

M. bovis BCG overexpressing *M. tuberculosis desA3* and converted to the methyl esters (8). Methyl esters (0.5 mg) were dissolved in 50 μ l of a pyridine-dioxane mixture (1:8) followed by the addition of 500 μ g of OsO₄ in 50 μ l of dioxane (16). The solution was allowed to stand for 2 h at room temperature followed by another hour after the addition of 1.5 ml of a suspension of 16% Na₂SO₃ in water-methanol (1:3:4). The mixture was gradually acidified to pH 3.0 with HCl and extracted twice with *n*-hexane. The combined hexane extracts were dried under nitrogen and silylated as described above. The osmium-oxidized-silylated products were dissolved in *n*-hexane, and 1 μ l aliquots were analyzed by GC/MS (Thermo-Quest gas chromatogram and mass spectrometer) under the following operating conditions: 30 m by 0.25 mm capillary column (Supelco); the oven temperature was programmed from 60°C to 170°C at 30°C per 1-min and then from 170°C to 300°C at 4°C min⁻¹; the carrier gas was He; total running time was 32 min. The following fatty acid methyl esters, C18:1 Δ 6, C18:1 Δ 7, C18:1 Δ 9, C18:1 Δ 11, C18:1 Δ 12, C18:1 Δ 15, purchased from Supelco Inc. (Bellefonte, PA), were likewise oxidized and analyzed.

Cell-Free Reaction for Analysis of in vitro Effect of ISO on Oleic Acid Synthesis—The wild type *M. bovis* BCG strain was grown in Sauton medium supplemented with FeSO₄ (20 mg/L) (17) and 0.025% Tyloxapol. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in 0.25 M sucrose, pulse-disrupted by probe sonication, and centrifuged at 27,600 $\times$ g for 30 min at 4°C. The Δ 9 stearoyl-CoA desaturase activity was assayed as described with minor modifications (18) in a reaction mixture containing 1 μ mole NADPH (Sigma, St. Louis, MO) in 0.1 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), and 2 mg of the *M. bovis* BCG 27,000 $\times$ g supernatant in a total volume of 1 ml. Mixtures were preincubated in the presence or absence of ISO (dissolved in 20 μ l of a solution in 50% dimethylsulfoxide and 1% Tween 20) at 37°C for

20 min prior to the addition of 25 nmoles (0.25 μ Ci) of [14 C]stearoyl-CoA (10 μ Ci/ μ mol in 0.01 M 1:1 sodium acetate:ethanol; American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO). Purified recombinant six-histidine tagged protein (3.7 to 22 μ g) produced in *M. bovis* BCG (see below) was added to some assays. After further incubation at 37° for 30 min, reactions were terminated by the addition of 2 ml of tetrabutylammonium hydroxide solution, saponified and methylated. The radiolabeled products were resolved by argentation-TLC in petroleum ether:acetone (90:10, two developments) and the incorporation of radioactivity into oleic acid was analyzed using a Bioscan System 2000 Imaging Scanner (Bioscan Inc., Washington, D.C.).

Detection of M. tuberculosis desA3 Transcript—*M. tuberculosis* H37Rv was maintained in Sauton broth for RNA isolation and subsequent RT-PCR. After the addition of lysozyme and proteinase K to a cell suspension in RNase-free water, total RNA was isolated with Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Gibco BRL). The purified RNA was used subsequently in RT-PCR to detect *desA3* transcripts. Reverse transcription and PCR were carried out sequentially in a single tube using Ready-To-Go RT-PCR beads (Amersham Pharmacia). Each room-stable bead contained M-MuLV reverse transcriptase, RNase inhibitor, buffer, nucleotides, *Taq* DNA polymerase, and 30 μ l of RNA template in RNase free water. The RT-PCR reaction was conducted in a programmable master-gradient thermal machine (Eppendorf, Germany) using specific *desA3* primers, 5'GGT GAC CGA CTT AGC CAT ACG CTT 3' upper primer; 5'AGC ATC ACC TCT ATC CGG AC TGC C 3', lower primer. The thermal program involved reverse transcription at 55°C for 30 min, followed by the initial denaturation at 94°C for 5 min. The amplification was performed for 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing and extension at 72°C for 1 min. The final extension was set at 72°C for 10 min. Negative controls contained all reaction components except the RNA template,

To determine whether transcribed mRNA or contaminating DNA was amplified, purified nucleic acids were subjected to DNase and RNase treatment prior to cDNA synthesis and PCR. The amplicons obtained from RT-PCR were analyzed for the 341-bp fragment specific for *M. tuberculosis* *desA3* by 1.0% agarose gel electrophoresis (19) in Tris-borate-EDTA buffer (0.089 M Tris-HCl, pH 8.0), 0.044 M boric acid, and 0.001 M EDTA at 100 V for 1 h. Gels were stained with ethidium bromide and visualized by UV transillumination.

Cloning and Overexpression of the M. tuberculosis desA Gene Family in M. bovis BCG—

Two primers were designed to correspond to the 5' and 3' ends of each ORF previously identified as *M. tuberculosis* *desA1* and *desA2* (Rv0824c and Rv1094, respectively) (20). A 1,034-base pair fragment of *desA1* was PCR amplified with the primers,

5' CTCTGAATTCTCACCGGGCTAACGAC 3' and

5' CAGCCAAACTGACCGACCTGCA 3', sense and antisense, respectively. A similar strategy was used to amplify a 895-base pair fragment of *desA2* with the primers,

5' CACAAAACCTGTTGCTGAAGCCGCTGACCC 3' and

5' GCTAGAATTCTGAGTGCACGCTACTCCG 3'. Underlined sequences indicate the

introduced *EcoRI* restriction sites. The PCR-amplified *desA1* and *desA2* genes were gel purified, cut with *EcoRI* and cloned into *BalI-EcoRI* sites of pMV261 under the control of the transcriptional and translational signals of the heat shock protein 60 (*hsp60*) promoter (21). The *desA3*, Rv3329c, was overexpressed in pVV16, a derivative of pMV261, allowing the production of C-terminal six-histidine tagged fusion proteins under the control of the *phsp60* promoter (22). The *desA3* gene was amplified using the primers,

5' GTCGAGCAAAAGCTTGGCTGCCAGATCGTC 3' and

5' AGGGAGAAGCATATGCGGATCACTGACGTC 3' (underlined sequences correspond to

HindIII and *NdeI* restriction sites, respectively). The 1,360-base pair PCR product was digested with *NdeI* and *HindIII* and cloned into the similarly digested pVV16. The resulting expression vectors, pMV261desA1, pMV261desA2 and pVV16desA3, were electroporated into *M. bovis* BCG competent cells as described (23) and the production of recombinant DesA1, DesA2 and DesA3 proteins was then analyzed by immunoblotting (DesA1 and DesA2) or SDS-PAGE stained with silver nitrate and Coomassie Brilliant Blue (DesA3). Total protein extracts from each strain were loaded, separated on 0.1% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose (Schleicher & Schnell, Keene, NH). The production of recombinant DesA1 and 6-histidine tagged DesA3 proteins was revealed using primary anti-DesA1 antibodies raised in a mouse (a gift from Dr. Brigitte Gicquel) and primary mouse anti-His-tagged antibody (Qiagen, Valencia, CA), respectively. Alkaline phosphatase-conjugated secondary mouse antibodies (Sigma) were then used and color detection for proteins was performed using nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Promega, Madison, WI). To locate DesA3 within the bacterial cell, Western blotting was performed using subcellular fractions prepared from the DesA3-His tagged recombinant strain. The cytosol was recovered as the supernatant after centrifugation of cell lysate at 200,000 x g for 1 h, and the pellet represented the cell membrane fraction. Aliquots (100 µg) of protein from each fraction were analyzed by immunoblotting as described above. Alignment of amino acid sequences was achieved with Multalign (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>).

Purification of Recombinant His-tagged *M. tuberculosis* DesA3—The recombinant *M. bovis* BCG containing pVV16/desA3 were grown to mid-log phase (A_{600} 0.7) at 37° C in Sauton medium containing 20 µg/ml kanamycin and FeSO₄ 20 mg/L. Cells were harvested and washed once in 50 mM MOPS buffer pH 8. Cell pellet (20 g wet weight) was subsequently

resuspended in 30 ml of buffer A (50 mM MOPS pH 8, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol, and 500 mM NaCl) and sonicated for 10 cycles (60 sec on; 90 sec off) on ice. After the cell lysate was centrifuged at 27,000 g for 30 min, the resulting supernatant was collected and loaded onto a 1 ml metal BD-TalonTM resin chelating column (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) previously equilibrated with 20 ml of buffer A. Column washing was performed with 25 ml of buffer A followed by 25 ml buffer A containing 5 mM imidazole. Proteins were eluted using linear gradients of buffer A containing 50 mM, 100 mM and 200 mM imidazole. The elution fractions were checked by SDS-PAGE (12% gel) and Western blot. The 200 mM imidazole fraction, which contained His-tagged *M. tuberculosis* DesA3 was subsequently adjusted to a volume of 2.5 ml with buffer B (10 mM MOPS pH 8, 1 mM MgCl₂, 10% glycerol), desalted using a PD-10 column (Amersham Biosciences), concentrated and the protein concentration measured prior to the determination of the enzymatic function of the purified protein.

Determination of the Effect of Overexpression of desA3 on MIC of ISO—The microplate alamar blue assay as modified from Yajko *et al.* (24) was used to determine the MIC of ISO. Inocula were prepared from *M. bovis* BCG and the recombinant strain harboring the pVV16desA3 construct. Cells were grown in Sauton medium containing 0.025% Tyloxapol to a turbidity equal to that of a No. 1 McFarland standard ($\sim 2.0 \times 10^7$ CFU/ml). Serial dilutions of ISO from a stock solution in DMSO were prepared in Sauton medium. Duplicated treatments with different concentrations of ISO were conducted. Four controls were included which contained medium only, culture only, medium plus DMSO, and culture plus DMSO. At the outset, 10 x alamar blue solution was added to the controls. After incubation overnight at 37°C in a moisture control chamber, alamar blue was added to all treated wells. Plates were further incubated, and the color in each treated culture was recorded. MIC was determined as the lowest

concentration of ISO for which the blue dye in the treated culture did not turn pink.

RESULTS

ISO Inhibits the Synthesis of Unsaturated Fatty Acids and Mycolic Acids—Previous studies with [1,2-¹⁴C]acetate as a precursor of fatty acid synthesis showed that ISO inhibited the synthesis of both mycolic acids and shorter chain-fatty acids in *M. tuberculosis* (8). In this latter respect, ISO differed from INH and ETH, suggesting a different mode of action of ISO. To evaluate the effects of ISO on the synthesis of saturated fatty acids, unsaturated fatty acids, and mycolic acids, extracts containing [¹⁴C]labeled fatty acid and mycolic acid methyl esters were prepared from untreated and ISO-treated *M. tuberculosis* cultures and analyzed by argentation-TLC. In the presence of ISO at concentrations as low as 1 µg/ml, there was an apparent decided decrease in the synthesis of unsaturated fatty acids concomitant with a partial increase in the synthesis of saturated fatty acids (Fig. 2). Measurement of the radioactive counts in the relevant bands established that ISO at 1.0 µg/ml inhibited unsaturated fatty acid synthesis by 60%. The effect of ISO on mycolic acid synthesis, reported previously (8), can also be seen by this simple analysis; clearly, ISO inhibited the incorporation of [1,2-¹⁴C]acetate into all types of resolved mycolic acids (Fig. 2).

The cellular fatty acids synthesized under present conditions by *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG are palmitic acid, stearic acid, oleic acid, and tuberculostearic acid (Fig. 3 A and C), in accord with earlier reports (25, 26). In *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG treated with ISO at 2.0 µg/ml, the incorporation of [1,2-¹⁴C]acetate into oleic acid and tuberculostearic acid was almost totally eliminated as determined by radio-GC (Fig. 3 B and D). Similar results were obtained at 1 µg/ml of ISO.

The Effects of Oleic Acid Supplement on Partial Rescue of M. tuberculosis from ISO

The observations that ISO inhibited oleic acid synthesis in *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG led to the concept that supplementation of the growth medium with oleic acid should rescue cells

from the killing effect of ISO. The addition of oleic acid to the 7H11 agar medium in the form of the oleic acid-albumin-dextrose complex (OADC) partially reversed the bactericidal effect of ISO; there was comparable growth on the OADC-supplemented medium with or without ISO; however, the albumin-dextrose complex without oleic acid could not support growth in the presence of ISO (Fig. 4).

Demonstration of $\Delta 9$ Desaturase Activity in Cell-Free Extracts and the Effects of ISO

The specific inhibition of oleic acid synthesis by ISO suggested that the drug target is the aerobic desaturation system responsible for the synthesis of oleic acid from stearoyl-CoA in mycobacteria (17, 18, 27, 28). To test this hypothesis, *M. bovis* BCG was grown in Fe-supplemented medium, sonicated, centrifuged at low speed, and both cell wall pellet and the supernatant containing both cytosol and plasma membrane were assayed for $\Delta 9$ fatty acid desaturase activity. The assay was performed as originally described by Fulco and Bloch (18) with minor modifications. For instance, ferrous ions were added to the culture medium rather than to the reaction mixture itself because iron was shown to be required at the terminal stage of synthesis and/or assembly of the desaturase system (17). Only the supernatant allowed the conversion of stearoyl-CoA to the oleic acid derivative in the presence of atmospheric oxygen and NADPH. Consistent with the findings of Fulco and Bloch (18), in the absence of NADPH in the assay mixture, no oleic acid was detected. ISO consistently inhibited the incorporation of radioactivity into the oleic acid, but not into stearic acid, by 7% at 0.1 $\mu\text{g/ml}$ and 61% at a concentration of 1.0 μg of ISO/ml in one typical experiment.

*Overexpression of *M. tuberculosis* *desA1*, *desA2*, and *desA3* genes in *M. bovis* BCG and evidence that *desA3* encodes a fatty acid desaturase*—Three ORFs in the genome of *M. tuberculosis* are annotated as putative fatty acid desaturases: *desA1*, *desA2*, and *desA3* (20). All three ORFs of *desA* were amplified by PCR, cloned in-frame into the mycobacterial expression vector pMV261 or pVV16, and constitutively expressed under the control of the *hsp60* promoter in *M. bovis* BCG. Production of all three proteins was demonstrated by SDS-PAGE and staining

with silver and Coomassie Brilliant Blue (Des A2) or by immunoblotting (DesA1, DesA2) (results not shown). To assess the cloned ORFs for $\Delta 9$ desaturase activity, the three overexpression strains and *M. bovis* BCG wild-type were labelled with [1,2- 14 C]acetate and their derived fatty acid methyl esters were analyzed by argentation-TLC. Quantitation of the production of [14 C]oleic acid was performed by scraping and counting the bands corresponding to the methyl ester of oleate. The *desA1*- and *desA2*-overexpression strains synthesized oleic acid approximately 0.2-fold less than the *M. bovis* BCG wild type in contrast to a 2-fold increase in oleic acid production by *M. bovis* BCG overexpressing the *desA3* gene, suggesting that the putative acyl CoA desaturase gene *desA3*, but not the putative acyl-ACP desaturase genes *desA1* or *desA2*, encodes the $\Delta 9$ desaturase responsible for the synthesis of oleic acid. Analysis of the radiolabeled fatty acid methyl esters by radio-GC confirmed this conclusion (Fig. 5). Consistent with these results, comparison over time of the $\Delta 9$ desaturase activity exhibited by cell-free extracts of *M. bovis* BCG wild type and the *M. bovis* BCG/pVV16*desA3* clone over time showed almost 50% increase in enzyme activity in the latter strain at the longer incubation periods (Fig. 6).

That the C18 unsaturated product formed in the cell-free assays corresponded to oleic acid (C₁₈:1 $\Delta 9$) was checked by subjecting the methyl esters recovered from cold *in vitro* assays to OsO₄ oxidation, trimethylsilylation, and GC-MS analysis (16). The characteristics of the EI-MS spectrum of C₁₈:1 $\Delta 6$ is a major fragment at *m/z* 257 and minor fragments at *m/z* 217 and *m/z* 185. However, C₁₈:1 $\Delta 9$ yields typical fragments at *m/z* 259 and *m/z* 217. Using this approach, the sole unsaturated C18 product identified in *M. bovis* BCG and *M. bovis* BCG/pVV16*desA3* reaction mixtures was C₁₈:1 $\Delta 9$. Likewise, the sole product identified in whole cells of wild-type *M. bovis* BCG and *M. bovis* BCG/pVV16*desA3* was C₁₈:1 $\Delta 9$ (data not shown).

Because the overexpression of *desA3* in whole BCG cells could have indirectly stimulated the production of oleic acid, recombinant DesA3 purification was achieved (Fig. 7A).

Although the purified enzyme itself showed no activity in the desaturase assay, presumably due to missing cofactors or components of the desaturase system (e.g., cytochrome c reductase or ferredoxin, flavoprotein) (18, 28), addition of the purified enzyme to the standard $\Delta 9$ cell-free assay resulted in an approximate two-fold increase in specific activity of the enzyme (Fig. 7B). The enzyme activity was dependent on the amount of recombinant DesA3 added to the assay mixture (results not shown) and the incubation time (Fig. 7B). These results confirmed the function of the DesA3 desaturase as responsible for the synthesis of oleic acid. Finally, a *desA3* transcript was detected by RT-PCR in *M. tuberculosis* H37Rv during the exponential growth (data not shown), confirming the expression of this gene *in vivo* and emphasizing the importance of the enzymatic product and function.

Overexpression of the M. tuberculosis desA3 Increased the Resistance of M. bovis BCG to ISO – The MIC of ISO against the parent *M. bovis* BCG as determined by the microplate alamar blue assay, was 3.0 $\mu\text{g/ml}$ compared to 6.0 $\mu\text{g/ml}$ for the *M. bovis* BCG/pVV*desA3* overexpression strain. Thus the terminal enzyme of the $\Delta 9$ desaturation system encoded by *desA3* is very likely to be the target of the drug.

Comparative Effects of ISO and the Known $\Delta 9$ Desaturase Inhibitor, Sterculic Acid – The naturally occurring cyclopropene fatty acid, sterculic acid (9,10 cyclopropenoid), is a potent and specific inhibitor of the $\Delta 9$ desaturation of stearic to oleic acid (29-32) and therefore provided a useful means to compare the effects of ISO to those of an established inhibitor of acyl-CoA $\Delta 9$ desaturase. The effect of sterculic acid on the growth of *M. bovis* BCG was determined by the broth dilution technique (8) at concentrations of 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$. Consistent with the fact that oleic acid is synthesized by a stearyl-CoA utilizing $\Delta 9$ desaturase in mycobacteria, *M. bovis* BCG was found to be sensitive to sterculic acid. Sterculic acid at 50 $\mu\text{g/ml}$ was sufficient to inhibit the growth of the cells by about 80%, and complete inhibition of approximately 1.0×10^5 CFU/ml was obtained at a concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$. Under present growth conditions employing the broth dilution technique, sterculic acid had a MIC value between 50 and

100 µg/ml. The inhibitory effect of sterculic acid on the Δ^9 desaturase activity was also evaluated in intact cells of *M. bovis* BCG by measuring the incorporation of [1,2- 14 C]acetate into oleic acid and analyzing the extractable lipids by radio-GC. At 50 µg/ml, there was complete inhibition of the synthesis of oleic acid (Fig. 8), and the effects of ISO and sterculic acids on oleic acid synthesis were similar in this respect. However, at this concentration, sterculic acid, unlike ISO, had no effect on mycolic acid synthesis, whereas, under these conditions, 1 µg ISO/ml resulted in inhibition of synthesis of α - and ketomycolates by 64% and 27%, respectively (results not shown). This comparison of the effects of ISO and sterculic acid leads to the conclusion that the production of oleic acid and mycolic acids is not linked, a conclusion reinforced by the fact that sterculic acid, unlike ISO, does not result in the accumulation of long-chain fatty acids (C24:0 to C26:0) (Fig. 8). This latter phenomenon is also seen under conditions of INH treatment (10), suggesting that long-chain fatty acid accumulation is a consequence of the inhibition of mycolic acid synthesis and provides further proof that the effects of ISO on mycolic acids are distinct from those on oleic acid synthesis.

DISCUSSION

Previous observations demonstrated that ISO inhibits the synthesis of both mycolic acids and shorter chain fatty acids (8-10). In contrast, both INH and ETH inhibit mycolic acid synthesis (10, 11) and result in the accumulation of fatty acids (10). Cross-resistance between ISO and ETH suggests that these two drugs share a common step in their action, and a recent genetic and chemical study revealed that cross-resistance to ISO and ETH is associated with the activation of the thiocarbonyl moiety (Fig. 1) shared by these two drugs (33, 34). The product of the resistance-conferring gene was identified as a putative regulator controlling the expression of a flavin-containing monooxygenase that catalyzes the S-oxidation of the thiocarbonyl to S-oxide electrophilic intermediates (34, 35).

