

ลักษณะพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย
และไวต่อยาคลาริโทรมัยซิน

GENETIC CHARACTERIZATION OF CLARITHROMYCIN-SUSCEPTIBLE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CLINICAL ISOLATES



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2557

KMITL-2014-SC-M-020-024

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**GENETIC CHARACTERIZATION OF CLARITHROMYCIN-SUSCEPTIBLE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CLINICAL ISOLATES**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE**

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2014

KMITL-2014-SC-M-020-024

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2014

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ลักษณะพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยและไวต่อยา
คลาริโทรมัยซิน

Genetic Characterization of Clarithromycin-Susceptible
Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates

นักศึกษา

นายชัยทัศน์ จิตแยม

รหัสประจำตัว

52651706

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พลักษณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร.เทอดศักดิ์ พราหมณ์นนท์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา	โลหะทรัพย์ทวี	
รศ.ดวงใจ	โอชัยกุล	
รศ.ดร.อังคณา	ฉายประเสริฐ	
ดร.เทอดศักดิ์	พราหมณ์นนท์	
ผศ.ดร.สรัญญา	พันธุ์พลักษณ์	

KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2557 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 ชั้น 4 อาคารปฏิบัติการหลังใหม่

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุชนัน ธีระบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ลักษณะพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย
นักศึกษา	และไวต่อยาคลาริโทรมัยซิน
รหัสประจำตัว	นายชัยทัศน์ จิตเข้ม
ปริญญา	52651706
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
พ.ศ.	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	2557
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พุกษ์
	ดร. เทอดศักดิ์ พราหมณะนันท์

บทคัดย่อ

โดยธรรมชาติแล้วเชื้อวัณโรคจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะคลาริโทรมัยซิน ยีน Rv3197A (*whiB7*) และ Rv1988 (*ermMT*) มีบทบาทสำคัญในการดื้อยาดังกล่าว ในการศึกษาสามารถแยกเชื้อวัณโรคไวต่อยาคลาริโทรมัยซินได้จากผู้ป่วยจำนวน 4 สายพันธุ์ ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และระดับการแสดงออกของยีน *whiB7* และ *ermMT* ผลการทดลองพบว่าเชื้อหนึ่งสายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ของยีน *whiB7* โดยมีนิวคลีโอไทด์หายไป 1 คู่เบส ทำให้มีกรดอะมิโนของโปรตีน WhiB7 เปลี่ยนไป 13 ตัว และมีกรดอะมิโนสั้นกว่าโปรตีนปกติ 16 ตัว เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มีการแสดงออกของยีน *whiB7* ต่ำกว่าปกติ ในขณะที่เชื้อ 3 สายพันธุ์มีการแสดงออกของยีน *ermMT* เช่นเดียวกับเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยาคลาริโทรมัยซิน นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน WhiB7 ที่มีการกลายพันธุ์นี้ไม่สามารถทำงานได้เหมือนกับโปรตีนปกติ และน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อวัณโรคสายพันธุ์นี้ไวต่อยาคลาริโทรมัยซิน แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของยีน *whiB7* ต่อความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาคลาริโทรมัยซิน และยังพบว่าการแสดงออกของยีน *ermMT* ไม่ขึ้นอยู่กับโปรตีน WhiB7 เพียงอย่างเดียว

คำสำคัญ: เชื้อวัณโรค คลาริโทรมัยซิน ยีน *whiB7* ยีน *ermMT*

Thesis	Genetic characterization of clarithromycin-susceptible <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clinical isolates
Student	Mr. Chaitas Jityam
Student ID.	52651706
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2014
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch
Thesis Co-advisor	Dr. Therdsak Prammananan

