

Abstract

Project code: MRG4580031

Project Title: Investigation for the Role and Significance of Tandem Repeats within *Mycobacterium tuberculosis leuA* Gene

Investigator: Wimon Chanchaem ^a and Prasit Palittapongarnpi

^a Department of Biology , Faculty of Science, Ramkhamhaeng University , Huamark, Bangkok, Bangkok 10240, Thailand.

^b Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, RamaVI Rd, Phayathai , Bangkok 10400, Thailand.

E-mail Address: wimolc@hotmail.com

Project Period: 2 years

In order to investigate for the role and significance of tandem repeats within *Mycobacterium tuberculosis leuA* gene encoding alpha-isopropylmalate synthase (α -IPMS), we compared the properties of native α -IPMS and mutated α -IPMS of which the 2 copies of 57 bp repeats has been deleted. By using mutagenic PCR procedure , we successfully constructed a recombinant plasmid of pET15 b expression vector carrying the mutated gene. Optimum expression conditions were studied and properties of gene products were compared. Mutated gene was optimally amplified at 64⁰C annealing temperature and well expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) at 25⁰C for 3-6 hrs using isopropylthio - β -galactoside at the final concentration of 0.5 mM as inducer. Properties of both native and mutated enzymes were compared. The results showed that with deletion of the 2 copies of 57 bp tandem repeats, the mutated *leuA* can well expressed to a functional mutated α -IPMS. The basic properties of mutated α -IPMS was similar to the native α -IPMS. Mutated α -IPMS was smaller, corresponding to the deleted 2 copies of 19 amino acids repeats and the native form of the enzyme was also dimer. The optimal temperature and optimal pH for enzyme activity was between 30⁰-50⁰ C and 7.5 respectively. The stability of mutated α -IPMS also similar to the native α -IPMS. Upon the studies, significant differences was not observed between the two types of enzyme. These results showed that the 2 copies of 57 bp tandem repeats may have no effect on *leuA* expression and α -IPMS basic properties.

Keywords: tandem repeats, alpha-isopropylmalate synthase, *leuA*, *Mycobacterium tuberculosis*

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4580031

ชื่อโครงการ: การศึกษาบทบาทและความสำคัญของ Tandem Repeats ภายในยีน *leuA* ของเชื้อวัณโรค

ชื่อนักวิจัย: วิมล จันทร์แจ่ม¹ และ ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์²

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง หัวหมาก

บางกะปิ กรุงเทพฯ 10240

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6

พญาไท กรุงเทพฯ 10400

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

ในการศึกษาบทบาทและความสำคัญของส่วน tandem repeats ในยีน *leuA* ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ alpha-isopropylmalate synthase (α -IPMS) ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ได้ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ดังกล่าวที่เตรียมจากยีน *leuA* ปกติและที่เตรียมจากยีน *leuA* ที่ได้ตัดส่วน tandem repeat ซึ่งยาวชุดละ 57 คู่เบสจำนวน 2 ชุด ออกโดยวิธี mutagenic PCR โดยยีน *leuA* ทั้ง 2 แบบได้ถูกเชื่อมต่อกับ expression vector pET15b และทำการสร้างเอนไซม์ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ B L 21(DE3) ซึ่งจากการปรับหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 แบบถูกสร้างได้ดี เมื่อใช้สาร isopropylthio- β -galactoside ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในการกระตุ้นการทำงานของยีน และใช้อุณหภูมิ 25⁰ ซ เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่ายีน *leuA* ที่ถูกตัดส่วน tandem repeats ออก สามารถกำหนดการสร้าง α -IPMS ที่มี activity เทียบเท่าเอนไซม์ที่สร้างจากยีนปกติ โดยที่ mutated α -IPMS มีคุณสมบัติพื้นฐานใกล้เคียงกับเอนไซม์ปกติ ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ และค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน ความเสถียรในสภาพพีเอชต่างๆ และจำนวนหน่วยย่อยของเอนไซม์ สำหรับค่าน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของเอนไซม์พบว่า mutated α -IPMS มีขนาดเล็กลง ซึ่งเป็นผลมาจากการตัดส่วนของ tandem repeats ออก ผลจากการศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า tandem repeat ดังกล่าว อาจไม่มีความสัมพันธ์กับยีน *leuA* ในแง่การแสดงออกของยีนและคุณสมบัติพื้นฐานของเอนไซม์

คำหลัก: tandem repeats, alpha-isopropylmalate synthase, *leuA*, *Mycobacterium tuberculosis*

บทนำ

เอนไซม์ α -isopropylmalate synthase (α -IPMS) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาแรกในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน Leucine ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้มีชื่อว่า *leuA* (1-3)

จากการศึกษาคุณสมบัติ polymorphisms ของโครโมโซมเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv พบว่าที่ปลายด้าน 3' ของยีน *leuA* มี repeated sequence ซึ่งมีความยาว 57 คู่เบส เรียงติดกัน 2 ชุด โดยอยู่ในส่วน coding region ของยีนดังกล่าว (4) นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งของโลคัสนี้ซึ่งมีชื่อว่า VNTR4155(5) ของโครโมโซม *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากผู้ป่วยมีลักษณะของ polymorphisms อีกด้วย (4)

บนส่วนของ tandem repeats ที่พบในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv นี้ ไม่พบ stop codon และมีความยาวของ repeats ในลักษณะ “multiples of 3 bp” ดังนั้นการเกิด insertion หรือ deletion ของโครโมโซมส่วนนี้อาจไม่มีผลในการขัดขวางกระบวนการ translation ของเซลล์ แต่มีผลกับกรดอะมิโนของเอนไซม์ α -IPMS ที่อาจเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปตามการเกิด insertion หรือ deletion ของ repeated sequence ดังกล่าว นอกจากนี้จากการศึกษาลำดับเบสของจีโนมของ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากผู้ป่วยที่แสดงลักษณะ polymorphisms ของยีนส่วนนี้ พบว่าลักษณะดังกล่าวเป็นผลมาจากการมีจำนวนชุดที่ต่างกันของ tandem repeat ยีนดังกล่าวสามารถทำงานได้ เอนไซม์ที่สร้างขึ้นมีลักษณะ polymorphisms สอดคล้องกับลักษณะ polymorphisms ของยีน (6) โดยที่ยังคงมีคุณสมบัติทั่วไปและการทำงานเช่นเดียวกับ α -IPMS ของเชื้ออื่นๆ

