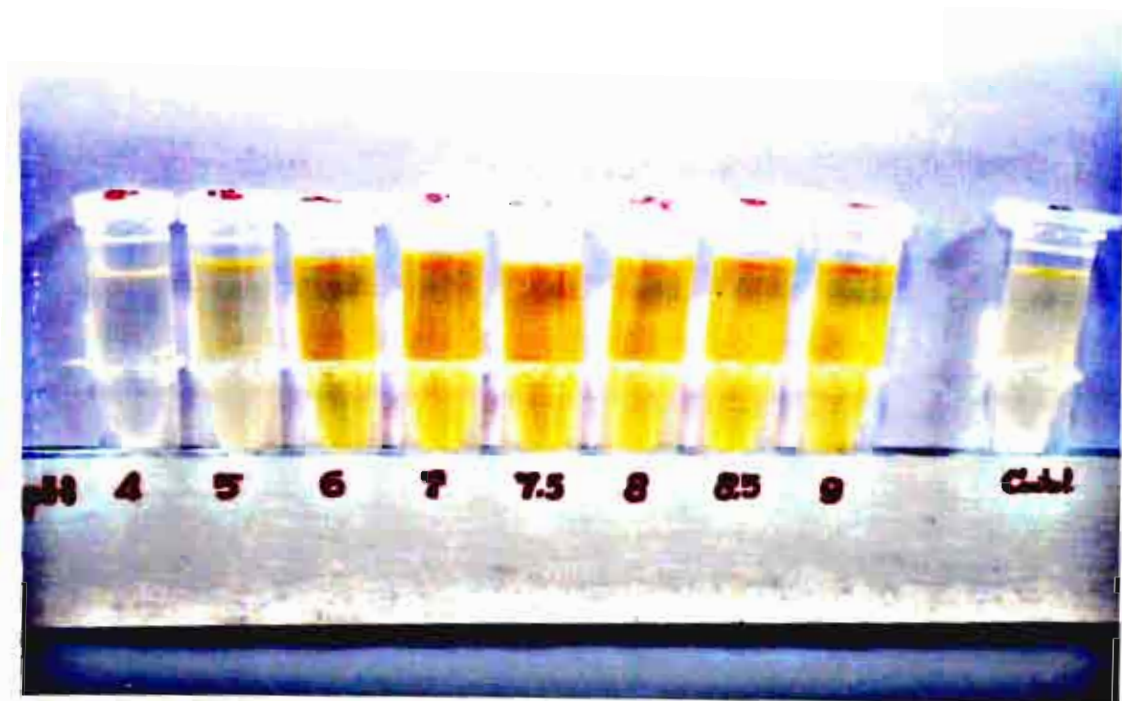
ผลการศึกษาตามรูปที่ 11 แสดงให้เห็นว่าค่า optimum pH สำหรับการทำงานของ mutated α -IPMS คือที่ pH 7.5

Mutated alpha-IPMS activity at various pH



รูปที่ 11 ค่า enzyme activity ของ mutated α -IPMS เมื่อทดสอบที่ pH ต่างกัน ได้แก่ pH 4, 6, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9

Enzyme activity assay



รูปที่ 11 (cont) แสดงผล enzyme activity assay ของ mutated α -IPMS เมื่อทดสอบที่ pH ต่างกัน