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is naturally resistant to clarithromycin (CLR). Rv3197A (*whiB7*) and Rv1988 (*ermMT*) have been shown to be involved in the resistant phenotype. In this study, four CLR-susceptible (CLR^s) *M. tuberculosis* clinical isolates were identified, and their nucleotide sequences and expression profiles of *whiB7* and *ermMT* were investigated. Results revealed that one isolate contained one nucleotide deletion in the *whiB7*, resulting in a 13-amino acid change and a 16-amino acid deletion of WhiB7. Expression of *whiB7* was low in all isolates whereas three isolates showed similar level of *ermMT* expression as that of the CLR-resistant reference strain. Furthermore, the truncated WhiB7 was investigated and results revealed that it did not function as same as the wild type protein and may cause the CLR-susceptible phenotype. From this study, *whiB7* has been shown to play an important role in the CLR-susceptible phenotype. In addition, expression of *ermMT* was unlikely depending only on the WhiB7.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Clarithromycin, *whiB7*, *ermMT*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.เทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์ และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งกรุณาสละเวลา ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี และ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.สารดี วาฤทธิ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ จนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบพระคุณ ทุนวิชัยวัฒน์ โรคคื้อยา ศิริราชมูลนิธิ ในพระอุปถัมภ์สมเด็จพระเจ้าพี่นางเธอ เจ้าฟ้ากัลยาณิวัฒนา กรมหลวงนราธิวาสราชนครินทร์ และห้องปฏิบัติการวิจัยวัณโรค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับทำงานวิจัยและวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้ให้เงินทุนสำหรับสนับสนุนในการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์ สัญญารับทุนเลขที่ TGIST 01-52-022

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ ทั้งในและนอกห้องปฏิบัติการที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่ดีในการทำวิจัยและวิทยานิพนธ์

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ ผู้เป็นที่รัก ผู้ให้กำลังใจและให้โอกาสการศึกษาอันมีค่ายิ่ง

ชัยทัศน์ จิตเยี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา	1
1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย	2
1.5 ขอบเขตการวิจัย	2
1.6 ขั้นตอนของการศึกษา	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เชื้อวัณโรคและการก่อให้เกิดโรค	4
2.1.1 เชื้อวัณโรค (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	4
2.1.2 กลไกการเกิดพยาธิสภาพ	7
2.2 การดื้อยาในเชื้อวัณโรค	9
2.2.1 การดื้อยาไอโซไนอาซิด	10
2.2.2 การดื้อยาไรแฟมพิซิน	11
2.2.3 การดื้อยาอีแทมบูทอล	11
2.2.4 การดื้อยาไพราซิनाไมด์	11
2.2.5 การดื้อยาสเตรปโตมัยซิน และยาในกลุ่ม 2-deoxystreptamine aminoglycosides	12
2.3 ยีน <i>whiB</i>	13
2.4 การกระตุ้นการแสดงออกของยีน <i>whiB7</i>	15
2.5 ยีนภายใต้การควบคุมของ <i>WhiB7</i>	16

2.6 โครงสร้างและหน้าที่ของ <i>WhiB7</i>	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
3.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย	20
3.2 พลาสมิด	20
3.3 สารเคมี	20
3.4 เครื่องมือ	21
3.5 วิธีการ	22
3.5.1 การเลี้ยงเชื้อ	22
3.5.2 การเตรียม crude DNA จากเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	22
3.5.3 การออกแบบไพรเมอร์	22
3.5.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	23
3.5.5 การตรวจหาผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ในเจลอะกาโรส	24
3.5.6 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	24
3.5.7 การทำสารละลายดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์และ การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรส	24
3.5.8 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตจากพลาสมิด (dephosphorylation)	25
3.5.9 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (DNA ligation)	25
3.5.10 การทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) หรือ การนำดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่เซลล์	25
3.5.11 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ	27
3.5.12 การตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	27
3.5.13 การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อมัชโคแบคทีเรีย	27
3.5.14 Quantitative Real-time reverse transcription PCR	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	30
4.1 การทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคทั้งสี่สายพันธุ์ต่อยาคลาริโทรมัยซิน	30
4.2 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>whiB7</i> และ <i>ermMT</i> ในเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยาคลาริโทรมัยซิน	30
4.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>whiB7</i> และ <i>ermMT</i>	34
4.4 การโคลนยีน <i>whiB7</i> ของเชื้อวัณโรค	35

4.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาอุณหภูมิเมอเรส.....	35
4.4.2 การเตรียมพลาสมิด p SMT1.....	36
4.4.3 การทำพลาสมิด pSMT1 $\Delta luxAB$ ให้บริสุทธิ์โดยการตัด ออกจากเจลอะกาโรส.....	37
4.4.4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ.....	38
4.4.5 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาอุณหภูมิเมอเรส.....	39
4.4.6 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม.....	42
4.5 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา.....	44
บทที่ 5 บทสรุป.....	47
บรรณานุกรม.....	48
ภาคผนวก ก.....	60
ภาคผนวก ข.....	61
ประวัติผู้เขียน.....	62