แม้บนโครโมโซมของ *M. tuberculosis* ถูกพบว่ามี VNTR (variable numbers of tandem repeats) อยู่หลายชนิด และบางชนิดถูกนำไปใช้ช่วยในการวิเคราะห์เชื้อได้อย่างกว้างขวาง (5, 7-15) ก็ตาม แต่การศึกษาเพื่อให้ทราบถึงบทบาทและความสำคัญของ repeated sequence ดังกล่าวที่มีต่อ *M. tuberculosis* ยังคงมีน้อยมาก (16) และเนื่องจากการที่ยังไม่มีผู้ศึกษาโครงสร้าง 3 มิติ (three-dimensional structure) ของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ อันได้แก่ isopropylmalate/homocitrate/citrate synthase อย่างจริงจัง จึงทำให้การคาดคะเนผลของ repeated amino acid ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ α -IPMS ยังไม่อาจทำได้ นอกจากนี้ข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์ชนิดนี้ของเชื้อ *Mycobacterium* sp. มีน้อยมาก อีกทั้งบทบาทและหน้าที่ของ VNTR ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ α -IPMS ของจุลินทรีย์ 23 ชนิด จากกลุ่มของ Eubacteria, Archaeobacteria และ Fungi พบว่ามีเพียง α -IPMS ของ *M. tuberculosis* เท่านั้น ที่มี repeated sequence ของกรดอะมิโน (6) จึงเป็นที่น่าสนใจว่า repeated amino acid sequence อาจไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ

การทำงานตามปกติของเอนไซม์ แต่มีบทบาทสำคัญอย่างอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตและการก่อโรคของเชื้อดังกล่าว เช่นการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมและการหลบหนีจากกลไกทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (17) เป็นต้น

นอกจากนี้ Leucine biosynthesis ของเชื้อกลุ่ม *M. tuberculosis* complex ยังมีผู้สนใจนำมาใช้เป็นเป้าหมายสำหรับการทำให้เชื้อดังกล่าวอยู่ในภาวะ attenuation เพื่อใช้ในการชักนำให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นในสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าได้ผลดีเทียบเท่าการใช้ BCG (18) การวิจัยดังกล่าวแสดงสู่ทางการใช้ leucine auxotroph ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรคซึ่งอาจเป็นไปได้ในอนาคต

ดังนั้นผู้วิจัยมีความเห็นว่าการศึกษาดังกล่าว และความสำคัญ tandem repeats ภายในยีน *leuA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* จะนำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีผู้ศึกษา ได้แก่ ข้อมูลความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ α -IPMS ของเชื้อ *M. tuberculosis* เอง ทั้งในแง่ของคุณสมบัติทั่วไป โครงสร้าง 3 มิติ และ การทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้การทราบถึงบทบาทและความสำคัญของ tandem repeats ที่มีต่อเอนไซม์ α -IPMS อาจนำไปสู่การค้นพบบทบาทและหน้าที่ที่แน่ชัดของ VNTR ในโครโมโซมของจุลชีพ และหาก tandem repeats นี้เป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์ α -IPMS หรือมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตและการก่อโรคของเชื้อ อาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาการป้องกันและการรักษาวัณโรคด้วยแนวทางใหม่ๆต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษารoles และความสำคัญของ tandem repeats ภายในยีน *leuA* ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ α -isopropylmalate synthase

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review) และเอกสารอ้างอิง

การสังเคราะห์กรดอะมิโนในกลุ่ม branched chain amino acid ซึ่งได้แก่ leucine, isoleucine และ valine มีผู้สนใจและศึกษาอย่างกว้างขวาง ทั้งในสิ่งมีชีวิตพวก Eukaryotes และ Prokaryotes หลายชนิด เนื่องจากเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทั่วไป การสังเคราะห์กรดอะมิโน leucine ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่อาศัย Isopropylmalate (IPM) pathway ซึ่งปฏิกิริยาแรกเป็น committed reaction มีเอนไซม์ α -Isopropylmalate synthase (α -IPMS) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (1-3)

เอนไซม์ α -IPMS มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลชีพหลายชนิด ถูกกำหนดการสร้างโดยยีน *leuA* เป็นเอนไซม์ชนิด allosteric enzyme ซึ่งพบทั้งในแบคทีเรีย ฟังไจ และ พืช (1-3, 19-22) การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์นี้มีมาตั้งแต่ปี ค.ศ 1956 โดยเน้นที่วิธีการสังเคราะห์ leucine ใน IPM pathway (23) หลังจากนั้น ได้มีผู้รายงานการศึกษา leucine operon ส่วนต่างๆ ได้แก่ operators, structural genes รวมไปถึงการแสดงออก

ของ operon ดังกล่าว โดยส่วนใหญ่ทำการศึกษาในเชื้อ *Salmonella typhimurium* (19, 23-27) แต่ไม่มีรายงานการศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้ใน *M. tuberculosis*

ในการศึกษาคุณสมบัติ polymorphisms ของโครโมโซมเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv ได้มีรายงานการพบ repeated sequence ความยาว 57 คู่เบส เรียงติดกัน จำนวน 2 ชุด ที่ด้าน 3' ของยีน *leuA* โดยที่ tandem repeats นี้อยู่ในส่วนของ coding region ของยีนดังกล่าว จากการศึกษาโครโมโซมของ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากผู้ป่วย พบลักษณะ polymorphisms ที่ส่วนของ *leuA* gene อย่างชัดเจน (4) และเมื่อทำการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนที่แสดง polymorphisms พบว่าลักษณะดังกล่าวเป็นผลมาจากการมีจำนวนชุดที่ต่างกันของ repeated sequence ซึ่งมีความยาว 57 คู่เบส ข้างต้น (6)

นอกจากนั้นได้มีรายงานว่าทั้ง *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv ซึ่งมี repeated sequence จำนวน 3 ชุด และ 6 ชุด บนยีน *leuA* สามารถสร้างเอนไซม์ α -IPMS ได้ โดยที่เอนไซม์ที่ได้มีลักษณะ polymorphisms สอดคล้องกับลักษณะของยีน (6) ทั้งนี้ยังไม่เคยมีรายงานการพบ polymorphisms ของยีน *leuA* ในเชื้ออื่น รายงานข้างต้นนี้เป็นการสนับสนุนว่ายีน *leuA* ของ *M. tuberculosis* ที่มี repeated sequences สามารถทำงานได้จริง อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้ศึกษาเอนไซม์ α -IPMS ในเชื้อนี้

การค้นพบ VNTR ชนิดต่างๆ บนโครโมโซมของ *M. tuberculosis* ได้มีผู้รายงานไว้ (5, 7) และยังมีรายงานการใช้ VNTR ในการวิเคราะห์เชื้อในกลุ่ม Mycobacterium อีกด้วย (7-15) อย่างไรก็ตามบทบาทและหน้าที่ของ VNTR ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาที่มุ่งเน้นในเรื่องนี้ยังมีน้อยมาก

ในแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด ได้มีผู้รายงานว่า VNTR มักอยู่ในยีนที่กำหนดการสร้าง surface exposed proteins ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดพยาธิสภาพของเชืื่อนั้นๆ คุณสมบัติ polymorphisms ของโปรตีนอาจมีประโยชน์ในการช่วยให้เชื้อก่อโรคสามารถปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่อาศัย รวมทั้งอาจช่วยในการหลบหลีกจากการทำลายของภูมิคุ้มกันจากโฮสต์ (17)

สำหรับ VNTR-containing *leuA* gene ของ *M. tuberculosis* นี้เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์สำหรับเมตาโบลิซึมของเซลล์ ซึ่งไม่ได้มีการทำงานสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยตรง จึงอาจเป็นไปได้ว่า VNTR ดังกล่าวอาจมีบทบาทหรือความสำคัญอื่นๆ ต่อเชื้อนี้ทั้งในแง่ของการดำรงชีวิตและการก่อโรคที่รุนแรงในมนุษย์

