รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของยีนของ *Burkholderia pseudomallei* ในหนูทดลอง

โดย

รศ.รศนา วงศ์รัตนชีวิน

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เมษายน 2554

สัญญาเลขที่ RMU4980044

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของยีนของ *Burkholderia pseudomallei* ในหนูทดลอง

รศ.รศนา วงศ์รัตนชีวิน
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : RMU4980044

Project Title : การวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของยีนของ *Burkholderia pseudomallei* ในหนูทดลอง

Investigator : รศ.ดร.รศนา วงศ์รัตนชีวิน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address : rasana@kku.ac.th

Project Period : 20 กรกฎาคม 2549- 20 กรกฎาคม 2552

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียกรัมลบ สาเหตุของโรคเมลิออยโดสิสที่พบได้ทั้งในคนและสัตว์ เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อม การติดเชื้อผ่านทางบาดแผล ทางเดินหายใจ และทางการกิน เป็นสาเหตุการติดเชื้อในกระแสเลือดจากเชื้อถิ่นในประเทศไทยถึง 20% อัตราการตายหลังการติดเชื้อในกระแสเลือดสูงถึง 40% เชื้อที่พบในผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมมีความรุนแรงในการก่อโรคได้หลากหลาย และการจัดจำแนกที่มีอยู่ในปัจจุบันสามารถพบกลุ่มเดียวกันได้ทั้งจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม และไม่ขึ้นกับความรุนแรงในการก่อโรค ปัจจัยพื้นฐานของผู้ได้รับเชื้อจึงน่าจะเป็นส่วนสำคัญที่นำไปสู่ความรุนแรงที่แตกต่าง การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการเกิดโรค เช่น type III secretion system 3 และ type 6, pili, flagella ฯลฯ ยังไม่สามารถอธิบายความรุนแรงของการเกิดโรคที่ต่างกันได้ ในงานวิจัยนี้จึงหา marker ที่สามารถใช้จำแนกเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและจากผู้ป่วย และยีนใหม่ที่สัมพันธ์กับการก่อโรคซึ่งแสดงออกต่างกันในสัตว์ทดลองที่มีปัจจัยพื้นฐานของระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันโดยใช้เทคนิค DNA microarray ซึ่งมียีนของ *B. pseudomallei* K96243 sequence strain เมื่อเปรียบเทียบจีโนมของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย และสิ่งแวดล้อม พบว่ามี 4 GIs ที่พบในทุก isolate เหมือนกับ K96243 และ15 GIs ที่แตกต่าง โดย GIs ในเชื้อจากผู้ป่วยมีความหลากหลายมากกว่า และมีบาง GI ที่ต่างกันชัดเจนระหว่างเชื้อจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม แต่ virulence ของแต่ละ isolate เมื่อทดสอบใน BALB/c mice ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบ GI เหล่านี้โดย PCR ในอีก 96 isolate พบว่า clinical isolate มี GI8a 58-60% ในขณะที่ soil isolates มี 2-15% และพบ GI 17 48-50% ใน clinical isolates และ 2% ใน soil จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ตรวจติดตามแหล่งที่มาของเชื้อเมื่อมีการระบาด สำหรับยีนที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค ได้นำหนู BALB/C ที่ไวต่อการเกิดโรค และ C57BL/6 ที่ค่อนข้างทนต่อการเกิดโรคมาศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค DNA microarray C57BL/6 มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ยีนที่เกี่ยวกับกลไกการตอบโต้ของเชื้อลดลง BALB/c มีการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ ยีนการอยู่รอดของเชื้อและยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการก่อโรคก็เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งนำไปอธิบายความไวในการก่อโรคของหนู BALB/C ได้ดี ได้คัดเลือก 2 ยีน ที่มีการแสดงออกต่างกันในหนูทั้งสองกับสิ่งแวดล้อมอย่างชัดเจนไปศึกษา ต่อมา 2 ยีน ที่เลือกทำการทดลองมีการตีพิมพ์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับ type VI secretion system และ TssM ที่ควบคุมการแสดงออกโดย Type III secretion system นับเป็นแนวทางคัดเลือกที่ถูกต้อง แต่จำเป็นต้องคัดเลือกยีนเพิ่มเพื่อศึกษาต่อไป

Keywords : *B. pseudomallei*, Genomic islands, DNA microarray, virulence genes

Abstract

Project Code : RMU4980044

Project Title : Analysis of gene expression profile of *Burkholderia pseudomallei* in mice model

Investigator : Rasana Wongratanacheewin, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

E-mail Address : rasana@kku.ac.th

Project Period : 20 July 2006- 20 July 2009

Burkholderia pseudomallei is a saprophytic Gram-negative bacterium that causes melioidosis in humans and animals. The routes of infection are through inhalation, ingestion and skin abrasion. In Thailand, it is accounts for 20% of community-acquired septicemias where the mortality rate is up to 40%. Bacteria isolated from environment and clinical samples showed no significant different in virulence and molecular typing methods are unable to classify them according to virulence or source. Immune response and underlining diseases of host may contribute to the severe manifestation of the disease. The expression level of virulence genes such as type III secretion system 3, type 6, pili and flagella could only partially explain manifestation and gradient severity of the disease. Therefore, DNA microarray containing genes of *B. pseudomallei* K96243 sequence strain was used to screen for a suitable marker to identify environmental out of clinical isolates and novel genes that have different expression level under different immune background in animal model. When 2 environmental and 3 clinical isolates were compared, 4 genomic islands (GIs) were found to be in common with the K96243. Higher variability of GIs was observed in clinical isolates. However, the virulence in BALB/c mice was not significantly difference. A few GIs that different from clinical to environmental isolates were selected and tested by PCR in 96 isolates. GI8a was found in 58-60% of clinical while only 2-15% in soil isolates. GI 17 was detected in 48-50% of clinical and only 2% in soil isolates. The GI detection may be a useful tool to trace the source of infection in nature for epidemiological purpose. The bacterial gene expression profile in BALB/c (sensitive) and C57BL/6 (resistance) was compared using DNA microarray. Genes related to cell cycle were express higher in C57BL/6 but not in defense mechanism. On the other hand, genes related to cell cycle, survival and virulence were all express higher in infect BALB/c. These could explain the more sensitive to infection in BALB/c. Two genes that significantly express differently between 2 mice and *in vitro* were selected. Unfortunately, 2 of them were recently published as a unit in type 6 secretion system and a TssM protein control by Type III. It confirmed suitable criteria we chose but we need to find more unknown function genes for further study.

Keywords : *B. pseudomallei*, Genomic islands, DNA microarray, virulence genes

Executive summary

วัตถุประสงค์ เปรียบเทียบ Gene expression profile ของ *Burkholderia pseudomallei* strain1909a ในหนูทดลอง BALB/C และ C57BL/6 ซึ่งเป็นหนูที่ susceptible และ relatively resistance ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับการแสดงออกเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องทดลอง เพื่อหายีนที่แสดงออกสัมพันธ์กับการก่อโรค และ ศึกษา genome plasticity ของเชื้อที่ก่อโรคและเชื้อที่แยกจากธรรมชาติเพื่อหา marker ในการตรวจติดตามเชื้อที่อาจเป็นสาเหตุของการระบาดของโรค

การดำเนินการ infect หนู BALB/C และ C57BL/6 ด้วย *B. pseudomallei* strain1909a โดย intraperitoneal route ให้เกิด acute infection จากนั้นสกัด RNA จาก *B. pseudomallei* strain เดียวกันที่เจริญถึง mid-log phase ในอาหาร LB broth และจาก ปอด ตับ และม้าม ของหนู BALB/C และ C57BL/6 ที่ได้รับเชื้อดังกล่าว เปลี่ยนเป็น cDNA ด้วย genome directed primers ติดฉลาก cDNA ด้วย Cy3 หรือ Cy5 แล้ว hybridize กับ DNA Microarray ที่มียีนของ *B. pseudomallei* sequence strain K96243 โดยเทียบกับ genomic DNA ของ strain K96243 ซึ่งถือเป็นตัว normalize นอกจากนี้ได้เพิ่มการศึกษา genome plasticity ของ *B. pseudomallei* โดยใช้ Genomic DNA ของ isolate ที่แยกได้จากผู้ป่วย 3 isolates และ จากดิน 2 isolates มา hybridize กับ DNA Microarray slide เปรียบเทียบกับ strain K96243 เพื่อดู gene deletion

สิ่งที่พบ เมื่อฉีดในหนู BALB/C และ C57BL/6 ด้วย *B. pseudomallei* strain1909a ประมาณ 10^3 เซลล์ ($50LD_{50}$) จะเกิด acute infection หนู BALB/C ตายภายใน 7 วัน ส่วน C57BL/6 จะตายในประมาณ 11 วัน สามารถพบเชื้อในเลือดในวันที่ 2 แต่จำนวนไม่แน่นอน และไม่มากพอที่จะนำไปสกัด RNA ใน 3-4 วัน ปอด ตับ และม้ามจะมีเชื้อประมาณ 10^5 จึงสกัด RNA ของเชื้อจากปอด ตับ และม้ามในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อให้หนู การใช้ genome directed primers ให้ sensitivity ดีกว่า random primer ในการเปลี่ยน total RNA เป็น cDNA ในหนู C57BL/6 มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ยีนที่เกี่ยวกับกลไกการตอบโต้ของเชื้อลดลง ขณะที่ *B. pseudomallei* ในหนู BALB/c มีการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ที่มากกว่า อีกทั้งยังพบว่า *B. pseudomallei* มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเชื้อได้แก่ chemotaxis และ motility, secondary metabolism, drug resistant genes, gene modulate pathogenicity และ host-bacterial interaction ได้แก่ Type III secretion system, Type VI secretion system, capsule, fimbriae และ pili, exoproteins, adhesins และ RpoS transcription regulator เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค โดยเปรียบเทียบสัดส่วนของ gene expression profile ของ *B. pseudomallei* vivo/in vitro ในม้าม ปอด และตับของหนู BALB/c กับ C57BL/6 โดยคัดเลือกยีนที่มี expression ratio มากกว่า 2SD หรือ น้อยกว่า -2SD เมื่อเทียบในอวัยวะเดียวกันของหนูสองชนิด แล้วนำไปยืนยันด้วย qReal-Time RT-PCR. พบว่ายีนที่เข้าข่ายนั้นเป็นยีนที่เคยมีรายงานว่าสำคัญต่อการก่อโรค หรือความรุนแรงของการก่อโรค และพบยีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่

จำนวนหนึ่งซึ่งจัดเป็น novel gene ที่อาจสำคัญต่อการก่อโรคของแบคทีเรีย จึงคัดเลือก 2 ยีน มาเพื่อทำ mutant และศึกษาต่อ แต่ต่อมาในปี 2009 และ 2010 2 ยีนนั้น มีผู้ทยอยตีพิมพ์ โดยยีนหนึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ type VI secretion system และอีกยีนเป็น TssM ซึ่งควบคุมการแสดงออกโดย Type III ซึ่งต้องไปคัดเลือกยีนใหม่เพื่อศึกษาต่อไป

การศึกษา genome plasticity พบว่า genome ของ *B. pseudomallei* 5 isolates ที่นำมาเปรียบเทียบ ส่วนมากมีความเหมือนกับ K96243 sequence strain และเมื่อศึกษาบริเวณที่เป็น genomic islands (GIs) จะมี 4 GIs ที่พบในทุก isolate เหมือนกับ K96243 และ15 GIs ที่มีความแตกต่างโดยพบความต่างของ GI pattern ระหว่าง clinical และ environmental isolates นอกจากนี้ variability ของ GIs ใน clinical isolates ยังมีมากกว่า แต่ virulence ของแต่ละ isolate เมื่อทดสอบใน BALB/c mice ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นความแตกต่างของ GIs จึงน่าจะช่วยให้แบคทีเรียอยู่รอดได้ดีขึ้น แต่ไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคโดยตรง นอกจากนี้จากการ hybridization ของ genomic DNA และยืนยันด้วย PCR ใน *B. pseudomallei* 96 isolates พบว่า clinical isolate มี GI8a 58-60% ในขณะที่ soil isolates มี 2-15% และ GI 17 พบได้ใน 48-50% ของ clinical isolates และ soil 2% จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการตรวจติดตามแหล่งที่มาของเชื้อว่าเป็นเชื้อจากผู้ป่วยหรือสิ่งแวดล้อมเมื่อมีการระบาด

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของยีนของ *Burkholderia pseudomallei* ในหนูทดลองได้รับทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษาปี 2549 จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทนำ

เมลิออยโดสิสเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบ *Burkholderia pseudomallei* ที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างอิสระในธรรมชาติ แต่เมื่อเข้าสู่ร่างกายคนหรือสัตว์ สามารถทำให้เกิดโรคที่มีอาการแตกต่างได้ตั้งแต่การติดเชื้อโดยไม่มีอาการ ติดเชื้อเฉพาะที่ ติดเชื้อแบบแพร่กระจาย และการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งมีอัตราการตายที่สูงกว่า 40% ของผู้ติดเชื้อและอาจเสียชีวิตได้ภายใน 48 ชั่วโมงแม้ได้รับยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม (Chaowagul, White et al. 1989) เชื้อนี้พบระบาดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย นอกจากนี้ยังมีรายงานในประเทศจีนตอนใต้ อินเดียตอนใต้ และ อาฟริกา และยังมีรายงานการพบเชื้อในดินหรือมีผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อจากการเดินทางมายังแหล่งระบาดได้ในบางประเทศในยุโรป เช่น เยอรมันและฝรั่งเศส (White 2003; Cheng and Currie 2005) การใช้เทคนิคต่าง ๆ ทางอณูชีววิทยาเพื่อจำแนกเชื้อที่พบในธรรมชาติออกจากเชื้อที่พบในผู้ป่วย และจำแนกแหล่งที่มาของเชื้อที่พบทั่วโลก ยังไม่ประสบความสำเร็จ (U'Ren, Schupp et al. 2007) ดังนั้นเชื้อที่พบในธรรมชาติอาจเป็นเชื้อที่พบอยู่แต่เดิมหรือเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อที่มาจากผู้ป่วยก็ได้ ทำให้การติดตามการระบาดเป็นไปได้ยาก นอกจากนี้เชื้อที่แยกได้จากดินและผู้ป่วยหรือเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงต่างกัน พบว่ามีความรุนแรงในการก่อโรคในหนูไม่แตกต่างกัน (Ulett, Currie et al. 2001) ดังนั้นปัจจัยในการทำให้เกิดอาการ และความรุนแรงของโรคที่มีความแตกต่างกันได้มาก บางส่วนอาจมาจากปัจจัยของแบคทีเรีย ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และอีกส่วนที่สำคัญ น่าจะมาจากพื้นฐานทางพันธุกรรมหรือระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อเอง เนื่องจาก *B. pseudomallei* ไม่ได้สร้างสารพิษที่มีผลรุนแรงต่อการติดเชื้อและอัตราการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อโดยตรง แต่เป็นปัจจัยร่วมต่าง ๆ เช่น capsule, flagellin, type III และ type VI secretion system ซึ่งสามารถหลั่งโปรตีนจากแบคทีเรียผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ผู้ติดเชื้อได้โดยตรง ฯลฯ อย่างไรก็ตาม ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ ยังไม่สามารถอธิบายความรุนแรงของการก่อโรคที่มีความหลากหลาย ได้ทั้งหมด ดังนั้นการจำแนกยีนอื่น ๆ ของแบคทีเรียที่มีบทบาทในการก่อโรคจึงยังมีความจำเป็น เพื่อเข้าใจกลไกการก่อโรคและนำไปสู่การป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อทำการทดลองในหนูที่ไวต่อการเกิดโรคเมลิออยที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* กลไกระหว่างหนูและแบคทีเรีย จะกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิสึมที่เปลี่ยนไปจากเมื่อแบคทีเรียอยู่ในสิ่งแวดล้อมภายนอก และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกที่ใช้ในการอยู่รอดในหนู ซึ่งเป็นการก่อโรคในมุมมองของผู้ติดเชื้อ ซึ่งยีนเหล่านี้น่าจะมีการแสดงออกต่างจากเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อม และเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่หนูที่ค่อนข้างทนต่อการเกิดโรค (C57BL/6) ยีนของแบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นให้แสดงออกในส่วนของเมตาบอลิสึมน่าจะไม่แตกต่างกัน แต่ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคน่าจะต่ำกว่าหนูที่ไว (BALB/C)(Leakey, Ulett et al. 1998) หรืออาจต้องแสดงออกสูงกว่ามาก หรือในหนูที่ไวอาจพบว่ามีการแสดงออกที่สูงขึ้นกว่า

มาก ด้วยแบบจำลองในลักษณะนี้ น่าจะสามารถนำไปสู่การจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการก่อโรคได้

DNA Microarray เป็นการนำ oligonucleotide ที่ออกแบบมาจากส่วนหนึ่งของแต่ละยีนแล้วพิมพ์ลงบน slide โดยจุดที่พิมพ์มีขนาดเล็กมากจนสามารถบรรจุ oligonucleotide จากยีนได้เป็นหลายพันถึงหมื่นยีน และสามารถนำไปตรวจการแสดงออกของยีนทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ ได้ โดยการสกัด total RNA จากช่วงเวลาที่สนใจมา hybridize กับ slide ดังกล่าว ซึ่งได้มีผู้ทำการศึกษาใน *B. pseudomallei* ไว้ในเชิงเปรียบเทียบกับเชื้ออื่นและในบางสภาวะการเลี้ยง (Ou, Ong et al. 2005; Tuanyok, Kim et al. 2005) ดังนั้น การสกัด total RNA ของแบคทีเรียที่แสดงออกในหนูที่มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันดังกล่าว จึงน่าจะสามารถค้นพบยีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ และมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อโรคได้ นอกจากนี้ จากข้อมูลของจีโนม *B. pseudomallei* ที่มีบริเวณของ Genomic island (GI) ซึ่งคือบริเวณ ของโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่ (>10 Kb) ซึ่งเคย mobile แต่ปัจจุบันมีความเสถียรมากขึ้น มักพบยีนสำหรับสร้าง tRNA และมักพบ repeat structures อยู่ด้วย โดยจะเป็นส่วนที่มี G+C content แตกต่างไปจากบริเวณอื่นของ genome รวมทั้งมี mobile elements เช่น phages และ plasmids อยู่ด้วย บาง genomic islands มียีนสร้างเอนไซมม์ที่สามารถใช้ตัดตัวเองให้หลุดจาก chromosome และถ่ายทอดไปยังเซลล์ผู้รับอื่นได้ จึงเป็นส่วนหนึ่งของ horizontal gene transfer ในแบคทีเรียที่สำคัญ จากการศึกษาจีโนมของ *B. pseudomallei* K96243 strain มีรายงานว่ามี 16 GIs (Holden, Titball et al. 2004) หากนำ genomic DNA ของเชื้อจากผู้ป่วยและเชื้อจากธรรมชาติมา hybridize กับยีนบน slide ก็จะสามารถเปรียบเทียบยีนที่เหมือนและแตกต่างได้ ซึ่งสามารถนำไปค้นหาบริเวณที่มีความแตกต่างระหว่างเชื้อทั้งสองแหล่ง ซึ่งอาจเป็นบริเวณของ GI ต่าง ๆ ของ *B. pseudomallei* เพื่อนำไปใช้ในการจำแนกเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยและเชื้อที่พบตามธรรมชาติได้

1) วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของยีนของ *B. pseudomallei* ในหนูทดลอง ที่ไวต่อการเกิดโรคและค่อนข้างทนต่อการก่อโรค เพื่อค้นหายีนใหม่ที่มีบทบาทในการก่อโรค

1.2 ศึกษา Comparative genome hybridization ของ *B. pseudomallei* เพื่อหา marker สำหรับ clinical และ environmental isolate เพื่อใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อในสิ่งแวดล้อม

2) วิธีการทดลองและผลการทดลอง (เนื่องจากมีการทดลองหลายขั้นจึงอธิบายวิธีการไปพร้อมกับผลเพื่อให้ติดตามได้ง่าย)

2.1 การแสดงออกของยีนของ *Burkholderia pseudomallei* ในหนูทดลอง

- **<u>เชื้อและปริมาณที่เหมาะสมในการศึกษา</u>** : จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความรุนแรงในการก่อโรคของ *B. pseudomallei* พบว่าเชื้อในสิ่งแวดล้อมและเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย แสดงความรุนแรงในการทำให้หนู BALB/C ตายหลากหลาย ไม่ขึ้นกับแหล่งที่มา จึงน่าจะเป็นปัจจัยของ host ที่ส่งผลให้เกิดความรุนแรงหลังการติดเชื้อที่ต่างกัน ดังนั้นจึงต้องการศึกษาเปรียบเทียบ gene expression profile ของ bacterium ที่ติดเชื้อแบบ acute infection ในหนู BALB/C ที่เป็น sensitive mouse และ C57BL/6 ที่เป็น relatively resistance (มี Th1 immune response เข้มแข็งกว่า ทำให้ต่อต้านต่อการติดเชื้อที่เป็น intracellular bacteria ได้ดีกว่า)โดยใช้เชื้อซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง mid-log phase เป็น profile ของ *in vitro* culture เพื่อเปรียบเทียบ ทำการ infect หนู BALB/C และ C57BL/6 โดย intra-peritoneal injection ด้วย *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากผู้ป่วย septicemia 2 isolates คือ A2 (จากผู้ป่วย sepsis ประเทศออสเตรเลีย) และ 1909a (จากผู้ป่วย sepsis โรงพยาบาลสรรพประสิทธิประสงค์ อุบลราชธานี) จำนวน $1x10^8$ เพื่อดูระยะเวลาในการอยู่รอดของหนู isolate 1909a สามารถทำให้หนู BALB/C ตายภายใน 7-14 วัน ส่วน isolate A2 หนูตายภายใน 2-3 วัน ดังนั้นจึงเลือก 1909a เพื่อศึกษาโดย LD_{50} ของ 1909a ใน BALB/C คือ 20 เซลล์

- <u>Kinetic ของ bacterium</u> ในเลือด ปอด ตับ และ ม้าม ของหนู BALB/c เมื่อฉีดเชื้อด้วยปริมาณต่าง ๆ เป็นดังตารางที่ 1 โดยพบว่าปริมาณของเชื้อที่พบในเลือดไม่แน่นอน และเมื่อพบก็อาจมีปริมาณไม่มากพอที่จะนำไปทำการสกัด RNA ถึงแม้จะเป็นแหล่งที่น่าจะสกัดได้ง่ายโดยไม่มี RNA ของ host ปะปนมากนัก ปอด และ ตับเป็นอวัยวะที่สามารถพบเชื้อได้มากหลังการติดเชื้อ และม้ามเป็นอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถพบเชื้อได้เช่นกัน อวัยวะทั้งสามจึงเป็นเป้าหมายที่จะทำการแยกแบคทีเรียและทำการสกัด total RNA และ เนื่องจากต้องการศึกษาภาวะ acute infection จึงใช้เชื้อในปริมาณที่สูงกว่า LD_{50}

จากผลในตารางที่ 1 ได้เลือก infect BALB/C ด้วย $50LD_{50}$ ของ 1909a เนื่องจากเป็น dose ที่หนูรอดชีวิตอยู่นานพอที่จะศึกษา และสามารถพบเชื้อได้ในทุก organ จากนั้นทดลองกับหนู BALB/C 3 ตัว เพื่อทดสอบ kinetic ในแต่ละ organ ที่กล่าวมา ผล kinetic ของเชื้อใน BALB/c ที่ได้เป็นดังตารางที่ 2 เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อและคำนวณจำนวนอาศัยการเทียบจาก optical density (OD) ของ growth curve ที่เคยทำมาแล้ว เมื่อนำมาทำ plate count ปริมาณมักจะไม่เท่ากับที่ต้องการ จึงได้คำนวณเป็นค่า LD_{50} ที่ใช้จริงไว้ด้วย

นำหนู BALB/C 2 ตัว และ C57BL/6 3 ตัว infect ด้วยปริมาณเชื้อ 50 LD_{50} (ปริมาณเชื้อจริง 40 LD_{50}) เจาะเลือดที่ orbital plexus ประมาณ 50 micro liters ทุกวันเพื่อนำมาเพาะเชื้อ และในวันที่ 3 นำแต่ละอวัยวะมาทำการเพาะเชื้อ โดยเก็บ C57BL/6 ไว้ 1 ตัว เพื่อดูระยะเวลาในการรอดชีวิต ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 เนื่องจาก BALB/C มีผลในเลือดแล้วจึงทำการนับ

ปริมาณเชื้อใน organ ของหนู 2 ตัวโดยเป็นค่าเฉลี่ย ส่วน C57BL/6 มีผลทั้งเชื้อในเลือดและใน organ ของหนู 2 ตัว (ทำวันที่ 3 /1 ตัว, วันที่ 4 / 1 ตัว) ส่วนตัวที่ 3 เก็บไว้เพื่อดูระยะเวลาที่หนูตาย

ตารางที่ 1. ปริมาณของ *B. pseudomallei* 1909a ในเลือดและอวัยวะต่าง ๆ ของ BALB/c เมื่อได้รับเชื้อในปริมาณต่าง ๆ