The present work serves to characterize the site of action of this activated form of ISO. Following on the earlier observation of an inhibition of short-chain fatty acids, efforts were focused in this area of metabolism, resulting in the conclusion that ISO is unique in its ability to inhibit the synthesis of oleic acid and tuberculostearic acid (Fig. 2 and Fig. 3). Oleic acid is the most abundant unsaturated fatty acid in *Mycobacterium* spp. (36) and is a vital constituent of mycobacterial membrane phospholipids (37, 38), where it apparently plays an essential role in membrane physiology (39). At physiological temperatures, phospholipids containing only saturated fatty acids cannot form a lipid bilayer, but the introduction of appropriate unsaturated fatty acids decreases the transition temperature from gel to the liquid crystalline phases and provides membranes with the necessary fluidity for physiological function (40-43). The vital functions of oleic acid lead to the conclusion that inhibition of its synthesis results in cell death, and thus the enzymes involved in oleic acid synthesis are probably lethal targets for drug therapy.

ISO also had a dramatic effect on the synthesis of the C10-mono-methyl-branched stearic acid, tuberculostearic acid. Typically, mycobacteria contain a large amount of methyl-branched

fatty acids (44, 45), mainly tuberculostearic acid and multi-methyl branched acids such as phthienoic (2,4,6 trimethyltetracos- Δ 2-enoic acid) (46, 47) and mycocerosic (2,4,6,8-tetramethyloctacosanoic) acids (48). The mycocerosic acids are confined to the phthiocerol-containing cell wall lipids and, although apparently implicated in the pathogenesis of *M. tuberculosis* and *M. bovis* (49, 50), are not essential for viability. However, tuberculostearic acid is a key ingredient of membrane phospholipids. It appears likely that the inhibition of tuberculostearic acid by ISO is a consequence of its effect on oleic acid synthesis, since tuberculostearic acid arises by direct methylation of oleic acid by S-adenosylmethionine once oleic acid is first esterified in the form of oleyl-phosphatidylethanolamine (51, 52). The indirect effect of ISO on tuberculostearic acid probably also extends to the synthesis of the phosphatidylinositol mannosides and eventually lipomannan and lipoarabinomannan, since tuberculostearic acid is a major constituent of all of the mycobacterial phosphoinositides (53).

This evidence suggested at once that ISO acts by inhibiting stearoyl-desaturase, the enzyme responsible for the insertion of the double bond at carbon 9 of stearic acid. The existence of such a desaturation system catalyzing the formation of oleic acid in mycobacteria has actually been demonstrated using *Mycobacterium phlei* as a model strain and shown to involve a particulate terminal desaturase enzyme that desaturates stearyl-CoA to form octadec-9-enoic acid (oleic acid) in the presence of NADPH as the reducing agent, NADPH-cytochrome c reductase, iron for electron flow, and oxygen as the final acceptor (17, 18, 27, 28). A desaturase assay based on that described by Fulco and Bloch (18) and conducted with cell-free extracts of *M. bovis* BCG in the presence or absence of ISO clearly demonstrated the ISO inhibits Δ 9 desaturase activity *in vitro*. Furthermore, the Δ 9 desaturase of the present system appears to be encoded by the putative acyl-CoA desaturase gene, *desA3*, as overexpression of the *M. tuberculosis desA3* gene in *M. bovis* BCG, but not those of the other putative desaturase genes of the genome, *desA1* or *desA2*, resulted in increased synthesis of oleic acid and Δ 9 desaturase activity in the recombinant strain (Fig. 5 and Fig. 6). Our inability to associate Δ 9

desaturase activity with the purified DesA3 enzyme is not surprising in light of its membranous nature and complex cofactor requirements. Instead, we had to rely on demonstrating a boosting effect on the endogenous activity of the wild-type strain (Fig. 7). The overexpression of *desA3* in *M. bovis* BCG also resulted in increased MIC of ISO in BCG-pVV16*desA3* as compared to the parent strain strongly suggesting that the terminal desaturase enzyme of the desaturation system is the target of the drug. Incidentally, Obukowicz *et al.* (54) have shown that a urea-derived inhibitor with a structure not unlike that of ISO selectively inhibits the stepwise $\Delta 5$ desaturase synthesis of arachidonic acid in rat and offers promise as an anti-inflammatory agent. This work further underlines the role of urea-based products as inhibitors of membrane and CoA requiring desaturases.

Consistent with its demonstrated membrane localization and affinity for acyl-CoA substrates, DesA3 shares signature motifs of membrane acyl-lipid and acyl-CoA desaturases characterized by three regions of primary conserved sequences, $HX_{(1-2)}H$, $HX_{(3-5)}HH$, and $HX_{(7-9)}HH$, designated as region Ia, Ib and II (39, 55). However, the alignment of the conserved "membrane desaturase" regions of DesA3 with some representative membrane $\Delta 9$ acyl-CoA desaturases from rat, yeast, and mouse revealed certain distinctions of some variable amino acids. In region Ia, all representative $\Delta 9$ desaturases contain the sequence HX_2HL while *M. tuberculosis* DesA3 contains the sequence HX_2H . In region Ib, the representatives of the $\Delta 9$ desaturases contain the sequence HX_3HH , while *M. tuberculosis* DesA3 has HX_3HH . In region II, the same representative $\Delta 9$ desaturases have a second occurrence of HX_3HH , whereas DesA3 from *M. tuberculosis* has a second occurrence of HX_3HL (Fig. 9). In these respects, it is interesting that DesA3 shares closer sequence identity with the $\Delta 6$ acyl-lipid and acyl-CoA desaturases of cyanobacteria and higher plants than with $\Delta 9$ acyl-CoA and acyl-lipid desaturases of animals, yeasts, higher plants and cyanobacteria (39). The hydropathy analysis of the secondary structure of DesA3 provided further evidence that DesA3 contains up to three hydrophobic domains, sufficient to span the membrane bilayer several times. Also, computer-

assisted predictions (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPREDform.html>) suggest the presence of at least two transmembrane domains starting at positions 104 and 194, and the three His regions are within hydrophilic loops. All of the His motifs (AA 90 to 94; 125 to 130; and 301 to 308) are located in the hydrophilic regions of the primary sequences as is the case in all desaturases, suggesting that the catalytic site of DesA3 is located on the cytosolic face of the membrane (55). Altogether, the presence of His conserved motifs and transmembrane domains supports the conclusion that DesA3 is a membrane desaturase, a conclusion reinforced by Western blotting, demonstrating directly that DesA3 is localized in the bacterial membrane fraction (results not shown).

The use of steric acid proved to be invaluable in demonstrating the parallel between its action as a known inhibitor of oleic acid synthesis and that of ISO. Firstly, this comparison demonstrated that the inhibition of oleic acid synthesis is sufficient to kill *M. bovis* BCG, and thus that the enzymes involved in the synthesis of this fatty acid are indeed lethal targets in mycobacteria. Secondly, the use of steric acid demonstrated that there is likely no relationship between the two effects of ISO on oleic acid and mycolic acid synthesis, i.e., mycolic acid probably does not originate in oleic acid. Rather, the results raise the possibility that ISO exerts an additional effect, possibly on the specialized enzymes, dehydratases and desaturases, that provide precursors for mycolic acid synthesis (56). Although ISO inhibits the formation of both oleic acid and mycolic acids, the data from this study support the concept that its inhibition of the growth of mycobacteria results primarily from effects on oleic acid rather than mycolic acid synthesis. This conclusion is drawn primarily from the observation of the rescue of ISO-treated *M. tuberculosis* with oleic acid and the high MIC value of BCG expressing *desA3*. The mechanism by which ISO inhibits mycolic acid synthesis has yet to be determined, but clearly it is not merely an effect on oleic acid synthesis.

Acknowledgment—We thank Drs. J. T. Belisle, S. Mahapatra, and V. Vissa for scientific advice and discussion, and Mrs. Marilyn Hein for preparing the manuscript.

REFERENCES

1. World Health Organization. Strategic framework to decrease the burden of TB/HIV. Document WHO/CDS/TB/2002.296, WHO/HIV_AIDS/2002.2. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002.
2. Dye, C., Williams, B. G., Espinal, M. A., and Raviglione, M. C. (2002) *Science* **295**, 2042-2046.
3. Espinal, M. A. (2003) *Tuberculosis*, **83**, 44-51.
4. Tischer, R. (1966) *Praxis Pneumol.* **20**, 202-206.
5. Urbancik, B. (1966) *Tuberc. Edinb.* **47**, 283.
6. Urbancik, B. (1970) *Antibiot. Chemother.* **16**, 117-123.
7. Lamberlin, G. (1970) *Antibiot. Chemother.* **16**, 84-95.
8. Phetsuksiri, B., Bauland, A., Cooper, A. M., Mimmikin, D. E., Douglas, J. D., Besta, G. S., and Brennan, P. J. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1042-1051.
9. Winder, F. G., and Collins, P. B. (1970) *J. Gen. Microbiol.* **63**, 41-48.
10. Winder, F. G. (1982) in *The biology of mycobacteria* (Ratledge, C., Stanford, J., eds.), pp. 353-438, Academic Press, Inc., New York.
11. Winder, F. G., Collins, P. B., and Whelan, D. (1971) *J. Gen. Microbiol.* **66**, 379-380.
12. Sauton, B. (1912) *C.R. Acad. Sci.* **155**, 860-861.
13. Cohn, M. L., Waggoner, R. F., and McClatchy, J. K. (1968) *Am. Rev. Respir. Dis.* **98**, 295-296.
14. Morris, L. J. (1966) *J. Lipid Res.* **7**, 717-730.
15. Dunphy, P. J., Kerr, J. D., Pennock, J. F., Whittle, K. L., and Feeney, J. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **136**, 136-147.
16. Evans, J. E., and Dulaney, J. T. (1983) *Biochem. Biophys. Acta* **752**, 346-352.
17. Kashiwabara, Y., Nakagawa, H., Matsuki, G., and Sato, R. (1975) *J. Biol. Chem.* **78**, 803-810.

18. Fulco, A. J., and Bloch, K. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 993-997
19. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) in *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
20. Cole, S. T., Bloch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Kingmei, K., Gu, S., Barry, C. E. III, Tekoa, F., Baddock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krongh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skellion, J., Squares, S., Squires, R., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B. G. (1998) *Nature* **393**, 537-544
21. Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Henet, L. T., Bansal, P., Young, J. F., Lee, M. H., Harfull, G. F., Snapper, S. B., Barletta, R. G., Jacobs, W. R. Jr., and Bloom, B. R. (1991) *Nature* **351**, 456-460
22. Jackson, M., Crick, D. C., and Bretman, P. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30092-30099
23. Kremer, L., Baulard, A., Estanguier, J., Content, J., Caprin, A., and Loch, C. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 642-653
24. Yajko, D. M., Madej, J. J., Lancaster, M. V., Sanders, C. A., Cawthon, V. L., Gee, B., Bahit, A., and Hadley, W. K. (1995) *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2324-2327
25. Chou, S., Chedore, P., Haddad, A., Paul, N. R., and Kasatiya, S. (1996) *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1317-1320
26. Chou, S., Chedore, P., and Kasatiya, S. (1998) *J. Clin. Microbiol.* **36**, 577-579
27. Fulco, A. J., and Bloch, K. (1962) *Biochem. Biophys. Acta* **63**, 545-546
28. Kashiwabara, Y., and Sato, R. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 405-413
29. Johnson, A. R., Pearson, J. A., Shennstone, F. S., and Forger, A. C. (1967) *Nature* **214**, 1244-1245
30. Jeffcoat, R., and Pollard, M. R. (1977) *Lipids* **12**, 480-485

31. Quintana, J., Barrot, M., Fabrias, G., and Camps, F. (1998) *Tetrahedron* **54**, 10187-10198.
32. Andrianaivo-Rafehivola, A. A., Gaydou, E. M., and Rakotonivan, L. H. (1994) *Oleagineux* **49**, 177-188
33. Barry, C. E. III, Slayden, R. A., Sampson, A. E., and Lee, R. E. (2000) *Biochem. Pharmacol* **59**, 221-231
34. DeBarber, A. E., Mdluli, K., Bosman, M., Bekker, L.-G., and Barry, C. E., 3rd (2000) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**, 9677-9682
35. Baulard, A.R., Betts, J.C., Engohang-Ndong, J., Quan, S., McAdam, R. A., Brennan, P. J., Loch, C., and Besra, G. S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28326-28331
36. Ratledge, C. (1982) in *The biology of mycobacteria* (Ratledge, C., and Stunford, J., eds.), pp. 53-93, Academic Press, Inc., New York
37. Okuyama, H., Kankura, T., and Nojima, S. (1967) *J. Biochem., Tokyo* **61**, 732-737
38. Walker, R. W., Ratakat, H., and Hung, J. G. C. (1970) *Lipids* **5**, 684-691
39. Lo, D. A., and Murata, N. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1394**, 3-15
40. Stubbs, C. D., and Smith, A. D. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 89-137
41. Russell, N. J. (1984) *Trends Biochem. Sci.* **9**, 108-112
42. Hazel, J. R. (1995) *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 19-42
43. Houslay, M. D., and Gordon, L. M. (1984) *Curr. Top. Membr. Transp.* **18**, 179-231
44. Kameda, T. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 1229-1235
45. Campbell, L., and Niwal, J. (1969) *J. Lipid Res.* **10**, 593-598
46. Anderson, R. J. (1929) *J. Biol. Chem.* **83**, 169-175
47. Carson, J., and Sumrell, G. (1950) *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 4837-4838.
48. Ginger, I. G., and Anderson, R. J. (1945) *J. Biol. Chem.* **157**, 203-211.
49. Cox, J. S., Chen, B., McNeil, M., and Jacobs, Jr., W. R. (1999) *Nature* **402**, 79-83
50. Camacho, L. R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., and Guilhot, C. (1999) *Mol. Microbiol.* **34**, 257-267

51. Jennarz, W. J., Scheuerbrandt, G., and Bloch, K. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 664-671
52. Akamatsu, Y., and Law, J. H. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 701-708
53. Jesra, G. S., Morehouse, C. B., Rittner, C. M., Warchter, C. J., and Brennan, P. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 18460-18466
54. Obukowicz, M. G., Welsch, D. J., Salsgiver, W. J., Martin-Berger, C. L., Chinn K. S., Duffin, K. L., Raz, A., and Needleman, P. (1998) *J. Pharm. Exp. Therapen.* **287**, 157-166
55. Shanklin J., Whittle, E., and Fox, B. G. (1994) *Biochemistry* **33**, 12787-12794.
56. Barry, C. E., 3rd, Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A., and Yuan, Y. (1998) *Prog. Lipid Res.* **37**, 143-179

FOOTNOTES

¹The abbreviations used are: ISO, isoxyl; ETH, ethionamide; INH, isoniazid; FAME, fatty acid methyl ester; MAME, mycolic acid methyl ester; MIC, minimal inhibitory concentration; PBS, phosphate-buffered saline; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; OADC, oleic acid-albumin-dextrose complex; DMSO, dimethylsulfoxide.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Structure of the thiourea known as thiocarlide or isoxyl, a 4,4' diisoamyloxy diphenyl thiourea.

FIG. 2. Analysis of the effect of ISO on fatty acid and mycolic acid synthesis in *M. tuberculosis*. The inhibitory effect of ISO on the synthesis of fatty acids and mycolic acids was assayed by whole-cell labeling with [1,2-¹⁴C]acetate in the presence and absence of ISO. Labeled FAMES and MAMES were extracted from control and ISO-treated cultures and equal counts of radiolabel were applied to TLC plates, which had been impregnated with a 10% aqueous AgNO₃ solution. Autoradiograms were produced after the plate was developed twice in petroleum ether and acetone (90:10) and exposed to Kodax X-Omat AR film. Lane 1, untreated culture; Lane 2, culture treated with 1.0 µg/ml ISO; Lane 3, culture treated with 2.0 µg/ml ISO.

FIG. 3. Effects of ISO on *in vivo* synthesis of oleic acid and tuberculostearic acid in *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG. FAMES (and MAMES) of [1,2-¹⁴C]acetate-labelled *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG were prepared from untreated and ISO-treated cultures and equal counts were subjected to radio-GC coupled to the Lablogic GC-RAM radio-detector under conditions that resolve only the FAMES. A, untreated *M. tuberculosis* culture; B, ISO-treated (2.0 µg/ml) *M. tuberculosis* culture; C, untreated *M. bovis* BCG culture; D, ISO-treated (2.0 µg/ml) *M. bovis* BCG culture.

FIG. 4. Effects of an oleic acid supplement in reversing the bactericidal effect of ISO. A series of 10-fold dilutions of *M. tuberculosis* were prepared in medium. An aliquot (5 µl) of each dilution was spotted on 7H11 agar supplemented with OADC or ADC with or without ISO. A, 7H11 medium and OADC; B, 7H11 with OADC and ISO at 0.5 µg/ml; C, 7H11 medium

with ADC; D, 7H11 with ADC and ISO at 0.5 µg/ml.

FIG. 5. GC analysis of the effects of the overexpression of the *desA* genes on oleic acid synthesis. [^{14}C]-labeled FAMES and MAMES were extracted from *M. bovis* BCG wild-type and the *M. bovis* BCG/pVV16*desA3*. Equal counts of the mixtures of FAMES and MAMES from each strain were sited and applied to a Hewlett Packard HP 5890 GC equipped with a capillary HP-1 column and the Lablogic GC-RAM detector. Peaks were identified by comparing the retention times with those of FAME standards.

FIG. 6. Comparison of the levels of Δ^9 desaturase activity in *M. bovis* BCG wild type and *M. bovis* BCG/pVV16*desA3*. A final volume of 1 ml reaction mixture contained crude cell lysate of *M. bovis* BCG wild-type (diamonds) or BCG/pVV16*desA3* (squares), 20 µl of solution containing 50% DMSO and 1 % Tween20, 1 µmole NADPH in 0.1 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) and 25 nmole [$1\text{-}^{14}\text{C}$] 18:0-CoA as substrate. Duplicates of assay were performed. After the indicated incubation times, the reactions were stopped with 1ml of 15% tetrabutylammonium hydroxide. FAMES were extracted, methylated and analyzed for [^{14}C] C18:1 by argentation TLC and Bioscanner.

FIG. 7. Effect of adding purified DesA3 on endogenous Δ^9 desaturase activity.

A. SDS-PAGE and Western blot of the purified DesA3 enzyme. M, BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen). Lane 1, DesA3 eluted from a 1 ml metal BD-Talon™ resin

chelating column (BD Biosciences) with 50mM imidazole. Lane 2, DesA3 as eluted with 100mM imidazole. Lane 3, Pure DesA3 as eluted with 200mM imidazole. Other details and staining of the gel are described in *Experimental Procedures*. B. DesA3 purified protein was added to the enzymatic reaction to determine the effect of purified DesA3 on $\Delta 9$ desaturation. A final volume of 1 ml reaction mixture contained crude cell lysate of *M. bovis* BCG wild-type (0.55 mg), 20 μ l of a solution containing 50% DMSO and 1 % Tween 20, 1 μ mole NADPH in 0.1 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) and 25 nmole [$1-^{14}$ C] 18:0-CoA as substrate. No purified DesA3 was added to the assay (black bars) or purified DesA3 was added in the amount of 4.8 μ g (grey bars). Duplicates of assay were performed. After 1 or 2 h of incubation at 37°C, the [$1-^{14}$ C] C18:1-CoA was quantified as described in Fig. 6.

FIG. 8. Comparative effects of stercularic acid and ISO on the synthesis of oleic and tuberculostearic acids from [1,2- 14 C]acetate in *M. bovis* BCG. Conditions are described in Figure 3. A, untreated *M. bovis* BCG; B, *M. bovis* BCG treated with 50 μ g/ml stercularic acid; C, *M. bovis* BCG treated with 1.0 μ g/ml ISO.

FIG. 9. Multiple alignment of the putative "membrane desaturase" regions of the *M. tuberculosis* $\Delta 9$ desaturase, DesA3, and other related proteins. Comparative amino acid sequence analysis of the various regions of the various membrane desaturases and the $\Delta 9$ and CoA-requiring DesA3 of *M. tuberculosis* is shown. The eight conserved His residues are indicated by shading (two in region Ia, three in region Ib, and three in Region II). Identical amino acid residues are in bold letters. Gaps are introduced to facilitate the sequence alignment. Representatives of membrane $\Delta 9$ desaturases are from *Rattus norvegicus* (Rat), *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast), and *Mus musculus* (Mouse).