และสืบเนื่องจากการที่ *M. tuberculosis* ยังคงเป็นสาเหตุสำคัญของการตายในประชากรโลก การป้องกันโรควัณโรคโดยใช้วัคซีน BCG แม้จะไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากและใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ประสิทธิภาพของการป้องกันโรคของวัคซีนชนิดนี้ยังคงมีความผันแปรอยู่มาก (28, 29) การคิดค้นหรือพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรคที่มีคุณสมบัติดีขึ้น จึงยังคงเป็นสิ่งที่ต้องการและมีความสำคัญต่อสังคมอย่างมาก เช่น การพัฒนา mutant สายพันธุ์ใหม่ๆ ของ Mycobacteria ที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้โฮสต์สามารถสร้างภูมิคุ้มกันในระดับที่สูงพอ มีประสิทธิภาพดี และสามารถป้องกันโรคได้ในระยะยาว

ได้มีผู้รายงานการใช้ leucine biosynthetic pathway เป็นเป้าหมายในการทำให้เชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex กลายเป็นเชื้อที่อ่อนกำลังและไม่สามารถก่อโรคได้ เช่น การใช้เทคนิค transposon mutagenesis ในการสร้าง BCG leucine auxotroph ที่มีบางส่วนของยีน *leuD* ซึ่งเป็นยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ α -IPM isomerase ถูกทำลายไป ทำให้เชื่อดังกล่าวอยู่ในภาวะ attenuation เมื่อทดสอบในหนู และไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงของ macrophages (30, 31)

จากรายงานของ Hondalus และคณะในปี ค.ศ 2000 แสดงให้เห็นว่า leucine auxotroph ของเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งสร้างขึ้นโดยใช้เทคนิค allelic exchange โดยแทนที่ยีน *leuD* ด้วย mutant copy ที่มีส่วนของยีนนี้หายไป 359 คู่เบส อยู่ในภาวะ attenuation เมื่อทดสอบในหนู และทำให้หนูมีอัตราการรอดตายจากการรับเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ดีเทียบเท่ากับการใช้วัคซีน BCG (18) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้ leucine auxotroph ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรคในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ α -isopropylmalate synthase (α -IPMS) ซึ่งกำหนดโดยยีน *leuA* ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37 Rv โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ที่สร้างโดยยีน *leuA* ปกติ และเอนไซม์ที่สร้างโดยยีน *leuA* ที่ตัดส่วน repeated sequence ซึ่งยาวชุดละ 57 คู่เบสจำนวน 2 ชุดออกแล้วโดยเรียกว่า mutated enzyme (สร้างจาก mutated gene) ระเบียบวิธีวิจัยและรายละเอียดมีดังนี้

1. การสร้างพลาสมิดที่มี mutated *leuA* gene ประกอบด้วย การทำ mutation โดยนำ repeated sequence ซึ่งยาวชุดละ 57 คู่เบส จำนวน 2 ชุดออกโดยใช้เทคนิค Mutagenic PCR procedure
2. เตรียมเอนไซม์ α -IPMS จากยีน *leuA* ปกติ (native α -IPMS) และ mutated *leuA* gene
3. ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของ mutated α -IPMS กับ native α -IPMS

1. สายพันธุ์แบคทีเรียและชนิดของพลาสมิด

แบคทีเรียที่ทำการศึกษานี้คือ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37 Rv ซึ่งใช้เป็นแหล่งของยีน *leuA* สำหรับการผลิตเอนไซม์ alpha-isopropylmalate synthase (α -IPMS) และใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α (BRL) เป็นโฮสต์สำหรับขั้นตอนการทำ cloning ในส่วนของ protein expression ใช้ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) (Novagen) และใช้พลาสมิด pET15b (Novagen) เป็น cloning vector และ expression vector ดังแสดงในรูปที่ 1

pET-15b

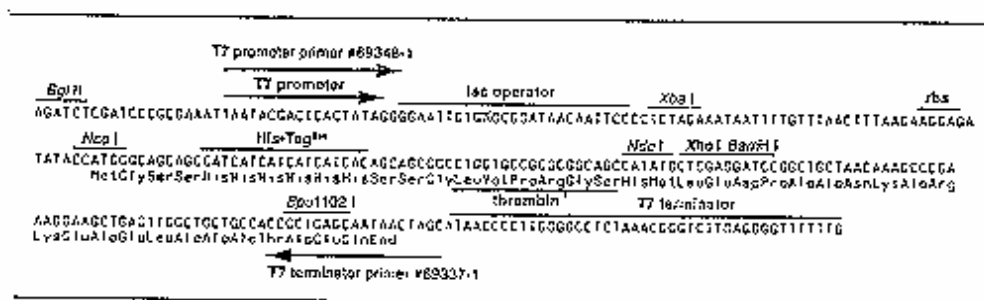


Figure 6 Transcription, cloning region sequence of pET15b expression vector.

รูปที่ 1 แสดง cloning vector (pET15b) ที่ใช้ในการศึกษา

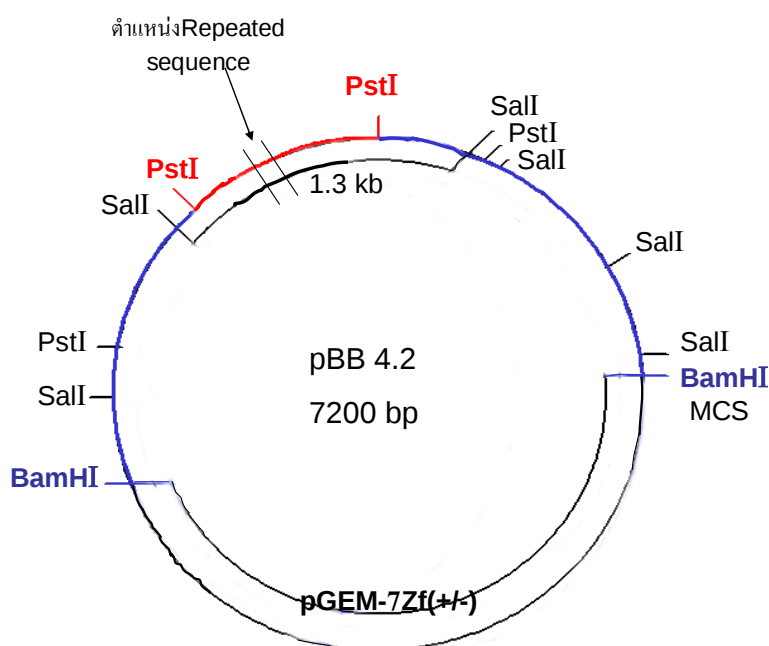
2. การสร้าง recombinant plasmid ที่มี mutated *leuA* gene