3.4 การศึกษา pH stability ของเอนไซม์

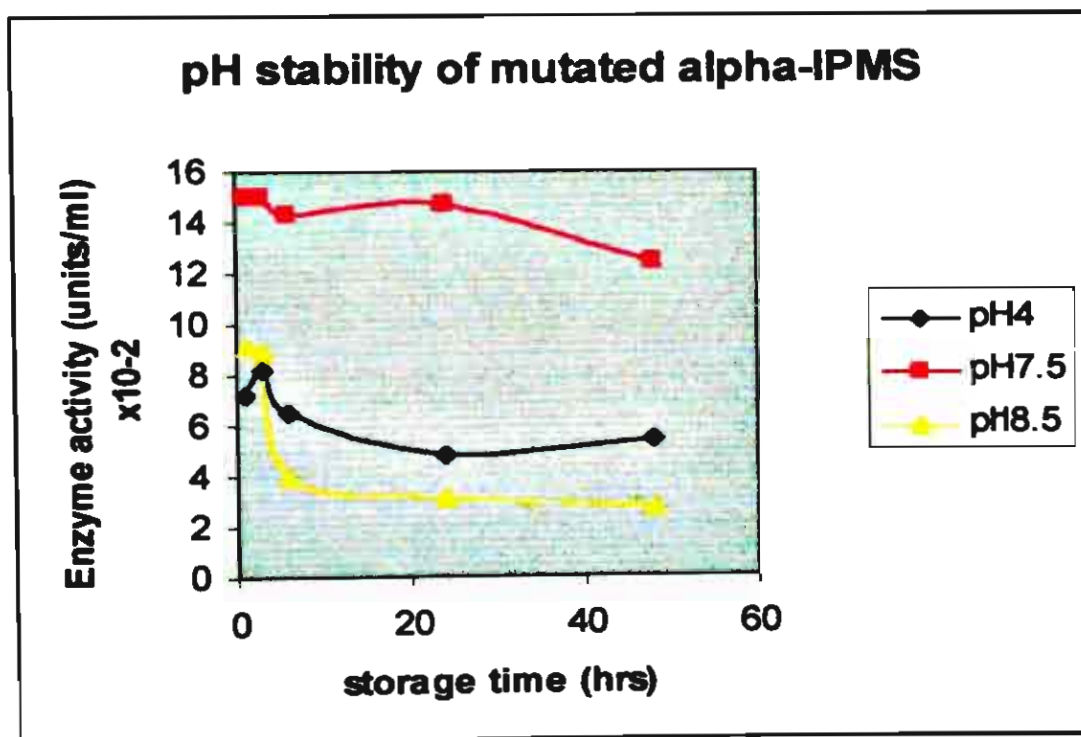
pH stability ของ mutated α -IPMS ศึกษาโดยการตรวจสอบ enzyme activity หลังเก็บไว้ที่ pH

ต่าง ๆ (pH 4, 7.5 และ 8.5) เป็นระยะเวลาต่างกัน ได้แก่ 1 ชม., 3 ชม., 12 ชม. และ 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 0°ซ

ผลการศึกษาพบว่าที่ pH7.5 mutated α -IPMS มี stability สูงกว่าที่ pH 4 และ 8.5

เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชม. เอนไซม์มี activity ลดลงเหลือ ไม่เกิน 75% ที่ pH4.0, ไม่เกิน 82% ที่

pH7.5 และไม่เกิน 30% ที่ pH8.5



รูปที่ 12 ผลการศึกษา pH stability ของเอนไซม์ mutated α -IPMS เมื่อเก็บไว้ที่ pH ต่าง ๆ (pH 4, 7.5, และ 8.5) เป็นระยะเวลาต่างกัน ได้แก่ 1 ชม., 3 ชม., 6 ชม., 12 ชม., และ 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 0°ซ

Enzyme activity assay



รูปที่ 12 (cont) แสดงผลการศึกษา pH stability ของเอนไซม์ mutated α -IPMS เมื่อเก็บไว้ที่ pH ต่าง ๆ เป็นระยะเวลาต่างกัน ที่อุณหภูมิ 0°C