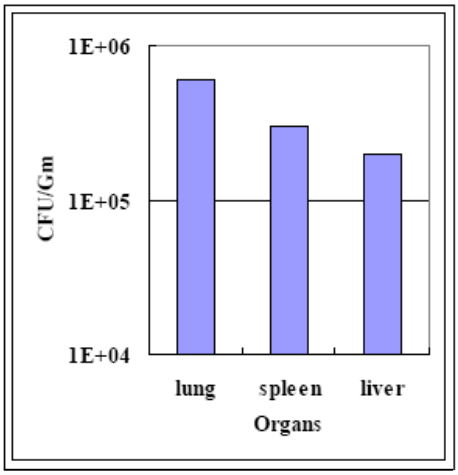
Dose of infection (CFU/ml)	Mice No.	Blood culture (CFU/ml) Day after infection					Organ culture after mice died (CFU/ml)			
		D2	D4	D7	D9	D12	Spleen	Liver	Renal	Heart
$10LD_{50}$	1	40	NG	10	NG	500	-	-	-	-
(200)	2	40	NG	NG	NG	Died	-	-	-	-
$50LD_{50}$	1	100	-	-	-	-	TC	TC	TC	TC
(1,000)	2	rare	NG	NG	NG	Died	-	-	-	-
100 LD_{50}	1	NG	NG	NG	Died	-	TC	TC	TC	TC
(2,000)	2	rare	NG	Died	-	-	TC	TC	TC	TC

NG = no growth TC= too numerous to count

ตารางที่ 2 ผลการ Infect BALB/C, intra-peritoneal ด้วย 1909a, $80LD_{50}$ (1,600 CFU by plate count)

Day	Blood culture (colony)			Organ			
	no.1	no.2	no.3	Dilution	lung	spleen	liver
1	20	0	0	ND	ND	ND	ND
2	8	0	0	Un-diluted	TC	++	+++
3	2	0	0	-3	TC	TC	TC
4	ND	ND	ND	-7	TC	TC	TC
				-8	TC	TC	TC

ND= not detect TC = too numerous to count



รูปที่ 1 ปริมาณเชื้อที่พบใน ปอด ม้าม และ ตับ ของหนู BALB/c ที่ฉีดด้วย *B. pseudomallei* 1909a ปริมาณ 80LD_{50}

ตารางที่ 3 ปริมาณเชื้อต่อกรัมของ Organ จากการ Infect BALB/c และ C57BL/6, intra-peritoneal ด้วย 1909a, 40LD50 (800 CFU by plate count)

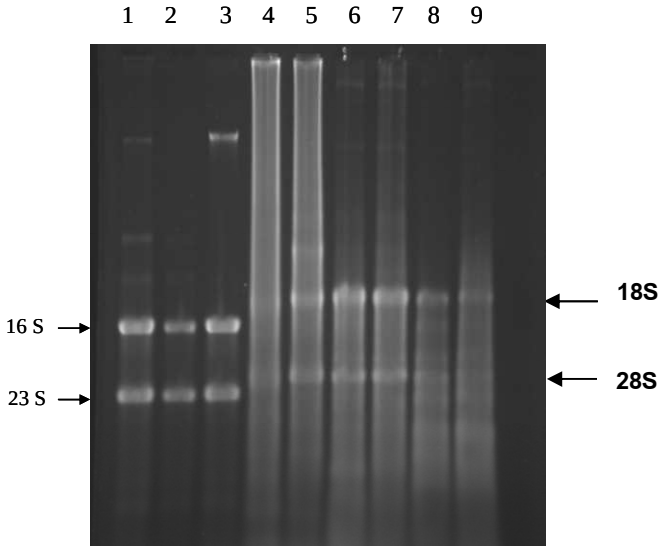
Day	Blood culture (colony) (C57BL/6)			Organ (C57BL/6) CFU/ml			Organ (BALB/c) CFU/ml		
	no.1	no.2	no.3	lung	spleen	liver	lung	spleen	liver
1	NG	NG	102	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	NG	NG	82	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	NG	2	3	$8x10^5$	$6 x10^5$	$4 x10^5$	$6 x10^5$	$3 x10^5$	$2 x10^5$
4	NG	NG	NG	$1x10^6$	$1.4x10^6$	$7.5 x10^5$	-	-	-

ND= not detect NG = no growth Note หนู C57BL/6 ตัวสุดท้ายตายวันที่ 11

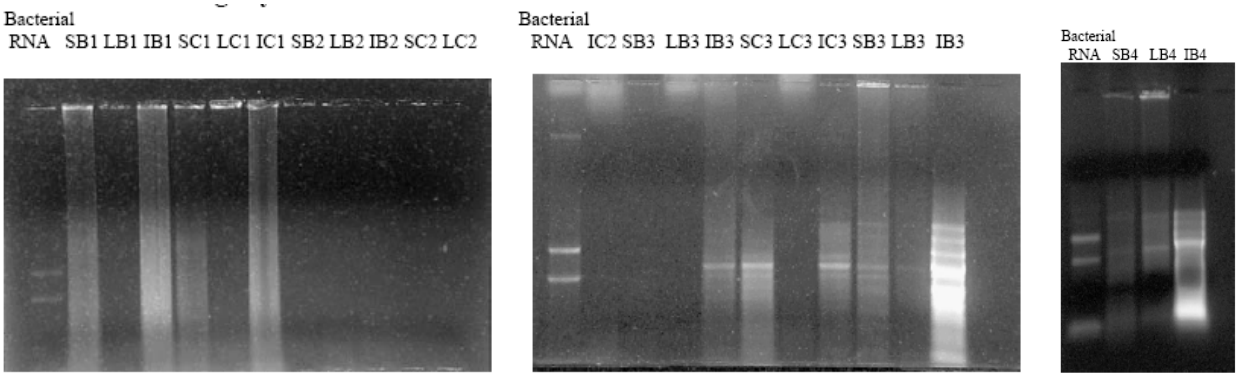
- Bacterial injection and RNA extraction ทำการ infect หนู BALB/c และ C57BL/6 อย่างละ 4 ตัว ด้วย 50LD_{50} และในวันที่ 3 นำแต่ละ organ ของแต่ละตัวแยกกัน มาบดผ่านตะแกรง sterile กรองผ่าน nylon wool จากนั้นนำไป สกัด total RNA โดยใช้ Trizol® reagent และทำ phenol/chloroform extractionโดยมีอวัยวะจากหนูที่ไม่ได้รับเชื้อเป็น control และทำการเพาะเลี้ยง *B. pseudomallei* 1909a ใน LB broth จนถึง mid-log phase แล้วนำมาสกัด RNA เพื่อใช้เป็นตัว normalize ในการทำ DNA Microarray นำ Total RNA ที่สกัดได้ไปแยกโดย Gel electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 ซึ่งสามารถเห็นแถบของ 16 S และ 23 S Ribosomal RNA ของ *B. pseudomallei* ได้ชัดเจนจากเชื้อที่เลี้ยงใน broth แต่ที่สกัดจากแบคทีเรียที่อยู่ในหนู จะเห็น Ribosomal RNA ของหนูที่มีขนาดใหญ่กว่าชัดเจน เมื่อ load ในปริมาณ RNA ที่เท่า ๆ กัน แสดงว่ามีเซลล์ของหนูปนมาในการสกัดค่อนข้างมาก จึงเพิ่มขั้นตอนโดยการปั่นเหวี่ยง solution ที่กรอง

ได้ ด้วยรอบเบา ๆ ประมาณ 3,000 rpm เพื่อกำจัดเศษอวัยวะที่ปนมาก่อนนำไปสกัด RNA ผลที่ได้ไม่แตกต่าง แต่ปริมาณ RNA ที่สกัดได้น้อยลง คาดว่าคงสามารถกำจัดเซลล์หนูไปได้บางส่วน จึงสกัดเพิ่มจากหนูอีก 2 ชุด เพื่อให้ปริมาณเพียงพอในการใช้งาน RNA sample จึงมีทั้งหมด 4 ชุด ดังแสดงในตารางที่ 4

เมื่อส่ง Total RNA ที่ตกตะกอนใน absolute ethanol ไปยัง University of Wisconsin, re-suspended และตรวจด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่า คุณภาพของ RNA ไม่เหมือนเดิม (รูปที่ 3) น่าจะมีการ degrade เนื่องจากไม่เห็นแถบของ Ribosomal RNA



รูปที่ 2 Agarose gel electrophoresis ของ Total RNA ที่สกัดจาก *B. pseudomallei* 1909a ที่เลี้ยงใน LB-broth ในเลนที่ 1-3, จากอวัยวะหนู BALB/C ที่ปอด (เลนที่ 4) ตับ (เลน 5) ม้าม (เลน 6) และ C57BL/6 ที่ปอด (เลนที่ 7) ตับ (เลน 8) ม้าม (เลน 9) ตัวอย่างจากหนูจะเห็น ribosomal RNA ของหนูชัดเจน แต่ไม่เห็น 16 S และ 23S ของแบคทีเรีย



รูปที่ 3 Ethidium bromide stain ของ agarose gel electrophoresis ของ total RNA ที่สกัดได้จาก spleen ของหนู BALB/C pool 1 (SB1), Lung หนู BALB/C pool 1 (LB1), Liver หนู BALB/C pool 1 (IB1), spleen ของหนู C57BL/6 pool 1 (SC1), Lung หนู C57BL/6 pool 1 (LC1), Liver หนู C57BL/6 pool 1 (IC1), และของหนู pool 2 และ 3 ในทำนองเดียวกัน Total RNA จาก *B. pseudomallei* ที่เลี้ยงใน LB-broth อยู่ในแถวแรกซ้ายมือ (bacterial RNA)

ตารางที่ 4 RNA samples และ concentration.

Mouse	Organ	ID.	Concentration(ng/□l)	Total amount (□g)
• Replicate 1(Pool)* DNAse treated				
BALB/c	Spleen	SB1	1,454	72.7
	Lung	LB1	115	5.7
	Liver	IB1	1,891	382.0
C57 BL/6	Spleen	SC1	702	35.0
	Lung	LC1	160	8.0
	Liver	IC1	1,484	74.0
• Replicate 2(Pool)				
BALB/c	Spleen	SB2	78	3.9
	Lung	LB2	186	9.3
	Liver	IB2	148	7.4
C57 BL/6	Spleen	SC2	48	2.4
	Lung	LC2	38	1.9
	Liver	IC2	125	6.2

Mouse	Organ	ID.	Concentration(ng/□l)	Total amount (□g)
• Replicate 3(Pool)				
BALB/C	Spleen	SB3	61	3.0
	Lung	LB3	36	1.8
	Liver	IB3	335	16.6
C57 BL/6	Spleen	SC3	612	30.0
	Lung	LC3	90	4.5
	Liver	IC3	323	16.0
• Replicate 4 (Pool)				
BALB/C	Spleen	SB4	461	23.0
	Lung	LB4	117	5.8
	Liver	IB4	3,459	172.0
C57 BL/6	Spleen	SC4	543	27.0
	Lung	LC4	356	17.8
	Liver	IC4	2,499	125.0

- Oligomer designใช้ Soft ware เพื่อตรวจสอบ Open reading frame ใน genome ของ *B. pseudomallei* แล้วออกแบบ Genome directed primers (GDPs) ที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์ 7-8 ตัว เพื่อให้ครอบคลุมสามารถใช้ generate cDNA จาก mRNA ของ gene ทั้งหมดที่สนใจได้โดยไม่เข้าคู่กับ RNA ของหนู ซึ่งได้คัดเลือก 8 oligomer 4 สาย และ 7 oligomer 46 สาย เพื่อสร้าง oligonucleotide

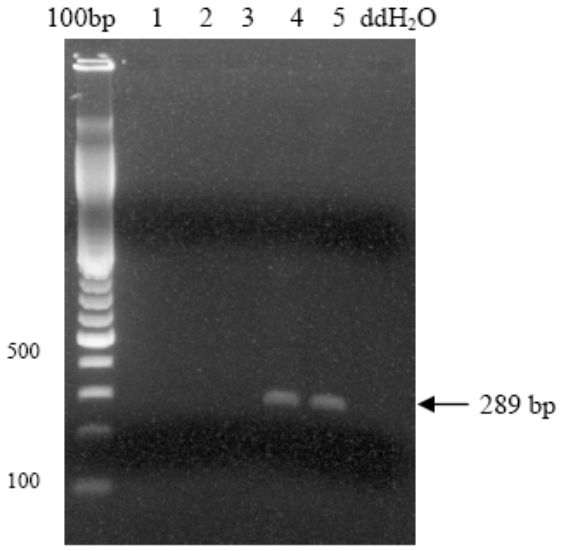
- RT-PCR โดยใช้ primer specific ต่อ virulence gene ของ *B. pseudomallei* เพื่อตรวจคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้จาก *in vivo* โดยออกแบบ primers ดังตารางที่ 5 เพื่อเพิ่มปริมาณยีน Flagellin fliC ของ *B. pseudomallei* ซึ่งมีขนาด 289 bp เมื่อทดลองโดยมี genomic DNA ของ *B. pseudomallei* ด้วย ผลเป็นดังรูปที่ 4 ซึ่งแสดงว่า RNA ที่ได้จาก *in vitro* culture มีคุณภาพดี สามารถ convert จาก mRNA ไปเป็น cDNA และเพิ่มจำนวนยีนที่คัดเลือกไว้โดย RT-PCR ได้ แต่ RNA ที่สกัดจากอวัยวะไม่ให้แถบ แสดงว่าน่าจะมีการ degradation ระหว่างการเตรียมหรือขนส่ง หรือ RNA มีปริมาณน้อยเกินไป

ตารางที่ 5 PCR Primerสำหรับ Flagellin *fliC* Gene ของ *B. pseudomallei*

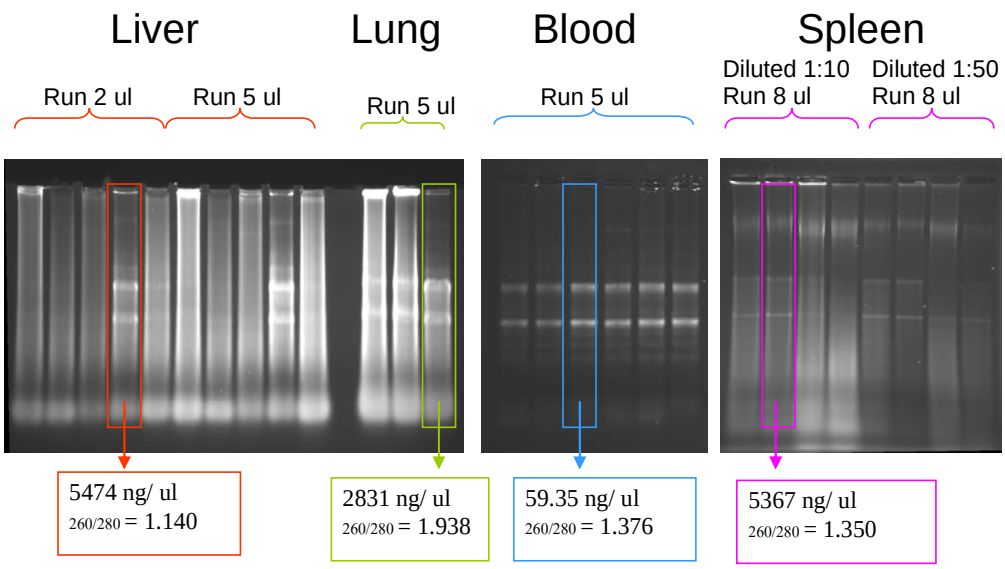
Ref. sequence	Gene Name	Oligos primers
AF084812	*fliC*	Left Primer GCTTCGCAGACGAACTACAA
		Right Primer TCTGATCGGTGAACGTGAAG

ซึ่งเมื่อทดลองใช้ Genome-Direct Primers (GDPs) label Cy3 และ hybridize กับ Microarray slide ซึ่งมีความไวกว่าเป็นการตรวจสอบก็ไม่พบ signal

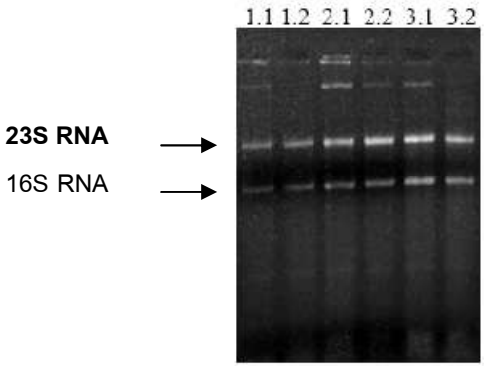
- การเตรียม RNA จากหนูครั้งที่ 2 เนื่องจากการสกัด RNA จากอวัยวะมี RNA ของหนูปนมามากทำให้รบกวนการวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ที่เป็นของเชื้อ จึงทดลอง infect หนู 2 ตัว ด้วย $50LD_{50}$ แล้วเจาะเลือดทาง orbital plexus เพื่อ culture เชื้อ พบว่าสามารถพบเชื้อให้ถึง 10^3 ในหนูบางตัว แต่ส่วนใหญ่จะมีประมาณ 10^2 หรือไม่พบ จึง infect หนู BALB/C และ C57BL/6 5 ตัว และเจาะเลือดให้ได้มากที่สุด จะได้ประมาณ 2 ml นำมาทำการสกัด RNA และ infect BALB/C และ C57BL/6 อย่างละ 10 ตัว ด้วย $50LD_{50}$ โดยแยกทำครั้งละเพียง 5 ตัว เพื่อให้การสกัดทำได้เร็วขึ้น ลดการ degrade ของ RNAโดยเก็บ organsในวันที่ 3 นำแต่ละ organ ออกมาใส่ใน RNA secure solution (Ambion) แช่ในน้ำแข็ง นำมาบดผ่านตะแกรง sterile ปั่นเหวี่ยงด้วยรอบต่ำเพื่อกำจัดเศษเซลล์ จากนั้นนำไปสกัด total RNA โดยใช้ Trizol reagent ผลที่ได้เป็นดังรูปที่ 5 ซึ่งเมื่อเทียบขนาดแล้ว ribosomal RNA สองแถบที่เห็นชัดจะเป็นของหนูมากกว่าแบคทีเรีย และเมื่อใช้ RNA จากเลือดไปทำ RT-PCR เพื่อตรวจยีนของแบคทีเรียก็ไม่พบ แต่ในRNA จากอวัยวะสามารถตรวจได้ในเฉพาะตัวอย่างที่สกัดแล้วเห็นแถบ RNA ชัดเจน ในครั้งนี้จึงมีแต่ RNA จากปอดที่คุณภาพดีและมีปริมาณพอจะทำ hybridization นอกจากนี้ยังเตรียม RNA จาก *in vitro* culture ขณะที่เป็น mid-log phase เพิ่ม ผลที่ได้ดังรูปที่ 6



รูปที่ 4 Agarose gel electrophoresis แสดง size marker ด้านซ้าย lane 1-3 RT_PCR ของ *fliC* จาก RNA สกัดจากม้าม ปอด ตับ และ lane 4 จาก RT_PCR ของ RNA สกัดจากแบคทีเรียเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ lane 5 จาก Genomic DNA ลูกศรระบุ PCR product จาก *fliC* gene ขนาด 289 bp



รูปที่ 5 Ethidium bromide stain agarose gel แสดงผลการสกัด RNA ของ *B. pseudomallei* จากเลือด

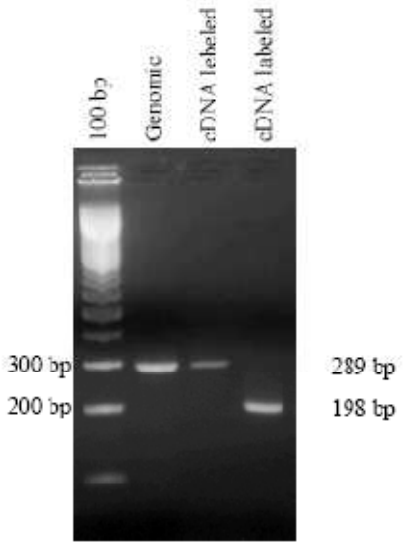


รูปที่ 6 Ethidium bromide stain agarose gel ของ total RNA ที่สกัดจาก *in vitro* culture

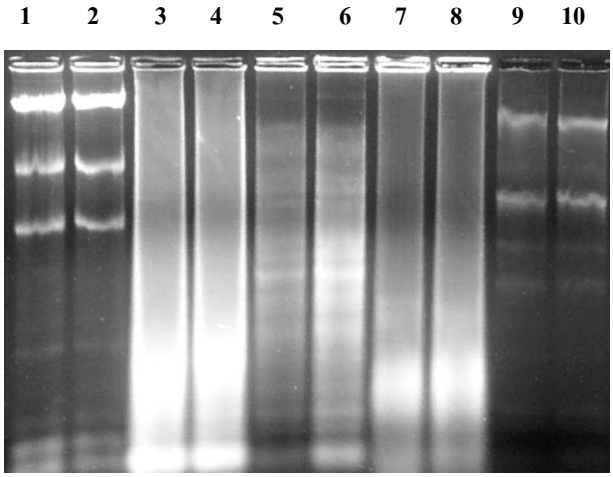
-cDNA labeling เนื่องจาก *in vitro* RNA มีคุณภาพดี จึง convert เป็น cDNA โดยใช้ Genome-Direct Primers (GDPs) โดยเปรียบเทียบกับการใช้ random primer จากนั้นทดลองใช้ cDNA เป็น template เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะ fliC และ 16S RNAโดยวิธี PCR ผลที่ได้เป็นดังรูปที่ 7 ซึ่งแสดงว่าได้ RNA ที่ไม่ degrade จากนั้นจึง label cDNA โดยใช้ RNA 1 µg ด้วย Cy3-dCTP ด้วยวิธี reverse transcriptase ได้ dye incorporation 0.6-0.8 pmol/µl

-DNA and RNA sample: สืบเนื่องจากการส่งตัวอย่าง total genomic DNA และ total RNA ไปยัง University of Wisconsin, USA โดยบริษัท FedEx ไม่ได้มีการเติม dry ice ให้ระหว่างการขนส่ง และระยะเวลาในการขนส่งก็นานเกินกว่าที่คาดการณ์จึงอาจทำให้คุณภาพของ RNA ที่ส่งไปไม่ดีพอ นอกจากนี้ RNA ที่ส่งไปเมื่อตกตะกอนและ resuspend ใหม่ ไม่ได้เติม salt ทำให้ปริมาณ total RNA ตกตะกอนไม่สมบูรณ์และหายไปค่อนข้างมาก ทั้งหมดทำให้มีปริมาณ RNA ไม่เพียงพอ รูปของ RNA ที่จำแนกขนาดใน agarose gel

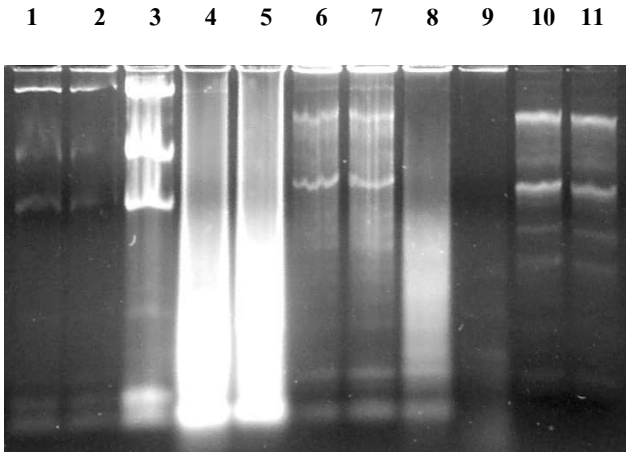
electrophoresis เมื่อส่งไปถึงเป็นดังรูปที่ 8, 9 และ 10 ซึ่ง RNA จาก *in vitro* และ blood เห็นแถบของ ribosomal RNA ชัดเจน น่าจะยังไม่ degrade



รูปที่ 7 PCR Amplification ของ *fliC* gene ขนาด 289 bpโดยใช้ genomic เป็น template (แถวที่ 2) หรือ cDNA เป็น template (แถวที่ 3) และ cDNA เป็น template และ amplify 16S RNA gene ขนาด 198 bp (แถวที่ 4)



รูปที่ 8 Agarose gel electrophoresis ของ Total RNA สกัดจาก *B. pseudomallei* ที่เลี้ยงใน *in vitro* (stationary phase); lane 1-2, Liver lane 3-4; Lung lane 5-6; Spleen lane 7-8 และ Blood จาก BALB/c mice lane 9-10.



รูปที่ 9 Agarose gel electrophoresis ของ Total RNA สกัดจาก lane 1-3 *B. pseudomallei* ที่เลี้ยงใน *in vitro* (stationary phase), lane 4-5 ตับ, lane 6-7 ปอด, lane 8-9 ม้าม, และ lane 10-11 เลือด จาก C57BL/6 mice.

ตารางที่ 6 Total RNA concentrations extracted from BALB/c mice.

RNA	260/280 Ratio	Concentration (ng/μl)	Total (μg)
Liver 1	1.088	3,644	1093.2
Liver 2	1.088	3,637	1091.1
Lung 1	1.848	2,183	654.9
Lung 2	1.554	3,418	1025.4
Spleen 1	1.238	3,590	1077
Spleen 2	1.134	3,601	1080.3
Blood 1	1.78	392	117.6
Blood 2	1.8	381	114.3

ตารางที่ 7 Total RNA concentrations extracted from C57 BL/6 mice.