2.1 การเตรียม mutated *leuA* gene

2.1.1 การออกแบบ Primer

ใช้ข้อมูล *leuA* gene sequence ในการออกแบบ Primers จำนวน 3 คู่ โดย 2 คู่ ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *leuA* ที่อยู่หน้าและหลัง tandem repeat ตามลำดับ ส่วนคู่ที่ 3 ใช้ในการเพิ่มจำนวน mutated gene จากการนำชิ้นส่วนของ gene 2 ส่วนที่เพิ่มจำนวนได้แล้วมาต่อกัน

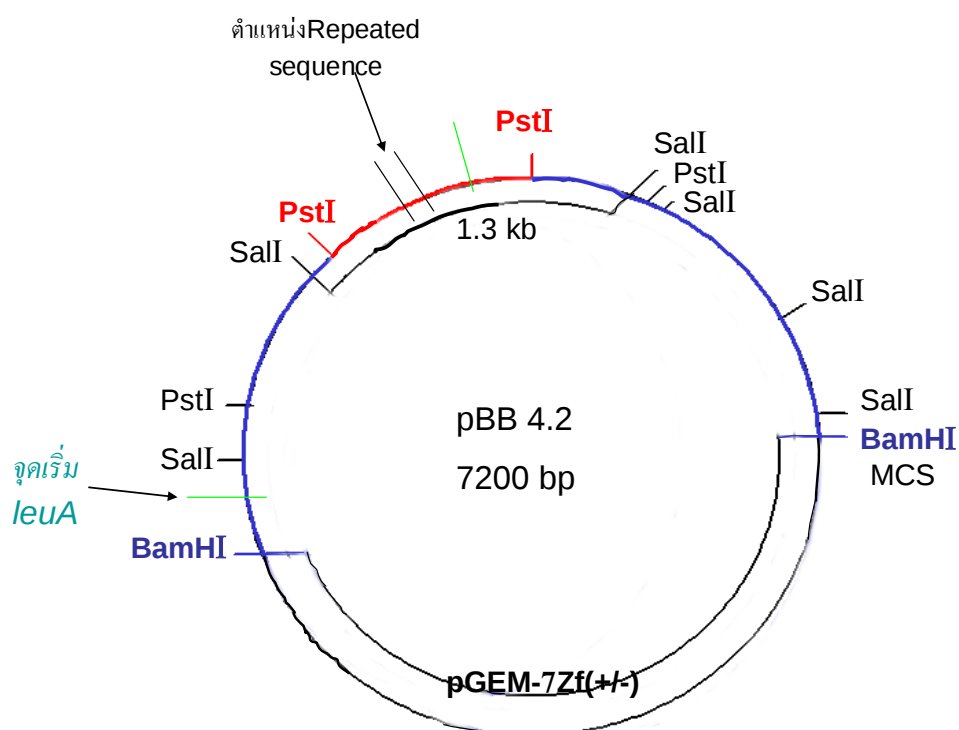
ในการออกแบบ Primer จะทำการออกแบบให้ได้ผลผลิตส่วนหน้าของ tandem repeat มีปลาย 3' เป็นเบสคู่สมกับส่วนหลังของ tandem repeat เป็นความยาว 12 คู่เบส จากนั้นทำ PCR รอบที่สอง โดยใช้ผลผลิตจากการเพิ่ม DNA ในรอบแรกที่ทำมาทำให้บริสุทธิ์แล้วและถูก anneal เข้าด้วยกันเป็น template ดังรูปที่ 2 ทั้งนี้ Primer คู่ที่ 3 ได้ออกแบบให้มี cloning site (*NdeI*, *BamHI*) เพื่อใช้ในการทำ cloning ต่อไป



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของ Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนส่วนของยีน *leuA* เพื่อใช้ในการศึกษา

2.1.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ *leuA* gene ส่วนที่อยู่หน้าและหลัง tandem repeat

ใช้เทคนิค PCR ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน 2 ส่วนจาก template ซึ่งเป็น recombinant plasmid ที่ประกอบด้วยชิ้นส่วนของ chromosomal DNA ของแบคทีเรีย *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv ความยาวประมาณ 4.2 Kb ซึ่งมี complete *leuA* gene อยู่ภายใน ต่อเข้ากับ cloning vector pGEM-7zf (+/-) เรียก pBB4.2 (4) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงพลาสมิด pBB4.2 ซึ่งมี complete *leuA* gene อยู่ภายในส่วนของโครโมโซมจากเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งยาว 4.2 Kb

ทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ PCR product ที่มีความจำเพาะและมีปริมาณมากพอ ทำการตรวจสอบผลผลิตจาก PCR โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose เป็น 1% หรือ 1.5% ใน 0.5 M Tris Boric EDTA buffer (TBE) ขึ้นกับขนาดของ PCR product

2.1.3 การต่อชิ้นส่วนที่ 1 (ส่วนหน้า tandem repeat) และชิ้นส่วนที่ 2 (ส่วนหลัง tandem repeat) เข้าด้วยกัน และการเพิ่มจำนวน mutated gene

ในการต่อชิ้นส่วนที่ 1 และ 2 ของ *leuA* gene จะต้องทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ชิ้นส่วนทั้งสองต่อเข้าด้วยกันได้อย่างดีก่อนนำไปใช้เป็น template เพื่อเพิ่มจำนวน mutated gene ดังกล่าวให้ได้ปริมาณมาก สำหรับใช้ในการตัดต่อเข้ากับ cloning vector การต่อชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวจะต้องทำ annealing ในหลอดทดลอง ก่อนทำ PCR และปรับหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ในการเพิ่มจำนวน mutated gene ด้วย

2.2 การเชื่อมต่อ mutated gene เข้ากับเวกเตอร์

นำ mutated gene fragment ที่เพิ่มจำนวนได้แล้ว มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit (Qiagen) หาความเข้มข้นด้วยวิธี Spectrophotometry (260 nm) จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 0.8% low melting agarose ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ตัดแยกส่วนที่มี DNA ที่ต้องการมาทำการสกัดชิ้นส่วน DNA ออกโดยใช้ gel extraction kit (Qiagen) หลังจากหาความเข้มข้นของ mutated gene fragment ที่เตรียมได้ นำมาต่อเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET15b ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน โดยใช้ molar ratio ที่เหมาะสม ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำ transformation เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ซึ่งเตรียมเป็น competent cell จากนั้นเพาะเลี้ยงบน L agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล.