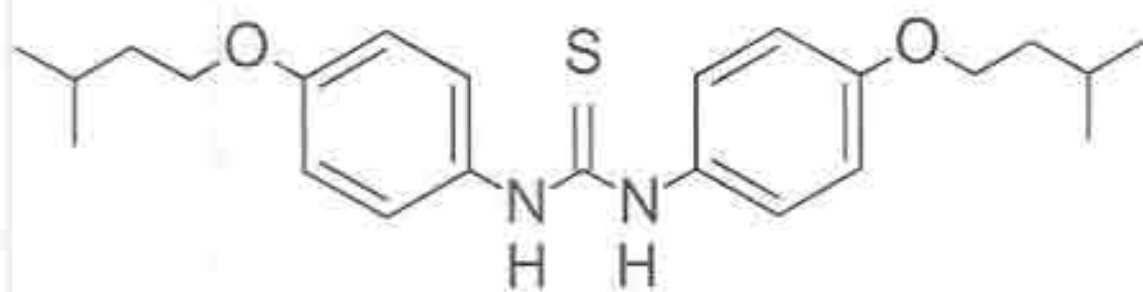


Figure 1

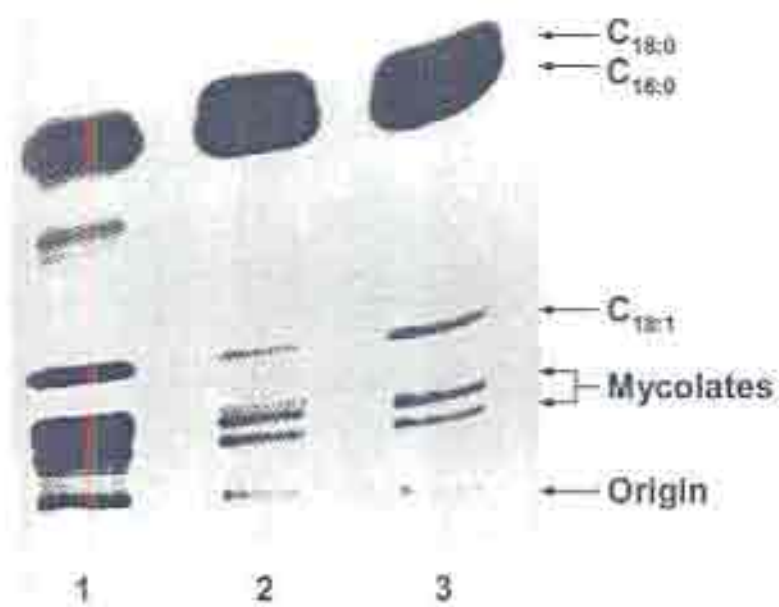


Figure 2

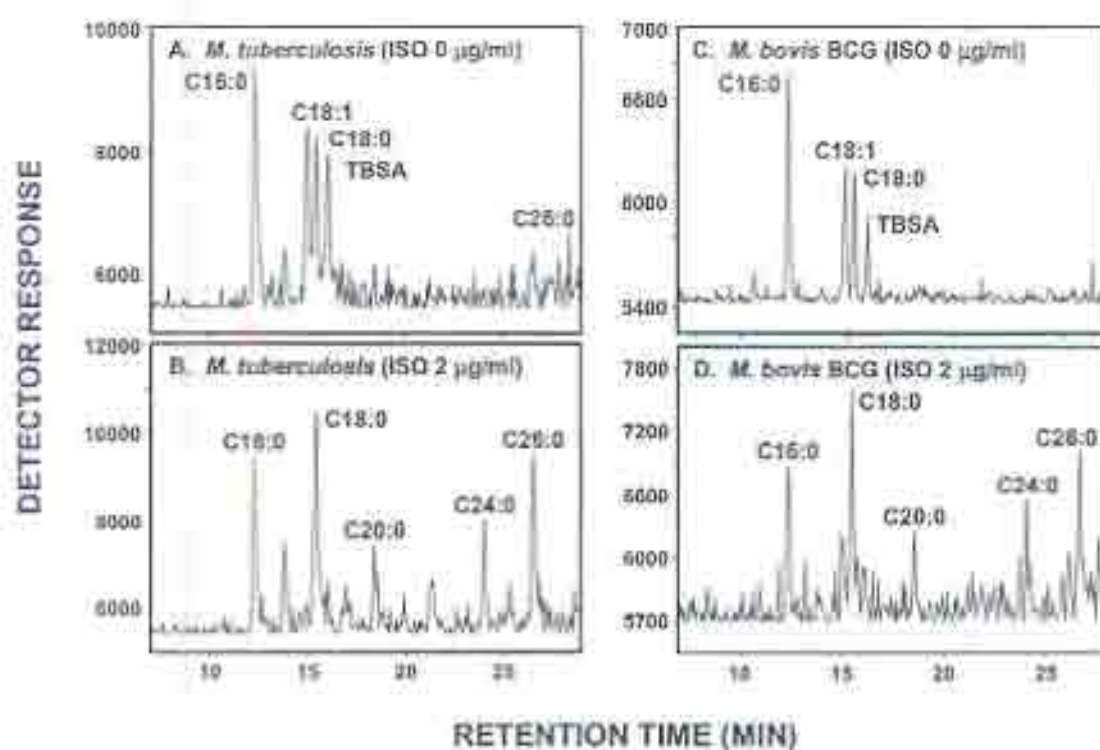


Figure 3

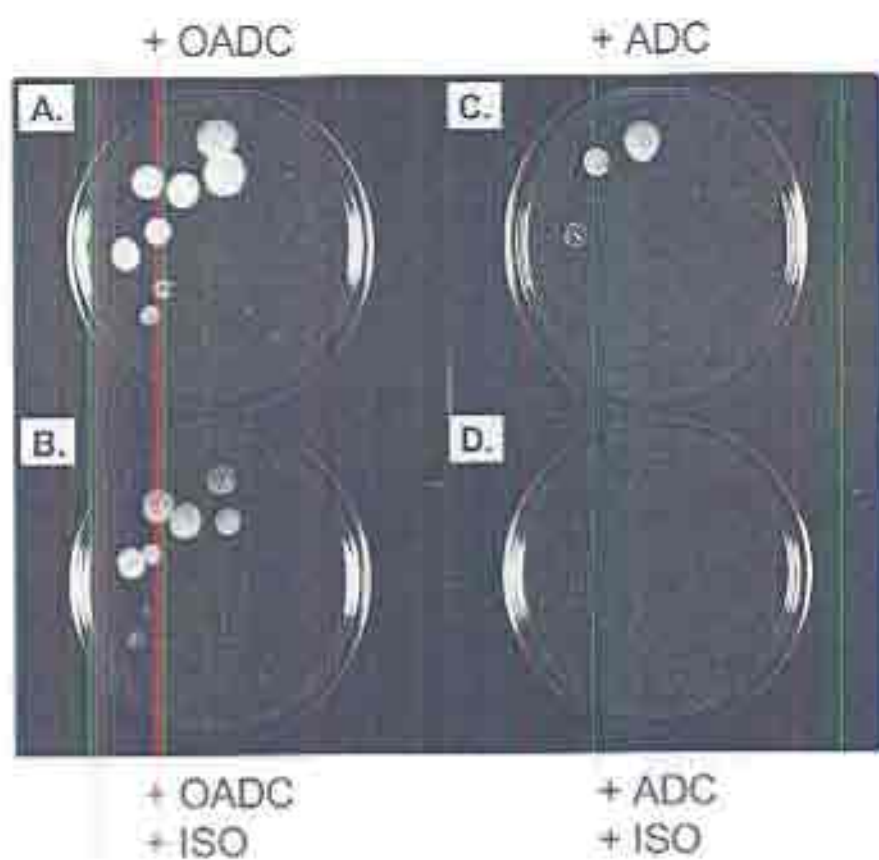


Figure 4

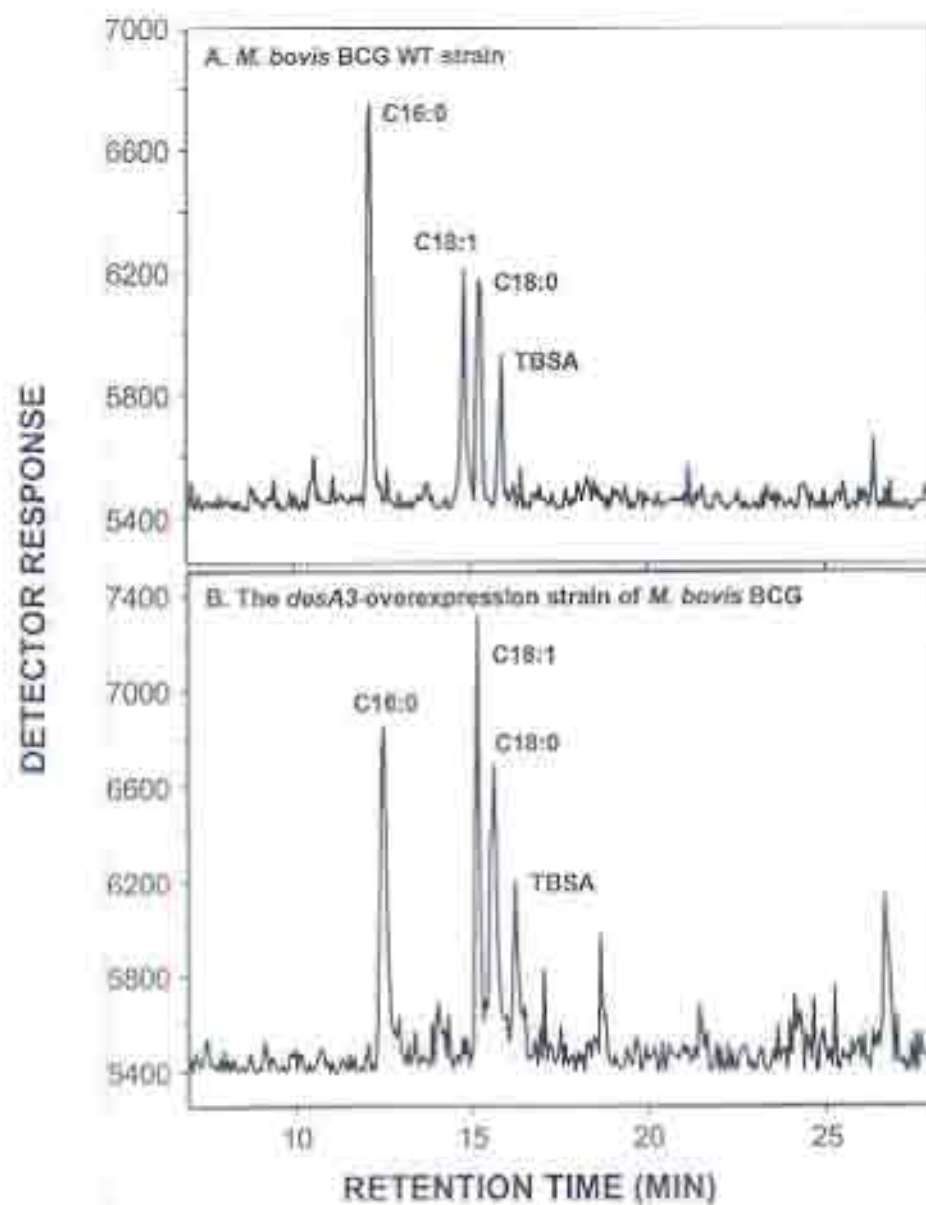


Figure 5

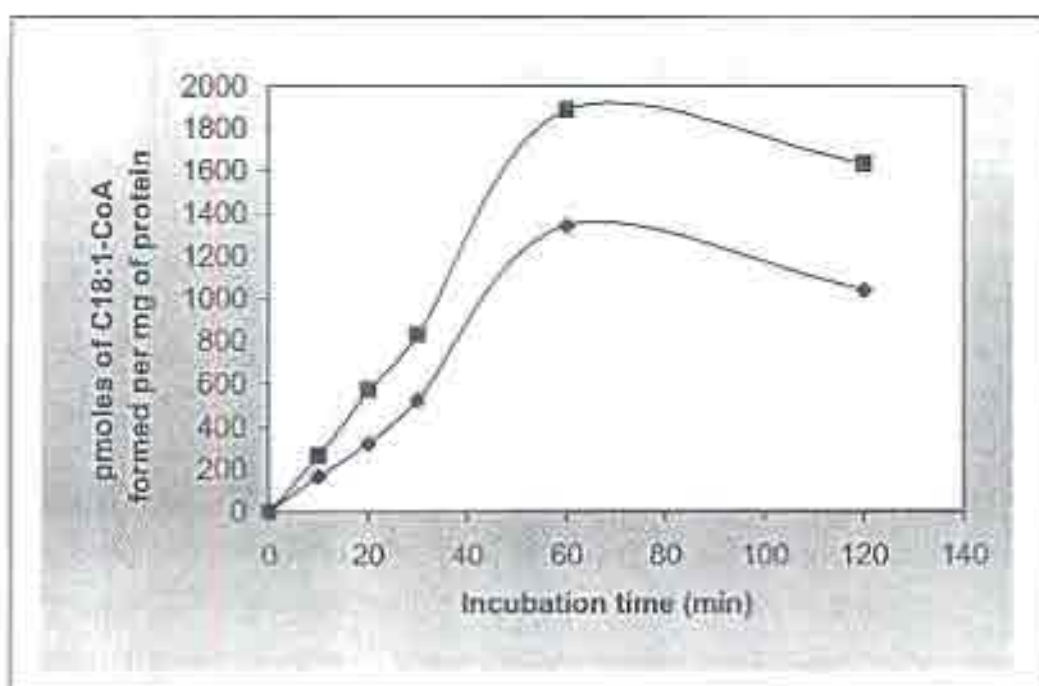


Figure 6

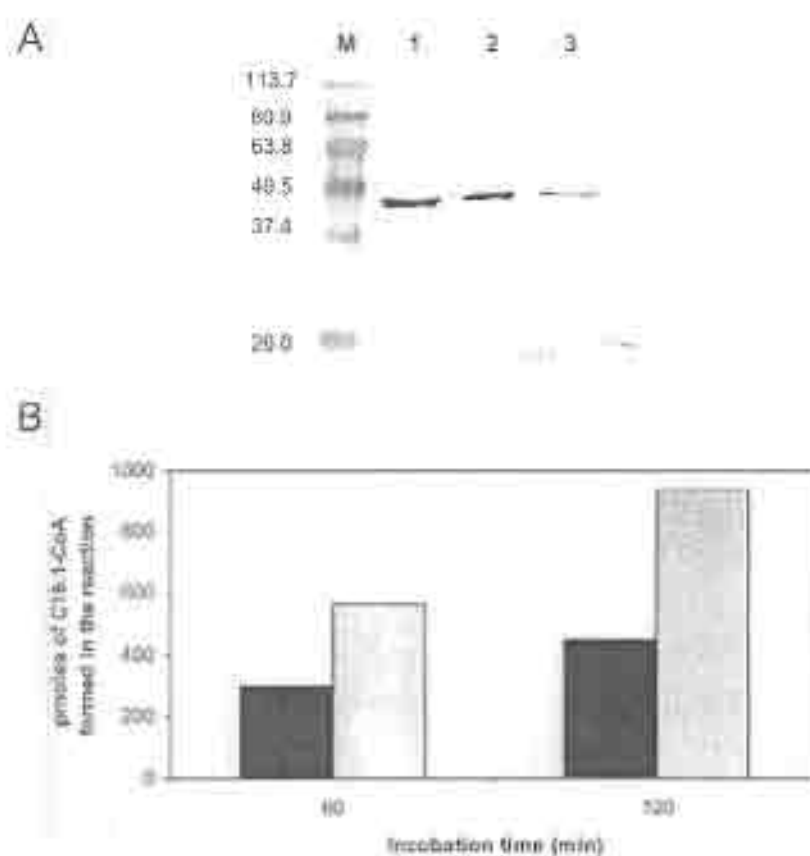


Figure 7

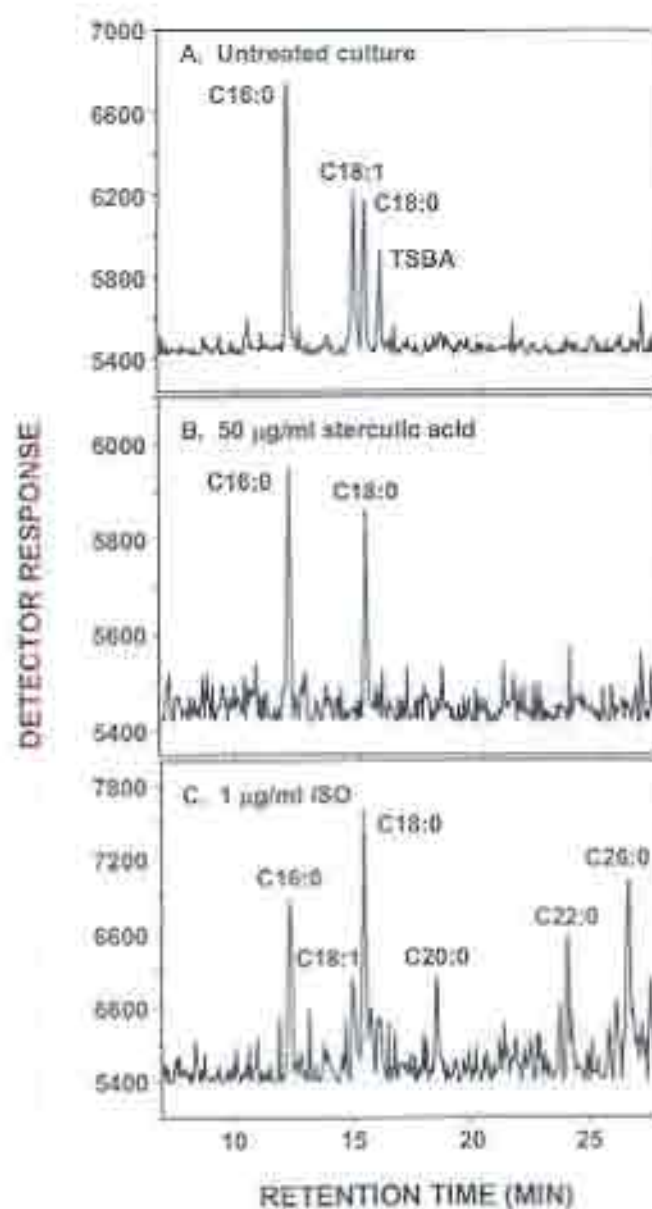


Figure 8

		Region Ia										Region Ib											
Rat	114	ITAG	HLWSHR	TYKARLPLRPLLIANTWAFQNDVYEWARD	HRHH	KHANTHADPHNR	173	ITAG	HLWSHR	SYSAHWPLRLPYAIFGCASVEGSAKNGHRS	HRHH	KYTDTLRDPTGAR	215	ITAG	HLWSHR	TYKARLPLRPLLIANTWAFQNDVYEWARD	HRHH	KPSKTHADPHNR	173				
Yeast	156																						
Mouse	114																						
M. tb	85	HWELG	ENV	WEG	QWQWMDPSIRSGSTWSDMSGSK	HWRT	ENFVHH	KYTNILGSDGVS	143														
DesA3																							

		Region II											
Rat	257	LNATWLVNSAHLVGYRPHYDNISQSENIIVSLGSSVGE	GF	ENFHH	APPYDYSASSEYHH	215							
Yeast	295	QQATPCINSMANYIGTQPPDDRSTPRENWTIAIVTSGE	GY	ENFHH	EPPTDYRMATKWIQ	253							
Mouse	257	LNATWLVNSAHLVGYRPHYDNISQSENIIVSLGSSVGE	EP	ENFHH	APPYDYSASSEYHH	215							
M. tb	264	KPKTKDMIGSPKQWYLQMLGRANFNAQPALEPMSCN	LC	HOISHHLYPOLPSNRLEIS	222								
DesA3													

Figure 9

NEW LIGHTCYCLER REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION PCR
SPECIFIC FOR QUANTITATIVE DETECTION OF *desA3* TRANSCRIPTS OF
Mycobacterium tuberculosis

Benjawan Phetsuksiri^{1,2}, Janisara Rudecaneksin^{1,2}, Jaroen Piyarawataporn³, Patrick J. Brennan³ and Prasit Palittapongpim⁴

¹Department of Medical Sciences, ²Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Nonthaburi, THAILAND, 11000, ³Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, THAILAND, 10400, ⁴Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA, 80526.

ABSTRACT

Mycobacteria have modulated their gene expression in response to disparate environments. In order to monitor bacterial gene expression, methods for direct analysis of transcripts are needed. Here we develop a method of quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) to detect the transcription of *desA3* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. By the use of a modified commercially ready-to-use guanidine-phenol extraction method *M. tuberculosis* RNA could be isolated. A single-tube reaction of a very fast reverse transcription and amplification of cDNA was performed in glass capillaries containing the SYBR Green I dye as a detection signal. Detection of the real-time RT-PCR product was performed on the LightCycler (LC) by melting curve analysis. Agarose gel electrophoresis was also conducted to verify that the LC-RT-PCR product was corresponding to the nucleotide sequence of 341-bp fragment of *M. tuberculosis desA3*. The assay could be easily and rapidly applied to monitor changes of *desA3* expression in *M. tuberculosis* and appear to be applicable in demonstrating a specific gene that associated with drug effects. The specificity of this assay is based on the use highly specific primers to *M. tuberculosis desA3*. Because mRNA is rapidly degraded upon cell death, the method of LC-RT-PCR specific for mRNA of *M. tuberculosis desA3* could, therefore, be adopted as potential molecular tool for rapid detection of viable *M. tuberculosis* as well as for quantification of mRNA in experimental settings.