RNA	260/280 Ratio	Concentration (ng/μl)	Total (μg)
Liver 1	1.066	3,090	927
Liver 2	1.085	3,649	1094.7
Lung 1	1.745	1,113	333.9
Lung 2	1.67	2,689	806.7
Spleen 1	1.798	2,638	791.4
Spleen 2	1.875	1,100	330
Blood 1	1.8	415	124.5
Blood 2	1.74	372	111.6

ตารางที่ 8 Total RNA concentration extracted from *in vitro.*

RNA	260/280 Ratio	Concentration (ng/μl)	Total (μg)
Stationary 1	1.792	2,159	215
Stationary 2	1.474	1,715	172
Mid Log 1	1.72	533	53
Mid Log 2	1.78	501	50
Mid Log 3	1.44	3,556	356

แต่เนื่องจาก 260/280 ratio ของ RNA sample หลาย sample เช่นจากตับและม้าม มีค่าต่ำ (e.g. 1.088, 1.238) จึงน่าจะมีโปรตีนปนอยู่มาก จึงต้องทำ phenol/chloroform extraction อีกครั้งให้ได้ ratio ใกล้เคียงกับ 2.0ก่อนนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA และทำการ label

- **Microarray hybridization** Microarray slide จาก TIGR ได้เปลี่ยนเป็น Microarray Version 2 ที่เปลี่ยนตัว coating (ดังรายละเอียดด้านล่าง) เมื่อ hybridize พบว่า signal ต่ำลงมาก จำเป็นต้องใช้ปริมาณ RNA มากขึ้น และมี background สูงขึ้น จึงต้องปรับปรุง protocol

- Slide Information

Array Name : *Burkholderia mallei/pseudomallei* microarray version 2

Elements on Array	: 2,176	ORFs w/o oligo	: 39
Grids	: 48	Control: 500 *A. thaliana* (70-mers)	
Surface Coating	: Amino-silane		
Array Type	: ss_oligo (70-mer)		
Oligo Replicates	: 2x		
Oligos Designed	: 9,826		

Protocol ที่ปรับปรุง (เป็นงานที่เริ่มกลับมาทำที่ประเทศไทย โดยทำที่ Microarray laboratory, BIOTEC โดยความกรุณาช่วยเหลือของ ดร.นิศรา การุณอุทัยศิริ)

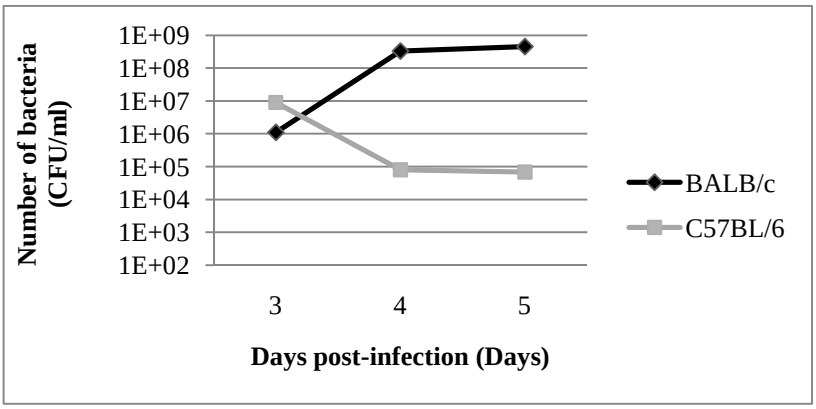
- Infect BALB/c และ C57BL/6 mice อย่างละ 20 ตัว ด้วย $50LD_{50}$ ของ 1909a จากนั้น 3-5 วัน จึงเก็บ liver, spleen และ lungs นำมาตรวจสอบเชื้อที่มีในแต่ละอวัยวะ (รูปที่ 10) และสกัด RNA ด้วย Trizol® จากนั้น re-extract ตะกอน RNA ด้วย Trizol® อีกครั้ง ตามด้วย phenol/chloroform extraction เพื่อกำจัด proteinให้ได้ RNA quality ที่ดีขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นปัญหาที่ทำให้เมื่อ convert เป็น cDNA และ hybridization แล้ว ได้ signal ที่ต่ำกว่าการใช้ genomic DNA มาก

- Optimize condition สำหรับ cDNA labelling โดยใช้ higher concentration of primers (250 ng – 10 μg). พบว่าให้ผลดีเมื่อใช้ primer 10 μg และ RNA 15 μg เพื่อ generate cDNA จากนั้นการใช้ cDNA 5 μg เพื่อ labeled ด้วย Cy3 ในการทำ hybridization ให้ได้ Cy3-cDNA signal ที่ดี

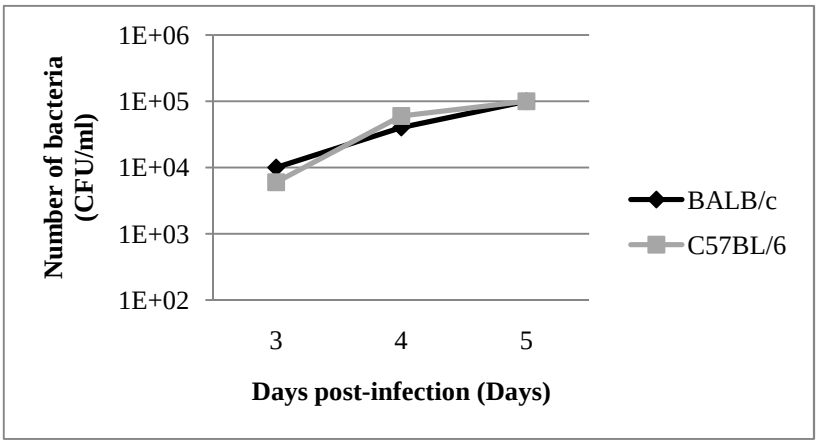
-Specificity and sensitivity of Genome Directed Primers (GDPs) when compared with random primer เนื่องจากการ hybridization ให้ได้ signal ที่ดี ต้องใช้ Cy3-cDNA ในปริมาณมาก (5 μg) จึงทำการทดสอบเปรียบเทียบการ convert *B. pseudomallei* RNA ด้วย GDPs และ random primers โดยใช้ RNA จาก *in vitro* และ *in vivo* (spleen)ใน

การเปรียบเทียบ จากนั้นทดสอบการ hybridize กับ Microarray slide พบว่า GDPs ให้ sensitivity ดีกว่า random primer โดย GDPs แสดงผลของ gene ที่differentially expressed >±2SD และ >± 3SD มากกว่าการใช้ random primer เมื่อใช้การ hybridization ของ RNA จาก *in vitro* และ *in vivo* (ตารางที่ 10) ดังนั้นการออกแบบ GDPs และการใช้งานจึงไม่ใช่ปัญหา และต้องใช้ cDNA 5 μg/slide

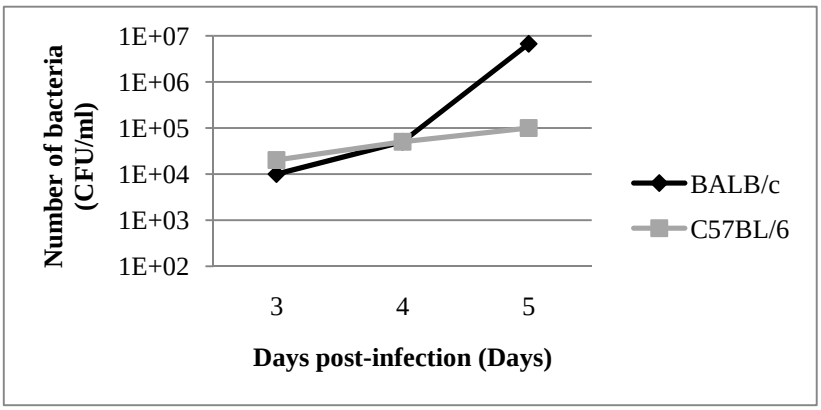
A



B



C



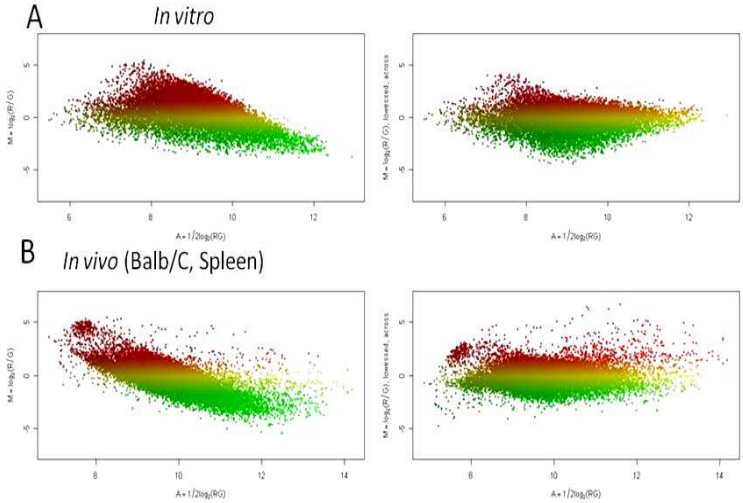
รูปที่ 10 จำนวนแบคทีเรียใน spleen (A), lungs (B) and liver (C) of BALB/c (◆) และ C57BL/6 (■) ของหนูหลังจากฉีดเชื้อให้ในวันที่ 3 ถึง 5

ตารางที่ 10 จำนวนยีนที่ differentially expressed

Gene difference in >±2SD			
In vitro		*In vivo*	
Random	GDP	Random	GDP
845	966	758	935
Gene difference to >3±SD			
In vitro		*In vivo*	
Random	GDP	Random	GDP
64	151	66	244

-<u>Normalization of data after hybridization</u> (quality control)

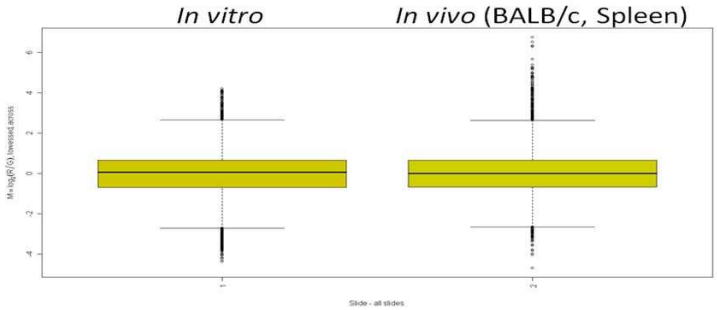
ใช้ LOWESS normalization method เพื่อ normalize spot intensity ภายใน microarray slide เพื่อตัด intensity-dependent dye และยัง normalize across slide เพื่อเปรียบเทียบระหว่าง slide โดยเมื่อทำ hybridization เทียบระหว่าง cDNA ที่ convert จาก RNA ของ *B. pseudomallei* ที่เลี้ยงใน *in vitro* label ด้วย fluorescent สีหนึ่ง และ cDNA ที่ convert จาก RNA ของ *B. pseudomallei in vivo* ด้วยอีกสีหนึ่ง แล้วนำ intensity ที่ scanได้มา plot กราฟ R-I plot ใน log scale (เพื่อให้ realistic กับ average expression intensity) (รูปที่ 11) โดยแกน Y, M= log2 (R/G) (red/green) ratios ของ array feature และแกน X, A= ½ $\log_2$(R*G) จากรูปที่ 11, A เป็นผลของ *B. pseudomallei* ที่เลี้ยงใน *in vitro* โดยด้านซ้ายเป็นผลก่อนการ normalize ซึ่งจะเห็นการกระจายออกจากค่าที่เป็น log2 (R/G) ratios = 0 ของแกน Y มากกว่าและไม่ symmetry แต่เมื่อ normalize แล้วดังด้านขวา จะเห็นการกระจายเป็น symmetrical และค่าเฉลี่ยของ log2 (R/G) ratios ใกล้ 0 เป็นส่วนมาก (expression ไม่เพิ่มหรือลดเมื่อเทียบกัน) ส่วนภาพ B จะเป็นผลของ *B. pseudomallei* ที่สกัดจาก *in vivo* (spleen) ของหนู BALB/c



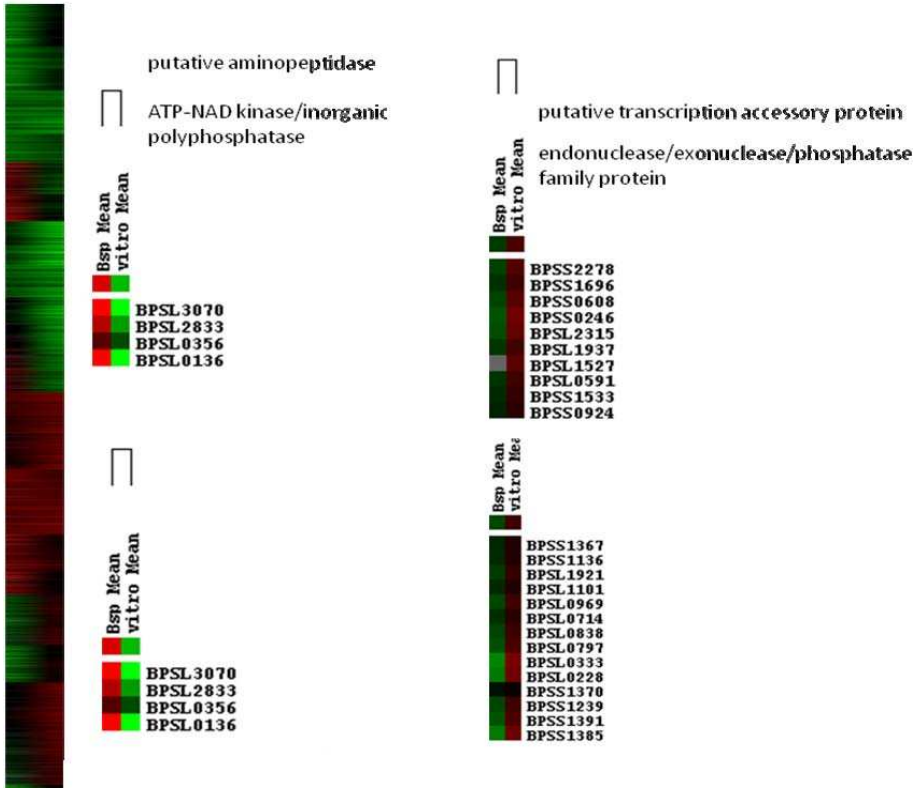
รูปที่ 11 normalization signal จากscan Microarray slide A) RNA ของ *B. pseudomallei in vitro* โดยซ้าย ผลก่อนการ normalize และขวา หลังจากการ normalize และ B) RNA ของ *B. pseudomallei* ที่สกัดจาก *in vivo* (spleen) ของหนู BALB/c

นอกจากนี้ได้ทำ box plot เพื่อวิเคราะห์ overall intensities ของ probes across the array จะเห็นการกระจาย intensity ของยีนต่าง ๆ ใน array โดยแสดงให้เห็นว่า microarray จากทั้งสอง slide สามารถเปรียบเทียบกันได้ (รูปที่ 12)

-<u>Clustering</u> เป็นการ group genes หรือ samples ที่มี expression profiles คล้ายกันมาอยู่ใกล้กันเพื่อเปรียบเทียบ โดยเมื่อนำผลจาก RNA samples ของ *in vitro* และ *in vivo* (Spleen of Balb/c mice) มาลองเปรียบเทียบดังผลในรูปที่ 13



รูปที่ 12 Box plot แสดงจำนวนยีนที่ intensity ratio อยู่ใน 50 percentile ในกล่องสีเหลือง



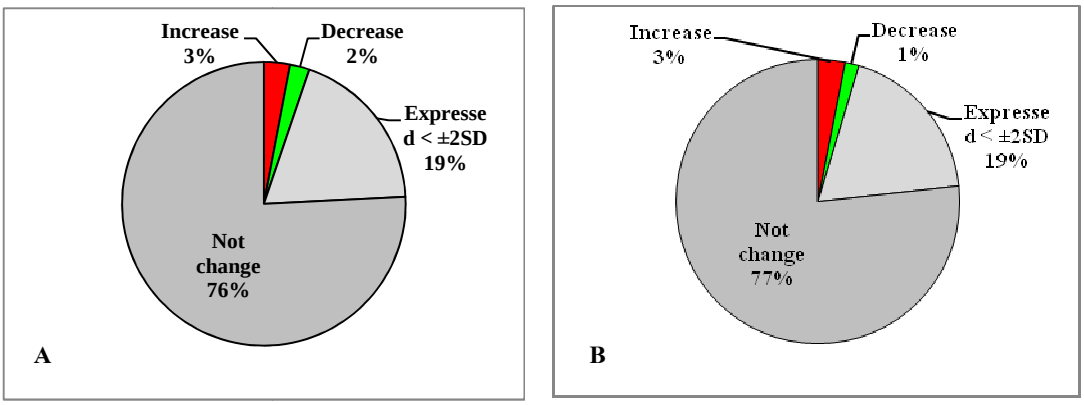
รูปที่ 13 แสดงผลของการ clustering เปรียบเทียบระหว่าง *in vitro* และ *in vivo* ที่มีการเปลี่ยน gene expression profile เมื่อมีสภาพการเจริญที่ต่างกัน

-Gene expression profile analysis ของ *B. pseudomallei*

1) Unique transcription profile ของ *B. pseudomallei* ในหนูแต่ละชนิด

Gene expression profile ของ *B. pseudomallei* ใน BALB/c เมื่อเปรียบเทียบกับ *in vitro* พบว่าแตกต่างอยู่ 4% โดย 3% เพิ่มขึ้น และ1% ลดลง สำหรับ *B. pseudomallei* genes ใน C57BL/6 มีความแตกต่าง 5% โดย 3% เพิ่มขึ้นและ 1% ลดลง โดยพิจารณาจากยีนที่มีระดับการแสดงออกแตกต่างในช่วง ±2SD หรือเทียบเท่ากับ ~3.4 fold increased และ ~0.27 fold decreased นอกจากนี้ยังมียีนที่แสดงออกแตกต่างกันต่ำกว่า ±2SD ในหนูทั้งสองในปริมาณใกล้เคียงกัน คิดเป็น 19 % ของยีนใน genome ของ *B. pseudomallei* (รูปที่ 14)

การแสดงออกของยีนของ *B. pseudomallei* ใน C57BL/6 เมื่อเทียบกับ *in vitro* ในแต่ละอวัยวะพบว่ามียีนที่ differentially expressed ใน spleen 326 ยีน โดย 195 ยีน แสดงออกมากขึ้น และ 131 ยีน แสดงออกลดลง เช่นเดียวกัน ในปอดจะมี 306 ยีนที่ differentially expressed โดย 141 ยีนแสดงออกมากขึ้นและ 165 ยีน แสดงออกลดลง และมี 279 ยีนที่ differentially expressed ในตับโดย 183 ยีน แสดงออกมากขึ้น และ96 ยีน แสดงออกลดลง ซึ่งเมื่อจัดกลุ่มโดยอาศัย Clusters of Orthologous Groups (COG) เป็น 8 กลุ่ม คือ 1) transports and metabolism, 2) Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, 3) Transcription, translation, ribosomal structure and biogenesis, DNA replication, recombination and repair, 4) Cell wall/membrane/envelope biogenesis and extracellular structure, 5) In tracellular trafficking, secretion and vesicular transport, 6) Cell cycle control, cell division and chromosome partitioning, 7) Defense mechanisms and 8) Proteins with function unknown จะได้ดังรูปที่ 15

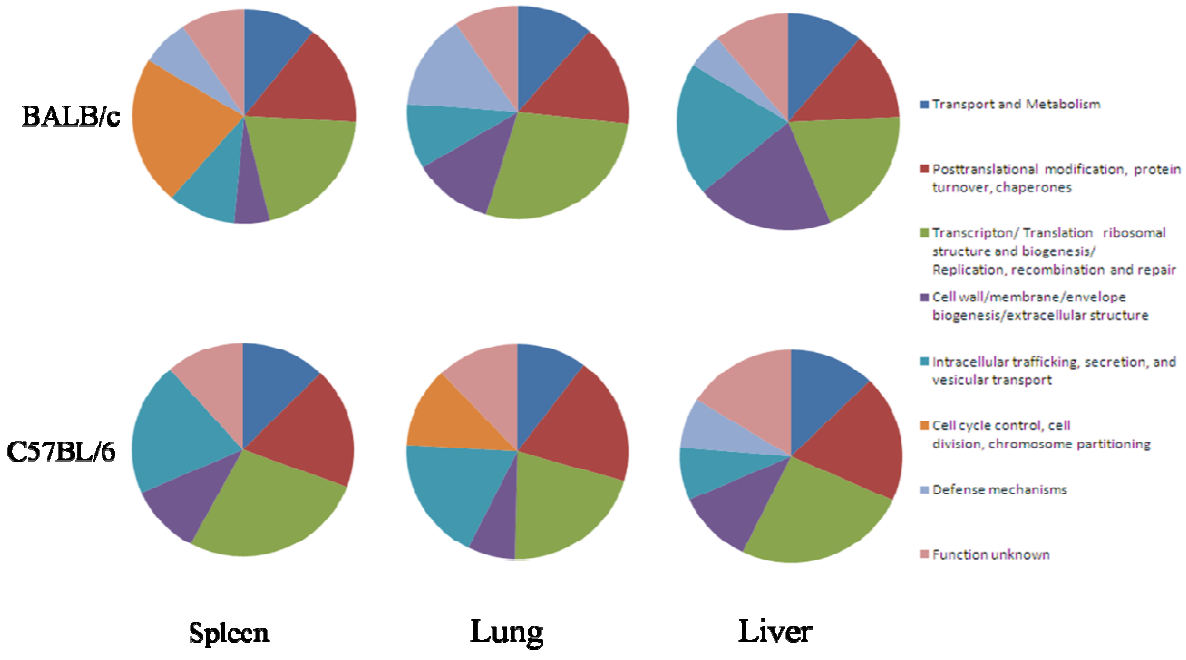


รูปที่ 14 Pie chart ของยีนเป็นเปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบการแสดงออกของยีน *B. pseudomallei* ใน in vitro กับ gene expression profile ใน BALB/c (A) และ C57BL/6 (B)

ยีนที่แสดงออกแตกต่างจาก *in vitro* ในหนูทั้งสองชนิดมีหน้าที่หลากหลาย เช่น intracellular trafficking, secretion และ vesicular transport บางยีนแสดงออกสูงมากในหลายอวัยวะ เช่น BPSL3128, BPSL3262 และ BPSS1543(*bsaQ*) ซึ่งอยู่ใน *bsa* locus ของ type 3 secretion system ซึ่งเป็น virulence factor พบว่ามีการแสดงออกสูงขึ้น 8 เท่า ใน spleen และ 24 เท่า ในปอดของหนู C57BL/6

ยีนในกลุ่มของ defense mechanisms มีการแสดงออกสูงขึ้นในทุกอวัยวะของหนู BALB/c ในขณะที่มีเพียงในตับของ C57BL/6 เท่านั้นที่สูงขึ้น ยีนเหล่านี้มีบางยีน เช่น BPSS2325, BPSL1797 ไม่เคยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ virulence และยีนที่เกี่ยวกับ drug resistance เช่น BPSL2468 นอกจากนี้ยังมียีนที่สร้างโปรตีนหลายยีนซึ่งไม่ทราบหน้าที่มีการแสดงออกสูงขึ้นในทุกอวัยวะ เหล่านี้อาจเป็นยีนที่มีบทบาทที่สำคัญในการก่อโรคในหนู (ตารางที่ 11)

จากการวิเคราะห์พบว่ายีน *B. pseudomallei* ที่มีการแสดงออกสูงขึ้นในม้าม ปอด และตับของหนู BALB/c มี 140, 170 และ 233 ยีน โดยแยกเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ survival และ virulence fuction ในม้าม ปอดและตับเป็น 11, 11 และ 19 ยีนตามลำดับ โดยระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวในม้ามสูงขึ้น 4-9 เท่า ปอด 3.5-10 เท่า และตับ 3.4-94.6 เท่า



รูปที่ 15 ผลการจัดกลุ่มยีนที่แสดงออกสูงขึ้นในหนูทั้งสองชนิด ในอวัยวะต่าง ๆ ตามหน้าที่

ตารางที่ 11 Cluster ของยีนที่เกี่ยวกับ suvival และ virulence ของ *B. pseudomallei* ที่แสดงออกใน *in vivo* สูงกว่า *in vitro*

Function	Notes
Survival	
Secondary metabolism	Putative hydroxamate, pyochelin, siderophore
Drug resistance	Ambler class A, B and D β-lactamase, including multidrug effect system
Intracellular stress	Superoxide detoxification, nitric oxide detoxification
Motility and chemotaxis	The components of a single flagella system and chemotaxis-associated protein
Virulence	
Secretion	Three type III secretion system and type VI secretion system
Lipopolysaccharide	Lipopolysaccarides biosynthetic cluster
Capsule	Capsular polysaccharide synthesis and export cluster
Exopolysaccharide	Surface polysaccharide biosynthetic cluster
Exoproteins	Collogenase, metalloprotease A, phospholipase C, Ser protease and hemolysin
Adhesins	Several surface proteins potentially modulate host-cell interactions
Fimbriae and pili	Thirteen cluster encoding components of type I fimbriae, type IV pili and *tad*-type pili

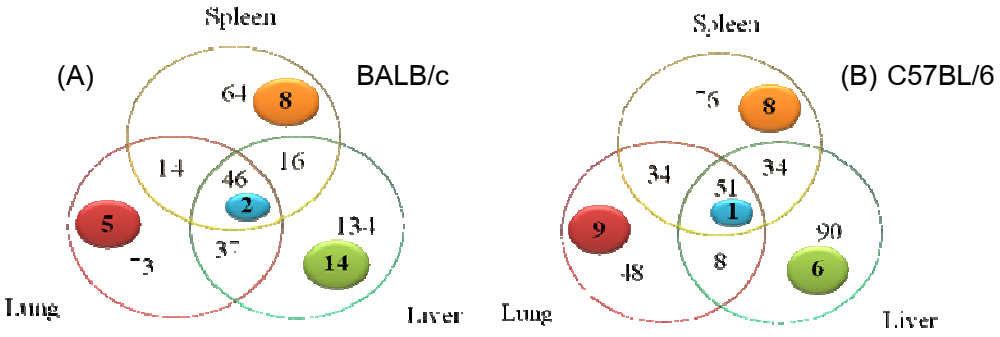
ในหนู C57BL/6 พบว่ายีน *B. pseudomallei* ที่มีการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติกับในม้าม ปอด และตับของหนูมีจำนวน 195, 141 and 183 ยีน โดยมียีนที่เกี่ยวกับ survival และ virulence fuction ในม้าม ปอด และตับจำนวน 18, 19 and 9 ยีน ตามลำดับ ระดับการแสดงออกในม้ามของยีนดังกล่าวเป็น 3.5-24 เท่า ปอด 3.6-21 เท่า และในตับ 4-19 เท่า เมื่อดูรายละเอียดของยีนในกลุ่ม virulence และ survival function ในหนู BALB/c และ C57BL/6 ที่แสดงออกสูงขึ้น พบว่ามียีน chemotaxis และ motility, secretion system (TTS and TSS), capsule (capsular polysaccharide synthesis และ export cluster รวมทั้ง potential surface polysaccharide biosynthesis cluster, fimbriae และ pili, exoprotein (phospholipase C และ Serine protease, drug resistant และ secondary metabolism สำหรับยีนที่แสดงออกสูงขึ้นโดยเฉพาะใน BALB/c คือ RNA polymerase sigma factor (*RpoS*) และ adhesins (hemagglutinin-related transmembrane protein)