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างที่สำคัญระหว่างโรคปฐุมภูมิและโรคหลังจากปฐุมภูมิ ในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันปกติ.....	9
ตารางที่ 2.2 กลไกการดื้อยาของเชื้อวัณโรค.....	13
ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	23
ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	24
ตารางที่ 4.1 แสดงค่า MIC ของเชื้อวัณโรคทั้งสี่สายพันธุ์ต่อยาคลารี โทรมัยซิน.....	30
ตารางที่ 4.2 ระดับการแสดงออกของยีน <i>whiB7</i> และ <i>ermMT</i> ก่อนและหลังสัมผัสกับ ยาคลารี โทรมัยซิน.....	34
ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาคลารี โทรมัยซินและกานามัยซิน.....	45



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 ลักษณะของเชื้อ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> จากการย้อมสีทึนกรด โดยติดสีแดงของคาร์บออลฟูคซัน	6
รูปที่ 2.2 โคโลนีของเชื้อ <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
รูปที่ 3.1 แผนภาพสรุปขั้นตอนการศึกษาวิจัย	29
รูปที่ 4.1 ลำดับเบสของยีน <i>whiB7</i> เปรียบเทียบระหว่างเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ DS3214 และ สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv	31
รูปที่ 4.2 โครงสร้างของโปรตีน WhiB7	33
รูปที่ 4.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>whiB7</i> ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	36
รูปที่ 4.4 ผลลักษณะที่ได้จากการตัดพลาสมิด pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI	37
รูปที่ 4.5 พลาสมิด pSMT1 $\Delta luxAB$ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว	38
รูปที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>whiB7</i> ปกติ, ยีน <i>whiB7</i> ที่มีการกลายพันธุ์บน ตำแหน่ง 189 และ พลาสมิด pSMT1 $\Delta luxAB$	39
รูปที่ 4.7 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ของทรานสฟอร์มเม้นต์ที่ได้	41
รูปที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pWhiB1	42
รูปที่ 4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pWhiB2	43
รูปที่ 4.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pWhiB3	43
รูปที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pWhiB4	44
รูปที่ 4.12 แสดงค่า MIC ต่อยาคลารีโทรมัยซินของเชื้อ <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	46

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วัณโรคเป็นโรคติดเชื้อที่มีอัตราการตายสูงที่สุดในมนุษย์ ในปี พ.ศ. 2555 มีผู้เสียชีวิตจากวัณโรคถึง 1.3 ล้านคน ในแต่ละปีจะมีผู้ติดเชื้อวัณโรคใหม่ปีละ 8-10 ล้านคน ผู้ป่วยวัณโรคส่วนมากจะพบในประเทศแถบแอฟริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และ แปซิฟิกตะวันตก ในปัจจุบันการแพร่ระบาดของโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคเอดส์ทำให้มีการระบาดของวัณโรคมากขึ้น แม้แต่ในประเทศพัฒนาแล้วก็ตาม การเพิ่มขึ้นของอุบัติการณ์การติดเชื้อวัณโรคคือยาหลายขนานและการเกิดเชื้อวัณโรคคือยาเกือบทุกขนานทำให้มีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการคิดค้นหายาด้านวัณโรคชนิดใหม่ที่สามารถลดระยะเวลาการรักษาและมีฤทธิ์ทั้งกับวัณโรคระยะติดต่อและระยะแฝง การศึกษาเกี่ยวกับกลไกการคือยามีความสำคัญและก่อให้เกิดองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์และการคือยา ยิ่งกว่านั้นยังช่วยในการพัฒนาด้านการตรวจวินิจฉัยและการค้นคว้าหายาใหม่ คลาริโทรมัยซิน (clarithromycin) เป็นยาในกลุ่มแมโครไลด์ (macrolide) ซึ่งออกฤทธิ์ได้ดีกับเชื้อในกลุ่มมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ใช่กลุ่มก่อวัณโรค จากการศึกษากลไกการคือโดยธรรมชาติต่อยาในกลุ่มแมโครไลด์ของเชื้อวัณโรคในห้องปฏิบัติการ พบว่าเมื่อเชื้อวัณโรคสัมผัสกับยาจะเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์เมทิลทรานเฟอร์เรส (methyltransferase) ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *ermMT* (Rv1988) และส่งผลให้เชื้อคือต่อยา นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีนนี้ถูกควบคุมโดยยีน *whiB7* ในสถานะที่มียา อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาเบื้องต้นสามารถแยกเชื้อวัณโรคที่มีคุณสมบัติไวต่อยาคลาริโทรมัยซินได้จากผู้ป่วย และยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาระดับยีน *ermMT* และ *whiB7* ในเชื้อวัณโรคเหล่านี้ ดังนั้นการหากลไกที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติไวต่อยานี้จะเป็นประโยชน์และมีคุณค่าสำหรับใช้ในการพัฒนาต่อยอดด้านวัณโรคชนิดใหม่ ตลอดจนก่อให้เกิดทางเลือกใหม่ในการพัฒนาใช้ยาในกลุ่มแมโครไลด์ในการรักษาผู้ป่วยวัณโรค