2.3 การคัดเลือก clone ที่มี recombinant plasmid ที่ต้องการ

ทำการคัดเลือก clone ที่มี recombinant plasmid ที่ต้องการ ซึ่งมี insert (mutated gene) 2 วิธีดังนี้

2.3.1 วิธี restriction analysis

สกัดแยก recombinant plasmid ออกจากโคโลนีโดยใช้วิธี alkaline lysis method จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *NdeI* โดยใช้ปริมาณ DNA 3 ไมโครกรัม อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นตรวจสอบผลโดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis

2.3.2 วิธี PCR amplification โดยใช้ colony extract

นำโคโลนีที่คาดว่าจะมี recombinant plasmid ซึ่งต้องการทดสอบ ปริมาณ 1 loop มาทำให้เป็น suspension ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้ละลายและปั่นให้เซลล์แตกด้วย vortex mixer เป็นเวลา 3-5 นาที ปั่นเก็บส่วนใส โดยใช้เครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำไปใช้เป็น template ในการทำ PCR โดยใช้ primer คู่ที่ 3 และสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ปรับหาไว้แล้ว

3. การเตรียมเอนไซม์ α -IPMS จากยีน *leuA* ปกติและยีนที่เป็น mutated *leuA* gene

3.1 การเตรียม α -IPMS จากยีนปกติ

นำ recombinant plasmid ซึ่งมียีน *leuA* ปกติ (pLEU151) (6) มาทำ transformation เข้าสู่โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ปริมาณมาก โดยใช้ LB broth ที่ผสมยาแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. และใช้ isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เป็นสาร inducer ทำการผลิตเอนไซม์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

นำ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ซึ่งมี recombinant plasmid pLEU151 มาเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่มียาแอมพิซิลิน ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และหมุนเหวี่ยงเพื่อเพิ่มอากาศด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เมื่อเชื้อเจริญจนกระทั่งมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5-0.6 เติมน้ำ IPTG ให้มีความเข้มข้น สุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ นำไป incubate ต่อที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 3-6 ชม. จากนั้นปั่นแยกเซลล์โดยใช้เครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย 50 mM Tris HCL buffer pH 7.5 นำเซลล์เก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ

3.2 การเตรียม α -IPMS จาก mutated *leuA* gene

นำ recombinant plasmid จาก clone ซึ่งตรวจสอบแล้วว่ามิ insert ที่ถูกต้อง มาทำ transformation เข้าสู่โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) จากนั้นดำเนินการทำนองเดียวกับการผลิตเอนไซม์จากยีนปกติ โดยจะต้องทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำ protein expression ด้วย ได้แก่ ความเข้มข้นของ IPTG, เวลา และการหมุนเหวี่ยง เพื่อเพิ่มอากาศขณะสร้างเอนไซม์

4. การสกัดแยกและการเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์

4.1 การเตรียม crude extract

นำตะกอนเซลล์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ มาทำให้ละลายและทำให้เป็น suspension ใน sonication buffer โดยใช้อัตราส่วน sonication buffer 10 มล. : cell culture 300 มล. นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator โดยแบ่งเป็น aliquot ที่เหมาะสม จากนั้นปั่นเก็บส่วนใสด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10000 g เป็นเวลา 20 นาที จะได้ crude extract เพื่อใช้ในการแยกเอนไซม์บริสุทธิ์ต่อไป

4.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography (His-tagged protein purification system)

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ทำโดยใช้ TALON spin column (CLONTECH Laboratories) โดยนำตัวอย่างซึ่งเป็น crude extract 0.6-1 มล. ใส่ลงใน column ที่ไว้ประมาณ 30 วินาที จากนั้นผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วนำไปเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที นำไป centrifuge ที่ 700 g เป็นเวลา 2 นาที ที่ส่วนที่ออกจาก column จากนั้นทำการล้าง column 8-10 ครั้งด้วย washing buffer 1 มล. ก่อนการ elute ด้วย elution buffer 400-600 ไมโครลิตร

5. การตรวจหา enzyme activity

การหา enzyme activity เป็นแบบ end point assay โดยเป็นการตรวจหา coenzymeA จากปฏิกิริยาดังกล่าวโดยใช้ DTNB [5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)]

Assay mixture ประกอบด้วย

Tris-HCl buffer pH 8.5	50 ไมโครโมล
KCl	20 ไมโครโมล
acetylCoA	2 ไมโครโมล
α - ketoisovalerate	0.5 ไมโครโมล

การหา enzyme activity ทำโดยเติมตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงใน assay mixture ที่ได้ทำ prewarmed ไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้น incubate เป็นเวลา 2-10 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาดังกล่าวด้วย absolute ethanol 0.75 มล. แล้วเติมสารละลาย DTNB ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มล. นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร เทียบหา unit ของ enzyme activity โดยใช้กราฟมาตรฐานของ coenzymeA

6. การหาความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง

การหาความเข้มข้นของโปรตีนใช้วิธีของ Bradford (32) ในกรณีที่โปรตีนมีความเข้มข้นสูงจะใช้วิธี Lowry หรือ spectrophotometry ที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร

7. การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของ mutated α -IPMS กับ native α -IPMS

คุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ที่ศึกษามีวิธีการดังนี้

7.1 การหา molecular weight (MW)

7.1.1 การหา MW ของหน่วยย่อย (subunit) ของเอนไซม์ โดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การทำ SDS-PAGE ใช้ polyacrylamide ความเข้มข้น 10% ซึ่งมี SDS อยู่ด้วย 0.1% และใช้ stacking gel ความเข้มข้น 4 % ตามวิธีของ Laemmli (33) และ Weber and Osborn (34) ตัวอย่างจะถูก reduced ด้วย SDS และ dithiothreitol (DTT) ก่อนนำไปทำให้ denature ด้วยการต้ม 3 นาที ปริมาณโปรตีนที่ใช้ใส่ในแต่ละหลุมของเจลมีปริมาณประมาณ 300 ไมโครกรัม โดยมี Prestained Protein Marker (Biolab) เป็นโปรตีนอ้างอิง

7.1.2 การหา MW ของเอนไซม์ โดยวิธี non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (ND-PAGE)

ND-PAGE ใช้ช่วยวิเคราะห์เอนไซม์ในการประมาณจำนวนหน่วยย่อยของเอนไซม์และการประมาณค่า MW ของเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติ

7.2 การหาค่า optimum temperature สำหรับการทำงานของเอนไซม์

ค่า optimum temperature หาโดยการหาค่า enzyme activity ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 4°C, 20°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C, และ 60°C

7.3 การหาค่า optimum pH สำหรับการทำงานของเอนไซม์

ค่า optimum pH หาโดยการหาค่า enzyme activity ที่ pH ต่างๆ คือ pH 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9

7.4 การศึกษา pH stability ของเอนไซม์

pH stability ศึกษาโดยการหาค่า enzyme activity หลังจากเก็บไว้ที่ pH ต่างๆ (pH 4, 7.5 และ 8.5) เป็นระยะเวลาต่างกัน ได้แก่ 1 ชม., 3 ชม., 6 ชม., 12 ชม., และ 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 0°C

7.5 การหาโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์

การศึกษาในส่วนนี้ อาศัยห้องปฏิบัติการเฉพาะ ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยในโครงการนี้มีผลการศึกษาดังต่อไปนี้