1. INTRODUCTION

Different methods can be applied for the quantification of bacterial transcripts such as northern blots, dot blots, reverse transcription (RT-PCR) or microarray. All these methods have different characteristics in terms of sensitivity, selectivity, dynamic range and analysis throughput. Recently, with the advent of sophisticated PCR machines that incorporated software-driven fluorescence analysis systems, real-time PCR is rapidly becoming a more common method for analysis and quantification of DNA as well as RNA (Higuchi et al., 1993; Epsy et al., 2000; Brengel-Pesce et al., 2002). Moreover, it was noted that real-time PCR has advantages over conventional PCR in that PCR products can be monitored in each round of amplification and hence quantification can be performed (Aldrea et al., 2002; Wittwer et al., 1997). In this report we present a LightCycler real-time RT-PCR in a single-tube capillary format which combined both rapid-cycle of reverse transcription and PCR and real-time monitoring of the processing using the SYBR Green I fluorescent dye. With this method *M. tuberculosis* *desA3* transcripts could be detected and relatively quantified. In our real-time RT-PCR assay, the specificity of primers was also determined. Because mRNA is rapidly degraded upon cell death, this method therefore, may be used as a rapid PCR based strategy for quantitative detection of viable *M. tuberculosis* in analyzed specimens.

2. MATERIALS AND METHODS

M. tuberculosis culture and RNA extraction

M. tuberculosis was grown in Sauton medium containing 0.5% Tyrospanol to early exponential phase. Cell lysis and isolation of crude total RNA was performed as follows. Cell pellets were harvested by centrifugation at 5,000 rpm 4° C and subsequently resuspended in 94 µl of RNase free water containing RNase inhibitor (GIBCO BRL, Gaithersburg, Md). This suspension was then sonicated at 4° C for 10 min followed by the addition of 6 µl of 3 mg/ml lysozyme (Amersham Pharmacia, Alameda, Calif). After incubation at 25° C for 10 min, the 900 µl of Trizol reagent (GIBCO BRL) containing phenol and guanidine thiocyanate was added. After thorough mixing, the homogenate mixture was stored at room temperature for 5 min to permit the complete dissociation of nucleoprotein complexes. The following step is phase separation, which performed by adding 100 µl of chloroform to homogenate mixture. Resulting samples were then shaken

vigorously in seconds and allowed to stand at room temperature for subsequent 15 min. Sample tubes were then centrifuged at 12,000 x g at 4 °C for 15 min. After centrifugation, the mixture was separated into three phases; aqueous, interphase and organic phase. The aqueous phase, which contains RNA was transferred with caution to leave the interphase and organic layers. RNA pellet was further precipitated by the addition of absolute cold ethanol, 0.3 M sodium acetate and 1 µl of 20 mg/ml glycogen. Finally, the resulting RNA pellet was washed once in 75% ethanol, dried at room temperature, and solubilized in RNase free water. The purified RNA was subsequently used in RT-PCR to quantify *M. tuberculosis desA3* transcripts.

Chromosomal DNA was also isolated from bacterial cultures. The chromosomal DNA was used in optimization of conventional and real-time PCR prior to the development of reverse transcription PCR (RT-PCR) and real-time RT-PCR, respectively. After harvesting cell pellets, DNA from cultures was extracted by heating at 80° C for 20 min. The supernatant was directly used for amplification.

Conventional RT-PCR

A preliminary experiment on reverse transcription and PCR (RT-PCR) was carried out sequentially in a single tube using RT-PCR ready TO-GO beads (Amersham Pharmacia). Each room-stable bead contains M-MuLV reverse transcriptase, RNase inhibitor, buffer, nucleotides and *Taq* DNA polymerase. The only additional reagents needed to compose the reactions are 1 µl of 20 pmol of each primer, and 30 µl of RNA template in RNase free water. The RT-PCR reaction in a total volume of 50 µl was carried out in a programmable master-gradient thermal machine using specific *desA3* primers, GGT GAC CGA CTT AGC CAT ACG CTT, upper primer; AGC ATC ACC TCT ATC CGG AC TGC C, lower primer, which were designed by the Oligo software (Version 6.0; National Bioscience Inc; Plymouth, Minn), and were synthesized at BIOTEC, Thailand. The thermal program involved reverse transcription at 55° C for 30 min, followed by the initial denaturation at 94° C for 5 min. The amplification was performed for 35 cycles of denaturation at 94° C for 1 min, annealing and extension at 69° C for 1 min. The final extension was set at 72° C for 10 min. Negative controls, which contained all reaction components except RNA template, was included to detect carry over contamination.

DNase and RNase treatment. For experiment to determine whether transcribed RNA or contaminating DNA was amplified by this protocol, purified nucleic acids were subjected

to DNase and RNase treatment prior to cDNA synthesis and PCR. In brief, DNase reaction was performed in a total volume of 30 μ l containing 1 unit of RNase free DNase (Amersham Pharmacia) and RNA template. The reaction mixture was incubated at 37° C for 10 min. Subsequently, the enzyme was inactivated at 80° C for 10 min. The resulting DNase-treated RNA was subjected to RT-PCR. To ensure that the DNase reaction used was an optimal condition, the DNase control reaction, which contains RNase free DNase and DNA template was included. After incubation for DNase activity, the latter reaction mixture was subjected to PCR.

Again, to assure that amplicons derived from RT-PCR was originated from RNA, the control containing RNase was performed. Briefly, RNA obtained from extraction procedure was treated with 1 μ l of 10 mg/ml RNase (Qiagen, Valencia). After incubation at 37° C, the RNase reaction was terminated by heat inactivation at 80° C for 10 min. The resulting RNase treated RNA was used as a control template in parallel with RNase untreated RNA, which then were added directly to the mixture of RT-PCR reaction. The control RT-PCR was completed by our simple protocol as described above.

The amplicons obtained from RT-PCR were analyzed for 341-bp fragment of *M. tuberculosis* by 1.0% agarose gel electrophoresis in Tris-borate-EDTA (TBE) buffer (0.089 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.044 M Boric acid, and 0.001 M EDTA). Electrophoresis was conducted at 100 V for 1 h. Gels were stained with ethidium bromide and visualized by UV transilluminator. To verify RT-PCR product, direct sequencing of RT-PCR product was performed with automated sequencer using forward and reverse primers.

Real-time PCR

Preliminary experiments of real-time PCR targeting 341-bp fragment of *desA3* sequence using chromosomal DNA as a template was performed prior to the development of a real-time RT-PCR. The *desA3* amplicons were amplified in the reaction sealed capillary tube using a Roche LightCycler (LC) instrument. Firstly, the "HotStart" reaction mix was prepared by pipetting the total volume 60 μ l LightCycler-FastStart reaction Mix SYBR Green I into the LightCycler-FastStart enzyme. After gentle mixing, the resulting "HotStart" reaction mixture is ready for a final volume of 20 μ l each reaction. The component of LC-PCR in a final volume of 20 μ l included 2 μ l of ready to use reaction mix, which contains *Taq* DNA polymerase, reaction buffer, dNTP, $MgCl_2$ and 10 pmol of the primer pairs that were used in conventional PCR and SYBR Green I dye. To determine the optimal concentration of $MgCl_2$, the concentration of $MgCl_2$ was varied

from 1 to 5 mM. Prior to amplification, a pre-incubation step at 95° C for 7 min was performed to activate the HotStart enzyme. The PCR consisted of 40 cycles with the following thermal sequences: 95° C for 30 S, 69° C for 10 S, and 72° C for 15 S. Subsequently, LightCycler real-time RT-PCR for detection of *desA3* transcript was developed. The reaction mixture of the real-time RT-PCR was composed of 10 pmol of each of the primers, 4 mM MgCl₂ and RT-PCR reaction mixture containing buffer, dNTP mix, enzymes and SYBR Green I dye. The thermal program of RT-PCR consists of the reverse transcription at 55° C for 60 S and PCR cycles. Initial denaturation step was performed at 95° C for 30 S followed by 40 cycles of two-step thermal sequences: 95° C for 10 S and 69° C for 10 S. Final extension was performed at 72° C for 15 S. Amplicons were detected by fluorometer equipped with the LightCycler machine and data acquisition was facilitated through the detection of the fluorescent dsDNA binding dye, SYBR Green. The melting temperature (T_m) of RT-PCR product was used to characterize the amplified product. When the amplification was completed, a melting program was conducted from 80° C to 99° C at 20 ° C/S with continuous monitoring of the fluorescence. Data analysis was carried out with system software of LightCycler (Roche). A negative control, which is a reaction that template RNA was replaced by the PCR-grade water run with sample, was included.

Determination of specificity. To assess the specificity of the primers with *M. tuberculosis*, various species of mycobacteria and other organisms were grown and extracted for RNA. Resulting RNA was amplified by conventional and real-time PCR, respectively. Amplicons obtained from PCR were analyzed for the 341-bp fragment by 1% agarose gel electrophoresis. The sources and strains numbers of the bacterial species used to test the specificity of the assay are listed in Fig 1.

3. RESULTS

According to the fact that prokaryotic mRNA has a very short half-life, it is difficult to obtain intact RNA. In this study, RNA could be isolated by the use of commercial ready to-use phenol-thiocyanate solution (Bej et al., 1991; Patel et al., 1993). In the amplification presented, primers specific for *M. tuberculosis desA3* was designed resulting in the single band of PCR product at the size of 341 bp as analyzed by agarose gel electrophoresis (Fig. 1). The designed primers reproducibly amplified a 341-bp fragment when cDNA prepared from *M. tuberculosis* RNA was used. PCR product dose

not exist with other DNA except that of *M. bovis* indicating specific of the primers to *M. tuberculosis* complex (Fig. 1). Subsequently, the conditions of conventional PCR using DNA as a template were further applied to set up a system of conventional RT-PCR and real-time RT-PCR. We showed that the 341-bp fragment of *desA3* sequence was amplified from transcribed mRNA and not from small amount of genomic DNA contaminating our RNA preparation by pre-treating identical samples with RNase or DNase (Fig. 2). RNase treatment prevented amplification of the 341-bp product, while DNase treatment had no effect, as indicated in Fig. 2 supporting that the RT-PCR product originated from the RNA template.

Real-time RT-PCR method that monitored product accumulation was subsequently developed. Very fast amplification of DNA in small volumes could be continuously monitored with a rapid cycler that incorporated fluorimetric detection. Based on the principle that PCR products are labeled by fluorescent dye in each round of real-time PCR cycle, PCR products could then be monitored and quantitated by measuring the level of fluorescence. We designed a real-time RT-PCR approach using the SYBR Green I fluorescent. The 341-bp cDNA template was amplified, and the RT-PCR product was quantitatively detected. For specific and efficient amplification by real-time RT-PCR, it is essential to optimize the $MgCl_2$ concentration. The result of effects of $MgCl_2$ concentration on the amplification of *desA3* was shown in Fig. 3. The PCR product was observed to accumulate in an exponential manner. The concentrations of $MgCl_2$ affected the efficiency of amplification. It can be seen that the signal started to rise at different times depending on the efficiency of amplification (Fig. 3) and the DNA concentration (data not shown). In such condition, the signal produced in the early exponential phase of the reaction is proportional to the initial amount of DNA or RNA templates. The concentrations of DNA dose not affect the interpretation of the T_m . When the amplification was completed, a melting step was performed, in which the temperature of the tube was slowly increased to analyze the melting pattern of RT-PCR product. Melting pattern was monitored directly from the LC instrument. The melting temperature (T_m) of the RT-PCR product corresponding to the 341-bp fragment of *desA3* was at 90° C, approximately (Fig. 4). Agarose gel electrophoresis indicated that a single product of real-time RT-PCR, which had T_m about 90° C was equivalent to the 341-bp fragment of *M. tuberculosis desA3* (Fig. 5). The LightCycler real-time RT-PCR (LC-RT-PCR) present here was simple to perform and interpret and was able to quantify *M. tuberculosis desA3*

transcripts. Within 45 min, the LC-RT-PCR amplified a target sequence without the need of any post-PCR sample manipulation for product identification. A rapid cycler allowed continuous monitor of the accumulation of RT-PCR product. The approach described here is rapid, reliable and simple and could be used to estimate relatively levels of transcripts of *M. tuberculosis desA3*, which encodes desaturase enzyme, a target of antituberculosis agent, thiourea (Phetsuksiri et al., 1999; Phetsuksiri et al., 2004). Specificity of the primers proved to be applicable for detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens.

4. DISCUSSIONS

A key technique for analyzing purified RNA is expression analysis through quantitative real-time PCR. RT-PCR can be performed in either one or two steps, depending on the enzymes, primers and buffers used. The one-step real-time RT-PCR approach presented in this study was able to quantify *M. tuberculosis desA3* transcripts. The primers designed conferred species specificity in PCR assays. Based on the notion that mRNA is present in viable bacteria and vulnerable to degradation upon cell death (Albert et al., 1989; Gabrielle et al., 1996), the presence of mRNA may indicate cell viability (Bej, 1991; Patel, 1993). This RT-PCR assay, which is able to detect mRNA may be useful in detection of viable *M. tuberculosis* in a number of clinical situations. Comparing to conventional RT-PCR, which detect PCR product at the end point of PCR cycles, the LC-RT-PCR coupled to fluorogenic detection would provide superior advantages especially in term of relative quantitative detection particularly when used to determine the difference in amount of mRNA in small scales.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the grant from the Thailand Research Fund and the supplementation from Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand. We are grateful to Sirrat at Bamrasradura Institute, Department of Disease Control for providing facilities of LC. Culture Collection Section of Thai NIH, Department of Medical Sciences, Dr. Anksana Chaiprasert, Siriraj Hospital for providing mycobacterial cultures. We thank Sopa Srisanngam of Thai NIH for laboratory assistance.

REFERENCE

- Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Robert, and J. D. Watson. 1989. Control of gene expression, p.595. Molecular biology of the cell, 2nd ed. Garland Publishing, Inc., New York.
- Aldrea, C., C.P. Alvarez, L. Folgueira, R. Delgado, and J.R. Otero. 2002. Rapid detection of Herpes Simplex Virus DNA in genital ulcers by real-time PCR using SYBR Green I dye as the detection signal. J. Clin. Microbiol. 40: 1060-1062.
- Bej, A.K., M. H. Mahbubani, and R.M. Atlas. 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. Appl. Environ. Microbiol. 57: 597-600.
- Brengel-Pesce, K., P. Morand, A. Schmuck, M.J. Bourgeat, M. Buisson, G. Barges, M. Bouzid, and J.M. Selnurin. 2002. Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. J. Med. Virol. 66: 360-369.
- Epsy, M.J., T.K. Oss, R. Teo, K.A. Svein, A.D. Wpld, J.R. Uhl, and T.F. Smith. 2000. Evaluation of LightCycler PCR for implementation of laboratory diagnosis of Herpes simplex virus infection. J. Clin. Microbiol. 38: 3116-3118.
- Gabrielle, M. E., V. D. Vliet, P. Schepers, R. A. F. Schukkink, B. V. Gemen, and P. R. Klaster. 1994. Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. Antimicrob. Agents Chemother. 38:1959-1965.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and T. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology. 11: 1026-1030.
- Patel, B. K. R., D. K. Banerjee, and P.D. Butcher. 1993. Determination of *Mycobacterium leprae* viability by polymerase chain reaction amplification of 71-kDa heat-shock protein mRNA. J. Infect. Dis. 168: 799-800.
- Phetsuksiri B., A.R. Baulard, A.M. Cooper, D.E. Minnikin, J.D. Douglas, G.S. Besra, and P.J. Brennan. 1999. Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. Antimicrob Agents Chemother. 43: 1042-1051.
- Phetsuksiri B., M. Jackson , H. Scherman, M. McNeil, G.S. Besra, A.R. Baulard, R.A. Slayden, A.E. DeBarber, C.E. Barry 3rd, M.S. Baird , D.C. Crick, and P.J. Brennan. 2003. Unique Mechanism of Action of the Thiourea Drug Isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem. 278: 53123-53130.
- Wittwer, C.T., K. M. Ririe, R.V. Andrew, D.A. David, R.A. Gundry, and C.J. Balis. 1997. The LightCycler: a microvolume multisample fluorometer with rapid temperature control. Biochemistry. 22: 176-181.

LEGEND

Figure 1. Specificity of *desA3* primers by RT-PCR: A: *Mycobacterium* species; Lane M, DNA marker; Lane 1, *M. tuberculosis* (H37Rv); Lane 2, *M. tuberculosis* (clinical isolate); Lane 3, *M. smegmatis*; Lane 4, *M. bovis*; Lane 5, *M. kansasii* ATCC 12478; Lane 6, *M. avium* ATCC 2529; Lane 7, *M. goodii* 330; Lane 8, *M. intracellulare* ATCC 18950; Lane 9, *M. fortuitum* ATCC 23048; Lane 10, *M. marinum* ATCC 927; Lane 11, *M. scrofulaceum*; Lane 12, negative control. B: non-*Mycobacterium* species; Lane M, DNA marker; Lane 1, *Bacillus cereus*; Lane 2, *Comamonas acidovorans* ATCC11778; Lane 3, *Corynebacterium ulcerans* 3375; Lane 4, *Escherichia coli* ATCC 25822; Lane 5, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 2736; Lane 6, *Listeria monocytogenes*; Lane 7, *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate; Lane 8, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; Lane 9, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; Lane 10, *Streptococcus agalactiae* ATCC 16992; Lane 11, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311; Lane 12, Negative control.

Figure 2. Detection of mRNA transcript of *M. tuberculosis desA3* by RT-PCR. RNA isolated from *M. tuberculosis* was subjected to cDNA synthesis, PCR agarose gel electrophoresis. Replicate RNA samples were treated with DNase prior to cDNA synthesis. Lane 1, DNA marker; Lane 2, DNase; Lane 3, DNase and RNase; Lane 4, Negative control.

Figure 3. Accumulation of the fluorescence during PCR using different concentrations of $MgCl_2$: 2, 3, and 4 mM $MgCl_2$. NC; Negative control. F2 is the channel used by the LightCycler to detect the fluorescence.

Figure 4. Representative experimental melting pattern for 341-bp fragment of *M. tuberculosis desA3*. The temperature of the tube was slowly increased from 80° C to 99° C analyze the melting temperature of RT-PCR product. Melting pattern was monitored directly from the LC instrument.

Figure 5. Agarose gel electrophoresis for verification of real-time RT-PCR product. Real-time RT-PCR product was verified for 341-bp fragment specific to a portion of *M. tuberculosis desA3* gene by 1 % agarose electrophoresis.

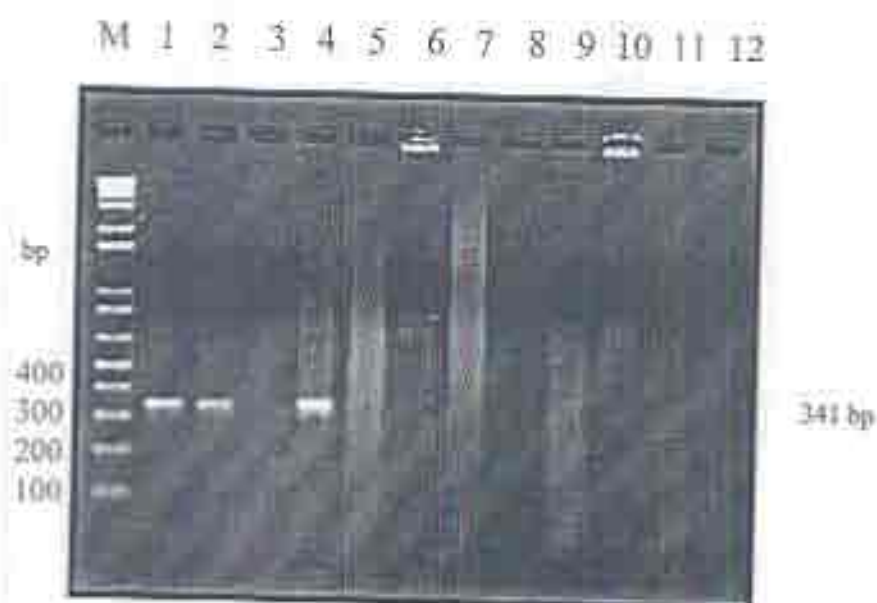


Figure 1. Specificity of *des34* primer: Lane M, DNA marker; Lane 1, *M. tuberculosis* (H37Rv); Lane 2, *M. tuberculosis* (clinical isolate); Lane 3, *M. smegmatis*; Lane 4, *M. bovis*; Lane 5, *M. kansasii* ATCC 12478; Lane 6, *M. avium* ATCC 2529; Lane 7, *M. goodii* 330; Lane 8, *M. intracellulare* ATCC 18950; Lane 9, *M. fortuitum* ATCC 23048; Lane 10, *M. marinum* ATCC 927; Lane 11, *M. scrofulaceum*; Lane 12, Negative control.