สรุปผลการทดลอง

1. การโคลนยีน *leuA* ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ α -isopropylmalate synthase (α -IPMS) ในลักษณะที่ส่วน tandem repeat ซึ่งมีความยาวชุดละ 57 bp จำนวน 2 ชุด ได้ถูกตัดออก โดยอาศัยเทคนิค mutagenic PCR สามารถทำได้สำเร็จ โดย mutated gene ซึ่งถูกเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pET15b ได้เป็น recombinant plasmid สามารถสร้างเอนไซม์ mutated α -IPMS ได้ดีเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสม
2. Mutated α -IPMS ที่สร้างขึ้นมีค่า enzyme activity จากการทำ enzyme activity assay ของ crude cell lysate ใกล้เคียงกับของ native α -IPMS
3. สามารถทำการสกัดแยก และ purify mutated α -IPMS จาก cell lysate ด้วย His-tagged protein purification system ได้เช่นเดียวกับ native α -IPMS
4. เอนไซม์ mutated α -IPMS มีค่า MW โดยประมาณจากการทำ SDS-PAGE และ ND-PAGE ที่ใกล้เคียงและสอดคล้องกับค่า MW ของ native α -IPMS โดยพบว่า native form ของ mutated α -IPMS ประกอบด้วย 2 subunits เช่นเดียวกับของ native α -IPMS
5. Mutated α -IPMS มีค่า optimal temperature และค่า optimal pH สำหรับการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ใกล้เคียงกับ native α -IPMS โดยที่ค่า optimal temperature และค่า optimal pH ของ mutated α -IPMS อยู่ที่ 37°-50°ซ และ pH7.5 ตามลำดับ ส่วนของ native α -IPMS อยู่ที่ 37°-50°ซ เช่นเดียวกัน และ pH8.5 ตามลำดับ
6. ผลการศึกษา pH stability ของ mutated α -IPMS พบว่าการเก็บเอนไซม์ไว้ที่ pH7.5 ให้ผลดีที่สุด และดีกว่าการเก็บเอนไซม์ไว้ที่ pH8.5 และ pH4 ส่วน native α -IPMS มีผลการเก็บเอนไซม์ไว้ที่ pH7.5 และ pH8.5 ใกล้เคียงกัน และเป็น pH ที่เอนไซม์มี stability ดีกว่าที่ pH4 เช่นกัน
7. Mutated α -IPMS ซึ่งสร้างจากยีน *leuA* ที่ได้ตัด 57 bp tandem repeat 2 ชุดออก สามารถทำงานได้ดี โดยแสดงจาก enzyme activity ของเอนไซม์ ที่มีความใกล้เคียงกับของเอนไซม์ที่สร้างจากยีนปกติ และจากการทำ activity staining ของเอนไซม์ที่อยู่บน non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าทั้ง pure enzyme และ crude cell lysate แสดงผล enzyme activity ที่ชัดเจนและมีตำแหน่งที่ตรงกัน

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ถึงแม้ว่าการใช้ TB control program ตามแนวทางของ WHO เช่น DOTS จะเป็นที่ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการช่วยให้การรักษาวัณโรคได้ผล และป้องกันการเสียชีวิตได้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งยังช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดโรคอีกด้วย (35,36) วัณโรคยังคงเป็นปัญหาของประชากรโลก โดยที่ 98 % ของรายที่เสียชีวิตจะอยู่ในประเทศกำลังพัฒนา (37) โดยรวมแล้วมีผู้เสียชีวิตเนื่องจากเชืื่อนี้ประมาณ 2 ล้านราย/ปีทีเดียว (38) ปัญหาที่สำคัญมากที่สุดประการหนึ่งคือ การแพร่กระจายของ multidrug-resistant (MDR) TB ซึ่งมีผลร้ายแรงในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อ HIV เนื่องจากทำให้เกิดอัตราการเสียชีวิตสูงมาก (39) การรักษาทำได้ยาก ค่าใช้จ่ายสูง และมีประสิทธิภาพต่ำ ซึ่งอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อคนไข้ (40)

ในการรักษาโรคนี้แม้จะมียาที่มีประสิทธิภาพ แต่โดยทั่วไปยังคงใช้เวลานาน และอาจต้องใช้ยาาร่วมกันหลายชนิด ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของ MDR (38)

สำหรับการศึกษา metabolism และ biochemical pathway ของเชื้อ *M. tuberculosis* ถือว่ามีความสำคัญยิ่งในการสร้างความรู้และความเข้าใจในเรื่องการดำรงชีวิตของเชืชนิดนี้ ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับ genome ของเชื้อสามารถช่วยให้การศึกษา metabolism เป็นไปได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น ในการศึกษาความสำคัญของ lipid metabolism การศึกษาความจำเพาะของ *M. tuberculosis* (38, 41) และในการศึกษาหา drug target ใหม่ ๆ สำหรับพัฒนาการรักษาโรคนี้เป็นต้น (38)