1. การสร้าง recombinant plasmid ที่มี mutated *leuA* gene

1.1. การเตรียม fragment ของ mutated gene

1.1.1 Primers

จากข้อมูล *leuA* gene sequence ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv ได้ทำการออกแบบ Primers จำนวน 3 คู่ สำหรับใช้ในการสร้าง mutated *leuA* gene โดยเทคนิค PCR โดย Primer คู่ที่ 1 และ 2 ใช้ในการเพิ่มจำนวนส่วนของ *leuA* gene ที่อยู่หน้าและหลัง repeated sequence ตามลำดับ คู่ที่ 3 ใช้ในการเพิ่มจำนวน mutated gene ซึ่งได้จากการนำ fragment ทั้ง 2 ส่วนมาต่อกัน แล้วใช้เป็น template

leu4 : 5' GGAATTCCATATGACAACTTCTGAATCGCCC 3'

leu6 : 5' CGCGGATCCCTAGCGTGCCGCCCGGTTGAC 3'

lmutA : 5' CCGTGACGAGTAAGACGG 3'

lmutB : 5' TACTCGTCACGGAGGCCTCCACATACGCGG 3'

ตารางที่ 1 รายละเอียด Primers ที่ใช้ในการวิจัย

Primer Pairs	ส่วนที่ amplify	ความยาว PCR product
คู่ที่ 1 (<i>leu4</i> - lmutB) : 31/30 mers	ส่วนหน้า repeated sequence ของ <i>leuA</i>	1726 bp
คู่ที่ 2 (lmutA- <i>leu6</i>) : 18/30 mers	ส่วนหลัง repeated sequence ของ <i>leuA</i>	110 bp
คู่ที่ 3 (<i>leu4</i> - <i>leu6</i>) : 31/30 mers	mutated <i>leuA</i>	1836 bp

1.1.2 การเพิ่มจำนวนส่วนของยีน *leuA*

นำ Primers คู่ที่ 1 และ คู่ที่ 2 มาใช้ในการเพิ่มจำนวน ส่วนหน้าและส่วนหลังของ repeated sequence ตามลำดับ DNA fragment ซึ่งมี *leuA* gene ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv อยู่ในรูป plasmid pBB 4.2 (รูปที่3) ทำการเพิ่มจำนวนส่วนของ *leuA* โดยใช้ reaction mixture 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

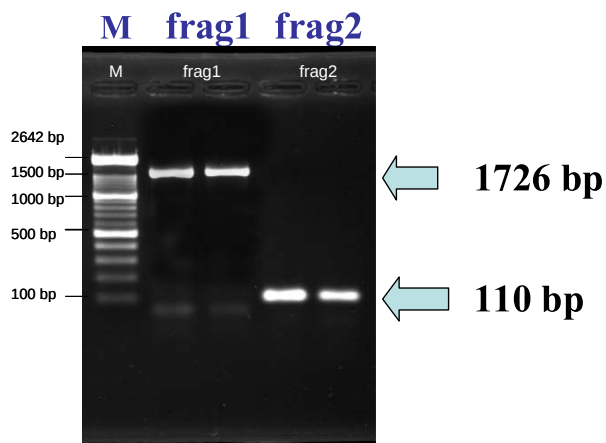
10 X PCR buffer	5 ไมโครลิตร
MgCl ₂	1.25 มิลลิโมลาร์
dNTP (each)	200 ไมโครโมลาร์
primer (each)	1.0 ไมโครโมลาร์
Vent Polymerase	0.4 ยูนิต
DNA template	100 นาโนกรัม

จากการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีนแต่ละส่วน และ mutated gene แสดงผลที่ได้ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 4

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน และ mutated gene

Primer	สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนส่วนของยีน				
	MgCl ₂ มิลลิโมลาร์	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles
คู่ที่ 1 (<i>leu4</i> - <i>lmutB</i>)	1.25	95°ซ, 1 นาที	64°ซ, 3 นาที	72°ซ, 1.45 นาที	35
คู่ที่ 2 (<i>lmutA</i> - <i>leu6</i>)	1.25	95°ซ, 1 นาที	61°ซ, 3 นาที	72°ซ, 1.45 นาที	35
คู่ที่ 3 (<i>leu4</i> - <i>leu6</i>)	1.25	95°ซ, 1 นาที	64°ซ, 3 นาที	72°ซ, 1.45 นาที	35

Preparation of mutated *leuA* gene by mutagenic PCR procedure



Amplification of gene fragment and preparation of mutated gene

รูปที่ 4 แสดง PCR Product ของการเพิ่มจำนวนส่วนของยีนที่อยู่หน้า repeated sequence หลัง repeated sequence

1.2 การเชื่อมต่อ mutated gene เข้ากับเวกเตอร์และการคัดเลือก clone ที่มี recombinant plasmid ที่ต้องการ

นำ PCR product ของ mutated *leuA* gene มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *BamHI* จากนั้นนำมาผ่าน gel electrophoresis สกัดจาก gel แล้วเชื่อมต่อกับ pET15b expression vector ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เดียวกัน จากนั้น transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งเตรียมเป็น competent cells จากนั้นเพาะเลี้ยงบน L agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล.

การคัดเลือก clone ที่ต้องการมี 2 วิธี คือ restriction analysis และ PCR amplification of colony lysate

รูปที่ 5 แสดง PCR amplification ของ mutated *leuA* insert จาก colony extract ของ positive clone เมื่อเทียบกับ product จาก template ที่มียืนปกติ

recombinant plasmid carrying mutated gene



selection of positive clone by PCR

รูปที่ 5 PCR amplification ของ mutated *leuA* insert จาก colony extract ของ positive clone เมื่อเทียบกับ control

2. การเตรียมเอนไซม์ α -IPMS จากยีน *leuA* ปกติและยีนที่เป็น mutated *leuA* gene

2.1 การเตรียม α -IPMS จากยีนปกติ

ทำการเพาะเลี้ยง recombinant clone ที่มี recombinant plasmid ซึ่งมียีน *leuA* ปกติ (pLEU151) อยู่ในโฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ใน LB broth ที่มียา ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. ขวดละ 400 มล. จำนวน 3 ขวด ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งเชื้อเจริญดีและมีค่า OD₆₀₀ อยู่ในช่วง 0.4-0.6 จึงเติมสารละลาย IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นบ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 ชม. จึงปั่นเก็บตะกอนเซลล์และล้างบัณฑิกล้างน้ำหนักเซลล์เปียก