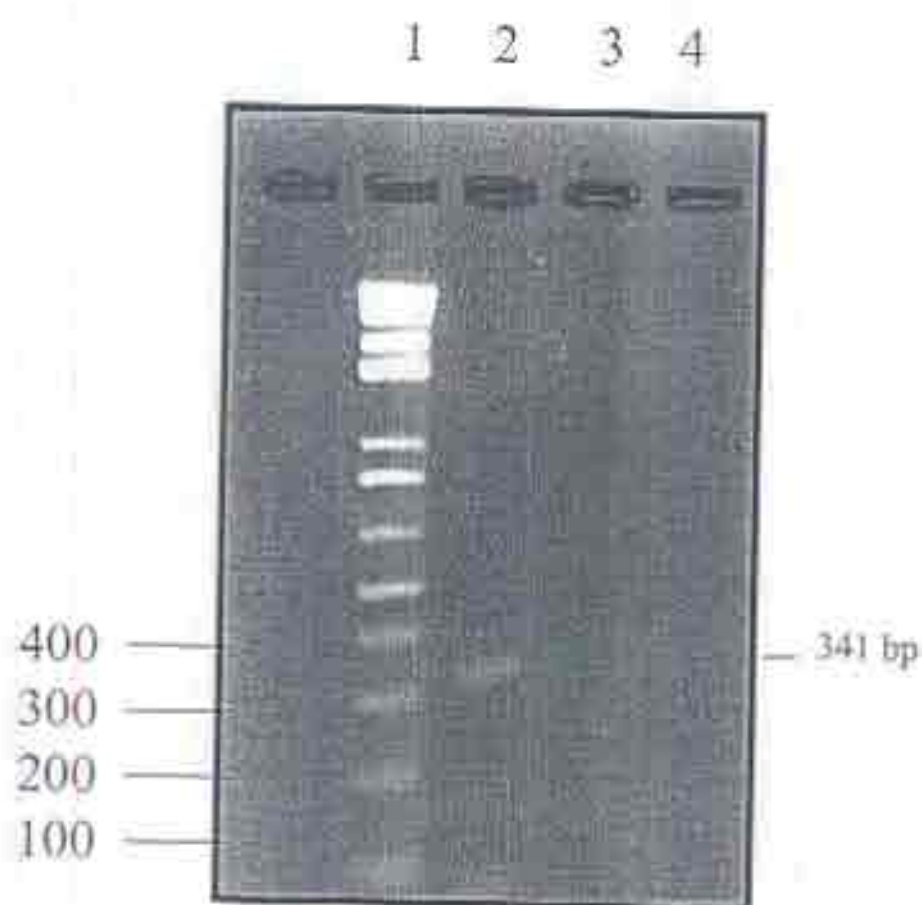


Figure 2 Detection of mRNA transcript of *M. tuberculosis* *desA3* by RT-PCR. RNA isolated from *M. tuberculosis* H37Rv was subjected to cDNA synthesis, PCR, agarose gel electrophoresis. Replicate RNA samples were treated with DNase prior to cDNA synthesis. Lane 1, DNA marker; Lane 2, DNase; Lane 3, DNase and RNase; Lane 4, Negative control.

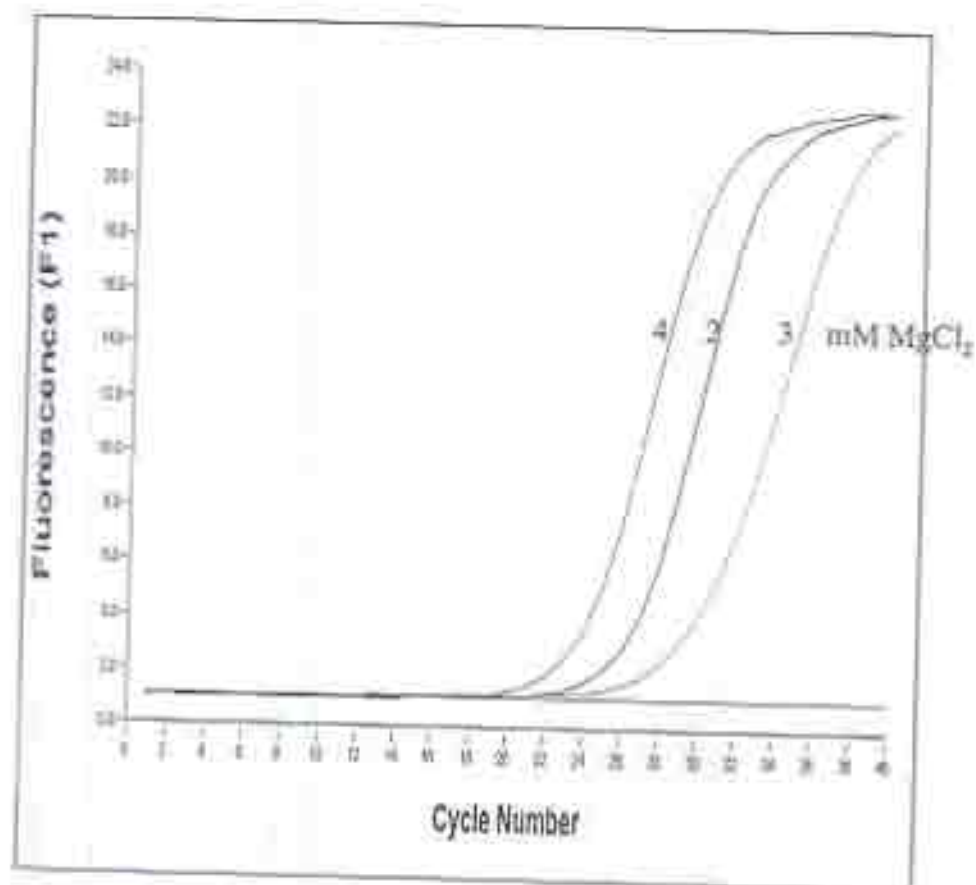


Figure 3 Accumulation of the fluorescence during PCR using different concentration of $MgCl_2$; 2, 3 and 4 mM $MgCl_2$, NC; Negative control. F2 is the channel used by the LightCycler to detect the fluorescence.

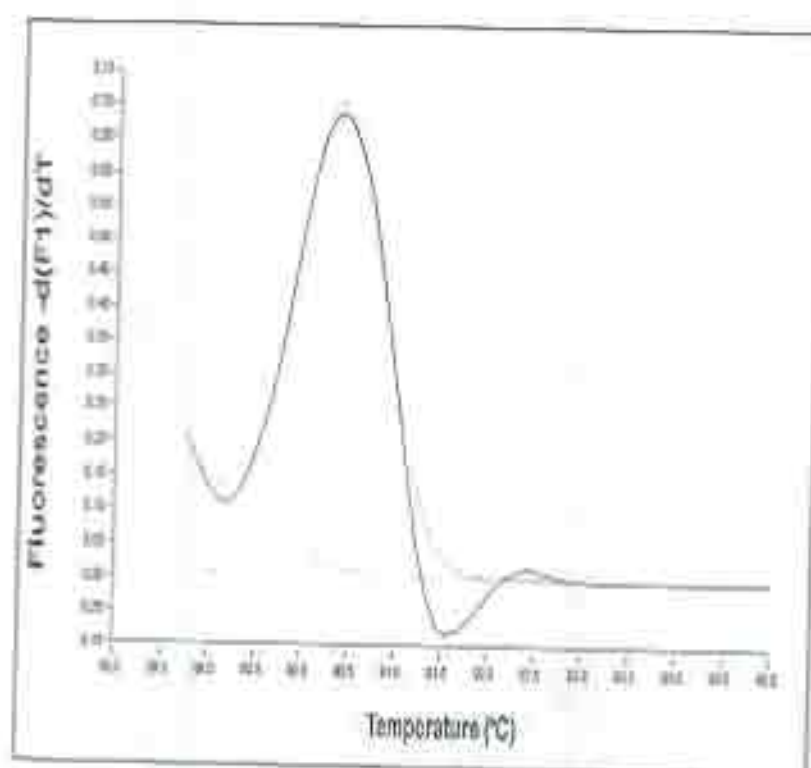


Figure 4 Representative experimental melting pattern for 341-bp fragment of *M. tuberculosis desA3*. The temperature of the tube was slowly increased to analyze the melting temperature of RT-PCR product. Melting pattern was monitored directly from the LC instrument.

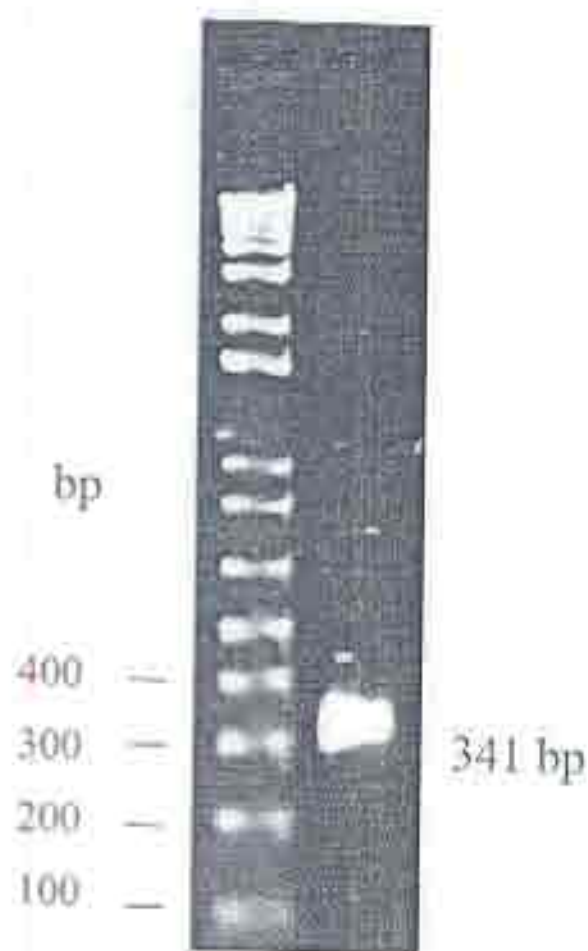


Figure 5 Agarose gel electrophoresis for verification of real-time RT-PCR product. Real-time RT-PCR product was verified for 341-bp fragment specific to the portion of *M. tuberculosis* *del43* gene by 1 % agarose gel electrophoresis.

เครือข่ายความร่วมมือ

ปฏิบัติงานวิจัยเพื่อติดต่อแลกเปลี่ยนข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะ และวิเคราะห์ผลโดยมีเครือข่ายความร่วมมือปฏิบัติงานวิจัยดังนี้

1. Prof. Patrick J. Brannan
Colorado State University, USA
2. Dr. Mary Jackson
Institute Pasteur, Unite de Genetique, Mycobacterienne, Paris Codex, France
3. รศ.นพ. ประสิทธิ์ ผลิตมผลการพิมพ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. รศ.ดร. อังคณา ฉายประเสริฐ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
5. ดร. สุภาพร จีวณวัจนธ์
คณะวิทยาการและเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
วิทยาเขตนบุรี
6. ศุภเรณิศา เจริญบุญทอง
งานชั้นสูง สำนักงานโรคเขตร้อน วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
กรมควบคุมโรค
7. ชุมนบุญช่วย เข็มมโกศลาค
กลุ่มงานจุลชีววิทยา สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค
8. ชุมนศิริวัฒน์ อิกานนท์สกุล
กลุ่มงานอิมมูโนวิทยา สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค

การเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ

การประชุมวิชาการ Genome and Health

October 27-30, 2002

ผลงานวิจัยที่น่าสนใจ

เรื่อง New Lightcycler real-time reverse transcription PCR able to quantify *desA3* transcripts of *Mycobacterium tuberculosis*

การเสนอผลงานวิชาการในที่ประชุมวิชาการในประเทศ

การประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ครั้งที่ 27

การวิเคราะห์ทางเอนไซม์ภูมิคุ้มกันการประยุกต์ใช้ทางคลินิก

29 เมษายน — 2 พฤษภาคม 2546

ผลงานวิจัยที่น่าสนใจ

เรื่อง Investigation of inhibitory effects of thioureas in *Mycobacterium tuberculosis*

4th HUGO Pacific Meeting
&
5th Asia-Pacific Conference on
Human Genetics

GENOME
&
HEALTH

Program and Abstract

October 27-30, 2002
Ambassador City Jomtien,
Pattaya, Chonburi, Thailand

ISBN 974-05-0173-7

- IF-11 **DIHYDROARTEMISININ ENHANCING PHAGOCYTOSIS OF *Plasmodium falciparum* INFECTED ERYTHROCYTES BY HUMAN MONOCYTE**
Parida, Pratee, Phansip, Vattanasomboon and Sumadee, Kamthornwongpalee
- IF-12 **CHARACTERIZATION OF AMINO ACID RESIDUES IN THE ACTIVE SITE OF *Anopheles dirus* SPECIES B GLUTATHIONE S-TRANSFERASE IN ISOFORM 1-3**
Pakorn, Wrayanawongkarn and Albert J. Ketterman
- IF-13 **CHARACTERIZATION OF RESIDUES INVOLVED IN THE ACTIVE SITE OF GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE**
Anochiaporn, Vannakhanvech, Jantana, Wongsontichan and Albert J. Ketterman
- IF-14 **ASPARTATE 150 OUTSIDE THE ACTIVE SITE HAS EFFECT ON THE SPECIFICITY OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ADGST1-3**
Jeerang, Wongtrakul and Albert J. Ketterman
- IF-15 **A SENSITIVE REGION IN THE STRUCTURE OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES**
Jontana, Wongsontichan, Albert J. Ketterman
- IF-16 **STUDIES OF DIPTERA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE INTERACTION WITH THE STRESS RESPONSE *JH/N*-N-TERMINAL KINASE**
Kungnue, Udomsengsart and Albert J. Ketterman
- IF-17 **NEW LIGHT CYCLER REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION PCR ABLE TO QUANTIFY *des43* TRANSCRIPTS OF *Mycobacterium tuberculosis***
Rempnan, Phetrakul, Lamsara, Rukhachon, Prapaporn, Supajkul, Nithon, Sawanpauyakit, and Prasit, Pailitpongpannam
- IF-18 **IN-SILICO DRUG TARGET AND LEAD GENERATION FOR TUBERCULOSIS**
Jagannathan, Kodali, NVK, Viswanath, Sujith, Kumar, Gulhakar, Varadaraj
- IF-19 **HAND-FOOT-AND-MOUTH DISEASE CAUSED BY ENTEROVIRUS 71 IN THAI CHILDREN: SIRIRAJ HOSPITAL**
Kulnua, Chokevithakul, Pongnada, Chongsul, Nirun, Vannasop, Sany, Chansul, Wongsamya, Phongsamut, Kewadee, Janyitha, Kumporn, Lunkha, Pailaporn, Puthawithana

Pharmacogenomics

- PH-01 **CYTOCHROME P450 2C19 GENETIC POLYMORPHISM IN A THAI POPULATION**
Wichai, Tassaneeyakul, Arporn, Udwale, Wongwiwat, Tassanomyakul, Vannakul, Kulnongwinyapan, Kanokporn, Niwatthanasun
- PH-02 **THE SEARCH FOR ANTI-METASTATIC AGENTS FROM THAI HERBS**
Klemppek, Urdapamngkhot, Sani, Thongtong, Hunsu, Prawat, Samrak, Rukhachon, Chantagorn, Srisomsop, Radee, Surail, Jonsorn, Svasti
- PH-03 **MORBIDITY VIS A VIS FOLK MEDICINE: A CASE STUDY AMONG THE MUNDA TEA LABOURERS IN ASSAM, INDIA**
Kumar, Bora
- PH-04 **HEALTH AND LONGEVITY AMONG KURICHANS**
Tharavalli, Parvathi, Kumara, Reddy

1F-117

NEW LIGHTCYCLER REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION PCR ABLE TO QUANTIFY *desA3* TRANSCRIPTS OF *Mycobacterium tuberculosis*.

Benjawan Phetsuksiri^{1,2}, Janisara Rodeaneksin^{1,2}, Prapaporn Supapakul^{1,2}, Pathom Sawanpanyalert¹, and Prasit Palittapongpiman¹. ¹Department of Medical Sciences, ²Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health, Nonthaburi, THAILAND, 11000. ³Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, THAILAND, 10400

In order to study the effects of thiourea, an antituberculosis agent, on the expression of specific gene in *Mycobacterium tuberculosis*, a new LightCycler real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) for quantitative detection of mRNA of *M. tuberculosis desA3* was developed. *M. tuberculosis* RNA could be extracted by the use of Trizol® reagent. The amplification reaction was performed in glass capillaries containing the SYBR Green I dye as a detection signal. Using primers designed from the sequence of H37229c resulted in the amplification of 341 nucleotide region of the *desA3* gene specific for *M. tuberculosis*. Confirming of the real-time RT-PCR product was performed on the LightCycler by melting curve analysis. Agarose gel electrophoresis was also conducted to verify that the LightCycler real-time RT-PCR product was corresponding to the nucleotide sequence of 341 base pair. Total processing time, which included reverse transcription, polymerase chain reaction and quantitative detection of a single amplified product was less than 45 min. The assay could be easily and rapidly applied to quantify relative levels of mRNA of *M. tuberculosis desA3* in the presence and absence of thiourea. Comparing to conventional RT-PCR, the LightCycler real-time RT-PCR provided superior advantages especially in term of relative quantitative detection particularly when used to determine the difference in amount of mRNA in small scales.

1F-118

In-silico drug target and lead generation for Tuberculosis

Jagannathan Kodam, N V N Viswanath, Sujith Kumar, Sudhakar Varma
Satyam Computer Services Limited, INDIA

Abstract Millions of people die from tuberculosis, a chronic infectious disease caused by the tubercle bacillus. The complete genomic sequence of the best characterized strain of *Mycobacterium tuberculosis*, H37Rv, has been completed and is available in public domain. The characteristic features of the tubercle bacillus include its slow growth, dormancy, complex cell envelope, intracellular pathogenesis and genetic homogeneity. Understanding the biology of this slow-growing pathogen is important for conceptualizing new prophylactic and therapeutic interventions. A possible approach for designing new therapeutics is to find gene sequences which are unique/specific for the microbe, targeting which makes it vulnerable for its survival and replication. We identified gene/protein sequences which are unique to tuberculosis using in-silico Bioinformatics sequence analysis. Effective therapeutic intervention against these targets can be achieved using non-traditional methods like gene knockout. However, gene knockout techniques like chemical mutagenesis, etc. can be lethal, and a safer alternative is gene silencing. Post-transcriptional gene silencing using RNA interference (RNAi) suppresses specific gene expression by complementary homologous dsRNA. It acts at the mRNA level and inhibits its maturation or accumulation. We have designed dsRNA for these unique gene sequences of tuberculosis.

Investigation of inhibitory effects of thioureas in *Mycobacterium tuberculosis*

Benjawan Phetsuksin¹, Janisara Rudeeaneksin¹, Jaroon Piyarawatarn²,
Prasit Paliatpongarn³, and Patrick J. Brennan⁴.

*Department of Medical Sciences¹, Department of Disease Control²,
Mahidol University³, Colorado State University⁴*

Isoxyl (4, 4' diisobutoxy-diphenylthiourea) and new synthetic derivatives of thiourea were investigated in vitro for their antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. By employing the rapid microplate alamar blue assay, isoxyl was shown to be highly effective against clinical isolate of *M. tuberculosis* with MIC of 0.30-1.25 µg/ml. Four new derivatives also exhibited potent activity against *M. tuberculosis* with MIC in the range of 0.30-10.0 µg/ml. The selective mode of action of thiourea was demonstrated by whole cell labeling of *M. tuberculosis* with [$1, \pm$ -C¹⁴] acetate. Analysis of labeled fatty acids by thin layer chromatography (TLC) demonstrated the inhibitory effects on the synthesis of unsaturated fatty acids, indicating a unique mechanism of action. We presented here that thiourea is a novel antituberculosis agent and dissection of the target of antituberculosis; thiourea would reveal a new therapeutic target of drugs effective against *M. tuberculosis*.