ในแง่ของการทำให้เกิด attenuation ของเชื้อโดยวิธี mutation ที่ gene ใน leucine biosynthesis ได้มีผู้รายงานการสร้าง attenuated strain ของ *M. tuberculosis* และ *M. bovis* โดย allelic exchange ซึ่งเป็นการแทนที่ wild-type *leuD* gene ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ α -IPM isomerase ด้วย mutant copy ซึ่งถูกคัดส่วนของยีนนอก 359 คู่เบส ผลปรากฏว่า ในภาวะขาด leucine จากภายนอก leucine auxotrope ที่ได้ ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในหนูและยังมีผลต่อการเจริญใน macrophage ของเชื้ออีกด้วย (18, 30, 31)

Tandem repeats (TR) เป็น repetitive DNA ประเภทหนึ่งที่พบได้ในเชื้อ *M. tuberculosis* ค่อมาพบว่า variability ในแง่ของ repeats number มาก จึงถูกเรียกว่า variable number tandem repeat (VNTR) loci (42) จากรายงานการใช้ Tandem Repeat Finder program (43) มีผู้พบว่า *M. tuberculosis* มี TR regions ไม่ต่ำกว่า 200-300 regions (44, 45)

VNTR ใน *M. tuberculosis* มีผู้ศึกษาและรายงานไว้เป็นจำนวนมาก และได้ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในการทำ strain characterization และการศึกษาในแง่ molecular epidemiology (7-15) ได้มีผู้รายงานว่า VNTR typing เป็นเทคนิคสำคัญที่มีศักยภาพในการถูกพัฒนาต่อไปเพื่อใช้ติดตามและจัดการกับการแพร่กระจายของโรควัณโรคอีกด้วย (46, 47) ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์แบบที่เรียกว่าโรคได้้อย่างถูกต้องถึงระดับสายพันธุ์เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาระบาดวิทยา (48)

อย่างไรก็ตามยังไม่มีผลการศึกษาที่ให้คำตอบที่แน่ชัดเกี่ยวกับ biological role ของ VNTR และความเกี่ยวข้องของ VNTR ต่อ evolutionary process (6, 7, 45) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง VNTR ที่พบในบริเวณ coding region ของ gene (5) จากผลการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่า *M. tuberculosis leuA* gene ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ α -IPMS และเป็น gene ที่มี VNTR ขนาด 57 เบสอยู่ 2 ชุด ที่ด้าน 3' สามารถแสดงออกและทำงานได้ (6) นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนชุดของ VNTR ที่ต่างกันของสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีผลต่อขนาดของเอนไซม์ α -IPMS อย่างมีความสอดคล้องกันอีกด้วย (6) จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้เป็นที่น่าสนใจในการเริ่มต้นศึกษาดังกล่าวและความสำคัญของ VNTR ดังกล่าวในเชื้อ *M. tuberculosis*

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้นำส่วนของ *M. tuberculosis leuA* repeat sequence ซึ่งมีความยาว 57 คู่เบส จำนวน 2 ชุดออก ด้วยวิธี mutagenic PCR procedure ได้ tandem repeat deletion mutant ที่เมื่อนำไปทำ gene expression ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) พบว่ามีระดับของ gene expression ใกล้เคียงกับระดับ gene expression ของ *leuA* ปกติ เมื่อทำการปรับสภาพที่เหมาะสมแล้ว นอกจากนี้เอนไซม์ mutated α -IPMS ที่แยกได้ ยังมีคุณสมบัติต่างๆ ใกล้เคียง native α -IPMS หลายประการ ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ น้ำหนักของหน่วยย่อยของเอนไซม์ enzyme activity เป็นต้น