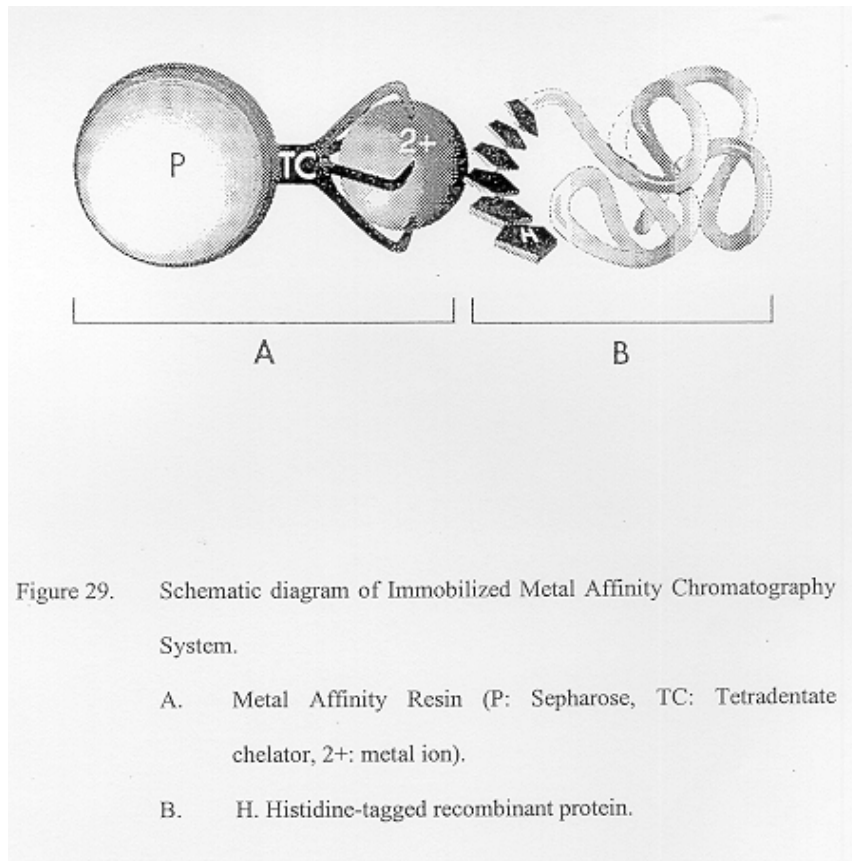
ตารางที่ 3 แสดงค่า OD₆₀₀ และน้ำหนักของเซลล์ที่เตรียมสำหรับการใช้ในการสกัดแยกเอนไซม์ α -IPMS จากยีนปกติ

ตารางที่ 3 ค่า OD₆₀₀ และน้ำหนักเซลล์เปียกที่ได้จากการเพาะเชื้อ (ขวดละ 400 มล.) เพื่อเตรียม α -IPMS

ขวดเลี้ยงเชื้อ	OD ₆₀₀	น้ำหนักเซลล์เปียก (กรัม)
1	0.562	2.0923
2	0.564	2.2122
3	0.552	2.0945

นำตะกอนเซลล์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C มาเตรียม crude extract ตามวิธีที่กล่าวแล้วข้างต้นและเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค affinity column chromatography ตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ที่ได้ ได้แก่ ความเข้มข้นของโปรตีน SDS-PAGE และตรวจดู enzyme activity

ผลการทำ SDS-PAGE ของ crude extract และ purified α -IPMS ที่ผลิตจากการทำ protein expression ของ *leuA* gene ปกติพบว่าเอนไซม์ α -IPMS จาก SDS-PAGE มีขนาดของ subunit ประมาณ 80 kDa



รูปที่ 6 แผนภาพแสดงการทำแอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography โดยใช้ Immobilized Metal Affinity Chromatography System

A : Metal Affinity Rasin (P: Sephadex, TC: Tetradsentate chelator, 2+: metal ion)

B : H : Histidine - tagged recombinant protein

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

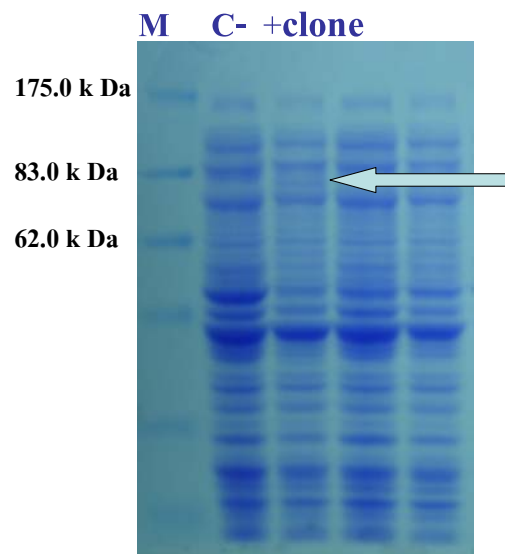
Chromatography

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. **25⁰ C**

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

2.2.2 Enzyme activity และผลการทำเอนไซม์บริสุทธิ์

การทำ 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 การปรับหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต α -IPMS จาก mutated *leuA*

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

โปรตีนในแผ่นจริง

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 % และตรวจดูผลโดยย้อมเจลดด้วย 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 -IMPS มีค่า MW ประมาณ 160 kDa และ native form ของเอนไซม์ประกอบไปด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อย activity ของเอนไซม์บน Non-denaturing Polyacrylamide gel แสดงในรูปที่ 9