เป็นที่น่าสนใจว่า ยีนใน TTSS3 เช่น BPSS1521ที่เป็น putative regulator, secreted protein; BPSS1524 (*bopA*), BPSS1531 (*bipC*), secretion apparatus; BPSS1538 (*bsaV*), BPSS1543 (*bsaQ*), chaperone (BPSS1533) (*bicA*) และยีน BPSS1551 บน *bsa* locus ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (Stevens et al., 2002) แสดงออกใน *in vivo* สูงกว่า *in vitro* นอกจากนี้ 5 ใน 6 clusters ใน T6SS clusters ของ *B. pseudomallei* แสดงออกสูงขึ้นใน *in vivo*

2) การจำแนกยีนของ *B. pseudomallei* ที่แสดงออกจำเพาะในทุกอวัยวะ หรือมีการแสดงออกเฉพาะอวัยวะหนึ่งที่จำเพาะในหนูแต่ละชนิดโดยใช้ *in vitro* เป็นฐาน

ในกลุ่มยีนของ *B. pseudomallei* ที่แสดงออกสูงขึ้นใน BALB/c โดย140 ยีนในม้าม 170 ยีนในปอดและ 233 ยีนในตับนั้นมี 46 genes ที่แสดงออกสูงขึ้นในทุกอวัยวะ และมียีนที่แสดงออกสูงอย่างจำเพาะในแต่ละอวัยวะโดยไม่พบในอวัยวะอื่น คือ 64 ยีนในม้าม 73 ในปอด และ 134 ในตับ ดังแสดงใน diagram ของ รูปที่ 16A ส่วนใน C57BL/6 มียีนแสดงออกสูงขึ้น 195 ยีนในม้าม 141 ยีนในปอดและ 183 ยีนในตับ และมี 51 ยีนที่แสดงออกสูงในทุกอวัยวะ ยีนที่แสดงออกสูงอย่างจำเพาะในแต่ละอวัยวะโดยไม่พบในอวัยวะอื่นคือ 76 ยีนในม้าม, 48 ในปอด และ 90 ยีนในตับ (รูปที่ 16B) ในกลุ่มยีนของ *B. pseudomallei* ที่แสดงออกสูงขึ้นใน BALB/c มียีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม survival และvirulence ยีน ในม้าม ปอด และตับ คือ 8, 5 และ 14 ส่วนในหนู C57BL/6 พบ 8, 9 และ 6 ยีน ในม้าม ปอด และตับ ยีนที่แสดงออกสูงในทุกอวัยวะของ BALB/c และอยู่ในกลุ่มนี้มี 2 ยีน คือ BPSS1521 ซึ่งมีข้อมูลว่าเป็น putative regulator และ BPSS2103 ที่เป็น hypothetical protein ที่คาดว่าน่าจะทำหน้าที่อยู่ใน T6SS (TSS-6 cluster) ใน C57BL/6 มียีน 1 ยีนคือ BPSS1521 ที่แสดงอกกสูงขึ้นในทุกอวัยวะและพบในทุกอวัยวะของ BALB/c ด้วย

ในภาพรวม ยีนที่สร้าง secondary metabolite จำนวนหนึ่งจะแสดงออกสูงขึ้นเมื่อเชื้อเข้าไปในหนู ส่วนยีนที่มีหน้าที่จำเพาะจะแสดงออกสูงในบางอวัยวะเมื่อเทียบกับขณะที่เชื้ออยู่ภายนอกสิ่งมีชีวิต เช่น sigma factor S (*RpoS*) ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ RNA polymerase และ adhesin จะพบการแสดงออกที่สูงในปอดของ BALB/c ส่วน BPSL2808 ซึ่งมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ virulence พบว่าแสดงออกสูงในตับของ BALB/c ยีน BPSL0226 ที่สร้าง flagella ก็แสดงออกสูงในม้ามของทั้ง BALB/c และ C57BL/6 เป็นต้นระดับของการแสดงออกของยีน *B. pseudomallei* ในหนูทั้งสอง เมื่อเทียบกับเมื่อเชื้ออยู่ภายนอกสิ่งมีชีวิตจะอยู่ในช่วง 3.4-10 เท่า แต่สำหรับ BPSS1521 (*bprC*) จะเป็น 9 เท่าในปอดและ 3 เท่าในตับหนูBALB/c และ 21เท่าในปอด และ 19 เท่าในตับของหนู C57BL/6



รูปที่ 16 Venn diagrams แสดงจำนวนของยีนที่แสดงออกสูงขึ้นในปอด ตับและม้ามของหนู BALB/C (A) และหนู C57BL/6 (B) โดยยีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม survival และ virulence ระบุอยู่ในวงกลมเล็ก

3) การจำแนกยีนของ *B. pseudomallei* ที่แสดงออกสูงขึ้นทั้งในหนู BALB/c และ C57BL/6 โดยใช้ *in vitro* เป็นฐาน

จากการวิเคราะห์ผล มียีน 411 ยีนของ *B. pseudomallei* ที่แสดงออกแตกต่างจาก *in vitro* ทั้งในลักษณะที่สูงขึ้นหรือต่ำลงในหนูทั้งสอง โดยมี 192 ยีนที่มีพฤติกรรมแบบเดียวกันในหนูทั้งสอง และ 85 ยีนจำเพาะกับ BALB/C และ 134 ยีนใน C57BL/6

เมื่อจำแนกตามอวัยวะ มียีน 448 ยีนในปอดที่แสดงออกแตกต่างจาก *in vitro* ในหนูทั้งสอง โดย 110 ยีนพบเหมือนกันในหนูทั้งสอง แต่ 142 ยีนพบเฉพาะใน BALB/C และ 196 ยีนใน C57BL/6

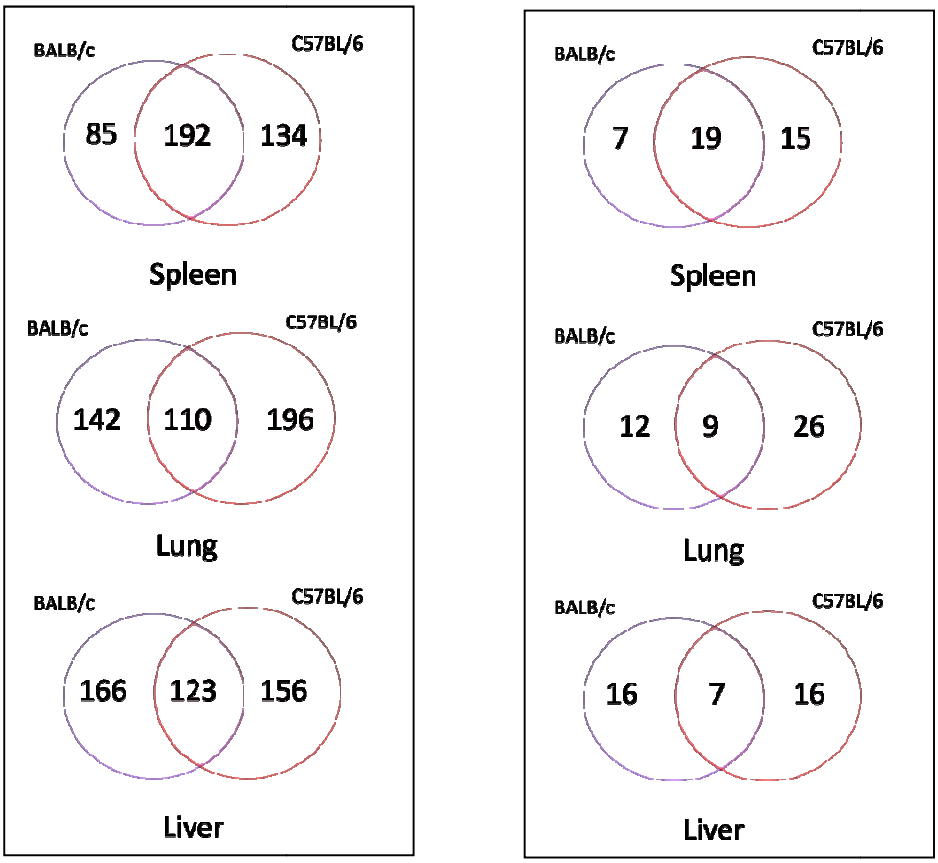
สำหรับในตับในหนูทั้งสอง มี 445 ยีนที่แสดงออกแตกต่างจาก *in vitro* โดยมี 123 ยีนพบเหมือนกันในหนูทั้งสอง 166 ยีนพบเฉพาะใน BALB/C และ 156 ยีนใน C57BL/6 (รูปที่ 17)

สำหรับยีนในกลุ่ม virulence-associated factors ของ *B. pseudomallei* นั้นพบว่ามี 19 ยีนในม้าม 9 ยีนในปอดและ 7 ยีนในตับ ที่มีการแสดงออกในแบบแผนเดียวกัน (ต่ำหรือสูง) ในหนูทั้งสอง โดยใน 19 ยีนในม้ามนั้นมี 5 ยีนที่แสดงออกสูงขึ้น และ14 ยีนที่ลดลง ส่วนในปอด จาก 9 ยีนมี 2 ยีน ที่แสดงออกสูงขึ้น และ 7 ยีนที่ลดลง ในกลุ่มยีนที่แสดงออกสูงขึ้นนั้น BPSS1521 แสดงออกใน C57BL/6 มากกว่า BALB/c ทั้งในปอดและตับ และใน 7 ยีนในตับ มี 3 ยีนที่แสดงออกสูงขึ้นและ 4 ยีนที่ลดลงเมื่อเทียบกับ *in vitro* (รูปที่ 17)

เป็นที่น่าสังเกตว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนแบคทีเรียในหนูนั้นเป็นไปในทิศทางที่ลดลงมากกว่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับ *in vitro* ยีน BPSS1264 เกี่ยวข้องกับ chemotaxis และ motility มีการแสดงออกที่สูงขึ้นมากและแสดงออกใน BALB/c มากกว่า C57BL/6 จึงเห็นได้ว่า ในหนูที่มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน จะมียีนจำนวนมากที่แสดงออกในระดับที่ต่างกัน แต่พบว่ายีนใน TTSS มีความสำคัญกับ *in vivo* condition เนื่องจากมีการแสดงออกสูงกว่าใน *in vitro* ในหนูทั้งสอง

4) การเปรียบเทียบแบบแผนการแสดงออกของยีนเป็นกลุ่มในแต่ละอวัยวะ

การจัดกลุ่มข้อมูลของยีนใน *B. pseudomallei* ที่มีแบบแผนการแสดงออกที่แตกต่างในอวัยวะของหนูซึ่งมีสภาวแวดล้อมต่างกันได้แสดงไว้แบบ hierarchical clustering ในรูปที่ 19 ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการจำแนกยีนที่มีบทบาทต่อการก่อโรคของแบคทีเรีย โดยอาศัยยีนที่มีข้อมูลเกี่ยวข้องกับยีนก่อโรคที่ได้เคยมีรายงานมาก่อน ยีนเหล่านี้อาจแสดงออกลดลงจากการกดจากภูมิคุ้มกันของ C57BL/6 จึงน่าจะแสดงออกใน BALB/C สูงกว่า C57BL/6 หรืออีกทางหนึ่ง ยีนที่แสดงออกใน C57BL/6 สูงกว่า BALB/C อาจเนื่องจากเป็นยีนก่อโรคใน *B. pseudomallei* ที่ต่อต้านระบบภูมิคุ้มกันของ C57BL/6

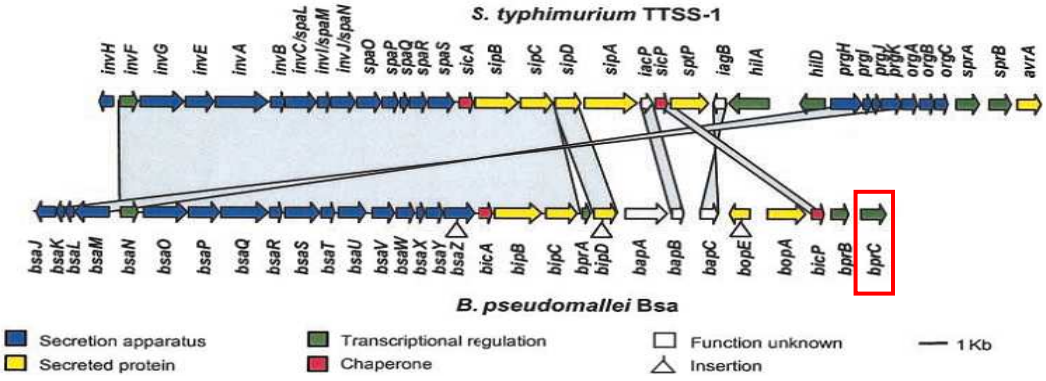


(A) (B)

รูปที่ 17 Venn diagrams แสดงจำนวนยีนของ *B. pseudomallei* ที่แสดงออกแตกต่างจากสิ่งแวดล้อม ในแต่ละอวัยวะของหนูแต่ละชนิด (A) ยีนที่แสดงออกเหมือนกันในม้าม ตับ และไตของหนู BALB/C และ C57BL/6 (B) virulence- associated genes ที่แสดงออกเหมือนกันในม้าม ตับและไตของหนู BALB/C และ C57BL/6

ในการศึกษานี้ได้นำแนวทางการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกใน BALB/C สูงกว่า C57BL/6 หรืออีกทางหนึ่ง ยีนที่แสดงออกใน C57BL/6 สูงกว่า BALB/C มาใช้เพื่อหายีนใหม่ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการก่อโรคของแบคทีเรีย โดยอาศัยการพบยีนที่ทราบหน้าที่ซึ่งเกี่ยวกับกลไกการก่อโรคในกลุ่มยีนที่คัดเลือกนี้เป็นเครื่องยืนยันแนวทาง เช่นใน T3SS3 locus ของ *B. pseudomallei* มีชื่อว่า Bsa (*Burkholderia* secretion apparatus) ประกอบด้วยยีนที่สร้างโปรตีนเพื่อใช้เป็นโครงสร้างของ secretion apparatus และโปรตีนที่ทำหน้าที่ (Stevens, Wood et al. 2002) (รูปที่ 18) *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *BsaQ* (BPSS1543) จะมีความสามารถในการบุกรุกเซลล์ A549 ซึ่งเป็น epithelial cells ของคนลดลง (Muangsombut, Suparak et al. 2008) ยีนนี้จึงมีบทบาทในการก่อโรค การศึกษานี้จึงใช้ยีน *BsaQ* เป็นแนวทางเพื่อคัดเลือกยีนที่มีแบบแผนการแสดงออกแบบเดียวกันนี้ด้วย นอกจากนี้ *BipC* translocation protein ใน T3SS3 (BPSS1531) ทำปฏิกิริยากับ convalescent serum จากผู้ป่วย melioidosis ซึ่งแสดงว่ามีการ

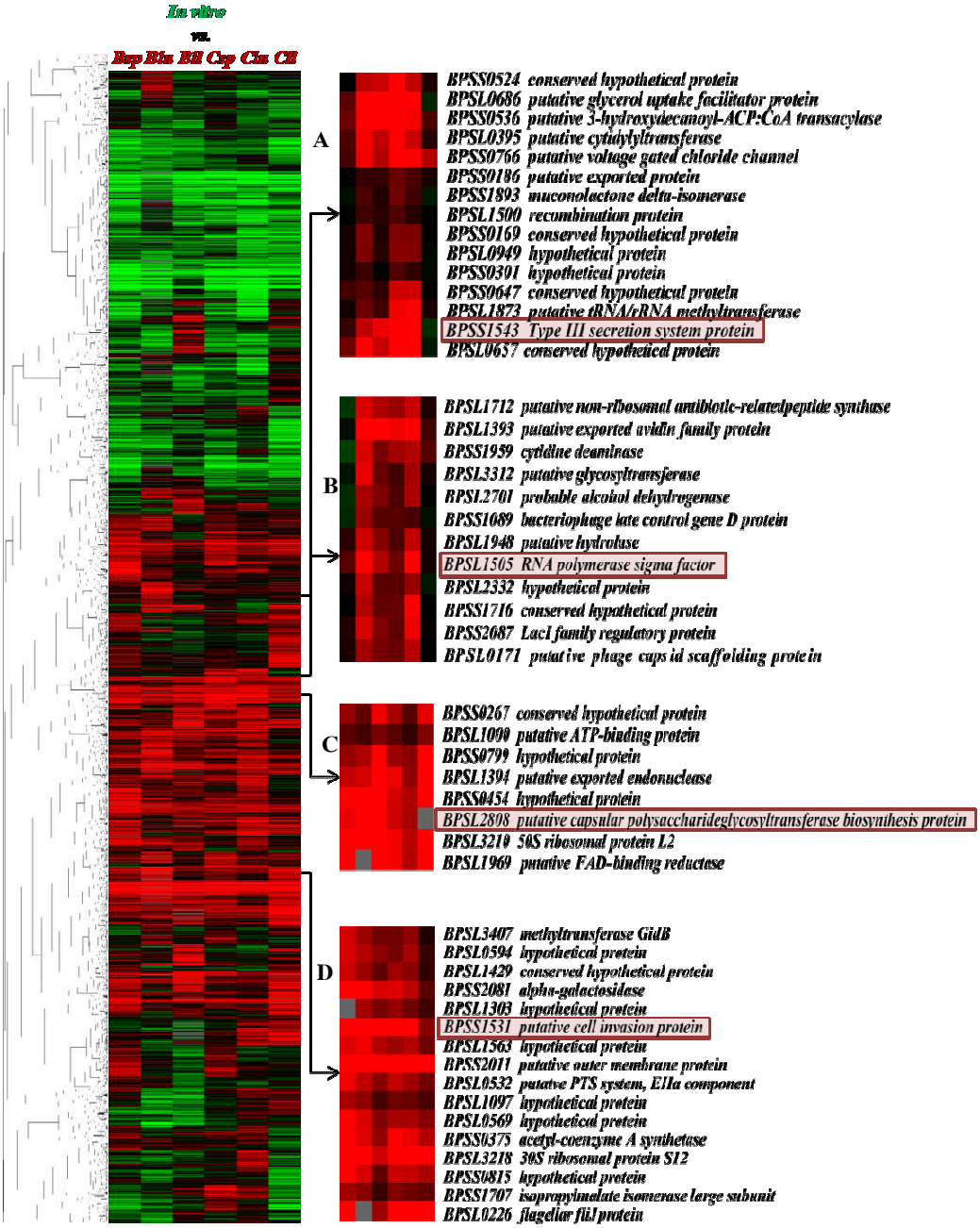
แสดงออกใน *in vivo* (Stevens, Wood et al. 2002) ข้อมูลที่ได้จาก Microarray data แสดงว่ายีนนี้มีการแสดงออกใน *in vivo* ต่างจาก *in vitro* ชัดเจน



รูปที่ 18 แสดงการเรียงตัวของยีนใน Type 3 secretion system (TTSS) ของ *S. typhimurium* เทียบกับ *B. pseudomallei* ซึ่งมีชื่อว่า Bsa ในกรอบแสดงยีน BPSS1521 ซึ่งอยู่ในบริเวณที่ใกล้กับ Bsa ของ *B. pseudomallei* (Stevens, Wood et al. 2002)

ยีนของ *B. pseudomallei* ในกลุ่มเดียวกับ BPSS1543 ที่แสดงออกสูงขึ้นในม้ามและปอดของ C57BL/6 เมื่อเทียบกับ *in vitro* และใน BALB/c มี 2 ยีนที่น่าสนใจคือ BPSS0524 (conserved hypothetical protein) ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ มีการแสดงออกที่ม้ามของ BALB/c มากกว่า C57BL/6 และ BPSL0657 (conserved hypothetical protein) ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่เช่นกัน มีการแสดงออกในม้ามและปอดของ C57BL/6 ที่สูงกว่าใน BALB/c (รูปที่ 19A)

ยีน BPSS1531ที่คาดว่าเป็น cell invasion protein หรือ *BipC* แสดงว่าถูกกระตุ้นให้แสดงออกในทุกอวัยวะแต่แสดงออกต่างจาก *in vitro* ในม้ามและปอดของ BALB/c และปอดของ C57BL/6 ยีน BPSS2011 (putative outer membrane protein) ซึ่งยังไม่มีการระบุหน้าที่ แสดงออกสูงขึ้นในเกือบทุกอวัยวะ ส่วนhypothetical proteins อื่นไม่มีการแสดงออกแตกต่างจาก *in vitro* (รูปที่ 19D)
มีรายงานว่า BPSL1505 (*RpoS*) (RNA polymerase sigma factor) เกี่ยวข้องในการควบคุมกระบวนการก่อโรคใน *B. pseudomalle* โดยพบว่า *rpoS* mutants สามารถกระตุ้นระดับของ iNOS ให้สูงขึ้นซึ่งส่งผลให้การอยู่รอดของแบคทีเรียลดลง (Utaisincharoen, Arjcharoen et al. 2006) และไม่สามารถทำให้เกิดการสร้าง Multinucleated Giant Cell (MNGC) รวมทั้งไม่สามารถกระตุ้น cytotoxicity ในการศึกษานี้พบว่ายีนนี้แสดงออกใน *in vivo* ต่างจาก *in vitro* และแสดงออก ในปอดของ BALB/c สูงกว่า C57BL/6 นอกจากนี้ยีนใน cluster เดียวกัน เช่น BPSL1393 (putative exported avidin family protein) ซึ่งยังไม่มีการระบุหน้าที่ มีการแสดงออกในปอดของ BALB/c มากกว่า C57BL/6 ยีน BPSL3312 (putative glycosyltransferase) ใน cell envelope biogenesis และ outer membrane และยีน BPSS1716 (conserved hypothetical protein) ซึ่งยังไม่มีการระบุหน้าที่ ก็มีแบบแผนการแสดงออกเหมือนกัน (รูปที่ 19B).