ในแง่ของบทบาทและหน้าที่ของ repeat sequence ได้มีผู้ตั้งข้อสังเกตสำหรับ microsatellite loci ในแบคทีเรียก่อโรคว่า ความสามารถในการเกิด mutation ได้มากกว่าปกติจะช่วยให้แบคทีเรียมี evolutionary flexibility ที่มากพอที่จะเกิดการปรับตัว (adaptation) ให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่ทำให้การควบคุมการแสดงออกตามปกติของยีนขาดประสิทธิภาพไป (17, 49) และได้มีผู้รายงานที่เกี่ยวข้องกับข้อสังเกตนี้ไว้ว่า การเปลี่ยนแปลงของจำนวนชุดของ VNTR (changes in VNTR copy number) มักมีผลกระทบต่อการแสดงออกของ gene ที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัว (adaptive response) ซึ่งอาจช่วยให้เชื้อสามารถหลบหนีจากกลไกการต่อต้านของเชื้อและยังสามารถปรับตัวให้เข้ากับ microenvironment ของโฮสต์ได้ (50, 51, 52, 53) มีการศึกษามากมายที่ชี้แนะว่า Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRUs) และ interspersed repetitive sequence อื่น น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อวิวัฒนาการ และการเกิดความหลากหลายของกลไกการทำงานต่าง ๆ ภายในเซลล์ของเชื้อกลุ่ม Mycobacteria ด้วย (54)

MIRU ซึ่งเป็น repetitive units ที่สำคัญของ *M. tuberculosis* เป็น DNA ซึ่งมีความยาวประมาณ 40-100 คู่เบส มักพบเป็น tandem repeats และกระจายในส่วน intergenic regions ของ *M. tuberculosis* complex genomes จากการศึกษาโดยวิธี PCR และ sequence analysis มีผู้รายงานว่า มี variation ทั้งในแง่ของจำนวนของ repeat copy และ DNA sequence โดยในส่วนที่มี hypervariability ของ repeat number ทำให้เกิดคุณสมบัติ polymorphism ถูกเรียกว่า "VNTR loci" (7) ซึ่งได้มีผู้เสนอไว้ว่าน่าจะเกิดจาก relaxation ของ recombinational control ระหว่าง partially divergent sequences และจากการที่เซลล์ไม่สามารถแก้ไขข้อผิดพลาดที่เรียกว่า polymerase slippage errors ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากการขาดกลไก mismatch repair system ของแบคทีเรียด้วย (55)

การเปลี่ยนแปลงของ DNA (genetic change) จัดเป็นกระบวนการสำคัญที่เป็นรากฐานของ adaptation กระบวนการเหล่านี้ ได้แก่ mutation, insertion, deletion และ inversion (56) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการ insertion และ deletion เป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เกิด repeat sequence ขึ้น (57, 58, 59) รวมไปถึงการเกิด variation ของจำนวนชุดของ repeats ซึ่งเป็นลักษณะของ Polymorphism อย่างหนึ่ง

นอกจากนี้ gene duplication ซึ่งเป็นกลไกการตอบสนองของแบคทีเรียต่อ selective pressure ที่เกิดขึ้น เพื่อปรับสรีรวิทยาของเชื้อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในภาวะ stress เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่ทำให้เกิด VNTR ขึ้น (56) นอกเหนือจาก homologous recombination ซึ่งเป็นกลไกหลักแล้ว (7)

เหล่านี้เป็นข้อมูลที่สนับสนุนว่าการพบ VNTR และ VNTR polymorphism น่าจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับกระบวนการ adaptation ของเชื้อก่อโรค

ในแง่ของบทบาทของ repeat sequence ที่มีต่อ gene expression ได้มีผู้รายงานความสัมพันธ์ของจำนวนของ tetranucleotide ในยีน *IgtC* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ phenotypic-switching ของ lipopolysaccharide epitope ที่มีต่อ variable expression นอกจากนี้ mutation ของ *IgtC* ทำให้เกิดภาวะ attenuated virulence ของเชื้อ *H. influenzae* ต่อการติดเชื้อในหนูแรกเกิดอีกด้วย (50, 51) ทั้งนี้มีรายงานข้อมูลจำนวนมากที่แสดงว่า short sequence repeats (SSR) ในพวก Prokaryotes มีบทบาทและหน้าที่เกี่ยวกับ gene expression นอกจากนี้ polymorphism ของ SSR ยังถูกรายงานว่า น่าจะมีความสำคัญต่อวิวัฒนาการของ gene regulation ด้วย (60, 61, 62, 63, 64)