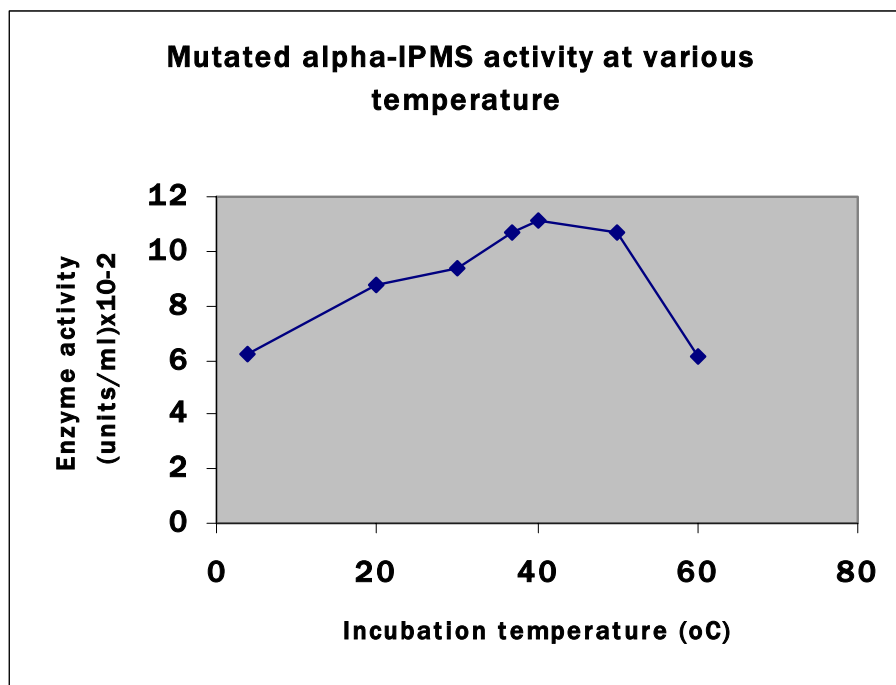
โปรตีนรูปในเล่มจริง

รูปที่ 9 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

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

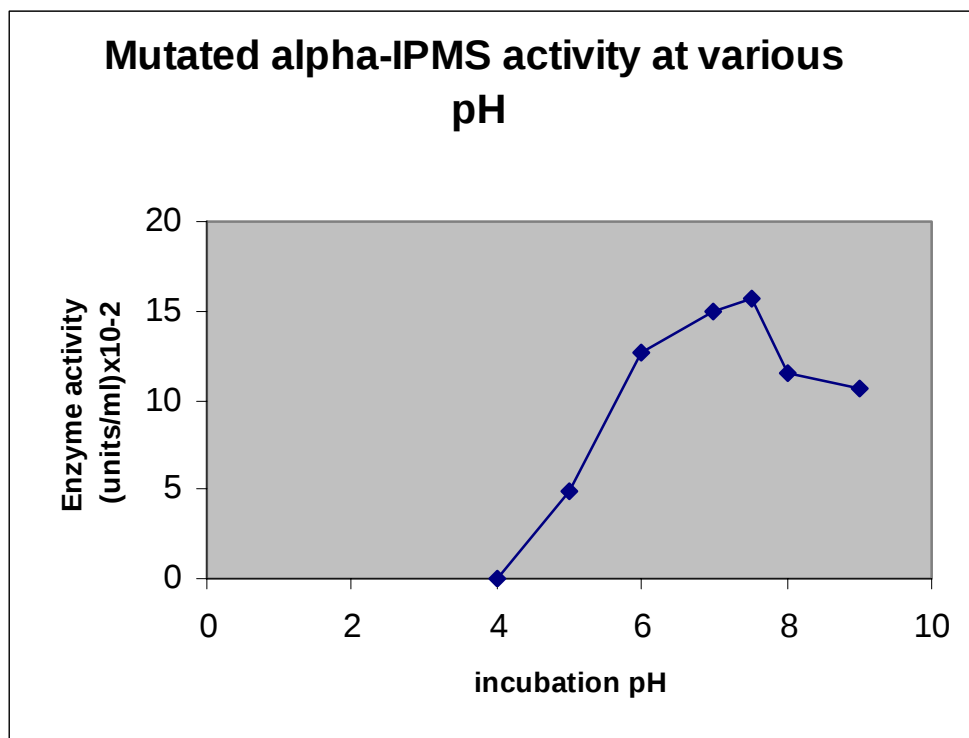


รูปที่ 10 ค่า enzyme activity ของ mutated α -IPMS เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 4°C, 20°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C และ 60°C

3.3 ค่า optimum pH ของการทำงานของเอนไซม์

ค่า optimum pH ของการทำงานของ mutated α -IPMS ศึกษาโดยการหาค่า enzyme activity ที่ pH ต่าง ๆ ได้แก่ pH 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9

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



รูปที่ 11 ค่า enzyme activity ของ mutated α -IPMS เมื่อทดสอบที่ pH ต่างกัน ได้แก่ pH 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9

11 cont

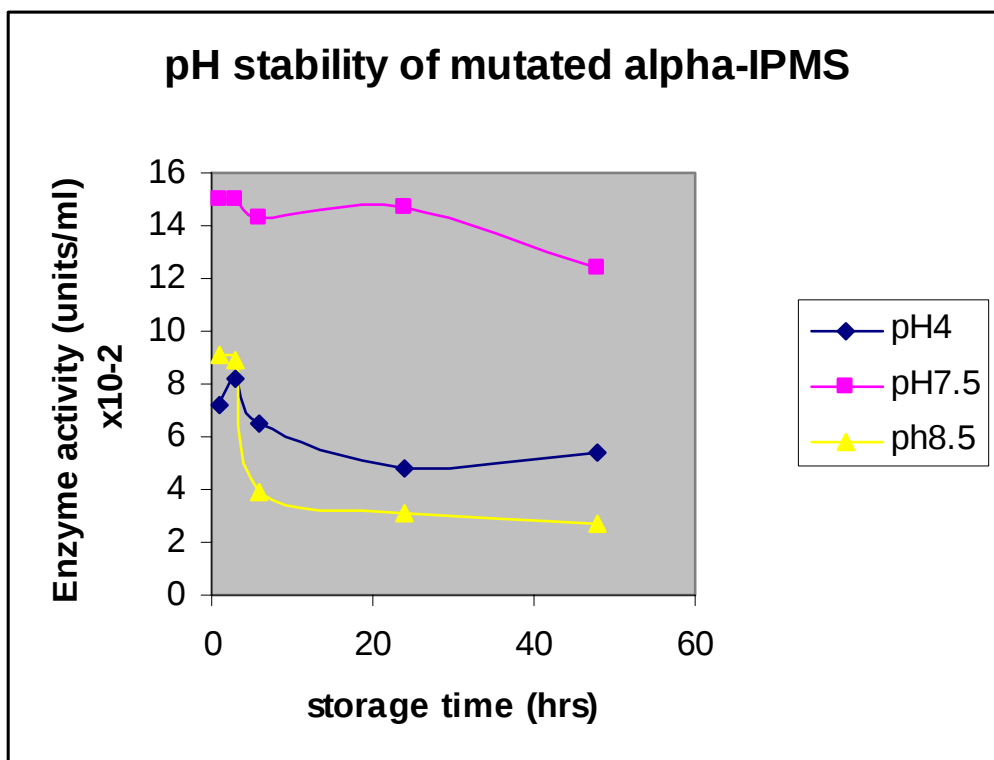
โปรดดูรูปในเล่มจริง

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

ผลการศึกษาพบว่า ที่ 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

12 cont

โปรดดูรูปในเล่มจริง

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) โรควัณโรคยังคงเป็นปัญหาของประชากรโลก โดยที่ 98 % ของรายที่เสียชีวิตจะอยู่ในประเทศกำลังพัฒนา (37) โดยรวมแล้วมีผู้เสียชีวิตเนื่องจากเชื้อมีประมาณ 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 ใหม่ๆ 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 DNAประเภทหนึ่งที่พบได้ในเชื้อ *M. tuberculosis* ต่อมาพบว่ามีความ 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 ไม่น่ากว่า 200-300 regions (44, 45)

VNTR ใน *M. tuberculosis* มีผู้ศึกษาและรายงานไว้เป็นจำนวนมาก และได้ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในการทำ strain characterization และการศึกษาในแง่ molecular epidemiology (7-15) ได้มีผู้รายงานว่า VNTR typing เป็นเทคนิคสำคัญที่มีศักยภาพในการถูกพัฒนาต่อไปเพื่อใช้ติดตามและจัดการกับการแพร่กระจายของโรควัณโรคอีกด้วย (46, 47) ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์แบคทีเรียก่อโรคได้อย่างถูกต้องถึงระดับสายพันธุ์เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาระบาดวิทยา (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) จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้เป็นที่น่าสนใจในการเริ่มต้นศึกษาถึงบทบาทและความสำคัญของ 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) ซึ่งอาจช่วยให้เชื้อสามารถหลบหลีกจากกลไกการต่อต้านของเชื้อและยังสามารถปรับตัวให้เข้ากับ microenvironment ของโฮสต์ได้ (50, 51, 52, 53) มีการศึกษามากมายที่ชี้แนะว่า Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRUs) และ interspersed repetitive sequence อื่นๆ 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 เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่เกิด VNTR ขึ้น (56) นอกเหนือจาก homologous recombination ซึ่งเป็นกลไกหลักแล้ว (7)

เหล่านี้เป็นข้อมูลที่น่าสนับสนุนว่าการพบ 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* ที่ได้ตัดส่วนของ 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 และคณะได้รายงานไว้ว่า 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, Shopsin 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, Locht 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, Locht 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, Locht 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, NH₂ 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 tendem 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. Kashi 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, Cagant 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