รูปที่ 19 TreeView chart แสดงการจัดกลุ่มการแสดงออกของยีนที่มีแบบแผนเดียวกันในอวัยวะของหนูทั้งสองชนิด โดยแต่ละแถวตั้งเป็นผลการแสดงออกของแต่ละการทดลอง โดย Bsp คือการแสดงออกในม้ามของหนู BALB/c, Blu การแสดงออกในปอดของ BALB/c และ Bli คือตับของ BALB/c ส่วน Csp, Clu, Cli คือการแสดงออกในม้าม ปอด และตับของหนู C57BL/6 แถวนอนเป็นผลของแต่ละยีน ความเข้มสีเป็น $\log_2$ ratios โดยเขียว negative; ดำ, zero; แดง, positive; เทา, missing data. ยีนใน cluster ที่มีแบบแผนการแสดงออกเหมือนกับยีนที่เคยมีรายงานว่าสัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อโรคจะจัดไว้ด้วยกันเป็นกลุ่ม โดยกรอบรอบยีนที่เคยมีรายงานดังนี้ (A): BPSS1543 (*BsaQ*), (B): BPSL1505 (*RpoS*), (C): BPSL2808 (*wcbB*) and (D): BPSS1531 (*BipC*)

Extracellular polysaccharide capsule เป็นปัจจัยให้เกิดความรุนแรงในการติดเชื้อ *B. pseudomallei* กลุ่มของยีนที่อยู่บริเวณ type I O-PS biosynthetic locus คือ *wcbN, wcbC, wzm2, wcbQ* และ *wcbB* ซึ่งมีรายงานว่าหากทำให้ยีนใดในกลุ่มนี้ไม่ทำงาน จะลดการอยู่รอดของแบคทีเรีย (Atkins, Prior et al. 2002; Cuccui, Easton et al. 2007; Lazar Adler, Govan et al. 2009) *B. pseudomallei* ที่ *wcbB* กลายพันธ์พบว่า attenuated เมื่อทดสอบในแฮมสเตอร์ รวมทั้งมีอัตราการเจริญในเลือดลดลง (Reckseidler, DeShazer et al. 2001; Reckseidler-Zenteno, DeVinney et al. 2005) ผลการทดลองใน microarray ของเราแสดงว่ายีน *wcbB* มีการแสดงออกที่สูงขึ้นใน *in vivo* และเมื่อ clustering เพื่อศึกษายีนอื่นที่มีแบบแผนเดียวกัน ก็จะนำไปสู่กลุ่มของยีนที่มีบทบาทในกระบวนการก่อโรค

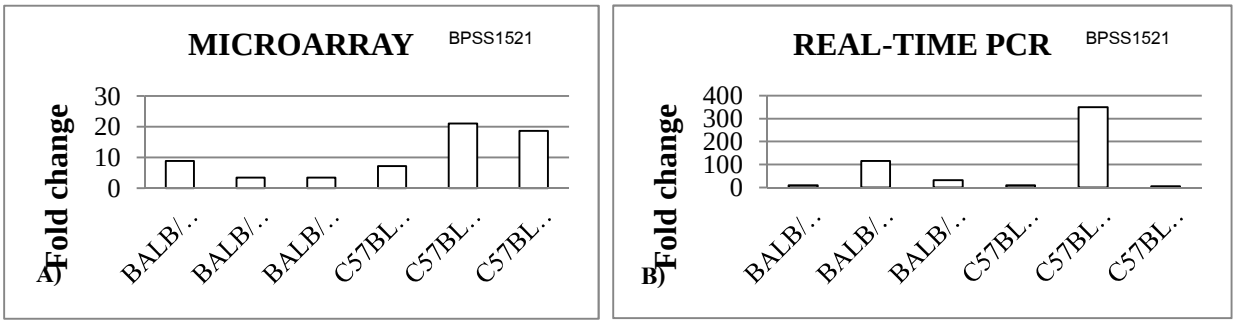
ในรูปที่ 19C แสดงยีน BPSL2808 ซึ่งเป็น putative capsular polysaccharide glycosyltransferase biosynthesis protein ซึ่งแสดงออกสูงขึ้นในเกือบทุกสภาวะที่ศึกษา และเพิ่มขึ้นถึง 4.2 เท่าในตับของหนูBALB/c นอกจากนี้ยังมียีนที่น่าสนใจ เช่น BPSS0267 (conserved hypothetical protein) ในกลุ่ม general function PSS0799 (hypothetical protein) ในกลุ่ม signal transduction mechanism และ BPSS0454 (hypothetical protein) ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ ยีนทั้งสามน่าจะเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรค และแสดงออกใน BALB/c สูงกว่า C57BL/6 (รูปที่ 19C)

5) Gene validation โดย real time RT-PCR

จากข้อมูลของ DNA Microarray ได้คัดเลือกยีนที่มี expression ratio มากกว่า 2SD หรือ น้อยกว่า -2SD เมื่อเทียบในอวัยวะเดียวกันของหนูสองชนิด ที่มีแนวโน้มสูงในบทบาทของการก่อโรคหรือความรุนแรงในการก่อโรค พบว่ายีนที่เข้าข่ายนั้น จำนวนหนึ่งเป็นยีนที่เคยมีรายงานว่าสำคัญต่อการก่อโรค หรือความรุนแรงของการก่อโรค และพบยีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่จำนวนหนึ่งซึ่งจัดเป็น novel gene ที่อาจสำคัญต่อการก่อโรคของแบคทีเรียคือ ซึ่งเป็นยีนใน TTSS3 ที่เป็น putative regulator ที่มีการแสดงออกสูงกว่า *in vitro* ในทุกอวัยวะของหนูทั้งสองชนิด และ BPSS1512 ซึ่งมีข้อมูลว่าเป็น ubiquitin-like protein จึงออกแบบ primer (ตารางที่ 12) เพื่อตรวจยืนยันการแสดงออกของยีน BPSS1521 ในแบคทีเรียที่ติดเชื้อในหนูเป็นเวลา 3 วัน ด้วยวิธี qReal-time RT-PCR (รูปที่ 20B) โดยเทียบกับผลของ DNA Microarray (รูปที่ 20) ผลของ qReal-time RT-PCR ยืนยันว่ายีน BPSS1521 แสดงออกใน *in vivo* สูงกว่า *in vitro* ในทุกอวัยวะแต่ต่างที่ fold changes จากการทำ three replicates ของทุกตัวอย่างและใช้ 2 biological replicates และเป็นเช่นเดียวกันสำหรับยีน BPSS1512 นอกจากนี้ยังมียีนที่ทราบหน้าที่อีก 5 ยีนที่ได้คัดเลือกมาทดสอบการแสดงออกเมื่อเทียบกับ Microarray โดยใช้ 16SrRNA เป็นตัวควบคุม (คิดเป็น ratio, expression ของยีนที่ศึกษา/ 16SrRNA) ซึ่งผลเป็นไปในทางเดียวกัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

ตารางที่ 12 primers ที่ใช้ในการทำ qReal-time RT-PCR เพื่อยืนยันการแสดงออกของยีน *B. pseudomallei* ที่คัดเลือกในหนู

GenBank accession number	Gene name	Primers	Amplicon size (bp)
YP_111519	BPSS1512	5'-GGACAAACGCTGGAAGTGAT-3' (FORWARD) 5'-GTTCAGAAAGAACGCCTTGG-3' (REVERSE)	129
YP_111527	BPSS1521	5'-TCGATCTTCTCGCTGACCTC-3' (FORWARD) 5'-TCAAGGAGATCCGCTTCAAC-3' (REVERSE)	100
YP_110202	BPSS0181	5'-GTGCTGAACGCGTATTCGTA-3' (FORWARD) 5'-AAACCAGTAGATGCCGTGCT-3' (REVERSE)	138
YP_106972	BPSL0345	5'-GCCGATCGATATCGTCTTGT-3' (FORWARD) 5'-GATCGAAGAACAGCGTCTCC-3' (REVERSE)	149
YP_110545	BPSS0524	5'-TCCAGGAAACGGATCTGAAC-3' (FORWARD) 5'-CGAGATCACCACCACATGAC-3' (REVERSE)	101
YP_110546	BPSS0525	5'-CTGTCGTTCAAGCAGCAGAC-3' (FORWARD) 5'-CTGTCGTCGAGCAGGAAATC-3' (REVERSE)	101
YP_107286	BPSL0657	5'-ATCGCGGTAATTGATTCGAG-3' (FORWARD) 5'-CTACTGGGAACAGGCGAAGA-3' (REVERSE)	136
	16S rRNA	5'-GGCTAATACCCGGAGTGGA-3' (FORWARD) 5'-CTAGCCTGCCAGTCACCAA-3' (REVERSE)	194



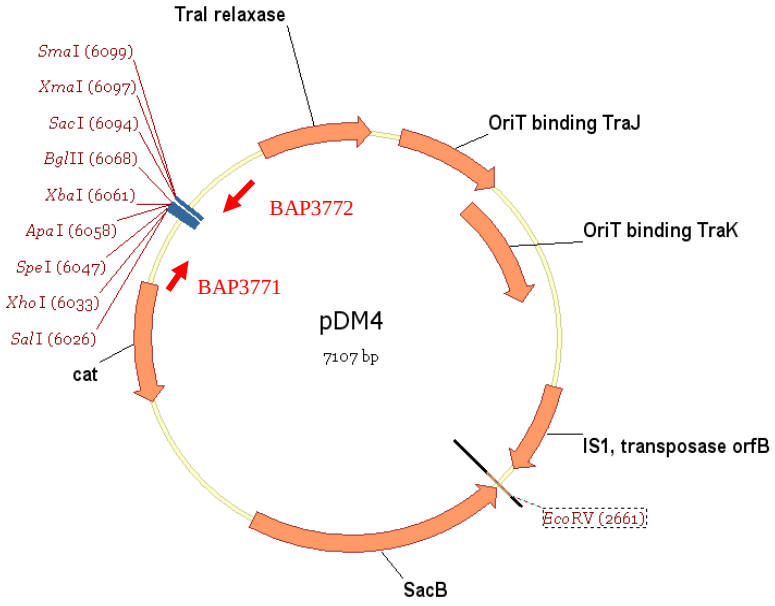
รูปที่ 20 ผลการแสดงออกของยีน BPSS1521 เป็นเท่าของการเปลี่ยนแปลง (fold change) ที่สูงกว่า *in vitro* ในปอด ม้ามและตับของหนู BALB/c และ C57BL/6 โดยวิธี A) Microarray และ B) real time PCR

6) การสร้าง *B. pseudomallei* กลายพันธุ์ที่ไม่มียีน BPSS1521 หรือ BPSS1512

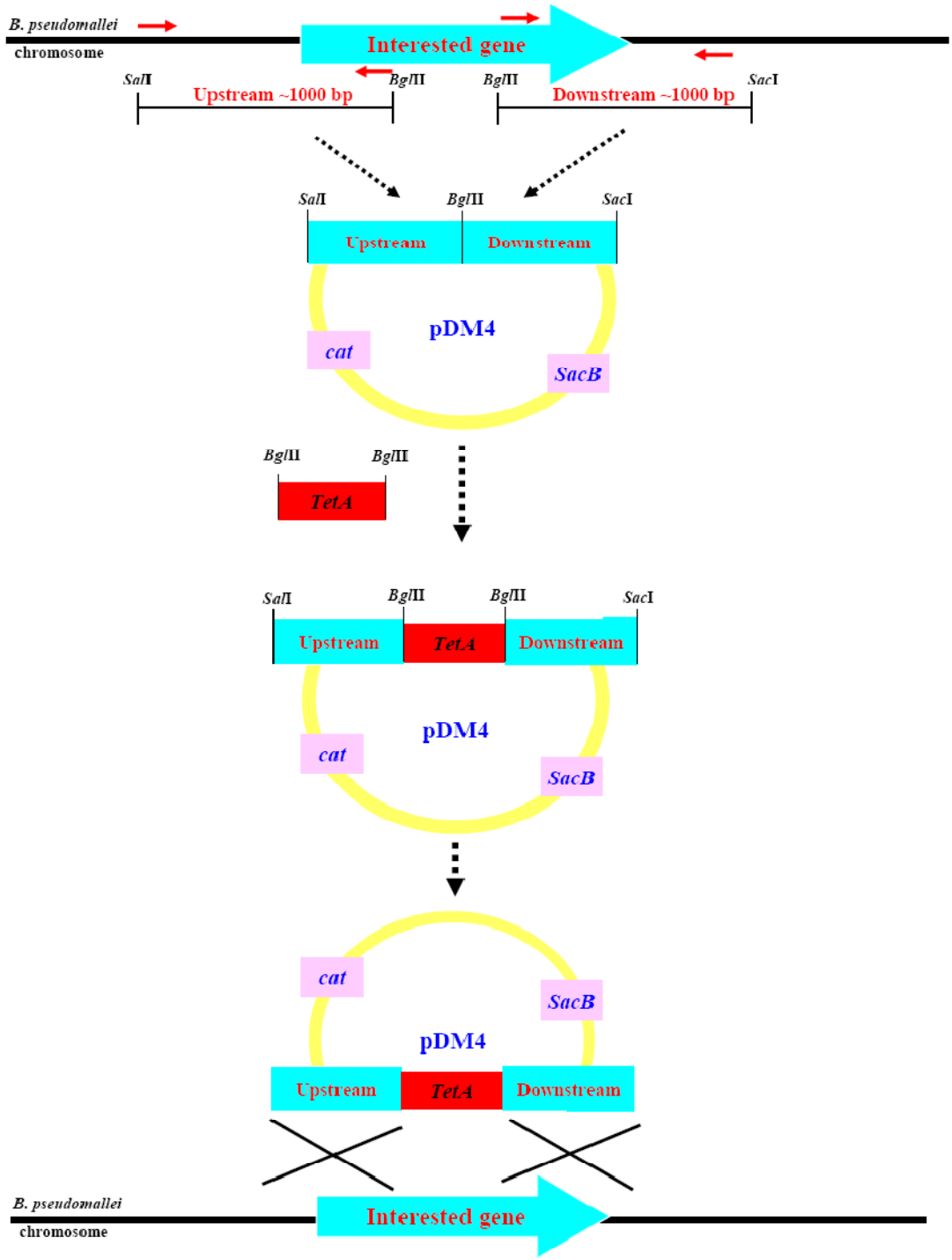
เพื่อสร้าง *B. pseudomallei* strain K96243 ที่ไม่มียีน BPSS1521 (Hypothetical protein) หรือ BPSS1512 (Putative membrane protein) ได้ออกแบบ primer เพื่อเพิ่มชิ้น DNA ทางด้านหัวและท้าย (800-1,000 bp) ของยีนแต่ละยีนและเพิ่ม restriction site สำหรับการโคลน (ตารางที่ 13) แล้วทำการโคลนเข้า suicide vector pDM4 (รูปที่ 21) pDM4 มีขนาด 7,107 bp ที่มี *oriR6K* สำหรับสร้าง levansucrase (*sacBR*) เพื่อใช้ในการคัดเลือก รวมทั้งยีน chloramphenicol resistance ขั้นตอนการสร้าง mutant แสดงในรูปที่ 22 ซึ่งยีนที่จะทำให้กลายพันธุ์จะถูกแทรกด้วย tetracycline resistance cassette จาก pUTminiTn5Tc (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Ben Adler, Monash University, Australia).

ตารางที่ 13: Sequence of the forward and reverse primers for mutant construction (I)

Gene name		Restriction Enzyme Added	Primers	Amplicon size (bp)
BPSS1521	Upstream	*Bgl*II *Xba*I	**F** 5'-TTATGAAGATCTtttcctgtcgtgaacattgg-3' **R** 5'-TTAATTTCTAGAgcatcggagcaacaagaatc -3'	927
	Downstream	*Xma*I *Bgl*II	**F** 5'-ATAATACCCGGGgatgaagatgctgctcgatg-3' **R** 5'-TTGTCAAGATCTgcgtaacgtgtgacgtgttg-3'	929
BPSS1512	Upstream	*Sac*I *Bgl*II	**F** 5'-AAATATGAGCTCgcacgctgacgaactacaac-3' **R** 5'- TAACTCAGATCTctttcacgaaccgctcgat-3'	993
	Downstream	*Bgl*II *Xba*I	**F** 5'-TATGAGAGATCTtgtctaagtcgaacgcatcg-3' **R** 5'- ATGAAGTCTAGAtgggcgttatggtcaaattc-3'	952



รูปที่ 21 Physical และ genetic map ของ suicide vector pDM4



รูปที่ 22 Diagram แสดงการสร้าง mutant ของยีนที่คัดเลือก โดยใช้ plasmid vector pDM4 ยีนเป้าหมายเมื่อเกิดการ re-combined จะได้ mutant ที่มียีน TetA แทรกอยู่กลางยีน ทำให้ไม่แสดงออกและสามารถใช้เป็น selectable marker ได้

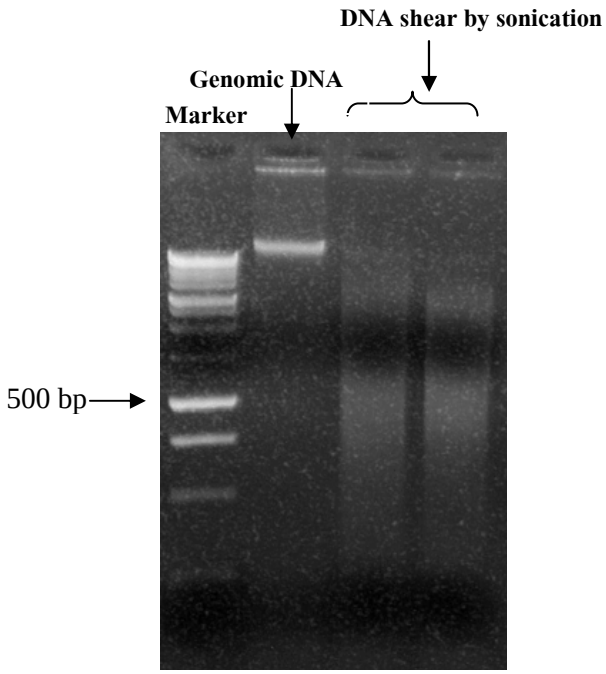
2.2 การศึกษา comparative genome hybridization ของ *B. pseudomallei*

- Genomic DNA label เนื่องจากในระยะเริ่มแรกของการทดลองยังไม่มี RNA จาก *in vivo* เพียงพอในการศึกษา condition ที่เหมาะสมในการ hybridization และมี RNA จาก *in vitro* ไม่มากจึงใช้ Genomic DNA จาก *B. pseudomallei* ในการทดสอบโดยเปรียบเทียบ labeling signal ระหว่าง Nick translation และ TIGR protocol ที่ label microbial genomic DNA ด้วย aminoallyl-dUTP nucleotides โดยเอนไซม์ Klenow DNA polymerase โดยจะ coupling aminoallyl groups ด้วย Cyanine-3 หรือCyanine-5 (Cy-3/Cy-5) fluorescent molecules ซึ่งจะต้องตัด genomic DNA ให้มีขนาดเหมาะสมก่อน

http://www.tigr.org/tigrscripts/CMR2/restrict_display.pl

ใน web site ของ TIGR ที่ระบุ จะให้ใช้ program เพื่อค้นหา restriction endonuclease ที่เหมาะสมในการตัด genome ที่มีลำดับในฐานข้อมูล โดยขนาดเฉลี่ยที่ตัดแล้วควรอยู่ประมาณ 2 – 5 Kb จากการคำนวณ เอนไซม์ *Sal* I จะให้ขนาดหลังตัดเฉลี่ยประมาณ 891 bp เมื่อตัดด้วย *Sal* I พบว่าขนาดเฉลี่ยของ DNA ค่อนข้างใหญ่กว่าที่ต้องการ จึงใช้ ultrasonication เพื่อทำให้ DNA shear ผลเป็นดังรูปที่ 24

ผลการ label ด้วย aminoallyl-dUTP nucleotides ได้ dye incorporation ratio ต่ำ จึงเปลี่ยนไปใช้วิธี nick translation โดยใช้ genomic DNA จาก 17 isolates ทั้งจากสิ่งแวดล้อมและที่แยกได้จากผู้ป่วย label ด้วย Cy3 และใช้ K96243 genome strain label Cy5 ผลการ label ได้ผลดังตารางที่ 14



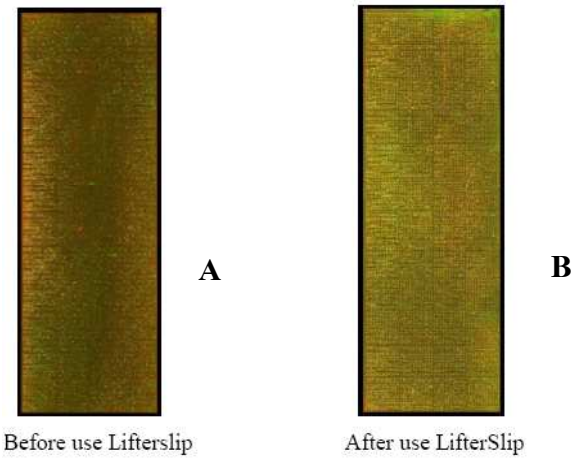
รูปที่ 24 Ethidium bromide stain gel แสดง 1 Kb markerในแถวที่ 1, Genomic DNA ที่สกัดได้ แถวที่ 2 และGenomic DNA ที่ shear ด้วย ultrasonication แถวที่ 3-4

ตารางที่ 14 ผลการ label genomic DNA ด้วย Cy3

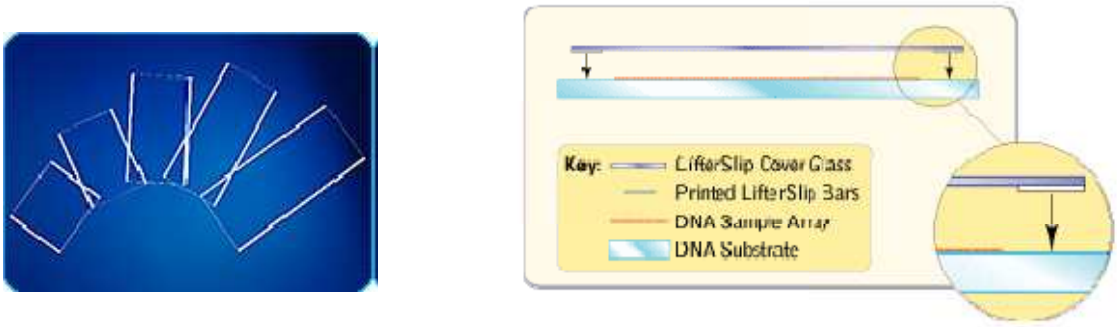
Sample	Cy3-Labeled	Concentration DNA (ng/ul)	Dye/Probe (pmol/ul)
1	BP012	48	5.0
2	C2	56	8.4
3	BP050	62	5.8
4	BP049L	56	7.0
5	H140	68	3.2
6	P171	52	3.4
7	H307	44	4.2
9	P263	80	8.0
10	H574	308	7.2
11	P475	64	6.2
12	H568	76	6.8
13	P69	56	6.0
15	BP061	24	0.2
16	1-1208	146	0.8
17	1-1068	156	0.6

-Genomic DNA hybridization บน Microarray slide

เมื่อทดลอง hybridized Genomic DNA ที่ label ด้วย Cy3 บน Microarray slide พบว่า signal การ hybridization ไม่สม่ำเสมอโดยกลางแผ่นมี signal อ่อนกว่า เนื่องจาก solution กระจายไม่สม่ำเสมอดังรูปที่ 25A จึงใช้ LifterSlip Cover Glass เพื่อกระจาย solution ซึ่งให้ผลดีกว่า (รูปที่ 25 B)



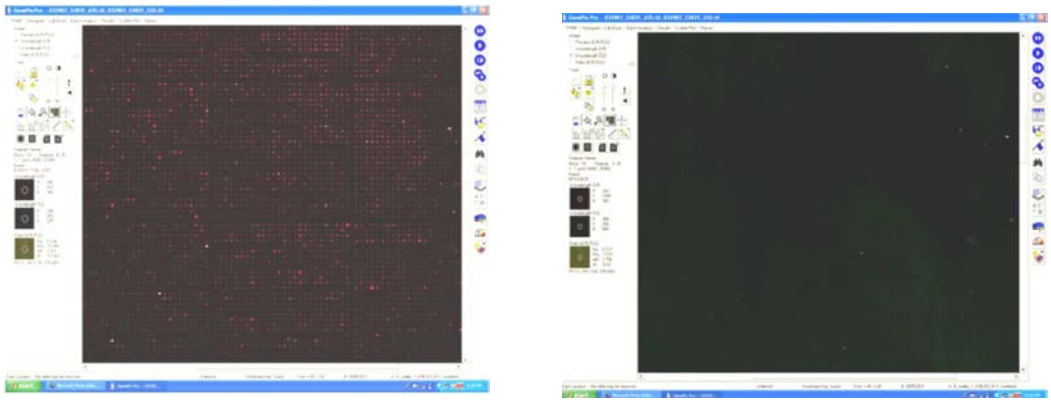
รูปที่ 25 ผลการ Hybridization บน Microarray slide จะเห็นบริเวณกลาง slide ที่มี signal จาง (A) และสม่ำเสมอขึ้นเมื่อใช้ LifterSlip Cover Glass (B)



รูปที่ 26 แสดงรูปของ LifterSlip และลักษณะการใช้งาน

เมื่อนำ genomic DNA ที่ label (Cy3) มา hybridize เทียบกับ K96243 (Cy5) ได้ good hybridization slide จาก clinical ทั้งหมด 8 slides และ environment 6 slides ซึ่งจะได้ทำการ analyzed โดย GeneSpring GACK software หรือโปรแกรมอื่น ที่มี ต่อไป

Comparison of genomic DNA and cDNA hybridization สำหรับ cDNA ที่ได้จาก GDPs และ random primers เมื่อมา hybridize กับ Microarray slide พบว่า % expression เป็น 40% กับ 38% ตามลำดับ แต่การ hybridization ของ cDNA- Cy3 ไม่ดีเมื่อเทียบกับการใช้ genomic DNA ที่ label Cy3 hybridize กับ slide ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 แสดงผล hybridization โดยใช้ genomic DNA ที่ label Cy3 ด้านซ้าย และ cDNA label Cy3 ด้านขวา

ได้ปรับ condition ของการ hybridization และพบว่าเป็นปัญหาจาก Microarray slide ที่ได้มาชุดที่สอง ที่ต้องการ probe ในการ hybridization ประมาณ 2 เท่า ของที่ใช้ใน lot เดิม เมื่อปรับจนผลเป็นที่น่าพอใจจึงเริ่มทำ cDNA จาก *in vitro* culture ก่อนเนื่องจากได้ RNA คุณภาพดี ได้ slide ทั้งหมด 3 replicates ซึ่งจะรอ analyze ต่อไปเช่นกัน

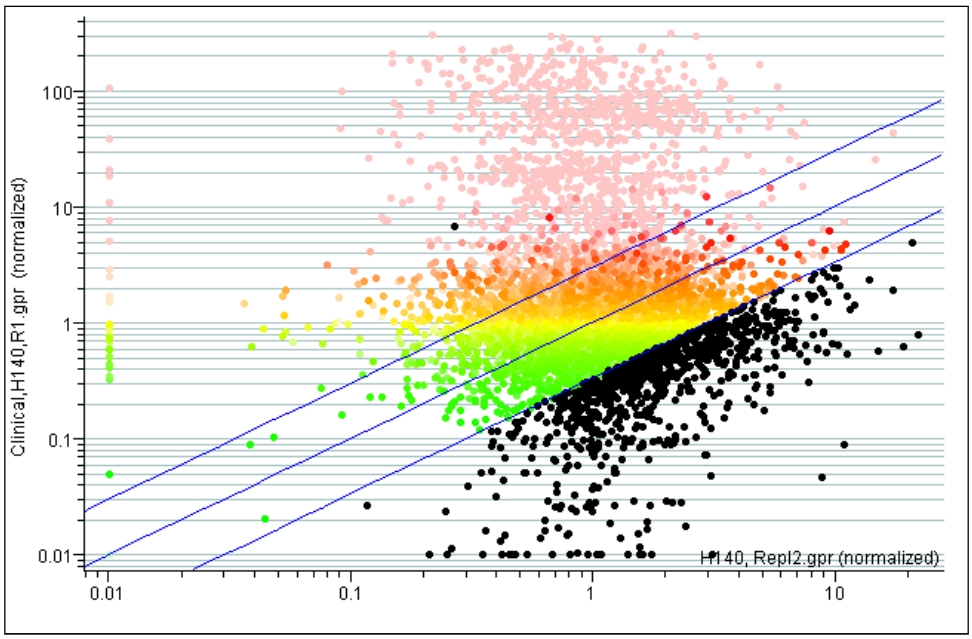
-Normalization and data analysis using GeneSpring

ทำการทดลองโดยใช้ genomic DNA ของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย H140 ที่ label (Cy3) มา hybridize เทียบกับ K96243 (Cy5) นำข้อมูลจากการ scanning มาทดลอง normalizationดังนี้

1. Clinical Isolate : H140 (Replicate 1 และ 2).
2. Normalizations : LOWESS normalization.
3. Interpretation : Log Scale (View data as a distribution of ratios on a logarithmic scale).
4. Filtering for Differential Expression. (Base on fold change)

   : Filter for genes that are 3-fold up and down-regulated. To specifically identify genes that were differentially expressed by more than 3-fold
5. The presences of significant gene diversity.