ในแง่ของ activity ของเอนไซม์ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า mutated α -IPMS ซึ่งสร้างจาก mutated *leuA* ที่ได้คัดส่วนของ 57 bp-tandem repeat ทั้ง 2 ชุดออก (tandem repeat deletion mutant) มี enzyme activity เทียบเท่าเอนไซม์ปกติ

การที่การทำงานของ mutated enzyme ไม่แตกต่างจากเอนไซม์ปกติ ซึ่งแสดงโดยค่า enzyme activity นี้ แสดงว่า 57 bp tandem repeat จำนวน 2 ชุดดังกล่าว อาจไม่มีความสัมพันธ์กับยีน *leuA* ในแง่ของ gene expression และคุณสมบัติพื้นฐานของเอนไซม์ แม้ว่าผลจากการที่ mutated *leuA* มี deletion ของ 57 bp tandem repeat จำนวน 2 ชุด ซึ่งอยู่ในลักษณะ in frame จะทำให้เกิด deletion ของ amino acid 19 residues จำนวน 2 ชุด อย่างไรก็ตาม Koon และคณะได้รายงานว่า ส่วนของ VNTR sequence ดังกล่าวอยู่ในบริเวณ regulatory domain (R domain) ของเอนไซม์นี้ด้วย (38) ดังนั้น VNTR ซึ่งเป็น 57 bp-tandem repeat จำนวน 2 ชุดที่พบในยีน *leuA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv นี้ อาจมีบทบาทสำคัญอื่นบางประการต่อยีน *leuA* ซึ่งต้องอาศัยการศึกษาในระดับต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Fink P. Biosynthesis of branched chain amino acids. In: Sonenshein A, Hoch J, ed. *Bacillus subtilis*. The model gram positive organisms. Washington DC: American Society for Microbiology; 1993: pp 307-317.
2. Kohlhaw G B. α - Isopropylmalate synthase from yeast. *Methods Enzymol* 1988; 166: 414-423.
3. Patek M, Krumbach K, Eggeling L, Sahm H. Leucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme activities, structure of *leuA*, and effect of *leuA* inactivation on lysine synthesis. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 133-140.
4. Namwat W, Luangsuk P, Palittapongarnpim P. The genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Thailand studied by amplification of DNA segments containing direct repetitive sequences. *In J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 153-159.
5. Smittipat N, Palittapongarnpim P. Identification of possible loci of variable number of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 2000; 80: 69-74.
6. Chanchaem W, Palittapongarnpim P. A variable number of tandem repeats result in polymorphic α - Isopropylmalate synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2002; 81(1)1-6.
7. Supply P, Mazar E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36: 762-771.
8. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2607-2618.
9. Frothingham R, Strickland P L, Bretzel G, Ramaswamy S, Musser J M,

- Williams D L. Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from West Africa. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1921-1926.
10. Frothingham R, Meeker-O'Connell W A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable number of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998; 144: 1189-1196.
 11. Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2520-2524.
 12. Bifani P, Moghazeh S, Shopsis B, Driscoll J, Ravikovitch A, Kreiswirth B N. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3200-3204.
 13. Bifani P J, Mathema B, Liu Z et al. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* 1999; 282: 2321-2327.
 14. Magdalena J, Supply P, Loch C. Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2471-2476.
 15. Magdalena J, Vachee A, Supply P, Loch C. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex *J Clin Microbiol* 1998; 36: 937-943.
 16. Supply P, Magdalena J, Himpens S, Loch C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* 1997; 26: 991-1003.
 17. Van Belkum A, Scherer S, Van Alephen L, Verbrugh H. Short- sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* 1988; 62: 193-275.
 18. Hondalus M K, Bardarov S, Russell R, Chan J, Jacobs W R Jr, Bloom B R.

Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2000; 68: 2888-2898.