(Financial Sources: Thailand Research Fund and supplement from Department of Disease Control)

ข้อเสนอโครงการวิจัย
(Proposed proposal)

โครงการ: กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านเชื้อวัณโรค thiourea และอนุพันธ์ใหม่ และผลต่อ
การแสดงออกของยีน *desA3* ในเชื้อวัณโรค
(Thiourea and new derivatives: Mode of action and effects on the
expression of the *Mycobacterium tuberculosis desA3* gene)

หน้าสรุปโครงการวิจัย
รายละเอียดโครงการวิจัย

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

1. ชื่อโครงการ: กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านเชื้อวัณโรค thiourea และอนุพันธ์ใหม่ ในระดับคือการแสดงออกของยีน *desA3* ในเชื้อวัณโรค

Thiourea and new derivatives as anti-tuberculosis agents / Mode of action and effects on the expression of the *Mycobacterium tuberculosis* *desA3* gene

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ:

เบญจวรรณ เกตุสุริย

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ (9)

งานวิจัย: กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข

โทรศัพท์ 5801593, 5801567 โทรสาร 5916473

3. สาขาที่ทำการวิจัยสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ชีววิทยาทางการแพทย์

4. งบประมาณทั้งโครงการ

400,000 บาท

5. ระยะเวลาดำเนินการ

2 ปี

6. ได้เสนอขอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกันเรื่องนี้บางส่วน เพื่อขอทุนด้วยแหล่งทุนอื่นหรือไม่

1. ไม่ได้เสนอขอแหล่งทุน

เสนอต่อ

ชื่อโครงการที่เสนอ

กำหนดทราบผล

หรือสถานภาพที่ทราบ

7. ปัญหาทางการแพทย์ และความสำคัญของปัญหา

วัณโรค (tuberculosis) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจาก แบคทีเรียทิวเบอริคูลอสิส (*Mycobacterium tuberculosis complex*) จัดเป็นโรคติดต่อที่สำคัญที่เป็นสาเหตุของการป่วย ภาวะเสียชีวิต และการแพร่ระบาดในผู้ป่วยประชากรทั่วทุกภูมิภาคของโลก โลกจะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรควัณโรคประมาณ 2 - 3 ล้านคน และมีผู้ป่วยใหม่ประมาณ 8 - 10 ล้านคนต่อปี (Blom and Murray, 1992; Isaman, 1994; Dolin et al., 1994) การกลับมาระบาดของโรคทำให้อัตราการตายด้วยโรคประจำตัวของผู้ป่วยเพิ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2536 (ค.ศ. 1993) กำหนดให้วัณโรคเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ต้องได้รับความสนใจและแก้ไข (World Health Organization, 1994) อย่างไรก็ตามพบว่าวัณโรคมีอุบัติการณ์มากขึ้น มีการคาดคะเนว่าจำนวนผู้ป่วยที่เสียชีวิตเนื่องจากวัณโรคจะยังคงเพิ่มขึ้นเป็น 4 ล้านคนในปี พ.ศ. 2547 (A.A. 2004) (World Health Organization, 1998) และประเทศไทยได้ถูกจัดเป็น 1 ใน 6 ประเทศของทวีปเอเชียที่มีจำนวนผู้ป่วยวัณโรคสูงที่สุดรองจาก จีน, อินเดีย, อินโดนีเซีย, บังกลาเทศ และเวียดนาม (ภาสกร-อัครเสวี, 2543)

วัณโรคเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่มีผลกระทบต่องานบริการและสังคม จากเหตุผลขนาดใหญ่อันตรายของวัณโรค การควบคุมวัณโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข จำนวนผู้ป่วยวัณโรคได้เพิ่มขึ้น 3 - 4% ต่อปีนับตั้งแต่ พ.ศ. 2534 อัตราการป่วยได้เพิ่มขึ้นจาก 65 /100,000 ในปี 2534 เป็น 76 /100,000 ในปี พ.ศ. 2541 (ภาสกร-อัครเสวี, 2542) สาเหตุหนึ่งที่ทำให้วัณโรคกลับมาระบาดทั้งในประเทศไทยและทั่วทุกภูมิภาคของโลกเกิดจากการแพร่ระบาดของโรคเอดส์ (Antonucci et al., 1995; Zimhlo et al., 1999) ปัญหาเชื้อวัณโรคที่ขยายเป็นภัยคุกคามที่สำคัญที่ทำให้วัณโรคระบาดเพิ่มขึ้น (Zimhlo et al., 1999) การติดเชื้อของเชื้อทิวเบอริคูลอสิสก่อนเชื้อเข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะเปลี่ยนมาอาศัยเชื้อเข้าสู่ร่างกายที่สำคัญที่ทำให้เชื้อวัณโรคที่ตายได้ยาก ผู้ป่วยวัณโรคที่หายแล้วไม่ครบจำนวน ไม่สม่ำเสมอ หยุดยาหรือรับประทานยาผิดขนาด ยาไม่ถูกขนาด เป็นต้น ปัจจัยทางธรรมชาติอื่นๆ ที่เสริมให้เชื้อเข้าสู่ร่างกายได้แก่ โครงสร้างพิเศษของผนังเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมัน (fatty acids และ mycolic acids) หลายชนิดจำนวนมาก และการที่เชื้ออาศัยอยู่ภายในเซลล์ (intracellular pathogen) ทำให้ยากต่อการซึมผ่านของยาเข้าไปทำลายเชื้อ โดยทั่วไปการรักษาวัณโรคจะใช้ระบบการฉายยา (multidrug therapy) เพื่อป้องกันปัญหาเชื้อดื้อยา ระบบยามาตรฐานที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ ประกอบด้วยยา isoniazid, rifampicin, ethambutol และ pyrazinamide หรือ streptomycin (Mitschison, 1995; Stratton and Reed, 1986) เนื่องจากเชื้อวัณโรคมีการเจริญเติบโตช้า ดังนั้นระยะเวลาในการรักษาจะใช้เวลานานกว่า 6 เดือน (Ginsberg et al., 1984) ถึงแม้ว่าจะใช้ระบบยาหลายขนานในการรักษาพบว่าเชื้อวัณโรคมีการพัฒนามันเชื้อที่ดื้อต่อการฉายยา (multidrug-resistant *M. tuberculosis*) ซึ่งได้แก่เชื้อวัณโรคที่ดื้อยา isoniazid

และ rifampicin และพบเชื้อวัณโรคมากขึ้น (Koch *et al.*, 1993) การศึกษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อตามรายงานมีความยุ่งยาก การใช้ยาสูง ค่าใช้จ่ายมีค่อนข้างแพงเมื่อใช้ตามแนวทางมาตรฐาน และมีอัตราการเป็นซ้ำ (relapse) สูง (Blanchard, 1996; Morris *et al.*, 1996; Newble *et al.*, 1994) การศึกษา isoniazid และ rifampicin มีความสำคัญเนื่องจากอาจสังเกตพบเป็นสาเหตุหลัก (first-line drugs) ในสูตรมาตรฐานระยะสั้น (short-course chemotherapy) (Koch *et al.*, 1993) ทำให้ต้องใช้ยาลำรอง (second-line drugs) ซึ่งมีประสิทธิภาพทำลายเชื้อที่ต่ำกว่าและมีผลข้างเคียงรุนแรง (Basso and Blanchard, 1998) ความล้มเหลวในการรักษาทำให้เชื้อยังคงเจริญเติบโต และสามารถแพร่ไปยังบุคคลอื่น ผู้ป่วยบางรายถึงแก่ชีวิตโดยไม่มีอัตราการเสียชีวิตสูง 40 - 60% (Bloom and Murray, 1992) ปัญหาการกลับระบาดของวัณโรคจากแพร่หลายและปัญหาเชื้อวัณโรคดื้อยาทำให้เห็นถึงความล้มเหลวของการพัฒนายาใหม่เนื่องจากยาลำรองที่มีอยู่จำกัด อีกทั้งไม่มีการพัฒนายาวัณโรคใหม่ขึ้นตั้งแต่การค้นพบ rifampicin ในปี 1966 มาตรการ 3 ปีที่มีผู้สนใจในการควบคุมปัญหาเชื้อวัณโรคได้อีก การพัฒนายาใหม่ให้ขึ้นเพื่อลดระยะเวลาในการรักษา พัฒนายาใหม่ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากยาเดิม และพัฒนายาใหม่ที่สามารถทำลายเชื้อที่ไม่มีอยู่เจริญเติบโต (latent or dormant organisms) (Bury *et al.*, 1997) คุณสมบัติอื่นๆที่ผู้ป่วยได้แก่ มีฤทธิ์ต้านการเชื้อ (bactericidal) ซึ่งดีกว่าการยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) มีค่า pharmacokinetics ที่มี มีฤทธิ์ไม่ถึงประเภทยาตัว และที่สำคัญคือสามารถทำลายเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนานได้

การพัฒนายาวัณโรคใหม่มีส่วนสำคัญต่อการควบคุมปัญหาวัณโรคคือยา ความพยายามในการศึกษาหาใหม่ส่วนหนึ่งได้จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยาในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยา isoniazid ซึ่งถือเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายเชื้อวัณโรคด้วยความเข้มข้นของยาลำดับ (minimum inhibitory concentration, MIC) 0.02 - 0.2 $\mu\text{g/ml}$ (Hofel 1994) หลักฐานจากงานวิจัยรายงานว่า isoniazid ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase type II complex ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ กรดไขมัน (fatty acids) สังเคราะห์ mycolic acids (Bansjee *et al.*, 1994; Rozwarski *et al.*, 1995; Mdali *et al.*, 1996) ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อวัณโรคของยา isoniazid แสดงให้เห็นชัดเจนว่าขบวนการสังเคราะห์ fatty acids และ mycolic acids มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเชื้อ วัณโรคอื่นๆ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ fatty acids และ mycolic acids ได้แก่ ethionamide ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของยา isoniazid (Winder, 1982) และมีผลต่อการออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับยา isoniazid (Quemard *et al.*, 1992; Winder *et al.*, 1971; Winder, 1982) ยา ethionamide ถูกจัดเป็นยาลำรองในการรักษาวัณโรค ความพยายามในการศึกษาการสังเคราะห์ fatty acids และ mycolic acids ได้นำไป

สู่ความเข้าใจปฏิกิริยาพื้นฐานในสัตว์ชั้นสูง และเข้าใจหน้าที่และการทำหน้าที่สำคัญของเอนไซม์ที่มีเกี่ยวข้อง ซึ่งมีผลถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์ด้วยสารเคมีหรือยาเคมีมีผลทำให้เชื้อวัณโรคตายในที่สุด การศึกษาในระดับนี้มีหลักฐานมากกว่าสาร thioureos ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างกันขึ้นเนื่องจากยา isoniazid และ ethionamide (Winder, 1972) ผลฤทธิ์ทำลายเชื้อวัณโรคโดยยับยั้งการสร้างลิแกแรน fatty acids และ mycolic acids (Pharmakoti et al., 1999) ด้วยความเป็นพิษต่ำสุด (LD₅₀) 0.5 - 2.5 µg/kg สัตว์มีคุณสมบัติทำลายเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาหลายชนิด และสามารถใช้ทำลายเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาได้สูงในแมลงโดยให้ผลด้วยความเข้มข้น 0.05 - 2.5 µg/ml (Pharmakoti et al., 1999) จากการใช้สาร thioureos เป็นเครื่องมือในการศึกษาเพื่อค้นหาเป็นยาชนิดใหม่ (new drug target) พบว่า thioureos ยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid (Pharmakoti et al., 2001) ซึ่งผลคล้ายกับผลของยาทำให้มีลักษณะของ stearic acid ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 คาร์บอนเรียกว่า stearic acid แต่ไม่มีพันธะคู่ ผลของยาคือสามารถนำไปสู่ข้อสรุปที่ว่า thioureos มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากยา isoniazid และ ethionamide โดยยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid การใช้ thioureos เป็นเครื่องมือในการศึกษามีเป็นสิ่งที่น่าสนใจเพราะสามารถนำไปสู่การค้นพบยาชนิดใหม่ (new drug target) อีกทั้ง thioureos ยังเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อวัณโรคที่มีถิ่นอาศัยมาจากค่า LD₅₀ ซึ่งแท้จริงแล้วยังมีการสังเคราะห์ oleic acid จากสารตั้งต้น stearic acid ในจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์โดยการเติมคาร์บอนไฮดรอกซีเลส (Fuko and Bloch, 1964; Kashwbara et al., 1972; Kashwbara and Sato, 1973) การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์ desaturase ในเชื้อวัณโรคถูกยับยั้งโดยยา thioA3 (Pharmakoti et al., 2001) จึงสามารถกล่าวได้ว่า thioureos ยับยั้งการยับยั้งเอนไซม์ desaturase และน่าจะมีส่วนต่อความผิดปกติของยีน desA3

ในโครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจะใช้ thioureos เป็นเครื่องมือในการศึกษากลไกใหม่ในการออกฤทธิ์ทำลายเชื้อวัณโรคโดยมุ่งเน้นศึกษาผลกระทบของการยับยั้งของยีน desA3 และศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อวัณโรคของสาร thioureos กับยาชนิดใหม่ที่ได้จากการสังเคราะห์ และเปรียบเทียบผลของการยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid เพื่อการค้นหายาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายเชื้อวัณโรคด้วยกลไกที่แตกต่าง จากวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งในการทดสอบเพื่อยืนยันว่าสาร thioureos ยับยั้งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ desaturase ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของยีน desA3 และเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ oleic acid จาก stearic acid

8. วิจัยประสงค์

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวันโรคในล้านช้างโมเดลภาคเหนือและมีการประยุกต์ความรู้ใช้ในการพัฒนาภาควันโรคใหม่ การศึกษาให้ชัดเจนถึงผลกระทบหรือสารตกค้างในระดัมน้ำดื่มและในระดัมน้ำดื่มโมเดล จะช่วยทำให้เข้าใจภาพที่และปฏิสัมพันธ์ที่สำคัญในสัตว์เชื้อ สามารถที่จะอธิบายกลไกที่แน่ชัดในการออกฤทธิ์ของยาหรือสารได้ตรงจุดและความรู้ที่สละสลวยเป็นแนวทางนำไปสู่การค้นพบเป้าหมายใหม่ของยา (new drug target) และการพัฒนายาใหม่ที่จะออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายใหม่ ในการศึกษาครั้งนี้จะวิจัยได้ความหมายที่จะศึกษาผลของสาร theobromine และอนุพันธ์ใหม่ต่อระดับเซลล์และระดับโมเลกุลของเชื้อวันโรค ได้แก่ผลของสารต่อการสังเคราะห์ theobromine และผลของสารต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ host desaturase ซึ่งเชื่อว่าเป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์ theobromine โดยเหตุที่ไม่ได้รู้โครงสร้างมากจนเกี่ยวข้องกับบทบาทของ theobromine ต่อการเป็นเป้าหมายใหม่ของยาวันโรค ผลของการศึกษานี้จึงน่าจะมีส่วนช่วยในการพัฒนายาวันโรคใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างจากยาที่มีใช้ในปัจจุบัน โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ประเมินประสิทธิภาพการต้าน theobromine และอนุพันธ์ใหม่ที่ได้จากเคมีสังเคราะห์ ในการทำลายเชื้อวันโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย ทั้งนี้เพื่อค้นหาสารในกลุ่ม theobromine ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายเชื้อ โดยทำการทดสอบแบบมาตรฐาน conversional-plaque proportion method และให้สารทดสอบแบบครึ่งเดียว (single blind)
2. วิเคราะห์ผลของสาร theobromine และอนุพันธ์ใหม่ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ theobromine โดยศึกษาผลต่อใหม่ในการแสดงออกของสาร theobromine และอนุพันธ์ใหม่ซึ่งยังไม่ได้มีการศึกษามาก่อน และเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ theobromine ได้สูงสุด theobromine จะใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบผลของการแสดงออกของการแสดงออกที่แตกต่าง
3. ศึกษาผลของสาร theobromine ต่อการแสดงออกของยีน theobromine ในเชื้อวันโรค เพื่อให้เข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของยาหรือสารที่แท้จริงก่อนการทดลองในขั้นสุดท้าย เอนไซม์ desaturase เป็นเอนไซม์ของยีน theobromine มีคุณสมบัติเป็นเป้าหมายใหม่ของยาออกฤทธิ์จากหน้าที่สำคัญของเอนไซม์ใหม่ในการกระตุ้นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ theobromine จาก stearic acid

9. ระเบียบวิธีวิจัย

แบบการวิจัย แบ่งเป็น 3 ส่วน

ส่วนที่ 1 : การประเมินประสิทธิภาพของสาร thiourea และอนุพันธ์ใหม่ต่อการทำลายเชื้อในโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย (Evaluation of bactericidal effect of thiourea and new derivatives on clinical isolates of *M. tuberculosis*)

ขณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร thiourea และอนุพันธ์ใหม่ต่อการทำลายเชื้อในโรค โดยวิเคราะห์เชื้อผ่านเชื้อวันบัสและค่า MIC ของสารทดสอบด้วยเทคนิค Microplate Alamar Blue Assay คือแบ่งจากวิธีของ Yajko และคณะ (1995) การทดสอบดังกล่าวนำใช้ Alamar Blue dye (resazurin) เป็นตัวชี้การมีชีวิตของเชื้อ Alamar Blue dye เป็น oxidation-reduction (redox) indicator (Franzblau et al., 1998) ปฏิบัติการ redox ในกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อมีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีชีวิตจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Alamar Blue dye จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูถึงแดง (Yajko et al., 1995) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า Franzblau และคณะ (1998) ได้นำ Alamar Blue dye มาประยุกต์ใช้ในการตรวจความไวของยาต้านเชื้อและการตรวจเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวันบัส ค่า MIC ที่ได้โดยการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานอื่นๆ เมื่อเทียบกับค่า ในภาวะที่โดย Alamar Blue assay พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Franzblau et al., 1998) เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวสามารถวินิจฉัยการทดสอบที่รวดเร็วและแม่นยำ จะได้นำมาประยุกต์ใช้ในกรณีปัจจุบันของประเทศไทย

1. เพราะเหตุผลเชื้อวันบัสที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยทำการเลี้ยงเชื้อจาก 1 โคโลนีในภาชนะเลี้ยงเชื้อชนิดหลอด (round bottom) 96 ช่องที่ 37°C จนถึงระยะ exponential phase คาดว่าจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อขึ้นมาประมาณ 1 เดือน เนื่องจากเชื้อวันบัสมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ
2. ปั่นความเข้มข้นเชื้อให้ได้มาตรฐานโดยเก็บปริมาณสุ่มของสารมาตรฐาน McFarland no. 1 ซึ่งจะมีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ 10^8 เซลล์/ml
3. เจือจางเชื้อจากข้อ 2 ที่มีความสุ่มมาตรฐานให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^5 เซลล์/ml ซึ่งเป็นมาตรฐานจำนวนเชื้อในการทดสอบความไวของยาและการวิเคราะห์หาค่า MIC
4. เตรียมสารทดสอบให้อยู่ในรูปแบบละลายน้ำแล้ว
5. เจือจางสารทดสอบใน 4 ให้มีความเข้มข้นของสารต่าง ๆ กัน (0.1 - 10.0 μ g/ml) โดยใช้สารพ่นเชื้อเป็นสวิตช์ควบคุม ในความเข้มข้นอื่นๆ จะทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อเปรียบเทียบหาค่าถึงขอบมาตรฐาน
7. เติมน้ำ 96 μ l ของเชื้อจำนวนมาตรฐานในภาชนะเลี้ยงเชื้อซึ่งเตรียมในข้อ 4 ลงใน 96-well sterile microplate

8. เติม 90 μ l ของสารละลายทดสอบที่ความเข้มข้นต่างกันลงในข้อ 7
9. ปั่นเชื้อที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง
10. เติม 20 μ l ของ 10 เท่า Alamar Blue dye ลงทุกหลอดทดสอบและหลอดควบคุม ซึ่งได้แก่เชื้อที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบ (positive only) (positive control) และสารอาหารที่ไม่ใส่เชื้อ (sterile medium only) (negative control)
11. ปั่นเชื้อที่ 37°C สังเกตการเปลี่ยนสีของสี indicator ทุกวันเป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน ในเวลาให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบ (MIC) โดยตัดสินจากความเข้มข้นต่ำสุดของค่าที่ indicator ให้สีน้ำเงิน
12. เปรียบเทียบค่า MIC ของสารเพื่อค้นหาสารในกลุ่ม thionure ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการทำลายเชื้อวัณโรค
13. สรุปและรายงานผล

ส่วนที่ 2. การวิเคราะห์ผลของสาร thionure และอนุพันธ์ใหม่ต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid ในเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย (Analysis of effects of thionure and new derivatives on the inhibition of oleic acid synthesis in clinical isolate of *M. tuberculosis*)

การเปรียบเทียบเชิงปริมาณ (quantitative analysis) เพื่อวิเคราะห์หาสารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid สามารถทำได้โดยการติดฉลาก (radioactive labeling) สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ oleic acid ได้แก่ acetic acid ภายใต้ภาวะที่มีสาร thionure ทำการตรวจวัด oleic acid ที่ผลิตจากเชื้อวัณโรค เปรียบเทียบกับการควบคุม จำแนกสารวิเคราะห์เป็นระดับต่าง

1. เตรียมเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยในสภาวะเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว
2. เมื่อเชื้อเจริญมาถึงระยะ exponential phase เริ่มทำการทดสอบเทียบมาตรฐาน isotope ของโมเลกุลสารตั้งต้นเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC เพื่อควบคุมให้จำนวนเชื้อคงอยู่เท่ากันระหว่างหลอดควบคุม และหลอดทดสอบ
3. หลังจากให้สารทดสอบในระยะเวลานี้ ทำการติดฉลาก oleic acid โดยการเติมสาร acetic acid ที่ติดฉลากในอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. การวิเคราะห์ติดฉลาก ทำการปั่นเอียงเพื่อแยกกับเซลล์และการล้างเซลล์เพื่อกำจัด acetic acid ที่ติดฉลากซึ่งไม่ถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์

5. เพื่อให้สามารถแยกแยะและวิเคราะห์กรดไขมันชนิดต่างๆ รวมทั้ง oleic acid โดยวิธีทาง chromatography การโม่
มันจะถูกละลายเป็นอนุพันธ์ ester ทำการกลั่นสารไขมันเป็นอนุพันธ์ ester โดยใช้ สาร sodium/potassium
hydroxide ทำปฏิกิริยาที่ 100 °C 1 ชม.
6. สกัดอนุพันธ์ของกรดไขมัน แยกแยะวิเคราะห์กรดไขมันโดยวิธี thin layer chromatography และใช้กรดไขมัน
มาตรฐานเป็นตัวเทียบการวิเคราะห์กรดไขมันที่แยกได้
7. วัดปริมาณ oleic acid ที่มีผลจากซึ่งถูกสังเคราะห์เป็นใหม่ โดยใช้ scintillation counting
8. คำนวณค่าเฉลี่ยขึ้นกับการลดลงของการสังเคราะห์ oleic acid จากค่าที่มีอยู่ซึ่งมีผลตรวจพบใน oleic acid ซึ่ง
สกัดได้จากเนื้อเยื่อ ความสูงและกลุ่มทดสอบด้วยสารกลุ่ม thiourea หรือ ionized
9. ปฏิบัติเหมือนปกติขึ้นกับการลดลงของ oleic acid ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น
ของสาร) เพื่อหาผลที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการศึกษาการสังเคราะห์ oleic acid
10. สรุปและรายงานผล