   : Select genes lower 3 fold.
6. คัดเลือกยีนที่มีสัญญานต่ำกว่า K96243 อย่างน้อย 3 fold ซึ่งได้ 848 ยีน (รูปที่ 28) แล้ววิเคราะห์ gene deletion analyzed โดย GACK software



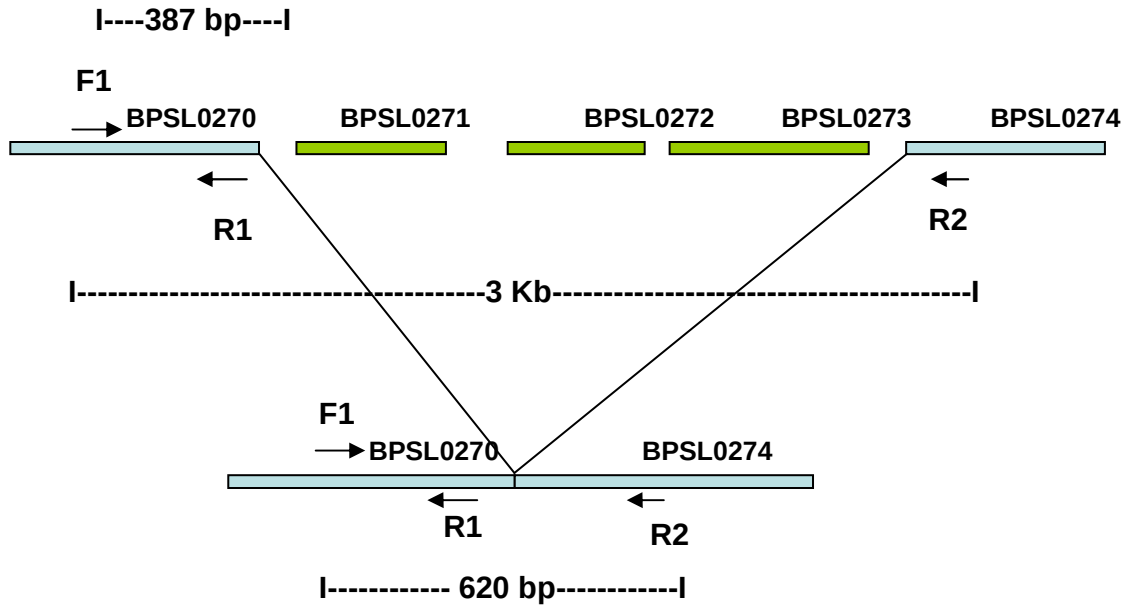
รูปที่ 28 Scatter plot ของยีน H140 normalized replicate1 versus replicate2

- GACK analysis

GACK เป็นการ categorize ข้อมูล โดยนำ raw หรือ normalized signal values จาก microarray แปลงเป็นข้อมูลที่มีความซับซ้อนน้อยลงและ classified เป็น present หรือ absent โดย GACK analysis โดยผลลัพท์ของการวิเคราะห์รายงานว่าพบยีน 1,313 ยีนที่ absent ใน isolate H140 เมื่อเปรียบเทียบกับ reference strain (K96243)

-PCR verification

เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการวิเคราะห์ยีนที่ absent โดย GeneSpring and GACK analysis ได้เลือกมาบริเวณหนึ่ง (ตารางที่ 15) เพื่อทดสอบโดยออกแบบ primer 3 เส้น เพื่อ amplify บริเวณ franking ของยีนที่คาดว่าจะเกิด deletion (รูปที่ 29) ซึ่ง primers คู่หนึ่ง(forward และ reverse 1) จะเพิ่มชิ้น DNA ที่อยู่ upstream ของ target region ขนาดประมาณ 1.5 Kb และ primer ที่ 3 (reverse 2) จะออกแบบให้ amplify ในช่วง downstream ของบริเวณเดียวกันขนาดไม่เกิน 3 Kb (forward และ reverse 2)



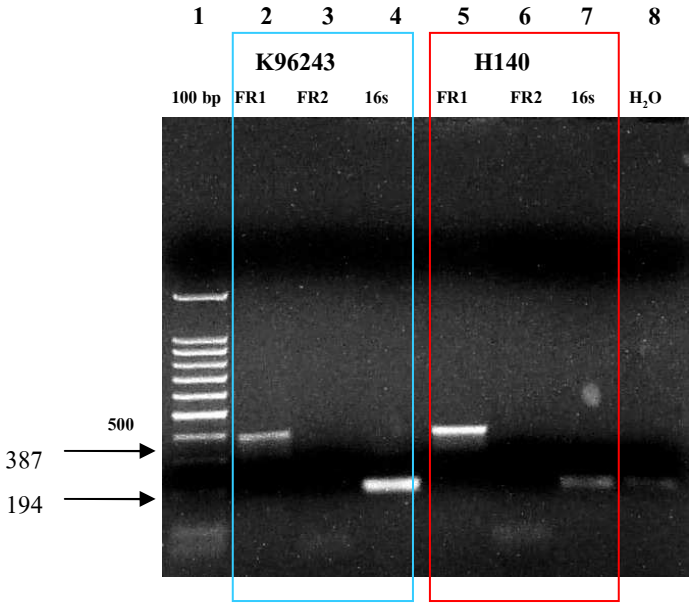
รูปที่ 29 รูปแสดงการออกแบบ PCR เพื่อยืนยันการ deletion ของยีนในบริเวณที่เลือกไว้ทดสอบ

ตารางที่ 15 ยีนที่หายไปใน H140 strain (BPSL0271-73) และ franking gene BPSL0270 และ

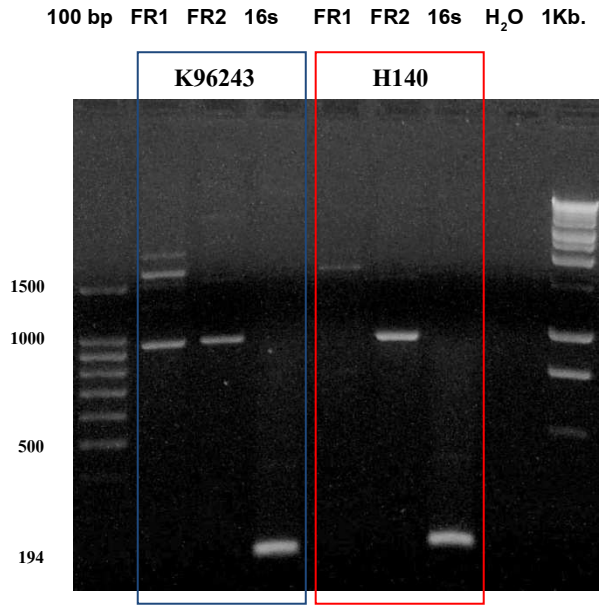
NAME	Location	Strand	Product
BPSL0270	282577..283068	+	putative flagella basal-body rod protein
BPSL0271	283152..283577	+	flagella basal-body rod protein
BPSL0272	283697..284482	+	putative basal-body rod modification protein
BPSL0273	284510..285751	+	putative flagella hook protein
BPSL0274	285778..286539	+	flagella basal-body rod protein

Primer Design	
- BPSL0270 LEFT PRIMER AGGAACTGCTGTCGTCGAAC (F) RIGHT PRIMER TCTTGATCTGCTGCGTCATC (R1) SEQUENCE SIZE : 492 PRODUCT SIZE : 387	**- BPSL0274** LEFT PRIMER CGACTGATCTATACGGCGATG RIGHT PRIMER TCGACGACAGCGTGTAGGT (R2) SEQUENCE SIZE: 762 PRODUCT SIZE (F, R2) : 3,316 bp (Expect, if not deleted) PRODUCT SIZE (F, R2) : 620 bp (Expect, if gene deleted)

การ Amplify DNA ของ K96243 (reference strain) ซึ่งแสดงว่าไม่มี deletion และ H140 จะได้ PCR product จาก forward-reverse1 primer set 387 bp ในขณะที่ forward และ reverse 2 primer set จะไม่สามารถ amplify K96243 ได้ถ้าไม่มีการ deletion เมื่อทำ PCR สามารถ amplified K96243 ได้ band ขนาด 387 bp และไม่สามารถ amplified ด้วย forward และ reverse 1 และสามารถ amplified H140 ได้ band ขนาด 387 bp ได้ตามคาด แต่ก็ไม่สามารถ amplified ด้วย forward และ reverse 2 ได้ (รูปที่ 29, 30) เนื่องจากชิ้นที่ amplified โดย forward และ reverse 2 มีขนาดประมาณ 620 bp อาจไม่สามารถ amplified ด้วย *Taq* DNA polymerase เมื่อลองใช้ GoTaq DNA polymerase ซึ่ง enhanced amplification มากกว่า conventional *Taq* DNA Polymerase ผลดังรูปที่ 31



รูปที่ 30 Agarose gel electrophoresis ของ PCR product, lane 1, 100 bp size marker, lane 2-4 amplified product ของ K96243 โดย lane 2ใช้ forward และ reverse 1, lane 3 forward และ reverse 2, lane 4 primer สำหรับ 16s Bp, lane 5-7 amplified product ของ H140 โดย lane 5ใช้ forward และ reverse 1, lane 6 forward และ reverse 2, lane 7 primer สำหรับ 16s Bp และ lane 8 negative control, ลูกศรแสดงขนาดของ PCR product 387 bp จาก forward และ reverse 1 และ 194 bp จาก 16s rRNA (positive control)



รูปที่ 31 Agarose gel electrophoresis ของ PCR product, lane 1, 100 bp size marker, lane 2-4 amplified product ของ K96243 โดย lane 2ใช้ forward และ reverse 1, lane 3 forward และ reverse 2, lane 4 primer for 16s Bp, lane 5-7 amplified product ของ H140 โดย lane 5ใช้ forward และ reverse 1, lane 6 forward และ reverse 2, lane 7 primer for 16s Bp, lane 8 negative control และ 194 bp จาก 16s rRNA (positive control)

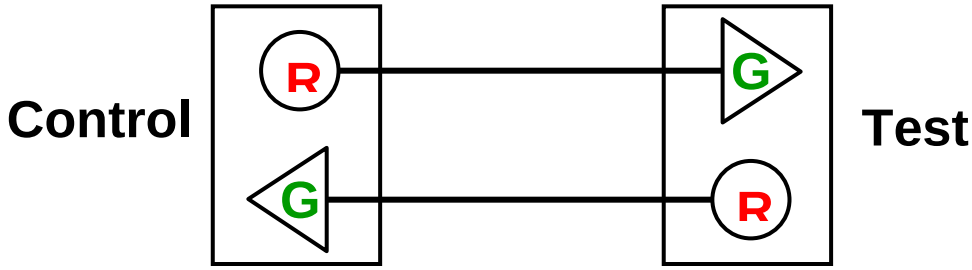
ผลการทดลองได้แถบที่ไม่ตรงตามที่คาด แต่ control positive 16s rRNA ยังสามารถ amplify ได้ถูกต้อง อาจต้อง blast Bp genome ด้วย primer เพื่อดูบริเวณที่อาจถูก amplify ได้ด้วย primer นี้ และเนื่องจากไม่สามารถยืนยัน deletion signal จากการ hybridization ดังนั้นการทำ genomic hybridization ด้วย dye 2 สียังอาจมี error จึงทดสอบและ compensate ด้วย Dye-Swap

-Dye-Swap Experiment

Two-color microarray experiments ที่ใช้ cy-3 และ cy-5 นั้น เนื่องจากคุณสมบัติที่ไม่เหมือนกันบางอย่าง เช่น incorporation property ของ dye ทั้งสอง อาจทำให้มีความแตกต่างกันในการ hybridize เป็น systematic errors ที่สำคัญ ดังนั้น การทำ Dye-Swap โดย reverse labeling DNA ตัวอย่าง จึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วย compensate สำหรับ signal correlation bias

Experimental Design: DNA จาก isolate ต่าง ๆ จะ labeled ด้วย Cy-3 และ K96243 control จะ labeled ด้วย Cy-5 จากนั้น Dye-swap จะ label DNA target จาก isolate ต่าง ๆ ด้วย Cy-5 และ K96243 control ด้วย Cy-3

	Array	
	1	2
Cy-3	Test	Control
Cy-5	Control	Test



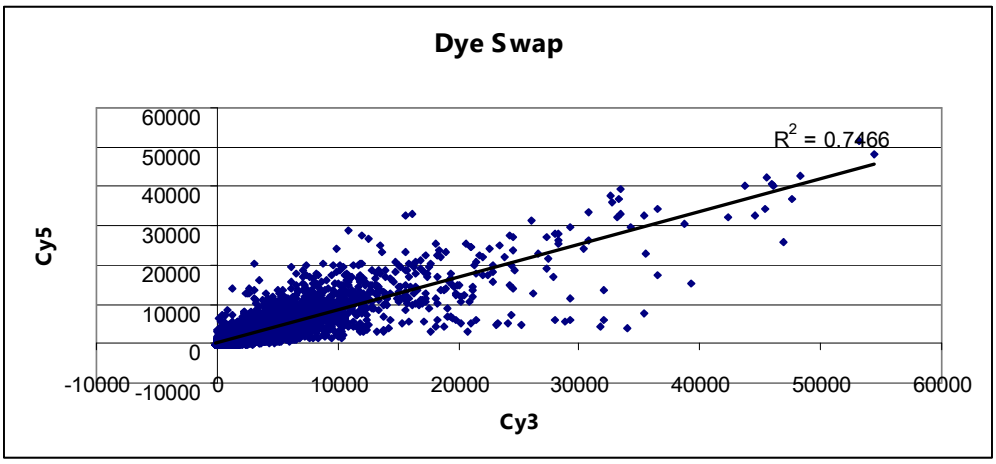
X (Cy-3)/ Y(Cy-5) = X(Cy-5)/ Y(Cy-3)

สัดส่วนที่ได้ควรจะใกล้เคียงกันเมื่อสลับการ label ของ dye ทั้งสอง

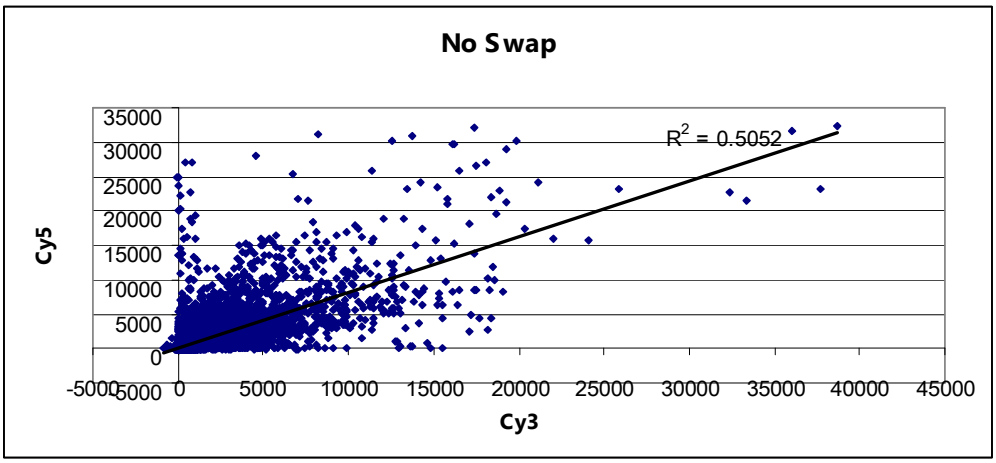
Microarray analysis.

1. Clinical Isolate : P263 (Replicate 1 and 2).
   P263-Dye swap (Replicate 1 and 2)
2. Normalizations : LOWESS normalization.
   Data transformation: Dye swap.
3. Interpretation : Cross-Gene error model on “Replicates”.
   Replicate sample is Dye-Swap hybridization

ผลที่ได้ของ ratio “ X (Cy-3)/ Y(Cy-5) = X(Cy-5)/ Y(Cy-3) ” (Correlation ในรูปที่ 32 และ 33)

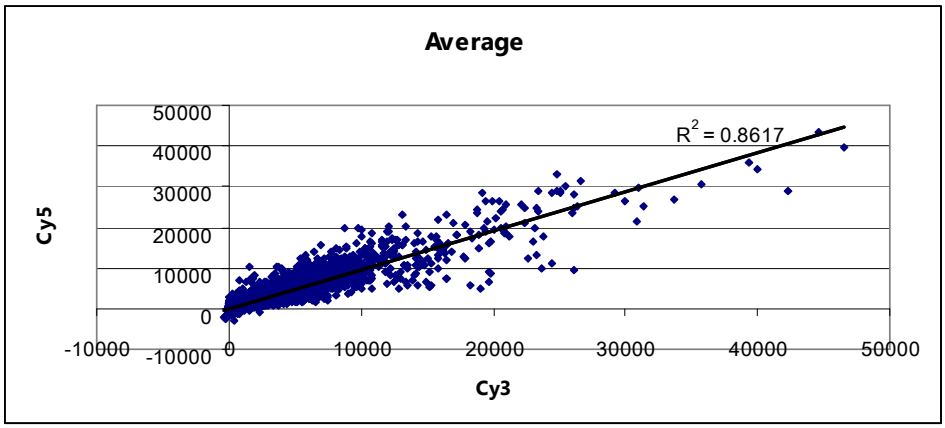


รูปที่ 32 Signal correlation จาก Dye Swap experiment



รูปที่ 33 Signal correlation of Standard experiment

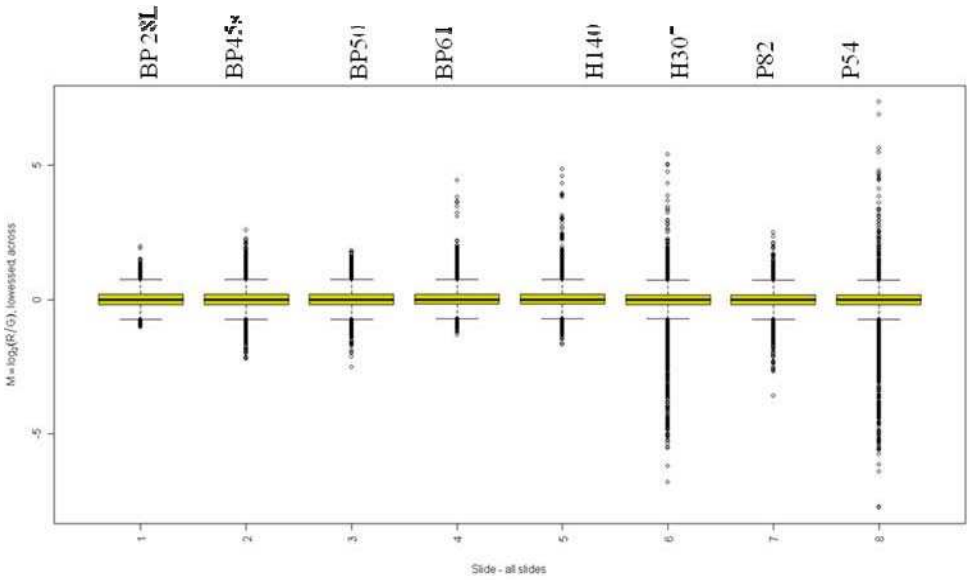
Compensate dye bias โดย averaging ratios จาก dye-swap hybridizations ระหว่าง standard (no swap) และ dye-swap โดยเปรียบเทียบ dye intensities กับ Cy3/Cy5 เนื่องจาก signal correlation bias จะให้ค่า signal ห่างออกจาก regression line ซึ่งจะดีขึ้นโดย signal มี correlation (R^2)ใกล้ 1.0 หลัง average (รูปที่ 34)



รูปที่ 34 Signal correlation หลังจาก average ด้วย dye swap experiment

จากผลที่ได้ จะเห็นว่า dye-swap normalization สามารถแก้ไข bias ของ dye โดยการ remove intensity dependent effect ออกไป แต่จากนี้เมื่อทำ data analysis จาก GeneSpring software และ analyzed ด้วย GACK software แล้วต้องใช้ EBArray software เพื่อเปรียบเทียบผลด้วย

ต่อไปเป็นงานการศึกษา genome plasticity ที่เริ่มกลับมาทำที่ประเทศไทยและเป็นงานที่ขยายเพิ่มเติมจากการศึกษา gene expression profiling โดยเริ่มนำ Microarray slide ที่ hybridize จาก Wisconsin มา scan ที่ศูนย์ vector ที่ศาลายา แต่ scanner มี resolution และใช้ software ที่ต่างออกไป นอกจากนี้ผลที่ได้ยังไม่สามารถ analyze ได้เนื่องจากไม่มีผู้เชี่ยวชาญการใช้ software จึงติดต่อ ดร.นิศรา การุณอุทัยศิริ Microarray laboratory, BIOTEC เพื่อขอความช่วยเหลือในการทำงาน



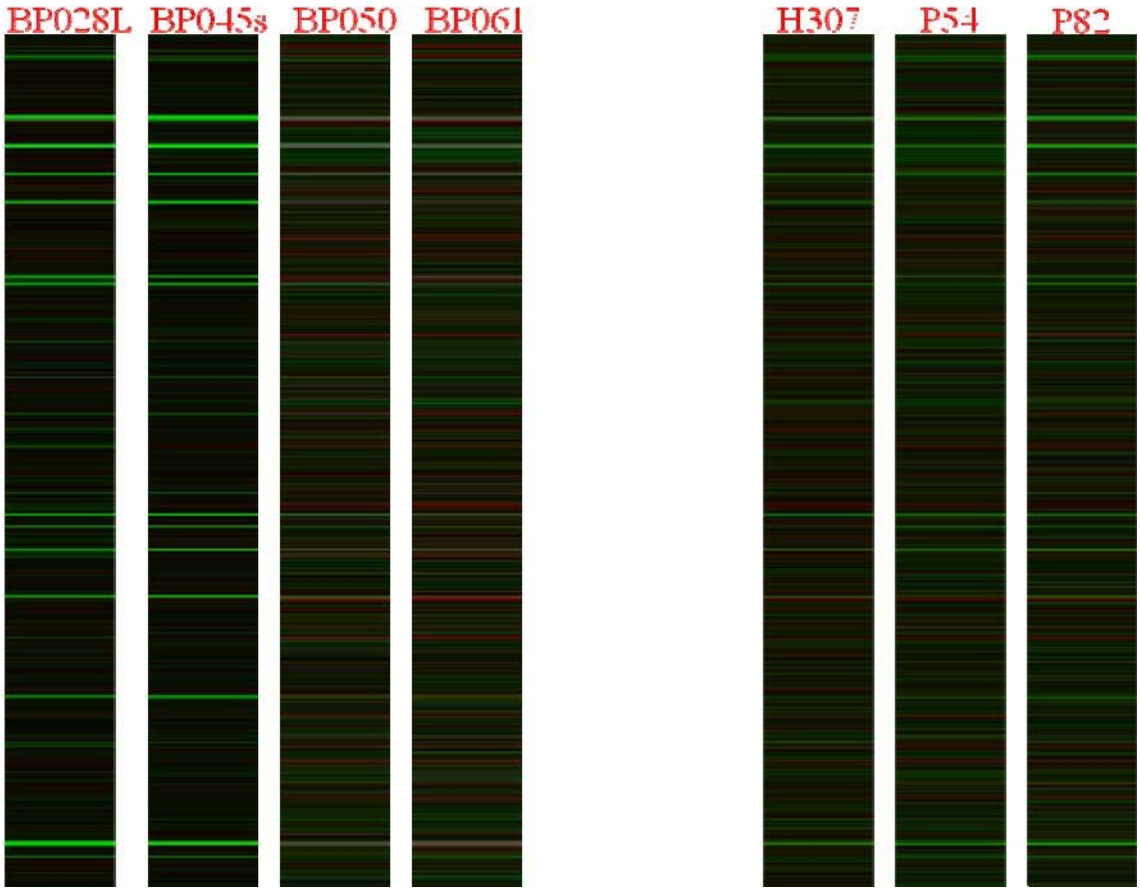
รูปที่ 35 Box plot ของ genomic DNA ที่แยกจากทั้ง environment BP28L, BP45s, BP50, BP61และผู้ป่วย H140, H307, P54, P82

ทั้ง hybridization, scanning และ data analysis ซึ่งได้รับความช่วยเหลือเป็น อย่างดียิ่ง โดยเฉพาะช่วยแก้ปัญหาในเรื่องของคุณภาพของ RNA ที่เตรียม และการทำ data analysis

-Genome hybridization

ได้เริ่ม label genomic DNA ที่เป็น test sample จำนวน 8 genome โดยเทียบกับ genomic DNA ของ K96243, hybridization, scanning ทำ normalization และ data analysis ใช้ R program LOWESS (Locally Weighted Scatter Plot Smoother), a curve fitting algorithm จากนั้นนำข้อมูลมาทำ Box plot (รูปที่ 35)

โดยการทำ box plot นั้น จะทำเพื่อเปรียบเทียบการ distributions ของ log intensities หรือ log ratios ของ genes บน microarrays slide หลายอัน ผลที่ได้ในรูปที่ 35 ของ *B. pseudomallei* isolates ที่แยกจาก environmental (BP28L, BP45s, BP50 and BP61) และ isolate ที่แยกจากผู้ป่วย (H140, H307, P54, P82) แสดง distribution เป็น central box จึงสรุปได้ว่าแต่ละ array สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ จึงนำ Microarray data มา visualize ด้วย program TREEVIEW เพื่อ predict gene deletion ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 36



รูปที่ 36 ภาพจาก program TREEVIEW แสดงแถบสีเขียวซึ่งแสดง genes deletion ในแต่ละ isolate และแถบสีแดงแสดงยีนที่มี copy numbers สูงกว่าเมื่อเทียบกับ K96243