19. Kohlhaw G B, Leary T R. α - Isopropylmalate synthase from *Salmonella typhimurium*: purification and properties. *J Biol Chem* 1969; 244: 2218-2225.
20. Wiegel J, Schlegel H G. α - Isopropylmalate synthase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. II. Substrate specificity and kinetics. *Arch Microbiol* 1977; 112: 247-254.
21. Leary T R, Kohlhaw G B. α - Isopropylmalate synthase from *Salmonella typhimurium*. Analysis of the quaternary structure and its relation to function. *J Biol Chem* 1972; 247: 1089-1095.
22. Beltzer J P, Chang L F, Hinkkanen A E, Kohlhaw G B. Structure of yeast *LEU4*. The 5' flanking region contains features that predict two modes of control and two productive translation starts. *J Biol Chem* 1986; 261: 5160-5167.
23. Jungwirth, C, Margolin P, Umbarger E. The initial step in leucine biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1961; 5: 435-439.
24. Margolin P. Genetic fine structure of the Leucine operon in *Salmonella*. *Genetics* 1962; 48: 441-457.
25. Burns RO, Calvo J, Margolin P, Umbarger HE. Expression of the leucine operon. *J Bacteriol* 1966; 91(4): 1570-1576.
26. Bartholomew JC, Calvo JM. Isopropylmalate synthase from *Salmonella typhimurium* : amino acid composition, NH_2 terminal analysis and fingerprint analysis. *Biochimica ET Biophysica Acta* 1971; 250: 577-587.
27. Ricca E, Calvo JM. The nucleotide sequence of *leuA* from *Salmonella typhimurium*. *Nucleic Acid Res* 1990; 18: 1290.
28. Dolin, PJ, Raviglione MC and Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull WHO* 72: 213-220.
29. Colditz GA, Brewer TF, BS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. 1994. *JAMA* 271: 698-702.

30. McAdam R A, Weisbrod T R, Martin J et al. *In vivo* growth characteristics of leucine and methionine auxotrophic mutants of *Mycobacterium bovis* BCG generated by transposon mutagenesis. *Infect Immun* 1995; 63: 1004-1012.
31. Bange F C, Brown A M, Jacobs W R Jr. Leucine auxotrophy restricts growth of *Mycobacterium bovis* BCG in macrophages. *Infect Immun* 1996; 64: 1794-1799.
32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -dye binding. *Anal Biochem*.1976; 72: 248-254.
33. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
34. Waber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969; 244: 4406-4411.
35. Dye C, Watt C J, Bleed D. Low access to a high effective therapy : a challenge for international tuberculosis control. *Bull W.H.O.* 2002; 80: 437-444.
36. Ministry of Health of the People's Republic of China. Report on Nationwide Random Survey for the Epidemiology of Tuberculosis in 2000. Ministry of Health of the People's Republic of China. 2002.
37. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. *JAMA* 1999; 282: 677-686.
38. Koon N, Squire C J, Baker E N. Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 8295-8300.
39. Corbett L, Raviglione M. Global Burden of Tuberculosis : Past, Present and Future. in "Tuberculosis and the Tubercle Bacillus" (Cole S T, Eisenach K D, Mc Murray D N, Jacobs Jr. W R.eds.)2005, ASM Press, Washington DC, USA.
40. Espinal M A, Salfinger M. Global Impact of Multidrug Resistance. in