ส่วนที่ 3. การวิเคราะห์ผลของสาร thiourea ต่อการแสดงออกของยีน *oxoA3* ในเชื้อยีสต์ (Analysis of thiourea and how derivatives on the expression of the *oxoA3* gene in *M. luteorubra*)

คณะผู้วิจัยจะทำการทดลองเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อยีน *oxoA3* ของเชื้อยีสต์
ด้วยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งการนี้เป็นการวัดปริมาณ DNA โดยใช้
mRNA เป็นแม่แบบ mRNA เป็นรหัสพันธุกรรมที่ถ่ายทอดจาก DNA ไปยังส่วนของกรดอะมิโน เพื่อใช้แสดงผลเป็น
โปรตีนหรือยีนใหม่ในขั้นตอน translation ต่อไป การแสดงยีนเป็นส่วนใหญ่วัดความสูงด้วยวิธีวัดความสูง ในบาง
ศึกษาส่วนนี้คณะผู้วิจัยจะศึกษาผลของสาร thiourea ต่อการแสดงออกของยีน *oxoA3* ซึ่งถือว่าเป็นยีนที่ถูกถอดรหัส
เป็นยีนใหม่ *oxoanase* (Phongsavan et al., 2001) และเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสังเคราะห์ oleic acid ขึ้นจน
การพัฒนารหัส RT-PCR เพื่อตรวจวัด mRNA ของ *oxoA3* ประกอบด้วย

1. กำหนด รหัสพันธุกรรมเป้าหมาย (target sequence) ที่จำเพาะต่อยีนส่วนของยีน *oxoA3* ของเชื้อยีสต์ การหา
ยีนส่วนจำเพาะของยีนของ *oxoA3* ที่มีความจำเพาะต่อยีนนั้น ได้จากการเทียบรหัสส่วนของยีน *oxoA3* ที่มีส่วนเหมือนกัน
(homology) กับยีนอื่นๆของเชื้อยีสต์และเชื้ออื่นๆ การวิเคราะห์ส่วนเหมือนกันของยีนจะให้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วย
วิเคราะห์ เลือกส่วนของยีน *oxoA3* ที่มีความแตกต่างจากยีนอื่นๆเป็นรหัสพันธุกรรมเป้าหมาย
2. ออกแบบ primers เพื่อใช้ในปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนของ

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR ยาศัยความสามารถในการจับเกาะของ primers ที่จำเพาะต่อรหัสพันธุกรรมเป้าหมาย และการต่อสายของ primers ให้ยาวขึ้นโดยเอนไซม์กระบวนการปฏิกิริยา polymerization และใช้ *desA3* ยีนที่อยู่ในบริเวณยีนกลุ่ม (pseudogene) เป็นต้นแบบของการต่อสาย primers

3. สกัดสาร RNA จากเชื้อวัณโรคโดยใช้ proteinase K และ lysozyme แล้วแยกเพื่อนำมาใช้ ขุดสกัด RNA คำนวณ ซึ่งจะนำมาคิดแปลงใช้กับการสกัด RNA จากเชื้อวัณโรค ทำการยับยั้งการทำลาย RNA โดยใช้ RNase inhibitor และทำสาร DNA ที่เป็นต้นแบบด้วยเอนไซม์ DNase สาร RNA ที่สกัดได้ในวิธี -20°C จะสามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ DNA จาก RNA ต่อไป

4. สังเคราะห์ DNA เป้าหมาย (cDNA synthesis) โดยใช้ RNA ที่สกัดได้เป็นต้นแบบ และใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ในการรวมใช้ในปฏิกิริยา reverse transcription

5. เพิ่มปริมาณของ DNA ที่เป็นชิ้นส่วน DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค polymerase chain reaction

6. ตรวจหาชิ้นส่วน DNA เป้าหมายโดยเทคนิค electrophoresis

การตรวจชิ้นส่วนของ DNA เป้าหมาย แสดงผลค่าเชิงบวกในการพัฒนาเทคนิคการ สามารถที่จะใช้วิธีการดังกล่าวศึกษาการตอบสนองของยีน *desA3* ซึ่งมีหลักฐานเบื้องต้นว่าเอนไซม์ที่มีรหัสยีน *desA3* ในการสังเคราะห์ oleic acid และเอนไซม์ที่มีเป้าหมาย (enzymatic target) ของสาร ของยีน ในการประยุกต์ใช้สำหรับเชื้อวัณโรค (Pharmakun et al., 2001)

ภายหลังการพัฒนาเทคนิค RT-PCR ในการตรวจวัด mRNA ของ *desA3* ทางต่อมาแล้ว จะได้ทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อและปริมาณ DNA (ตรวจหา) ในขั้นตอนนี้ที่จะต้องถูกเจือจางให้มีปริมาณต่ำๆกัน โดยทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นมาตรฐาน McFarland no. 1 จากนั้นทำการสกัด RNA สังเคราะห์ DNA จาก RNA เป้าหมาย ตรวจหา DNA เป้าหมายภายหลังการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction หลังจากขั้นตอนนี้จะช่วยในการวิเคราะห์ผล ในเชิงปริมาณ คาดว่าการพัฒนาวิธีตรวจวัด mRNA โดยเทคนิค RT-PCR จะเกิดผลสำเร็จภายในปีที่ 2

ในระยะสุดท้ายของแผนการดำเนินงานในปีที่ 2 จะใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นตรวจวัดระดับ mRNA ของ *desA3* ของเชื้อกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รักษา 700mg ขึ้นตอนประกอบด้วย

1. เพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคในอาหารเหลวที่ 37°C จนเชื้อโตอยู่ในระยะ exponential phase

2. ใช้สาร **thiourea** ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC เพื่อป้องกันมิให้มีการตายของเชื้อ และเพื่อควบคุมใช้จำนวนเซลล์ในหลอดทดลองเท่ากันกับชุดควบคุม
3. ชั่งการปั่นในระยะเวลาเพื่อเก็บเซลล์ ล้าง และทำการสกัด RNA
4. สังเคราะห์ DNA จาก RNA แบบ random โดยใช้ปฏิกิริยา reverse transcription
5. เพิ่มปริมาณ DNA ให้มีมากพอที่จะตรวจวัดได้โดยปฏิกิริยา polymerase chain reaction
6. วัดปริมาณ DNA แบบ random relative quantitation ด้วยเทคนิค electrophoresis เปรียบเทียบปริมาณ DNA เป้าหมายที่ได้ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง
7. สรุปและรายงานผล
10. จำนวนโครงการที่ผู้สมัครดำเนินการอยู่ โดยขอให้ระบุระยะเวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดของแต่ละโครงการ แหล่งทุน และงบประมาณที่สนับสนุนที่ได้รับ เวลาที่ใช้ทำโครงการวิจัยในแต่ละโครงการเป็นกี่ชั่วโมงต่อสัปดาห์ ทั้งในหัวหน้าโครงการ ผู้ร่วมโครงการของแต่ละโครงการที่กำลังดำเนินการอยู่

ชื่อโครงการ **Implementation of molecular tools in leprosy research and control**

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี ตั้งแต่ 2544-2547

แหล่งเงินทุนที่ได้รับการสนับสนุน **แผนรณรงค์มูลนิธิโรคเรื้อน ประเทศญี่ปุ่น (Sasakawa Memorial Health Foundation) สภามหาวิทยาลัย**

งบประมาณที่ได้รับ

สถานภาพผู้สมัคร

หัวหน้าโครงการ

ผู้ร่วมโครงการ

เวลาที่ทำวิจัยในโครงการนี้กี่ชั่วโมงต่อสัปดาห์ 25 ชั่วโมง

ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

1. ชื่อโครงการ: ทดสอบฤทธิ์ของสารต้านเชื้อวัณโรค thioamides และอนุพันธ์ใหม่ และผลต่อการแสดงออกของยีน *desA3* ในเชื้อวัณโรค

Thioamides and new derivatives as antituberculosis agents : Mode of action and effects on the expression of the *Mycobacterium tuberculosis* *desA3* gene สารต้านเชื้อวัณโรค

2. คณะผู้วิจัย

ชื่อหัวหน้าโครงการ: เบญจวรรณ เพชรสุรสีร์ Benjawan Phetsuksiri

คุณวุฒิ: ปริญญาเอก สาขา จุลชีววิทยา

ตำแหน่ง: นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ว)

งานวิจัย: การควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข

โทรศัพท์: 5801503, 5801567 โทรสาร: 5901473

ชื่อสำนักจัดซื้อบริการ: ม.ค.มท. ประสิทธิ์ ผลิตภัณฑ์การพิมพ์

ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โทรศัพท์: 2-600000

3. สาขาที่ทำการวิจัยสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เวชวิทยาทางทหารแพทย์

4. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

วัณโรค (tuberculosis) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ ภูมิคุ้มกันบกพร่องที่เรื้อรัง ขาดสารอาหาร

(*Mycobacterium tuberculosis* complex) จัดเป็นโรคติดต่อที่สำคัญที่เป็นสาเหตุของการป่วย การเสียชีวิต และการแพร่ระบาดของโรคในหมู่ประชากรทั่วทุกภูมิภาคของโลก ในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตด้วยโรควัณโรคประมาณ 2 - 3 ล้านคน และมีผู้ป่วยใหม่ประมาณ 8 - 10 ล้านคนต่อปี (Bloom and Murray, 1992; Iseman, 1994; Dain et al., 1994) การค้นพบยาต้านวัณโรคทำให้องค์การอนามัยโลกประกาศภาวะฉุกเฉินในปี พ.ศ. 2538 (ค.ศ. 1993) ถ้าหากไม่วัณโรคเป็นปัญหาระดับโลกที่ต้องได้รับความสนใจและแก้ไข (World Health Organization, 1994) อย่างไรก็ตามพบว่าวัณโรคกลับ

ขนาดมากขึ้น มีการคาดคะเนว่าจำนวนผู้ป่วยที่เสียชีวิตเนื่องจากวัณโรคจะยังคงเพิ่มขึ้นเป็น 4 ล้านคนในปี พ.ศ. 2547 (พ.ศ. 2004) (World Health Organization, 1998) และประเทศไทยได้ถูกจัดเป็น 1 ใน 6 ประเทศของทวีปเอเชีย ที่มีจำนวนผู้ป่วยวัณโรคสูงที่สุดรองจาก จีน อินเดีย, อินโดนีเซีย, บังกลาเทศ และเวียดนาม (ภาสกร อัครเสวี, 2543)

วัณโรคนับเป็นโรคสาหัสหาการดูแลสุขภาพที่มีประสิทธิภาพแก่ครอบครัวและสังคม จากข้อมูลระบาดวิทยาขององค์โรค กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข จำนวนผู้ป่วยวัณโรคได้เพิ่มขึ้น 3-4% ต่อปีนับตั้งแต่ พ.ศ. 2534 อัตราการป่วยได้เพิ่มขึ้นจาก 65 /100,000 ในปี 2534 เป็น 76 /100,000 ในปี พ.ศ. 2541 (ภาสกร อัครเสวี, 2543) สาเหตุหนึ่งที่ทำให้วัณโรคกลับระบาดทั้งในประเทศไทยและทั่วโลกภูมิภาครองโลกมีผลจากการแพร่ระบาดของโรคเขตร้อน (Antonucci et al., 1995; Zumla et al., 1999) ปัญหาเชื้อวัณโรคที่ขยายวงกว้างอีกปัจจัยหนึ่งที่วัณโรคระบาดเพิ่มขึ้น (Zumla et al., 1999) การเคลื่อนย้ายประชากรเคลื่อนที่กันเพื่อเข้าสู่ร่างกาย หรือเกิดโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องเข้าสู่ร่างกาย ปัจจัยที่ทำให้เชื้อวัณโรคสามารถขยายได้แก่ ผู้ป่วยวัณโรคที่ทานยาไม่ครบจำนวน ไม่สม่ำเสมอ หยุดขาดการรับประทานยาจนหาย ให้รับยาไม่ถูกขนาด เบื่อหน่าย ปัจจัยทางธรรมชาติอื่นๆ ที่เสริมให้เชื้อขยายได้แก่ โครงสร้างพิเศษของเยื่อเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมัน (fatty acids และ mycolic acids) หลายชนิดจำนวนมาก และการที่มีเชื้ออาศัยอยู่ภายในเซลล์ (intracellular pathogen) ทำให้ยากต่อการมีจำนวนของยาเข้าไปทำลายเชื้อ โดยทั่วไปการรักษาวัณโรคจะใช้ระบบยาหลายขนาน (multidrug therapy) เพื่อป้องกันปัญหาเชื้อดื้อยา ระบบยามาตรฐานเพื่อการควบคุมโรคและนำประเภทยาตัวยา isoniazid, rifampicin, ethambutol และ pyrazinamide หรือ streptomycin (Mishcon, 1995; Stratton and Reed, 1986) เนื่องจากเชื้อวัณโรคมีการเจริญเติบโตช้า ดังนั้นระยะเวลาในการรักษาจะนานอย่างน้อยประมาณ 6 เดือน (Glicker et al., 1984) ถึงแม้ว่าจะใช้ระบบยาหลายขนานในการรักษาพบว่าเชื้อวัณโรคมีการพัฒนาเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายขนาน (multidrug-resistant *M. tuberculosis*) ซึ่งได้แก่เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา isoniazid และ rifampicin และหรือเชื้อวัณโรคที่ดื้อยารุ่นอื่นๆ (Kochi et al., 1993) การรักษานักป่วยที่ดื้อยาหลายขนานมีความยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายสูง การรักษามีกลิ่นเหม็นต้องใช้ยาประเภทมาตรฐาน และมีอัตราการเป็นซ้ำ (relapse) สูง (Blanchard, 1996; Morris et al., 1996; Neville et al., 1994) การดื้อยา isoniazid และ rifampicin มีความสำคัญเนื่องจากอาจกล่าวเป็นยาหลัก (first-line drugs) ในสูตรยามาตรฐานระยะสั้น (short course chemotherapy) (Kochi et al., 1993) ทำให้ต้องใช้ยารอง (second-line drugs) ซึ่งมีประสิทธิภาพทำลายเชื้อที่ต่ำกว่าและมีผลข้างเคียงของยาสูง (Basso and Blanchard, 1998) ความล้มเหลวในการรักษาทำให้เชื้อยังคงเจริญเติบโต และสามารถแพร่ไปยังบุคคลอื่น ผู้ป่วยเหล่านี้จะมีชีวิตในที่สุดโดยมีอัตราการเสียชีวิตสูง 40 - 60% (Bloom and Murray, 1992) ปัญหา

ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid (Phatsuksin *et al.*, 2001) ขณะที่ยาเกินขนาดอาจทำให้เกิดการสะสม stearic acid ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 ตัวเช่นเดียวกับ oleic acid แต่ไม่มีพันธะคู่ ผลของยาจึงถูกนำไปสู่ข้อสรุปที่ว่า thiourea มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากยา isoniazid และ ethionamide โดยเน้นถึงการสังเคราะห์ oleic acid การใช้ thiourea เป็นเครื่องมือในการศึกษากลไกเป็นสิ่งที่น่าสนใจเพราะอาจนำไปสู่การค้นพบเป้าหมายใหม่ (new drug target) อีกทั้ง thiourea จัดเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อวัณโรคเมื่อพิจารณาจากค่า MIC ซึ่งเท่ากับหรือต่ำกว่าการสังเคราะห์ oleic acid จากสารตั้งต้น stearic acid ก็คือปฏิกิริยาถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ desaturase (Fujio and Bloch, 1964; Kashwabara *et al.*, 1975; Kashwabara and Sato, 1973) การศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้พบว่าเอนไซม์ desaturase ในเชื้อวัณโรคถูกถอดรหัสมาจากยีน *desA3* (Phatsuksin *et al.*, 2001) จึงอาจกล่าวได้ว่า thiourea ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ desaturase และน่าจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน *desA3*

ในโครงการวิจัยนี้คณะวิจัยจะใช้ thiourea เป็นเครื่องมือในการศึกษากลไกใหม่ในการออกฤทธิ์ทำลายเชื้อวัณโรคโดยมุ่งเน้นศึกษากลไกของการแสดงออกของยีน *desA3* และศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อวัณโรคของสาร thiourea กับสารอื่นใหม่ที่ได้จากการสังเคราะห์ และเปรียบเทียบผลของการยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid เพื่อการค้นหายาที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการทำลายเชื้อวัณโรคด้วยกลไกดังกล่าว งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งในการทดสอบเพื่อพิสูจน์ว่าสาร thiourea ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ desaturase ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของยีน *desA3* และเป็นส่วนหนึ่งที่จะกระตุ้นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ oleic acid จาก stearic acid

5. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความพยายามในการค้นหายาเป้าหมายใหม่ของยาส่วนหนึ่งได้จากการศึกษาความสำคัญของยีนและหน้าที่ความสำคัญของการโปรตีนเอนไซม์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของยีนนั้น (Jackson *et al.*, 1997) การพัฒนาเทคนิคใหม่เช่นการใช้ microarray assay ศึกษาการแสดงออกของยีนซึ่งจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยค้นหาเป้าหมายใหม่ของยา เพื่อการพัฒนา ยาใหม่ (Wilson *et al.*, 1999) โดยทั่วไปขั้นตอนถอดรหัสของยีนออกมาเป็นเอนไซม์หรือโปรตีน จะถูกควบคุมด้วยปัจจัยหลายชนิดเช่น cofactors, สาร intermediates ในกระบวนการเมตาบอลิซึม สารตั้งต้นหรือผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเกี่ยวข้อง การวิเคราะห์ยาที่เล็ดลอดไปยังปฏิกิริยาเฉพาะที่เอนไซม์กระตุ้นปฏิกิริยา จะทำให้เกิดการสะสมของสารตั้งต้นและการลดลงหรือหายไปของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา การวัดดังกล่าวจะเป็นตัวควบคุมการแสดงออกใน reverse transcription ของยีนที่ถอดรหัสได้เอนไซม์นั้น ดังนั้นการใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จึงเป็นวิธีการ

หนึ่งที่ใช้ในการศึกษากลไกการชะงักงันและการค้นหายาต้านมะเร็ง และเป็นวิธีใช้ศึกษาหน้าที่ของสารตั้งต้น และเอนไซม์เป้าหมาย (Wilson et al., 1999)

การศึกษานี้ได้เลือกใช้สาร thiourea ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างจากยา isoniazid และ ethionamide (Winder, 1982) มีหลักฐานรายงานว่า สาร thiourea คลุกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid ซึ่งปรากฏการณ์ไม่พบในเซลล์ของเชื้อวัณโรคที่ศึกษาด้วยยา isoniazid หรือ ethionamide (Phetsuksin et al., 2020) มีหลักฐานจำนวนมากที่การสังเคราะห์สำคัญของ oleic acid ของเซลล์ oleic acid เป็นกรดไขมันที่จำเป็นซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในเซลล์ของเซลล์ยูคาริโอตและพืช oleic acid มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และมีผลต่อการคงสภาพ osmolyte ซึ่งมีอิทธิพลต่อการทำงานปกติของเยื่อหุ้มเซลล์ในเยื่อหุ้มเซลล์ (Hung and Walker, 1970) บทบาทของ oleic acid ของเซลล์ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการสังเคราะห์ oleic acid และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการเป็นเป้าหมายในเชื้อวัณโรค งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ thiourea เป็นเครื่องมือในการศึกษาการชะงักงันการสังเคราะห์ oleic acid ศึกษาเอนไซม์และพื้นที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ oleic acid อีกทั้งทำการทดสอบประสิทธิภาพของอนุพันธ์ในแง่ของการทำลายเชื้อวัณโรคและการสังเคราะห์ oleic acid ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

6. การเชื่อมโยงกับนักวิจัยที่เป็นผู้เชี่ยวชาญในสาขาที่ทำการวิจัย

รศ.ดร. อิงคณา ขาวประเสริฐ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

รศ. สมณัญญ์ ธรรมสาร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. ระเบียบวิธีวิจัย

แบบการวิจัย แบ่งเป็น 3 ส่วน

ส่วนที่ 1. การประเมินประสิทธิภาพของสาร thiourea และอนุพันธ์ในแง่ของการทำลายเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย (Evaluation of bactericidal effect of thiourea and new derivatives on clinical isolate of *M. tuberculosis*) คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาร่วมกับประเมินประสิทธิภาพของสาร thiourea และอนุพันธ์ในแง่ของการทำลายเชื้อวัณโรค โดยวิเคราะห์ฤทธิ์ฆ่าเชื้อวัณโรคและค่า MIC ของสารทดสอบด้วยเทคนิค Microplate Alamar Blue Assay สืบค้นมาจากวิธีของ Yaylıoğlu และคณะ (1995) การทดสอบสีของสาร Alamar Blue dye (resazurin) เป็นตัวชี้การมีชีวิตของเชื้อ Alamar Blue dye เป็น oxidation-reduction (redox) indicator (Franzblau et al., 1998) ปฏิกิริยารีดอกซ์ ในระบบการเมตาบอลิซึมของเซลล์ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตหรือมีชีวิตจะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ Alamar