จากผลที่ได้สามารถทำการ hybridize กับ genomic DNA ให้ครบทั้งหมดด้วย methodology เดียวกัน จากนั้นศึกษาชนิดหรือกลุ่มของ gene deletion ในบริเวณที่เป็นแถบสีเขียว และใช้ PCR เพื่อยืนยันการเกิด deletion ใน isolate ต่าง ๆ ต่อไป

- **Data analysis**

1) Genomic Islands (GIs) identification

จากผลของ Microarray ของ 5 isolates พบว่าโครโมโซมส่วนใหญ่เหมือนกับ K96243 strain ที่ใช้สร้าง oligonucleotide บน slide โดยดูจากความเข้มของสัญญาณเมื่อเปรียบเทียบโดย $\log_2$ ratios เข้าใกล้ศูนย์ (รูปที่ 37) ยีนที่มี $\log_2$ hybridization ratios น้อยกว่า-2SD ของค่าเฉลี่ยจะแสดงว่ายีนบริเวณนั้นของสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบมีความแตกต่างหรือขาดหายไปเมื่อเทียบกับ K96243 strain โดยกราฟจะแสดงเป็นยอดที่ระบุตำแหน่งของ DNA ที่ขาดหายไปเป็น GIs เมื่อมียีนต่างไปอย่างน้อย 6 ยีน (รูปที่ 37A-D) จากรูปจะเห็นว่ามีบริเวณของ

โครโมโซมที่ขาดหายไป 15 GIs (ซึ่งนับเรียงตามลำดับการเรียงตัวของยีนบนโครโมโซม) เมื่อเทียบ *B. pseudomallei* ทั้ง 5 isolates กับ K96243 (ตารางที่ 17) ผลการทดลองพบว่ามี 4 GIs (1, 7, 9 และ 14 of K96243) ที่พบในทุก isolate จากการ hybridize ตรวจพบการขาดหายไปของ GI 8 ใน isolate อื่นเมื่อเทียบกับ K96243 เป็นสองบริเวณและมี %GC content แตกต่างจากโครโมโซมบริเวณอื่น ผู้วิจัยได้ระบุเป็น GIs 6 และ 7 และได้เทียบกับ GI ที่มีรายงานมาก่อนใน K96243 ในตารางที่ 17

จากการวิเคราะห์พบแบบแผนของ GIs ที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมนอกจากนี้ $\log_2$ hybridization ratios (รูปที่ 37) ยังแสดงให้เห็นว่าในแต่ละ GI มีจำนวนยีนที่ต่างไปจาก K96243 ในเชื้อจากดินมากกว่าเชื้อจากผู้ป่วย และเชื้อจากผู้ป่วยมีความหลากหลายในจีโนมมากกว่าเมื่อเทียบกับ K96243 strain ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยเช่นกัน เห็นได้จากค่า $\log_2$ hybridization ratios ที่แกว่งจากศูนย์ไม่มากแต่ถี่กว่าที่พบเมื่อเทียบกับเชื้อจากดิน เชื้อจากดินจะมี 14-15 GIs ที่ต่างจาก K96243 strain โดยแบ่งเป็น 9-10 GIs บนโครโมโซม 1 และ 5 GIs บน chromosome 2 คิดเป็น 335-341 kb (4.7-4.8% จากจีโนม 7.14 Mb) และอยู่ในช่วง 7.1 kb – 50.4 kb (ตารางที่ 17) จำนวนยีนที่ต่างจากที่พบในเชื้อจากดินมี 226-325 genes สำหรับเชื้อจากผู้ป่วย พบ GIs ที่ต่างหรือหายไป 10-11 GIs โดย 7 GIs บน chromosome 1 และ 3-4 GIs บน chromosome 2 รวมเป็น 251-254 kb (4.8% จากจีโนม 7.14 Mb) และอยู่ในช่วง 7.1 kb – 50.4 kb (ตารางที่ 17). จำนวนยีนที่ต่างหรือขาดหายใน GIs เหล่านี้คิดเป็นช่วงประมาณ 220-226 ยีน

2) Characterization of GIs

Genomic islands ที่พบจะมีลักษณะต่างจากบริเวณอื่นของจีโนม ซึ่งแสดงถึงการได้รับลำดับนิวคลิโอไทด์นั้นมาจากภายนอก GIs ทั้งหมด 15 GIs ที่ต่างจาก K96243 ยกเว้น GI 15 มี %GC contents 54.6-65.7% ซึ่งแตกต่างจากบริเวณอื่นของจีโนม *B. pseudomallei* ที่เป็น 68% สำหรับ GI 15 มี GC content เท่ากับ 69.5% และมี transposase genes และ insertion element อยู่ภายในหรืออยู่ที่ปลายทั้งสองด้าน (ตารางที่ 18) ซึ่งอาจเป็นเหตุให้ GI15 นี้ไม่เคยมีรายงานในจีโนมของ *B. pseudomallei* โดยการเปรียบเทียบจาก genome sequencing GIs 3, 4, 8, 9, 11 และ 13 เรียงติดอยู่กับ tRNA genes และมี repeats ที่ 3’ end โดยทั่วไปยีนที่อยู่ภายใน GI หรืออยู่ด้านปลายจะเป็น mobile genetic elements ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ว่าได้มาโดย horizontal gene transfer หน้าที่ของยีนใน GIs ของ K96243 genome แสดงไว้ในตารางที่ 19 โดยมียีนอยู่ใน GI 5.6% ของจีโนม (325/3,750) ยีนที่ต่างหรือไม่พบเมื่อเทียบกับ K96243 ส่วนมากเป็น hypothetical proteins (130 ยีน) ที่น่าสนใจคือ 59% ของยีนที่ไม่พบจะเป็น mobile genetic elements, plasmid, prophages หรือ prophage-like structures และ transposon และ extrachromosomal element ซึ่งมีบทบาทใน genome mobility ที่ทำให้เกิดกระบวนการ deletion

3) PCR verification

PCR amplification เพื่อยืนยันการหายไปของแต่ละ GI ที่พบความแตกต่างกับ K96243โดยใช้ primer ชุดแรกที่ออกแบบให้จับกับยีนใน GIs (F1&R1) ซึ่งจะเพิ่มจำนวนไม่ได้ถ้ายีนมีการ deletion ไปและ primers ชุดที่สอง F1&R2 ซึ่งจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของ K96243 GIs ได้ถ้าไม่มีการ deletion เนื่องจากเป็นระยะระหว่าง primer ที่ไกลมากเกินไป (ขนาดใหญ่เกินไป) ข้อมูลการทำ PCR และ primer ได้แสดงไว้ในตารางที่ 16-1 ถึง 16-4 แต่การตรวจสอบโดยใช้ primers ชุดที่สองก็ไม่สามารถเพิ่มชิ้น DNA ใน GI ที่ตรวจด้วย microarray ว่าหายไปเมื่อเทียบกับ K96243 ได้ทั้งโดย conventional *Taq* DNA polymerase หรือ long amplify PCR ยกเว้น GI 7 (ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ GI 8 ที่รายงานใน K96243 (ตารางที่ 17) โดย PCR products ที่ได้จากทุก tested isolates มีขนาดเท่ากัน เมื่อนำ PCR products จาก BP45s ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าขนาดคือ 995 bp เมื่อนำลำดับนี้ไปค้นในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า 496 bp ทางด้าน 5’ end ของชิ้นดังกล่าวเหมือนกับส่วนหนึ่งของยีน BPSL1692 และ 64 bp จาก 3’ end เหมือนกับส่วนหนึ่งของยีน BPSL1709 ยีนของ GI 8 ในจีโนมของ K96243 ส่วนตรงกลางของ PCR product ขนาด 435 bp นี้เหมือนกับส่วนหนึ่งของ non-ribosomal peptide synthetase gene (Bpse110_020300005244, E-value = 0) และ hypothetical protein (Bpse110_020300005249) ของ Bp1106b strain (Accession Number: NZ_AAMB02000002) ซึ่งเป็น relapsed strain ของ Bp1106a ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย (รูปที่ 38)

เนื่องจาก gap-PCR ไม่สามารถตรวจยืนยัน deletion จึงใช้ primers ซึ่งออกแบบเพื่อเพิ่มจำนวนยีนซึ่งเลือกมาจากภายใน GIs 2, 3, 5, 8, 12, 13 และ 15 ที่พบว่าขาดหายไปจากข้อมูล microarray ด้วยวิธี PCR amplification ซึ่งให้ผลลบที่สามารถยืนยันว่ายีนดังกล่าวไม่มีอยู่จริงตามผล microarray แต่ยีนเดียวกันใน K96243 strain ให้ผลบวก ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 16-1 Real time PCR conditions.

Program	Analysis Mode	Cycles	Segment	Target Temp	Time	Fluorescence Acquisition Mode
Holding	none	1	Pre incubation	95 ºC	10 min	none
Amplification	Quantification	45	Denaturation	94 ºC	10 s	none
			Annealing	Primer dependent	10 s	none
			Extension	72 ºC	10 s	single
Melting curve analysis		1	Denaturation	95 ºC	0 s	none
			Annealing	65 ºC	6 s	none
			Melting	99 ºC slope = 0.1 ºC/sec	0 s	continuous
Cooling	none	1	1	40 ºC	30 s	None

ตารางที่ 16-2 Primer sequences สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ยีนที่คัดเลือกใน GIs

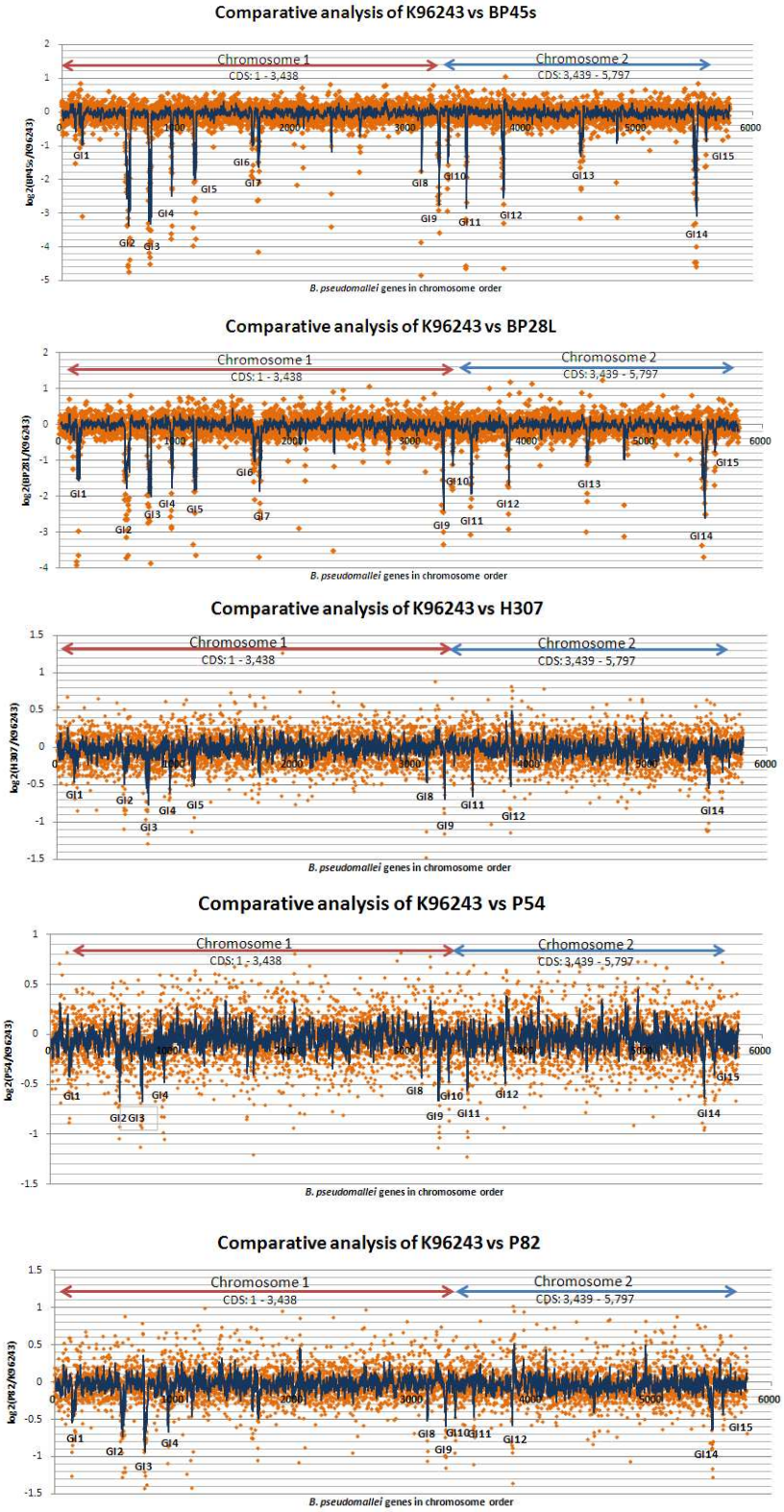
Amp regions	Primers	Product size
GI2		
BPSL0551	Forward 5'-GGTGCCATGATGCTATTCG-3'	4.5 Kb
BPSL0557A	Reverse 5'-GAGTCAGGCGCAAGAAGAGT-3'	
GI2		
BPSL0571	Forward 5'-ACAATCGGAAATTGCTTGCT-3'	2.7 Kb
BPSL0573	Reverse 5'-GGGCTCATAACTGGTTGCAT-3'	
GI3		
BPSL0743	Forward 5'-GATGAGAAGGGAATGGACGA-3'	3.8 Kb
BPSL0746	Reverse 5'-GTAGCAGTGCCCCTCGATAA-3'	
GI5		
BPSL1149	Forward 5'-GCGAGTCCGAATGGAATGTA-3'	2.1Kb
BPSL1155	Reverse 5'-AGCGCTCGTCTCTTTCGAT-3'	
GI7		
BPSL1692	Forward 5'-GTACCGCCCTGAACGAACT-3'	23 Kb
BPSL1709	Reverse 5'-AGCAACGACGAAACCAGATG-3'	
GI8		
BPSL3111	Forward 5'-ATCTGCTGTACGACGGCTTC-3'	7.7 Kb
BPSL3118	Reverse 5'-GGTGCCATGATGCTATTCG-3'	
GI12		
BPSS0387	Forward 5'-ACTTTGCAGGACGGAACACT-3'	5 Kb
BPSS0392	Reverse 5'-CACGATCCAGAGCATGAGTC-3'	
GI13		
BPSS1046	Forward 5'-ATCCGTACAGCCACTCGAAC-3'	2.8Kb
BPSS1048c	Reverse 5'-AGTGGTCGCAATTCCTTCAT-3'	
GI15		
BPSS2146	Forward 5'-TTCAGGTGCATCACGTTCAT-3'	4 Kb
BPSS2150	Reverse 5'-GACCGTCTATCACACGCTGA-3'	

ตารางที่ 16-3 Sequence ของ primers สำหรับ PCR virulence genes.

Primers for virulence genes	Product size
BPSL1502 (surE; stationary phase survival protein)	
Forward 5'-GTGATTCGCCAAACCAACC-3'	151 bp
Reverse 5'-CGTATGCGTGAGATCGAG-3'	
BPSL1505 (RNA polymerase sigma factor(rpoS))	
Forward 5'-CGCCATTTGGAGAAGAACTC-3'	151 bp
Reverse 5'-GCGACTGGCTCTGATCGT-3'	
BPSL2800 (wcbH; glycosyltransferase)	
Forward 5'-TCTCAAACGTGTGCCTACCGAA-3'	258bp
Reverse 5'-AACTCGACGCAATGACCGAGAT-3'	
BPSL3319 (Fli C; flagellin)	
Forward 5'-GCTTCGCAGACGAACTACAA-3'	289 bp
Reverse 5'-TCTGATCGGTGAACGTGAAG-3'	
BPSS0120 (fimbrial usher protein)	
Forward 5'-TGACCCATTCAGGCAAGGGAT TCT-3'	350 bp
Reverse 5'-TCCGTCCTGTTCGGTGATTTCGAT-3'	
BPSS1543 (Type III secretion system protein (bsaQ))	
Forward 5'-CGAACGTCGTGATGATCTTG-3'	151 bp
Reverse 5'-ATGGGCTCGTTCTACATCGT-3'	
BPSS2053 (cell surface protein)	
Forward 5'-TTGCATCGTTGTCGAAGAAG-3'	200 bp
Reverse 5'-CCCAATCGATGTTCCAGACT-3'	
BPSL1705 (hypothetical protein)	
Forward 5'-GCTGTGGCTGGTACGGTAAT-3'	224 bp
Reverse 5'-GGATCGGTGGTCTGTGAAGT-3'	

ตารางที่ 16-4 Primer สำหรับ gene ที่คัดเลือกและ 16s rRNA สำหรับยืนยันผล microarray

Gene name	Primers	Product size (bp)
BPSS1521	Forward 5’-TCGATCTTCTCGCTGACCTC-3’	100
	Reverse 5’-TCAAGGAGATCCGCTTCAAC-3’	
16s rRNA	Forward 5’-GGCTAATACCCGGAGTGGA-3’	194
(AY305818.1)	Reverse 5’-CTAGCCTGCCAGTCACCAA-3’	



รูปที่ 37 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log_2$ hybridization ratio ระหว่าง *B. pseudomallei* K96243 กับ *B. pseudomallei* ที่แยกจากดิน (BP45s: A, BP28L: B) และจากผู้ป่วย (BPH307: C, P54: D, P82: E) แกน Y เป็นค่า $\log_2$ ratio และ แกน X เป็นตำแหน่งยีนบนโครโมโซม ค่า Log_2 ที่ต่ำแสดงถึงยีนที่หายไปเมื่อเทียบกับยีนของ K96243 ในลักษณะ GIs จาก 1-10 GIs ในโครโมโซม1และ 11-15 ในโครโมโซม 2 โดยครอบคลุมช่วงละ 6 ยีน หนึ่งยีนต่อขั้น แต่ละ GI จะมีอย่างน้อย 6 protein coding sequence ที่มีค่าต่ำกว่า -2SD.

Table 17 Genomic islands (GIs) ที่แตกต่างเมื่อเทียบระหว่าง tested isolates กับ GIs ของ K96243

	Coordinates		Size	No.	%	tRNA	3'end	GI
GI	Start CDSs	Stop CDSs	(kb)	CDSs	GC	gene	repeats	K96243
1	BPSL0140	BPSL0176	27.3	37	65.7	-	-	GI 2*
2	BPSL0549a	BPSL0588	46.6	43	56.7	-	-	GI 3*
3	BPSL0745	BPSL0770	36.5	26	56.4	+	+	GI 4*
4	BPSL0939	BPSL0953	20.5	15	57.5	+	+	GI 5*
5	BPSL1137	BPSL1157	14.6	22	58.9	-	-	GI 6*
6	BPSL1638	BPSL1656	15.7	17	61.6	-	-	GI 8*
7	BPSL1693	BPSL1708a	21.8	16	59	-	-	GI 8*
8	BPSL3113	BPSL3118	7.1	6	54.6	+	+	GI 10*
9	BPSL3257	BPSL3269	12.7	13	55.8	+	+	GI 11*
10	BPSL3342	BPSL3349	9.5	8	56.8	+	+	GI 12*
11	BPSS0068	BPSS0080	16.7	13	59.4	-	-	GI 16b**
12	BPSS0378	BPSS0391a	18.4	18	59	+	+	GI 13*
13	BPSS1047	BPSS1089	35.1	50	65.3	-	-	GI 15*
14	BPSS2046	BPSS2076	50.4	34	60.8	-	-	GI 16*
15	BPSS2148	BPSS2154	8.3	8	69.5	-	-	-

CDS = protein coding sequence

The tRNA gene column indicates GIs that are adjacent to the tRNA gene: present (+), absent (-)

The 3' end repeats column indicates GIs that flanking with 3'small simple repeats: present (+), absent (-)

* GIs identified in K96243 genome (Holden et al., 2004).

** New GI discovered in *B. pseudomallei* genome (Tuanyok et al., 2008).

ตารางที่ 18 List of mobile genetic elements and 3’ end repeat of tRNA genes in each GI

GIs	Mobile Genetic Elements inside the GIs	Flanking Mobile Genetic Elements	tRNA Gene 3' end repeat
1	Many phage related genes	2 phage related genes	-
2	3 phage related genes 2 phage integrase	-	-
3	1 integrase/recombinase	1 phage related integrase	tRNA-Met-CAT
4	1 phage integrase/recombinase 1 IS element	-	tRNA-Leu-CAA
5	1 phage related gene 1 phage integrase	-	-
6	1 phage related gene 1 transposon related gene	2 IS elements	-
7	1 IS element 3 transposon related genes 2 recombinase	-	-
8	1 transposon related gene 1 integrase	-	tRNA-Thr-TGT
9	1 plasmid recombinase 2 plasmid conjugal transfer protein	1 plasmid related gene	tRNA-Ala-CGC
10	1 bacteriophage-related gene	1 bacteriophage-related gene	-
11	2 transposon related genes 1 IS element	-	tRNA-Ser- tRNA-Arg-CCG
12	1 phage integrase 4 phage related genes 1 transposon related gene	1 IS element 2 transposon related genes 1 bacteriphage-related gene	-
13	Many bacteriophage related gene	1 bacteriphage-related gene	tRNA-Ser-GGA
14	3 IS elements 1 transposon related gene	1 transposon related gene	-
15	1 IS elements 1 transposon related gene	2 transposon related genes 3 insertion elements	-

ตารางที่ 19 Functional classification of genes in the K96243 genome and in their GIs

Functions	No. of genes present in K96243	No. of genes present in identified GIs	% of genes present in identified GIs
Amino acid biosynthesis	160	1	0.6
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	177	2	1.1
Cell envelope	576	6	1.0
Cellular processes	320	14	4.4
Central intermediary metabolism	281	4	1.4
DNA metabolism	174	18	10.3
Energy metabolism	713	17	2.4
Mobile and extrachromosomal element functions	112	66	58.9
Protein fate	253	4	1.6
Protein synthesis	188	1	0.5
Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	77	0	0.0
Regulatory functions	482	20	4.1
Signal transduction	18	0	0.0
Transcription	91	4	4.4
Transport and binding proteins	737	17	2.3
Unknown function	303	10	3.3
Hypothetical proteins	1114	130	11.7
Gene not assigned	870	41	4.7
Total	5,780	325	5.6

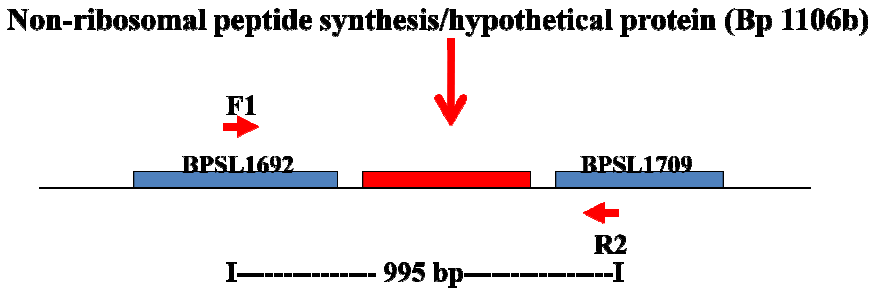
ตารางที่ 20 ผลของ PCR ที่เพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของยีนที่สุ่มเลือกจากภายในแต่ละ GI และผลของการใช้ F1&R2 primers สำหรับ Gap-PCR ที่คร่อม GI7 ของ K96243 และ tested isolates.