- "Tuberculosis and the Tubercle Bacillus" (Cole S T, Eisenach K D, Mc Murray D N, Jacobs Jr. W R.eds.)2005, ASM Press. Washington DC, USA.
41. Wheeler P R, Blanchard J S.General Metabolism and Biochemical Pathways of Tubercle Bacilli. in "Tuberculosis and the Tubercle Bacillus" (Cole S T, Eisenach K D, Mc Murray D N, Jacobs Jr. W R.eds.)2005, ASM Press, Washington DC, USA.
 42. Nakamura Y, Leppert M,O'Connell P, e tal. Variable number of tandem repeat(VNTR) markers for human gene mapping. Science 1987; 235: 1616-1622.
 43. Benson G. Tandem repeats finder : a program to analyze DNA sequence. Nucleic Acids Res. 1999; 27 : 573-580.
 44. Le Fleche, Hauck P Y, Onteniente L, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes : application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001 ; 1: 2.
 45. Yeramian E, Buc H.Tandem repeats in complete bacterial genome sequence: sequence and structural analyses for comparative studies. Res Microbiol. 1999; 150: 745-754.
 46. Roring S, Scott A, David B, et al. Development of variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis* : Comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. J Clin Microbiol. 2002; 40: 2126-2133.
 47. Drobniewski F, Balabonovs Y, Ruddy M, et al. Rifampin and multidrug resistant tuberculosis in Russian Civilians and prison inmates : dominance of the Beijing strain family. Emerging Infectious Diseases 2002; 8: 1320-1326.
 48. Le Fleche P, Fabre M, Denoeud F, Koeck J L, Vergnaud G. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. BMC Microbiol. 2002; 3: 37.
 49. Moxon E R, Rainey P B, Nowak M A, Lenski R E. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. Curr Biol. 1994; 4: 24-33.

50. Hood DW, Deadman ME, Jennings MP, Bisercic M, Fleischmann RD, Venter JC, Moxon ER. DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 11121-11125.
51. Peak IR, Jennings MP, Hood DW, Bisercie M, Maxon ER. Tetrameric repeat units associated with virulence factor phase variation in *Haemophilus* also occur in *Neisseria* spp. and *Moraxella catarrhalis*, FEMS Microbiol. Lett 1996; 137: 109-114.
52. Van Belkum A, Scherer S, van Leeuwen W, et al. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. 1997; 65: 5017-5027.
53. Weiser J N, Love J M, Moxon ER. The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. Cell; 59: 657-665.
54. Gordon S V, Supply P. Repetitive DNA in the *Mycobacterium tuberculosis* complex in "Tuberculosis and the Tubercle Bacillus" (Cole S T, Eisenach K D, Mc Murray D N, Jacobs Jr. W R, eds.) 2005, ASM Press, Washington DC, USA.
55. Mizrahi V, Andersen S J. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence ? Mol Microbiol 1998; 29: 1331-1339.
56. Riehle MM, Bennett AF, Long AD. Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 525-530.
57. Coggins LW, O'Prey M. DNA tertiary structures formed in vitro by misaligned hybridization of multiple tandem repeat sequences. Nucleic Acids Res. 1989; 17: 7417-7426.
58. Hauge X Y, Litt M. A study of the origin of "shadow band" seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. Nucleic Acids Res. 1993; 2: 411-415.
59. Chiurazzi P, Kozak L, Neri G. Unstable triplets and their mutational mechanism: Size reduction of the CGG repeat versus germline mosaicism in the fragile X

- Syndrome. *Am J Med Genet.* 1994; 51: 517-521.
60. Arie RG, Cohen C J, Yuval E, et al. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: Abundance, distribution, composition and polymorphism. *Genome Reseach* 2000; 10: 62-71.
 61. Rosenberg SM, Longerich S, Gee P, Harris RS. Adaptive mutation by deletion in small mononucleotide repeats. *Science* 1994; 265: 405.
 62. Kasbi Y, Soller M. Functional roles of microsatellites and minisatellites. in "Microsatellite evolution and application" (Goldstein DD, Schlotterer C. eds.) 1998 oxford university Press, Oxford, UK.
 63. Tonjum T, Caugant DA, Dunham SA, Koomy M. Structure and function of repetitive sequence elements associated with a highly polymorphic domain of the *Neisseria meningitidis PilQ* protein *Mol Microbiol.* 1998; 29: 111-124.
 64. Moxon ER, Wills C. DNA microsatellites : Agents of evolution ? *Sci. Am* 1999; 280: 94-99.
-

ภาคผนวก

1) การตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติ

- อยู่ระหว่างดำเนินการ

2) การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- ได้เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานการวิจัยในการประชุม “การประชุมเพื่อเสนอผลงานการวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่ และพบกับเมธีวิจัยอาวุโส สกว”. เมื่อวันที่ 14-16 มกราคม 2548