Blue dye จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูถึงแดง (Yajko et al., 1995). การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า Faublet และคณะ (1998) ได้นำ Alamar Blue dye มาประยุกต์ใช้ในการตรวจความไวของยาต้านเชื้อแบคทีเรียและการตรวจเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ค่า MIC ที่ได้โดยทำการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานอื่นๆ เมื่อเทียบกับค่า วิเคราะห์โดย Alamar Blue assay พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Faublet et al., 1998) เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวสามารถให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วและแม่นยำ จะได้นำมาประยุกต์ใช้ในการวิจัยนี้ ขึ้นตอนประกอบคือ

1. เพราะและเลี้ยงเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยทำการเลี้ยงเชื้อจาก 1 โคลนในสภาพเลี้ยงเชื้อของเหลว (liquid medium) บนเชื้อที่ 37°C จนถึงระยะ exponential phase คาดว่าจะให้ผลในทางเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 เดือน เนื่องจากเชื้อวัณโรคมีอัตราการเจริญเติบโตช้า
2. ปรับความเข้มข้นเชื้อให้ได้มาตรฐานโดยเทียบกับความทึบของสารมาตรฐาน McFarland no. 3 ซึ่งจะมีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ 10^7 เซลล์/มล
3. เจือจางเชื้อจากข้อ 2 ที่มีความทึบมาตรฐานให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^4 เซลล์/มล ซึ่งเป็นมาตรฐานจำนวนเชื้อในการทดสอบความไวของยาและการวิเคราะห์ค่า MIC
4. เตรียมสารทดสอบให้อยู่ในรูป/สารละลายเดียวกัน
5. เจือจางสารทดสอบใน 4 ให้มีความเข้มข้นของสารต่าง ๆ กัน (0.1 - 10.0 $\mu\text{g/ml}$) โดยให้ความหนาแน่นเชื้อเป็นค่าคงที่ ในความเข้มข้นนี้ จะทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อเปรียบเทียบหาค่าเบื้องต้นมาตรฐาน
6. เติม 60 μl ของเชื้อจำนวนมาตรฐานในจานเพาะเชื้อซึ่งเตรียมในข้อ 4 ลงใน 96-well sterile microplate
7. เติม 80 μl ของสารละลายทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในข้อ 6
8. บ่มเชื้อที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง
9. เติม 20 μl ของ 10 เท่า Alamar Blue dye ลงทุกหลุมทดสอบและหลุมควบคุม ซึ่งได้แก่เชื้อที่ไม่ได้รับยา ทดสอบ (culture only) (positive control) และอาหารที่ไม่ปลอดเชื้อ (sterile medium only) (negative control)
10. บ่มเชื้อที่ 37°C สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี indicator ทุกวันเป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน วิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบ (MIC) โดยตัดสินจากความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ indicator ให้น้ำเงิน
11. เปรียบเทียบค่า MIC ของสารเพื่อค้นหาสารในกลุ่ม thiourea ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการต้านเชื้อวัณโรค

ส่วนที่ 2. การวิเคราะห์ผลของสาร thiourea และอนุพันธ์ใหม่ต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid ในเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย (Analysis of effects of thiourea and new derivatives on the inhibition of oleic acid synthesis in clinical isolate of *M. tuberculosis*)

การเปรียบเทียบเชิงปริมาณ (quantitative analysis) เพื่อวิเคราะห์หาสารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid สามารถทำได้โดยการติดฉลาก (radioactive labeling) สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ oleic acid ได้แก่ acetic acid ภายใต้ภาวะที่มีสาร thiourea ทำการตรวจวัด oleic acid ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งแสดงการวิเคราะห์ปรากฏดังนี้

1. เพราะเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว
2. เมื่อเชื้อเจริญถึงระยะ exponential phase เติบโตจนครบระยะเวลามาตรฐาน 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC เพื่อควบคุมให้จำนวนเชื้อคงอยู่เท่ากันระหว่างชุดควบคุม และชุดทดสอบ
3. หลังจากได้สารทดสอบในระยะเวลาสั้น ทำการติดฉลาก oleic acid โดยการเติมสาร acetic acid ที่ติดฉลากในอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. ภายหลังจากติดฉลาก ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกกับเซลล์และการล้างเซลล์เพื่อกำจัด acetic acid ที่ติดฉลาก ซึ่งไม่ถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์
5. เพื่อให้สามารถแยกและวิเคราะห์กรดไขมันชนิดต่างๆ รวมทั้ง oleic acid โดยวิธีทาง chromatography กรดไขมันจะถูกเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ ester ทำการเปลี่ยนกรดไขมันเป็นอนุพันธ์ ester โดยใช้ สาร methylmagnesium iodide hydride ทำปฏิกิริยาที่ 100°C 1 ชั่วโมง
6. สกัดอนุพันธ์กรดไขมัน และแยกวิเคราะห์กรดไขมันโดยวิธี thin layer chromatography และใช้กรดไขมันมาตรฐานเป็นค่าเทียบอนุกรมกรดไขมันที่แยกได้
7. วัดปริมาณ oleic acid ที่ติดฉลากซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ โดย scintillation counting
8. คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของการสังเคราะห์ oleic acid จากค่าที่นับเล็งรังสีที่ตรวจพบใน oleic acid ซึ่งสกัดได้จากในชุดควบคุมและกลุ่มทดสอบด้วยสารกลุ่ม thiourea หรือ isoniadid
9. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดลงของ oleic acid ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (ทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อลดความแปรปรวนของสาร) เพื่อหาสารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid

ส่วนที่ 3 การวิเคราะห์ผลของสาร theourea ต่อการแสดงออกของยีน *docA3* ในเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย
(Analysis of theourea and new derivatives on the expression of the *docA3* gene in *M. tuberculosis*)

คณะผู้วิจัยจะทำการทดสอบเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อยีน *docA3* ของเชื้อวัณโรค ด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) วิธีการนี้เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ mRNA เป็นแม่แบบ mRNA เป็นรหัสพันธุกรรมที่ถ่ายทอดจาก DNA ในขั้นตอน transcription เพื่อใช้ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ควบคุมวัณโรคในชั้นตอนของการเติบโต การแสดงของยีนส่วนในผู้ป่วยควบคุมด้วยวิธี RT-PCR จะดำเนินการศึกษาส่วนนี้คณะผู้วิจัยจะศึกษาผลของสาร theourea ต่อการแสดงออกของยีน *docA3* ซึ่งเชื่อว่าเป็นยีนที่ถูกถอดรหัสเป็นเฮนไซม์ *doxaminase* (Phetchum et al., 2001) ซึ่งเกี่ยวเนื่องกับปฏิกิริยาการสังเคราะห์ isonicotinic acid ซึ่งสามารถพัฒนาเทคนิค RT-PCR เพื่อตรวจวัด mRNA ของ *docA3* ประกอบด้วย

1. การทดสอบรหัสพันธุกรรมเป็นภาษา (sequence alignment) ที่จำเพาะต่อยีนส่วนของยีน *docA3* ของเชื้อวัณโรค การหาชิ้นส่วนจำเพาะของยีนของ *docA3* ที่มีความจำเพาะต่อยีนนั้น ได้จากการเทียบหาส่วนของยีนที่มีส่วนเหมือนกัน (homology) กับยีนที่ทราบของเชื้อวัณโรคและเชื้ออื่นๆด้วย การวิเคราะห์ส่วนเหมือนกันของยีนจะใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยวิเคราะห์
2. ออกแบบ primers เพื่อใช้ในปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมในส่วนของ ยีนที่จำเพาะเป็นรหัสพันธุกรรมเป็นภาษา การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ PCR อาศัยความสามารถในการจับเกาะของ primers ที่จำเพาะต่อรหัสพันธุกรรมเป็นภาษา แต่การทดสอบของ primers ได้มาซึ่งเกิดโดยไฮโดรเจนคู่ปฏิกิริยา polymerization และใช้ *docA3* เป็นที่มีอยู่ในปริมาณเล็กน้อย (quantity) เป็นต้นแบบของการทดสอบ primers
3. สกัดสาร RNA จากเชื้อวัณโรคโดยใช้ proteinase K และ lysozyme วิธีการเทียบกับการใช้ ชุดสกัด RNA สำเร็จรูป ซึ่งจะนำมากัดและใช้กับสารสกัด RNA จากเชื้อวัณโรค ทว่าการนับจึงควรทำสาร RNA โดยใช้ RNase inhibitor และทำสาร DNA ที่ไม่เป็นอันตรายต่อ DNase สาร RNA ที่สกัดได้เก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ในปฏิกิริยา Reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ DNA จาก RNA ต่อไป
4. สังเคราะห์ DNA เป็นภาษา (cDNA synthesis) โดยใช้ RNA ที่สกัดได้เป็นต้นแบบ โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ในการกระตุ้นปฏิกิริยา reverse transcription

5. เพิ่มปริมาณของ DNA ที่เป็นชิ้นส่วน DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค polymerase chain reaction

6. ตรวจสอบชิ้นส่วน DNA เป้าหมายโดยเทคนิค electrophoresis

การตรวจสอบชิ้นส่วนของ DNA เป้าหมาย แสดงผลสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคการ สามารถที่จะใช้วิธีการดังกล่าวศึกษาการตอบสนองของยีน *cds43* ซึ่งมีหลักฐานเบื้องต้นว่าเป็นยีนที่ถ่ายทอดให้ยีนใหม่ *cds43ase* ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และยีนใหม่เป้าหมาย (enzymatic target) ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการถอดรหัสทำสายเชื้อโรค

ภายหลังการพัฒนาเทคนิค RT-PCR ในการตรวจวัด mRNA ของ *cds43* ข้างต้นแล้ว จะได้ทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อและปริมาณ DNA ที่ตรวจสอบ ในขั้นตอนนี้เชื้อจะถูกเจือจางให้มีปริมาณต่างกัน โดยทำการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐาน McFarland no. 1 จากนั้นทำการสกัด RNA สังเคราะห์ DNA จาก RNA แบบ แขน ตรวจสอบ DNA เป้าหมายภายหลังการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction ผลจากขั้นตอนนี้จะช่วยในการวิเคราะห์ mRNA ในเชิงปริมาณ หากทำการพัฒนาวิธีตรวจวัด mRNA โดยเทคนิค RT-PCR จะเกิดผลสำเร็จภายในข้อที่ 2

ในที่สุดท้ายของผลการดำเนินงานในปีที่ 2 จะใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นตรวจวัดระดับของ mRNA ของ *cds43* ของเชื้อกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับการทดลอง ขั้นตอนมีรายละเอียด

1. เพาะเลี้ยงเชื้อโรคในสภาพเหลวที่ 37°C จนเชื้อโตอยู่ในระยะ exponential phase
2. ให้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการตายของเชื้อ และเก็บควบคุมไว้จำนวนเฉลี่ยเท่ากับในชุดควบคุม
3. ทำการเตรียมเชื้อเพื่อเก็บเซลล์ ล้าง และทำการสกัด RNA
4. สังเคราะห์ DNA จาก RNA แบบแบบ โดยใช้ปฏิกิริยา reverse transcription
5. เพิ่มปริมาณ DNA ในปริมาณที่จะตรวจวัดได้โดยปฏิกิริยา polymerase chain reaction
6. วัดปริมาณ DNA เป้าหมายแบบ relative quantitation ด้วยเทคนิค electrophoresis เปรียบเทียบปริมาณ DNA เป้าหมายที่ใส่ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง
7. สรุปและรายงานผล

8. ขั้วแผนการสอนการวิจัย

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสาร thiourea สามารถทำลายเชื้อวัณโรคได้ที่มีความเข้มข้นต่ำ จึงได้มีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ใหม่เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อวัณโรคที่ดีขึ้นกว่าสารแม่แบบเดิม ปัจจุบันมีสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมากกว่า 20 ชนิด ในโครงการนี้จะศึกษาเปรียบเทียบผลของ thiourea และอนุพันธ์ใหม่จำนวน 2 ชนิด ซึ่งได้ผ่านการทดสอบเบื้องต้นแล้วว่ามีความปลอดภัยในการทำลายเชื้อวัณโรคที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (avirulent strain) มีความเข้มข้นของสารต่ำ ผลของสาร thiourea และอนุพันธ์ใหม่จะถูกทดสอบฤทธิ์ทำลายเชื้อวัณโรคและผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid กับเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยมาใช้ในการรักษาที่โรงพยาบาลโรคทรวงอก ภายหลังที่แยกเชื้อได้เชื้อจะถูกเลี้ยงอยู่ในบริเวณที่จำกัดสำหรับปฏิบัติการโรคติดเชื้อร้ายแรง (P3 level) มีการฆ่าเชื้อสารละลายด้วยเครื่องใช้และอุปกรณ์ที่สัมผัสกับเชื้อจะถูกนำไปฆ่าเชื้อก่อนนำไปทิ้ง และอุปกรณ์ใช้งานจะป้องกันตนเองด้วยการสวมเสื้อคลุม ถุงมือ และหน้ากากตลอดระยะเวลาทำงาน ส่วนวัสดุที่เป็นก้อนกับวัสดุภาพรังสีจะถูกใช้และถูกกำจัดอยู่ในบริเวณที่กำกวม และปฏิบัติตามคำแนะนำของหน่วยงานความปลอดภัยตามคู่มือเพื่อสันติ ส่วนการศึกษาผลของสาร thiourea ต่อการสังเคราะห์กรดไขมัน จะใช้เชื้อวัณโรคสายพันธุ์ H37 Rv ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคและสามารถเพาะเลี้ยงได้ในการดำเนินการ (sequencing) เบื้องต้นแล้ว

9. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย

Microcentrifuge	มีแล้ว
Thermocycle machine	มีแล้ว
Computer software	มีทั้งทางส่วน
Electrophoresis unit	มีแล้ว
Transilluminator	มีแล้ว
Scintillation counter	มีแล้ว

10. แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

แผนการดำเนินงานในปีที่ 1 การประเมินประสิทธิภาพของสาร thiourea และอนุพันธ์ใหม่ในการทำลายเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย และการยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid

ในระยะแรกของแผนการดำเนินงานในปีที่ 1 จะทำการศึกษานำเปรียบเทียบผลของสาร thiourea และอนุพันธ์ใหม่ในการทำลายเชื้อวัณโรคโดยวิธี Microplate Alamar Blue Assay โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคที่แยกเก็บ

ได้จากปฏิบัต การเตรียมสารละลายในรูปแบบของเหลว การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารที่ดัดแปลงผลตอบ
ในความสำเร็จวันที่กำหนด การปรับจำนวนเชื้อให้ได้ความหนาแน่นมาตรฐาน การเพาะเชื้อบน microplate การนับเชื้อ การ
วิเคราะห์ บันทึกและสรุปผล คาดว่างานส่วนนี้จะแล้วเสร็จในเวลา 2-3 เดือนเนื่องจากเชื้อวันโรคมีอัตราการเจริญเติบโต
โตช้า

การศึกษาของสาร thioamides และอนุพันธ์ต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ oleic acid จะได้ดำเนินการภายหลังจาก
การปลูกเชื้อข้างต้น ในการศึกษาส่วนนี้เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อวันโรคในสภาพเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคาดว่าจะใช้
สภาพนานประมาณ 1 เดือนจึงจะได้เชื้ออยู่ในระยะ exponential phase ตามด้วยการ ทำการศึกษาผลกระทบของสาร
ได้แก่สารที่มีสาร thioamides หรือสารทดแทนอื่นๆ ต่อการเจริญของกรดไขมัน เช่นกรดไขมัน oleic acid โดยวิธี thin
layer chromatography วิเคราะห์หาปริมาณ oleic acid ที่ผลิตออก เปรียบเทียบกับปริมาณ oleic acid ที่มีในสภาพ
ระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม คาดว่าผลการศึกษาในสองสัปดาห์จะแล้วเสร็จและเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ผล
งานที่สามารถเกิดขึ้นได้จากการศึกษานี้คือ Antituberculous activity of thioamides and new derivatives
through the inhibition of oleic acid synthesis

แผนการดำเนินงานในขั้นที่ 2 การศึกษาของสาร thioamides ในการแสดงออกของ desA3 ในเชื้อวันโรค
การศึกษาเริ่มจากการพัฒนาวิธีตรวจหา mRNA ของยีน desA3 ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase
chain reaction (RT-PCR)

เมื่อพัฒนาเทคนิคได้แล้ว จะนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจหา mRNA ของ desA3 ทำการเลี้ยงเชื้อวันโรค
ในภาวะที่มีสาร thioamides และภาวะควบคุม ควบคุมจำนวนเชื้อทั้งสองภาวะให้มีจำนวนไม่แตกต่างกัน ทำการแยก
เก็บ RNA ในระหว่างนี้จะได้ทำการศึกษาก่อนส่วนที่จำเพาะของ desA3 และออกแบบ primers ที่จะใช้รับตรง
polymerase chain reaction ทำการสังเคราะห์ DNA จาก RNA แบบโพลีเมอไรเซชัน reverse transcription และให้
โพลิเมอไรเซชัน polymerization เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายซึ่งได้แก่ชิ้นส่วนของ desA3 ตรวจหา DNA เป้าหมาย
เปรียบเทียบปริมาณ DNA เป้าหมายในชุดควบคุมและทดสอบ ซึ่งจะได้ผล ทำการสรุปและรายงานผลประจำปี ผล
งานวิจัยที่สามารถเกิดขึ้นได้จากการศึกษานี้คือ Effects of thioamides, a desaturase inhibitor, on the
expression of *M. tuberculosis* desA3 gene

11. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานศึกษานี้เกี่ยวข้องกับโรคไวรัสโคโรนาซึ่งประกอบด้วยการศึกษาในหลายด้าน เช่นการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา การวินิจฉัยและวัคซีนใหม่ การพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยโรค การประเมินผลการรักษา การศึกษาผลกระทบด้านสุขภาพ ความก้าวหน้าในการศึกษาเหล่านี้ส่วนหนึ่งมาจากความก้าวหน้าในองค์ความรู้ด้านชีวโมเลกุล ในโครงการวิจัยนี้ นอกจากจะเป็นการศึกษาหาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับหน้าที่ของยีนและเซนเซอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงของเชื้อไวรัสโคโรนาแล้ว การใช้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเซนเซอร์ใหม่เป็นเครื่องมือในการศึกษา จะช่วยแสดงให้เห็นถึงบทบาทของเซนเซอร์ใหม่ที่สามารถเป็นเป้าหมายใหม่ของการรักษาโรค หากไม่เช่นนั้นอาจมีงานมากกว่ามีสารที่ยับยั้งฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเซนเซอร์ใหม่ได้ ผลการศึกษานี้จะนำไปสู่การค้นพบเป้าหมายใหม่ของการรักษา และการพัฒนาการรักษาโรคไวรัสที่มีกลไกในการออกฤทธิ์แตกต่างไปจากยาที่มีอยู่เดิม ผลจากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการรักษาและควบคุมโรคโคโรนาโดยเฉพาะในโรคที่มีอุบัติการณ์ระบาด

การศึกษานี้มีประโยชน์ต่อของหลายในการทำลายเชื้อไวรัสและผลของการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส จะเป็นประโยชน์ต่อการค้นหาสารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านไวรัส (หากโครงการนี้ประสบความสำเร็จจากการศึกษาจะได้องค์ความรู้ใหม่ที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีน และได้ข้อสรุปว่ายาต้านไวรัสจากเชื้อไวรัสโคโรนาที่มีใช้ในปัจจุบัน คือ ไรบาเวอริล เป็นสารที่กลุ่มหนึ่งที่น่าสนใจด้วยกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากยาต้านไวรัสที่มีในปัจจุบัน การค้นพบของโครงการนี้จะสามารถนำไปสู่การค้นพบสารใหม่ที่มีคุณสมบัติทำลายเชื้อไวรัสโคโรนาตัวอื่นๆ

12. งบประมาณ

ปีที่ 1

เงินเพิ่มค่าครองชีพของผู้วิจัย (10,000 X 12)	120,000 บาท
ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	80,000 บาท
อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารสกัดจาก, สารเคมี, ฟิล์ม, microplate, sterile plastic wares ฯลฯ	

ปีที่ 2

เสนอขอประมาณ ปีละ 200,000 บาท เท่าเดียวกับงบประมาณที่เสนอขอในปีที่ 1

เงินเพิ่มค่าครองชีพของผู้วิจัย (10,000 X 12)	120,000 บาท
ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	80,000 บาท
ชุดสกัด RNA, dNTPs, เอนไซม์ polymerase, agarose gel, sterile plastic wares ฯลฯ	