GIs	Region	*B. pseudomallei* isolates					
		K96243	BP45S	BP28L	H307	P54	P82
2	BPSL0552-BPSL0557	+	-	-	-	-	-
2	BPSL0571-BPSL0572	+	-	-	-	-	-
3	BPSL0744-BPSL0745	+	-	-	-	-	-
5	BPSL1150-BPSL1154	+	-	-	-	-	-
7	BPSL1693-BPSL1708A**	-	+ *	+	+	+	+
8	BPSL3112-BPSL3117	+	-	-	-	-	-
12	BPSS0388-BPSS0391	+	-	-	-	-	-
13	BPSS1047-BPSS1048	+	-	-	-	-	-
15	BPSS2147-BPSS2149	+	-	-	-	-	-

* The PCR product ที่นำไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ (968bp)

**ยีนทั้งหมดใน GI 7

+ Positive สำหรับ PCR amplification, - negative สำหรับ PCR amplification



รูปที่ 38 Diagram แสดงบริเวณของ GI 7 โดย F1และ R2 เป็น primer ที่ออกแบบให้คร่อมบริเวณของ GI 7 (gap-PCR) ในภาพแสดงการแทรกของชิ้น DNA จาก *B. pseudomallei* 1106b แทนที่ GI เดิม ซึ่งทำให้ขนาดของ GI ที่พบเป็น 995 bp โดยส่วนกลางของ PCR product ที่มีขนาด 435 bp มาจากส่วนหนึ่งของ non-ribosomal peptide synthetase gene และ hypothetical protein ของ Bp1106b strain

4) การวิเคราะห์ genomic island ที่ต่างกันระหว่างเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยและจากดิน

เมื่อเปรียบเทียบ GI ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกจากดิน 2 isolates (BP45s และ BP28L) กับ K96243 พบว่ามีสอง genomotype patterns โดยมี GI ต่างไป 15 และ 14 GI (ตารางที่ 21) เมื่อเปรียบเทียบเป็นแบบแผนระหว่างเชื้อจากผู้ป่วย (H307, P54, P82) และจากดิน เชื้อจากผู้ป่วยมีจำนวน GI ที่ไม่พบใน K96243 น้อยกว่า (10-11 GIs) และพบความหลากหลายใน 3 บริเวณ คือ GIs 5, 10 และ 15 โดยมี 8 GI (GIs 1, 2, 3, 4, 9, 11, 12 and 14) ที่ไม่พบทั้งในเชื้อจากผู้ป่วยและดิน GIs 6, 7 และ 13 ไม่พบในเชื้อจากดิน แต่พบในเชื้อจากผู้ป่วย แต่ละ GI มียีนที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ อยู่ด้วยโดยใน GI 6 มี functional genes สูงถึง 71% ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับ energy metabolism, regulatory, central metabolism, cell envelope และ transport และ binding protein (ตารางที่ 19)

5) ความสัมพันธ์ระหว่าง genomic islands และ bacterial virulence ในหนูทดลอง

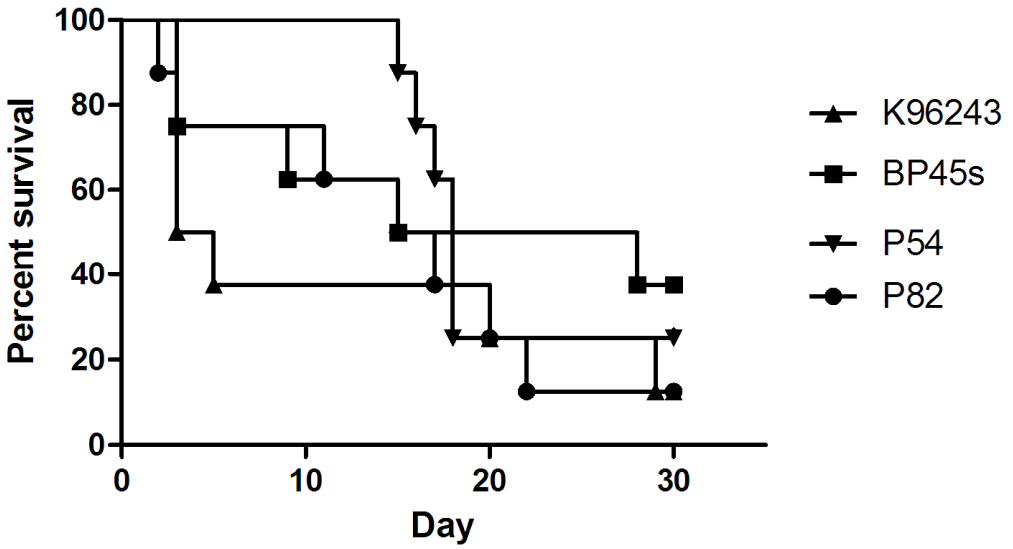
เนื่องจากแบบแผนของ genomic island ระหว่างเชื้อจากผู้ป่วย และเชื้อจากดินมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงนำมาศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างแบบแผนของ genomic island และความรุนแรงในการก่อโรคของ *B. pseudomallei* ในหนูทดลองโดยทดสอบ 3 isolate คือ BP45S: soil isolate ที่มี 15 GIs ที่แตกต่าง และ P54 และ P82: clinical isolates ที่มี 11 GIs ที่แตกต่างจาก K96243 โดยทดลองฉีด high dose ($2x10^6$ cfu) พบว่าให้ % การอยู่รอดต่ำกว่า 30%

ใน 3 วัน และ low dose ($5x10^3$ cfu) ทำให้หนูอยู่รอดอย่างน้อย 30 วัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงฉีดด้วยเชื้อ $1x10^5$ cfu เพื่อเปรียบเทียบ virulence

ผลการทดสอบพบว่า K96243 ทำให้หนูตายเร็วที่สุดโดยทำให้หนูมีอัตราการรอดชีวิต 40% ใน 5 วัน ในขณะที่ isolate อื่นใช้เวลา 16-19 วัน (รูปที่ 39) หลังจากทดสอบสองครั้งและทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p= 0.6)

ตารางที่ 21 GI ที่พบ (+) และไม่พบ (-) จากการวิเคราะห์ด้วย DNA microarray และหน้าที่

GIs	*B. pseudomallei* isolates					Functional Gene in GIs	Function classification
	Soil		Clinical				
	BP45s	BP28L	H307	P54	P82		
2	-	-	-	-	-	27%	Cellular processes, Regulatory, Cell envelope, DNA metabolism, Transcription
3	-	-	-	-	-	21%	Regulatory, Cell envelope, DNA metabolism, Protein fate, Energy metabolism
4	-	-	-	-	-	15%	Cellular processes/ Energy metabolism, Regulatory, DNA metabolism
5	-	-	-	-	-	33%	DNA metabolism, Transport and binding protein
6	-	-	-	+	+	9%	Cell envelope, Energy metabolism/protein synthesis/regulatory
8	-	-	+	+	+	71%	Energy metabolism, Regulatory, Central metabolism, Cell envelope, Transport and binding protein
8	-	-	+	+	+	25%	DNA metabolism, Regulatory, Cellular processes, Fatty acid
10	-	+	-	-	-	33%	DNA metabolism, Regulatory
11	-	-	-	-	-	8%	DNA metabolism
12	-	-	+	-	-	25%	Cellular protein, Protein fate
16b	-	-	-	-	-	23%	Cell envelope, Regulatory, Transport and binding protein
13	-	-	-	-	-	28%	DNA metabolism, Regulatory, Transcription
15	-	-	+	+	+	22%	Cellular processes/biosynthesis, Regulatory, Cell envelope, DNA metabolism, Transcription, Energy metabolism
16	-	-	-	-	-	38%	Cellular process/protein fate, Energy metabolism/AA biosynthesis, Regulatory, Central metabolism, Transcription, Transport and binding protein
17	-	-	+	-	-	25%	Biosynthesis/transport, Transport protein



รูปที่ 39 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ BALB/c mice ที่ฉีด intraperitoneal ด้วย 1x10^5 c.f.u. ของ *B. pseudomallei* K96243 (▲), *B. pseudomallei* 45S (■), *B. pseudomallei* P54 (▼) และ *B. pseudomallei* P82 (●) ซึ่งทำการทดสอบเก็บข้อมูล 30 วัน

6) การตรวจสอบ GI ในเชื้อ *B. pseudomallei*

ได้คัดเลือก GIs ที่มีความจำเพาะโดยพบในเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยและไม่พบในเชื้อที่แยกจากดิน (GI8a, GI8b and GI15) รวมทั้งที่ไม่พบในทั้งสองกลุ่มคือ GI14 และ GI17 ที่พบเพิ่ม (ตารางที่ 22) มาทดสอบใน *B. pseudomallei* 96 isolates โดยเป็นเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย 48 isolates และ เชื้อที่แยกจากดิน 48 isolates มาตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR ซึ่งออกแบบ primer ให้ตรวจสอบสองตำแหน่งในแต่ละ GI เนื่องจากความแตกต่างของการขาดหายไปของยีนในแต่ละ GI อาจไม่คงที่ โดยพบว่าเมื่อใช้ primer 1 GI8a ให้ผลบวกในเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย 60%, GI8b 25% และ GI17 48% โดย GI เหล่านี้พบน้อย (2-4%) ในเชื้อที่แยกจากดิน ส่วน GI 14 พบว่าพบได้น้อยมากในเชื้อทั้งสองแหล่ง (ตารางที่ 22) โดยการตรวจให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การนำ PCR นี้ไปตรวจสอบเชื้อที่พบในธรรมชาติน่าจะมีประโยชน์ในการระบุแหล่งที่มาหรือจัดจำแนกเชื้อโดยเฉพาะกรณีการระบาดในแหล่งชุมชนได้ต่อไป

ตารางที่ 22 การตรวจ 4 GIs ในเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยและจากดินโดยวิธี PCR

GIs	GI patterns					Positive (%)			
	Soil		Clinical			Soil (n=48)		Clinical (n=48)	
	BP45s	BP28L	H307	P54	P82	Primer 1	Primer 2	Primer 1	Primer 2
8a	-	-	+	+	+	2	15	60	58
8b	-	-	+	+	+	0	0	25	23
14	-	-	-	-	-	0	0	2	10
15	-	-	+	+	+	4	8	0	4
17	-	-	+	-	-	2	2	48	50

บทวิจารณ์

การศึกษายีนใหม่ที่น่าจะมีบทบาทในการก่อโรคหรือความรุนแรงในการก่อโรคของ *B. pseudomallei*

หลักการของการใช้ DNA Microarray ที่มี oligonucleotide จากยีนของ *B. pseudomallei* เป็นเครื่องมือในการศึกษาการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียเมื่อทำให้ติดเชื้อแบบเฉียบพลันในหนูทดลองสองชนิดที่มีความแตกต่างของภูมิคุ้มกัน โดย BALB/c จะไวต่อการติดเชื้อ แต่ C57BL/6 จะค่อนข้างทนต่อการติดเชื้อเนื่องจากมีระบบ innate immunity ที่เข้มแข็งกว่า BALB/c พบว่าสามารถประสบความสำเร็จในการคัดกรองยีนที่มีความสัมพันธ์กับการก่อโรคหรือความรุนแรงของโรคได้ โดยมีทั้งยีนที่เคยมีรายงานมาแล้วและยีนที่ไม่ทราบหน้าที่ ซึ่งหลังจากตัดยีนที่เกี่ยวข้องกับ metabolism และการดำรงชีพทั่วไปแล้วได้ยีนที่น่าสนใจสูงและยังไม่มีรายงานการจำแนกหน้าที่ 2 ยีน คือ BPSS1521 (Hypothetical protein) และ BPSS1512 (Putative membrane protein)

หลังจากได้ mutant ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน BPSS1521 หรือ BPSS1512 และได้ทำการศึกษาการติดเชื้อในเซลล์ A549 ซึ่งเป็น lung epithelial cell และ LD50 ในสัตว์ทดลอง พบว่า virulence ของ mutant ยีน BPSS1521 ลดลง แต่ mutant ของ BPSS1512 มี virulence เพิ่มขึ้น

ในช่วงนั้น ได้มีงานตีพิมพ์ของสิงคโปร์สองฉบับ เกี่ยวกับยีน BPSS1521 ซึ่งพบว่าการ delete ยีนใกล้เคียงซึ่งรวมยีนนี้ด้วยนั้นไม่ได้มีผลลดการแสดงออกของ TTSS3 ของ *B. pseudomallei* และได้ค้นพบยีนที่เป็น regulatory protein ของ TTSS3 และ ยีน BPSS1521 เป็นส่วนหนึ่งของ Type VI secretion system (T6SS) ของ *B. pseudomallei* (Sun, Chen et al.) และ รายงานว่า BPSS1512 มีลำดับนิวคลิโอไทด์เหมือน tssM ของ *Burkholderia mallei* 100% คือ virulence factor TssM ซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการ ubiquitination ของสารตัวกลางหลายตัว ส่งผลไม่ให้เกิดการ suppress inflammatory response ซึ่งพบได้ใน wild type ส่งผลให้ mutant ของ TssM ทำให้เกิด hyperinflammation ทำให้ความรุนแรงของโรคสูงขึ้น (หนูตายเร็วขึ้น) นอกจากนี้ การแสดงออกของ TssM นั้นควบคุมโดย type III secretion system (Tan, Chen et al.)

ในขณะนี้ได้คัดเลือกยีนในขอบเขตแบบเดิมเพิ่มและเป็นยีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ เพื่อนำไปสร้าง mutantแล้วนำไปศึกษาความสามารถในการก่อโรคเมื่อเทียบกับ wild type ต่อไป

การศึกษา genome plasticity ของ *B. pseudomallei*

การศึกษาเปรียบเทียบจีโนมของ *B. pseudomallei* K96243 sequence strain กับ *B. pseudomallei* ที่แยกจากดินสองสายพันธ์และจากผู้ป่วยสามสายพันธ์โดยใช้ DNA Microarray แสดงว่ามีการขาดหายไปหรือมีการได้รับบางส่วนของยีนในบริเวณที่จำเพาะซึ่งเรียกว่า genomic island (GI) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ bioinformatics tools หรือ *in silico* analysis (Holden, Titball et al. 2004; Tuanyok, Leadem et al. 2008; Tumapa, Holden et al. 2008) ซึ่งพบความหลากหลายของบริเวณที่เป็น GI ทั้งสิ้น 16 บริเวณ และไม่พบความแตกต่างของแบบแผน GI เมื่อเทียบระหว่างเชื้อที่แยกจากดินและแยกจากผู้ป่วย แต่จากวิธีที่ใช้นี้สามารถพบบริเวณที่น่าจะเป็น GI ใหม่ ในโครโมโซมที่

2 ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะunbiased %GC (69.5%) โดยจีโนมของ *B. pseudomallei* K96243 จะมี GC 68% และไม่พบ tRNA และ 3' end repeat แต่ GI 17 มียีนที่เกี่ยวข้องกับ genome mobility รวมทั้ง transpose genes และ insertion element ที่อยู่ทั้งใน GI และอยู่ท้างปลายสองด้านที่สามารถทำให้เกิดการโยกย้ายชิ้นของ DNA ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า GI 8 ของ K96243 ประกอบด้วยบริเวณ 2 บริเวณที่มี %GC ต่างกันเล็กน้อยและมีความแตกต่างเมื่อเทียบ K96243 กับเชื้อที่ทดสอบด้วย DNA microarray ซึ่งหากคำนวณด้วย bioinformatics อาจแยกจากกันไม่ได้

เนื่องจากบริเวณ GI เป็นที่ซึ่งมีความผันแปรได้มาก และการตรวจโดย DNA microarray สามารถตรวจพบเฉพาะ DNA ที่ตรงกับ K96243 และ DNA ที่หายไปใน isolate อื่น แต่ไม่สามารถตรวจ DNA ที่แทรกมาจากแหล่งอื่นที่ไม่มีใน K96243 ได้ ดังเห็นจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GI7 (GI8 ใน K96243) และเป็นผลทำให้การใช้ gap-PCR ตรวจ GI deletion อื่น ๆ ไม่ได้เนื่องจากเป็นการแลกเปลี่ยนชิ้นของ DNA อื่นเข้ามามากกว่าจะ delete หายไปเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานของ Tuanyok et al. (Tuanyok, Leadem et al. 2008) ที่รายงานการพบ GI sub-groups ขนาดต่าง ๆ ในช่วง 15.8-92.3 kb ที่ GI 7 (GI8 ใน K96243)

เชื้อที่ทดสอบ 5 isolates มีความแตกต่างของแบบแผน GI โดยมี 3 GIs ที่จำเพาะกับเชื้อจากผู้ป่วย (6, 7 และ 13) และ GIs 5, 10 และ 15 ที่แตกต่างระหว่างเชื้อจากผู้ป่วยและจากดิน ซึ่งโดยรวมทำให้ isolate จากผู้ป่วย (P82) มี GI ต่างจากเชื้อจากดิน (BP045s) มาก แต่เมื่อทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคใน BALB/c พบว่าไม่ต่างจาก K96243 อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ใน GI ที่ตรวจไม่พบในบาง isolate มียีนที่เกี่ยวข้องกับ metabolic และ transport functions รวมทั้ง outer membrane porin protein และยีนที่เกี่ยวข้องกับความนรุนแรงของโรคที่เคยมีรายงาน แต่ก็ไม่พบว่าทำให้หนูมีอัตราการตายที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น GI เหล่านี้จึงน่าจะช่วยสนับสนุนการอยู่รอดแต่ไม่ได้เป็นปัจจัยหลักในการก่อโรคของแบคทีเรีย

ในการศึกษานี้พบว่าแบบแผนของบาง GIs มีความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างเชื้อที่แยกจากดินและแยกจากผู้ป่วย จึงคัดเลือก 5 GI (8a, 8b, 14, 15 และ 17) มาทดสอบในเชื้อจากผู้ป่วย 48 สายพันธุ์ และจากดิน 48 สายพันธุ์ พบว่าข้อมูลจากการใช้ primer ตรวจใน GI 8a และ GI 17 ที่รายงานใหม่ในการศึกษานี้ สามารถให้ความแตกต่างระหว่างเชื้อจากผู้ป่วยและจากดินได้ จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการจำแนกแหล่งที่มาของเชื้อที่พบในธรรมชาติ และอาจนำไปช่วยตรวจติดตามการระบาดได้

หนังสืออ้างอิง

Atkins, T., R. Prior, et al. (2002). "Characterisation of an acapsular mutant of *Burkholderia pseudomallei* identified by signature tagged mutagenesis." J Med Microbiol **51**(7): 539-47.

Chaowagul, W., N. J. White, et al. (1989). "Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand." J Infect Dis **159**(5): 890-9.

Cheng, A. C. and B. J. Currie (2005). "Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management." Clin Microbiol Rev **18**(2): 383-416.

Cuccui, J., A. Easton, et al. (2007). "Development of signature-tagged mutagenesis in *Burkholderia pseudomallei* to identify genes important in survival and pathogenesis." Infect Immun **75**(3): 1186-95.

Holden, M. T., R. W. Titball, et al. (2004). "Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14240-5.

Lazar Adler, N. R., B. Govan, et al. (2009). "The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis: how does Burkholderia pseudomallei cause disease?" FEMS Microbiol Rev **33**(6): 1079-99.

Leakey, A. K., G. C. Ulett, et al. (1998). "BALB/c and C57Bl/6 mice infected with virulent *Burkholderia pseudomallei* provide contrasting animal models for the acute and chronic forms of human melioidosis." Microb Pathog **24**(5): 269-75.

Muangsombut, V., S. Suparak, et al. (2008). "Inactivation of *Burkholderia pseudomallei* bsaQ results in decreased invasion efficiency and delayed escape of bacteria from endocytic vesicles." Arch Microbiol **190**(6): 623-31.

Ou, K., C. Ong, et al. (2005). "Integrative genomic, transcriptional, and proteomic diversity in natural isolates of the human pathogen *Burkholderia pseudomallei*." J Bacteriol **187**(12): 4276-85.

Reckseidler-Zenteno, S. L., R. DeVinney, et al. (2005). "The capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* contributes to survival in serum by reducing complement factor C3b deposition." Infect Immun **73**(2): 1106-15.

Reckseidler, S. L., D. DeShazer, et al. (2001). "Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant." Infect Immun **69**(1): 34-44.

Stevens, M. P., M. W. Wood, et al. (2002). "An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behaviour of the pathogen." Mol Microbiol **46**(3): 649-59.

Sun, G. W., Y. Chen, et al. "Identification of a regulatory cascade controlling Type III Secretion System 3 gene expression in *Burkholderia pseudomallei*." Mol Microbiol **76**(3): 677-89.

Tan, K. S., Y. Chen, et al. "Suppression of host innate immune response by *Burkholderia pseudomallei* through the virulence factor TssM." J Immunol **184**(9): 5160-71.

Tuanyok, A., H. S. Kim, et al. (2005). "Genome-wide expression analysis of iron regulation in *Burkholderia pseudomallei* and Burkholderia mallei using DNA microarrays." FEMS Microbiol Lett **252**(2): 327-35.

Tuanyok, A., B. R. Leadem, et al. (2008). "Genomic islands from five strains of *Burkholderia pseudomallei.*" BMC Genomics **9**: 566.

Tumapa, S., M. T. Holden, et al. (2008). "*Burkholderia pseudomalle*i genome plasticity associated with genomic island variation." BMC Genomics **9**: 190.

U'Ren, J. M., J. M. Schupp, et al. (2007). "Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping." BMC Microbiol **7**: 23.

Ulett, G. C., B. J. Currie, et al. (2001). "*Burkholderia pseudomallei* virulence: definition, stability and association with clonality." Microbes Infect **3**(8): 621-31.

Utaisincharoen, P., S. Arjcharoen, et al. (2006). "*Burkholderia pseudomallei* RpoS regulates multinucleated giant cell formation and inducible nitric oxide synthase expression in mouse macrophage cell line (RAW 264.7)." Microb Pathog **40**(4): 184-9.

White, N. J. (2003). "Melioidosis." Lancet **361**(9370): 1715-22.

5. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ยังไม่มีงานวิจัยที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ กำลังจะส่ง manuscript 1 เรื่องที่ได้เคยส่งแต่ไม่ได้ตอบรับให้ตีพิมพ์ไปใหม่ คือ “Genomic islands as a target for differentiation between *Burkholderia pseudomallei* Clinical and Environmental Isolates” และกำลังร่าง manuscript อีกเรื่อง “Gene expression profile of *Burkholderia pseudomallei* in BALB/c and C57BL/6 reveals a novel virulence gene” และเมื่อยืนยันหน้าที่ของยีนที่ deleted ใหม่ได้แล้ว จะได้ร่าง manuscript อีกฉบับซึ่งคาดว่าน่าจะสามารถ submit ได้ภายในปีหน้า

6. กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

-การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการในต่างประเทศ

ได้มีความร่วมมือกับ Assistant Professor Adel M. Talaat, M.V.Sc., Ph.D. The Laboratory of Bacterial Genomics, Department of Pathobiological Sciences, University of Wisconsin ผ่านการรับทุน คปก ของนางสาวธนัชพร บาตรโพธิ์ เพื่อไปทำ Microarray hybridizationและใช้โปรแกรมออกแบบและทำการสังเคราะห์ Genome directed primers (GDPs) เพื่อเปลี่ยน RNA

เป็น cDNA โดยมีความจำเพาะกับ *B. pseudomallei* โดยไม่ cross กับหนู และได้ร่วมกันร่าง proposal เพื่อขอ Microarray slide จาก TIGR เพื่อใช้ในงานวิจัย โดย Dr Talaat ร่วมเป็น co-advisor ของนักศึกษา คปก

เพิ่มความร่วมมือกับ Associate Prof Bob Ernst, PhD, Department of Microbial Pathogenesis, University of Maryland – Baltimore, School of Dentistry, Baltimore, MD ผ่านการรับทุน คปก ของ นางสาวสุนิสา ชิระกุล เพื่อไปศึกษาหน้าที่ของยีนที่พบว่าการ deletion ทำให้เพิ่มความรุนแรงในการก่อโรคของ *B. pseudomallei*

-การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการในประเทศ

ได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ดร.นิศรา การุณอุทัยศิริ ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญด้าน Microarray technology ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ในการให้คำแนะนำ แก้ไขปัญหา รวมทั้งอนุญาติให้นักศึกษาได้ไปดำเนินการทดลอง hybridization, scanning และ data analysis ที่ ห้องปฏิบัติการ Microarray technology, BIOTEC ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้ปัญหาอุปสรรคที่มีผ่านไปได้

7. ปัญหาและอุปสรรค

หลังจากที่ *B. pseudomallei* ได้รับการจัดเป็น category B โดย CDC, USA ที่สามารถนำไปทำอาวุธชีวภาพได้ และ NIH, USA ได้เพิ่มงบประมาณวิจัยสนับสนุนนักวิจัยในสหรัฐอเมริกาเป็นอย่างมาก การทำวิจัยเกี่ยวกับเชื้อนี้ก็เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก ทำให้เกิดการแข่งขันที่สูง งานวิจัยแต่ละแห่ง เช่น กลุ่ม Prof Bancroft ในประเทศอังกฤษ กลุ่ม Mahidol-Oxford Wellcome research unit กรุงเทพฯ, Prof Paul Keim, University of Northern Arizona, Prof Bart Currie, Australia และ Prof Patrict Tan, Singapore มีทุนสนับสนุนและนักวิจัยทั้งระดับ Post-doc และ Ph.D. เป็นจำนวนมาก การตีพิมพ์ผลงานรวดเร็วและมีคุณภาพสูง ทำให้ยากต่อการแข่งขันเพราะทั้งทุนวิจัยและผู้ช่วยวิจัยที่มีศักยภาพในประเทศไทยมีน้อยกว่ามาก ยังนับเป็นโอกาสที่ดีที่มีนักวิจัยใน BIOTEC เช่น ดร นิศรา ที่เข้าใจความขาดแคลนของนักวิจัยต่างจังหวัด จึงยินยอมสละเวลาอันมีค่า และเอื้อเฟื้อเครื่องมือที่มีราคาแพงให้ผู้วิจัยได้ใช้ร่วมด้วย นอกจากนี้งานสอนจำนวนมากที่ไม่แตกต่างจากอาจารย์ที่ไม่ทำวิจัยมากนัก ทำให้มีเวลาในการทำวิจัยน้อย นักศึกษาปริญญาเอกที่เป็นกำลังสำคัญก็ต้องใช้เวลาในการสร้างเป็นเวลานานกว่าจะสามารถผลิตผลงานเพียงพอที่จะตีพิมพ์ได้ ซึ่งมักจะช้าเกินไปเพราะโจทย์วิจัยที่เราสามารถคิดได้ ต่างประเทศก็คิดได้และทำเร็วกว่ามาก

งานที่ท้าทายและโจทย์วิจัยที่ดีมักจะมีเวลาเพียงสั้น ๆ ที่ต้องทำให้สำเร็จเพื่อตีพิมพ์ก่อน ถึงพลาดโอกาสมีผู้ตีพิมพ์ไปก่อน ก็จะต้องทำต่อไปเพื่อให้งานตีพิมพ์ได้ ซึ่งเป็นเรื่องที่ยากขึ้น แต่ก็ได้พยายามทำอยู่ตลอดเพื่อสร้างให้นักศึกษาจบและมีงานตีพิมพ์ที่มีคุณภาพให้กับผู้ให้ทุนให้ได้ ช่วงปีกว่าที่ผ่านมา มีวิกฤตของชีวิตที่เกิดต่อเนื่องกัน คุณแม่ที่อยู่กรุงเทพฯ เป็นมะเร็งรังไข่ ต้องผ่าตัดและทำรังสีบำบัดที่ต้องใช้เวลาและความอดทนสูง ส่วนคุณพ่อผ่าตัดลิ้นหัวใจและทำ by-pass ฉุกเฉิน จึงทำให้กำลังใจและเวลาทำวิจัยที่มีอยู่ลดน้อยลงไป นับเป็นปัญหาอุปสรรคที่สำคัญอีกด้านหนึ่งที่อาจไม่สมควรกล่าวอ้างถึง