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาเชื้อวัณโรคที่มีคุณสมบัติไวต่อยาคลาริโทรมัยซิน โดยมุ่งศึกษาผลของยีน *whiB7* และ *ermMT* ต่อการคือยา

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่ายีน *whiB7* ทำหน้าที่เป็นยีนควบคุม (Regulatory gene) โดยมีเครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีนหลายยีนที่มีรายงานเกี่ยวข้องกับการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือยาากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (amnoglycoside) และกลุ่มแมคโครไลด์ในเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ได้แก่ ยีน *tap* และ *eis* ที่เกี่ยวกับการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ และยีน *ermMT* ที่เกี่ยวกับการดื้อยาของกลุ่มแมคโครไลด์ โดยปกติเชื้อวัณโรคจะดื้อยาของกลุ่มแมคโครไลด์โดยธรรมชาติ เนื่องจากมียีน *ermMT* แต่จากผลการศึกษาเบื้องต้นสามารถแยกเชื้อวัณโรคจากผู้ป่วยได้จำนวนหนึ่งที่มีลักษณะไวต่อยาคลาริโพรมัยซินซึ่งเป็นยาในกลุ่มแมคโครไลด์ การศึกษานี้จึงมุ่งศึกษายีน *whiB7* และยีน *ermMT* ที่มีรายงานเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มนี้ในการศึกษาคุณสมบัติไวต่อยาที่เกิดจากความบกพร่องของยีนเหล่านี้

1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

โดยปกติแล้ว เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) มักจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดโดยพื้นฐานตามธรรมชาติ (intrinsic resistance) การดื้อยาโดยพื้นฐานของเชื้อวัณโรคนั้นเกิดจาก เชื้อมีผนังเซลล์หนาทำให้ยาผ่านเข้าออกลำบาก มีกลไกการนำยาออกนอกเซลล์ มีระบบการทำลายยา และมีเอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยา โปรตีน WhiB7 เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสของยีนซึ่งเป็นส่วนสำคัญในกลไกการดื้อยาโดยพื้นฐานของเชื้อวัณโรค จากการศึกษาพบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายของยีน *whiB7* จะไวต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มแมคโครไลด์ เตตราไซคลิน (tetracycline) ลินโคซาไมด์ (lincosamide) มากขึ้นและรวมถึงยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ บางตัวด้วย

Erm คือโปรตีนไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ เมทิลทรานเฟอร์เรส (ribosomal RNA methyltransferase) ที่ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มแมคโครไลด์ของเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis* complex) และ *Mycobacterium smegmatis* การทำหน้าที่ของ Erm จำเป็นต้องอาศัย WhiB7 จากการศึกษาในเชื้อ *Mycobacterium smegmatis* ที่ยีน *whiB7* ถูกแทนที่ด้วยยีนดื้อยาไฮโกรไมซิน บี (hygromycin B) พบว่าเชื้อจะไวต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มแมคโครไลด์ ทั้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำด้วยยาปฏิชีวนะกลุ่มแมคโครไลด์ ดังนั้นจากองค์ความรู้ดังกล่าวสรุปได้ว่ายีน *whiB7* และ *ermMT* มีส่วนสำคัญต่อคุณสมบัติการดื้อยาของกลุ่มแมคโครไลด์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาใดรายงานถึงผลจากความบกพร่องของยีนเหล่านี้กับคุณสมบัติไวต่อยาของกลุ่มแมคโครไลด์ในเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย

1.5 ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์กลายที่ไวต่อยาคลาริโพรมัยซินที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 4 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv

1.6 ขั้นตอนของการศึกษา

ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยทำการหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) เพื่อหาเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยาคลาริโพรมัยซิน และศึกษา ยีน *whiB7* และ *erm* โดยการหาลำดับเบส (DNA sequencing) และการแสดงออกของยีนในสภาวะที่มีและไม่มี ยาด้วยวิธี Quantitative Real-time Reverse transcription PCR และศึกษาผลของยีนกลายพันธุ์ต่อการ คื้อยาคลาริโพรมัยซิน ในเชื้อต้นแบบ (model organism) ได้แก่ *M. smegmatis* mc² 155 และ *M. tuberculosis* H37Ra



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อวัณโรคและการก่อให้เกิดโรค

2.1.1 เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*)

เชื้อวัณโรคจัดอยู่ใน ชั้น (class) Actinomycetes อันดับ (order) Actinomycetales วงศ์ (family) Mycobacteriaceae สกุล (genus) *Mycobacterium* มีโคแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียที่คล้ายราซึ่งชื่อนี้ได้มาจากการที่เชื้อในสกุลนี้จะมีรูปร่างคล้ายราเมื่อเติบโตในอาหารเหลว เชื้อมีผนังเซลล์หนาและมีส่วนประกอบเป็นไขมันจำนวนมาก คุณสมบัติอีกประการของเชื้อในสกุล *Mycobacterium* คือการย้อมติดสีทนกรด (acid-fastness) สีจะไม่ถูกล้างออกด้วยกรดแก่เจือจางหรือแอลกอฮอล์หลังจากย้อมด้วยสีคาร์บอฟูคซิน (carbol fuchsin) หรือสีอาร์ริลมีเทน (aryl methane) ชนิดอื่น

เชื้อในสกุล *Mycobacterium* มีมากกว่า 100 สปีชีส์ สามารถแบ่งตามอัตราการเจริญเติบโตออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มโตช้า (slow grower) และกลุ่มโตเร็ว (rapid grower) เชื้อวัณโรคเป็นสาเหตุหลักของวัณโรคในคนจัดอยู่ในกลุ่มโตช้า ใช้เวลาเจริญประมาณ 1 เดือนจึงจะเห็นโคโลนีได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อกลุ่มก่อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis* complex) ประกอบด้วยเชื้อหลายชนิดที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก เชื้อทั้งหมดก่อให้เกิดวัณโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปัจจุบันประกอบด้วยเชื้อดังต่อไปนี้

Mycobacterium tuberculosis สาเหตุหลักของวัณโรคในคน

Mycobacterium africanum ก่อวัณโรคในคนแอฟริกัน

Mycobacterium bovis เป็นสาเหตุหลักของวัณโรคในวัว

Mycobacterium bovis BCG เป็นสายพันธุ์วัคซีน

Mycobacterium caprae ก่อให้เกิดวัณโรคในสัตว์ประเภทโคกระบือ พบก่อวัณโรคในคน

Mycobacterium canettii ก่อวัณโรคในคนแอฟริกัน

Mycobacterium microti ก่อให้เกิดวัณโรคในหนูนาและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก

Mycobacterium pinnipedii ก่อวัณโรคในแมวน้ำ

Mycobacterium orygis ก่อวัณโรคใน oryx

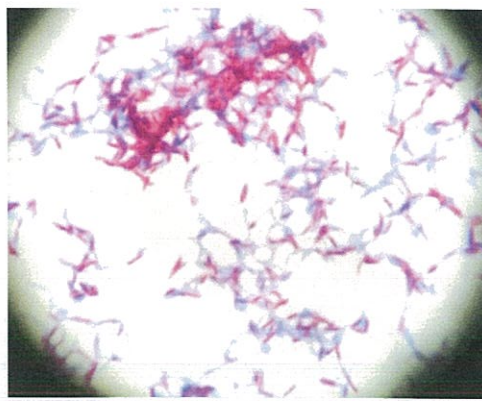
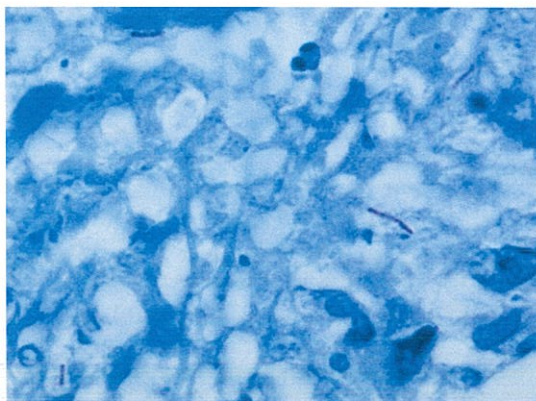
Mycobacterium mungi ก่อวัณโรคใน mongoose

เชื้อในกลุ่มก่อวัณโรคเป็นเชื้อที่ไม่เคลื่อนไหว (non-motile) ไม่สร้างสปอร์ (non-sporing) และไม่มีแคปซูล (non-capsulate) มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) ตรงหรือโค้งเล็กน้อยมีขนาด 3×0.3 ไมโครเมตร ในเสมหะหรือของเหลวอื่นมักพบเชื้อตัวเดี่ยวหรือเกาะกลุ่มเป็นกลุ่มเล็กๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีรูปร่างคล้ายเชือกบิดเรียกว่า “serpentine cord” (รูปที่ 2.1)

เชื้อวัณโรคสามารถโตได้ในอาหารหลายชนิด แต่นิยมใช้อาหาร Löwenstein-Jensen (LJ) ซึ่งประกอบด้วยไข่และกลีเซอรอล มีการเติมมาลาไคท์ กรีน (malachite green) ลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปนเปื้อน และทำให้โคโลนิของเชื้อ *Mycobacterium* สามารถมองเห็นได้ชัดเจน เชื้อ *M. bovis* เติบโตได้ไม่ดีหรือไม่โตเลยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ แต่จะโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมไพรูเวต (sodium pyruvate) แทนที่กลีเซอรอล เชื้อวัณโรคเจริญให้เห็นโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ ใช้เวลาประมาณ 4 สัปดาห์ แต่หากเป็นการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก บางครั้งจะต้องใช้เวลาถึง 8 สัปดาห์ โคโลนิที่มีสีขาวครีมผิวขรุขระ ลักษณะคล้ายดอกกระหล่ำ (รูปที่ 2.2) เชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสและจะไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียสและสูงกว่า 41 องศาเซลเซียส

เชื้อ *Mycobacterium* ทุกชนิดเป็นเชื้อที่จำเป็นต้องใช้ออกซิเจน (obligate aerobe) แต่ *M. bovis* เติบโตได้ดีในสภาวะที่ออกซิเจนต่ำ ดังนั้นเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งนิ่ม (soft agar medium) เชื้อ *M. tuberculosis* จะโตด้านบนผิว ส่วนเชื้อ *M. bovis* จะโตเป็นแถบใต้พื้นผิว

เชื้อวัณโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำนมและสารอินทรีย์ชนิดอื่น บนพื้นหญ้าตราบใดที่ไม่มีแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) ส่องถึง เชื้อไม่ทนต่อความร้อน ถูกทำลายโดยการฆ่าเชื้อวิธีพาสเจอร์ไรเซชัน (pasteurization) ถูกทำลายโดยสารเคมีจำพวกแอลกอฮอล์ (alcohol) ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) และกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) สามารถทนต่อกรด ด่าง และสารประกอบแอมโมเนียม ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ



รูปที่ 2.1 ลักษณะของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* จากการย้อมสีทึนกรดโดยติดสีแดงของคาร์บอิลฟูคซิน (Wikimedia Foundation, 2009)



รูปที่ 2.2 โคลินีของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (Wikimedia Foundation, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 กลไกการเกิดพยาธิสภาพ (Greenwood et al., 2012)

เชื้อวัณโรคก่อให้เกิดพยาธิสภาพจากความสามารถของเชื้อที่มีชีวิตอยู่ได้ภายในเซลล์มาโครฟาจ (macrophage) และกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ผลที่ตามมาทำให้เกิดพยาธิสภาพบริเวณที่ติดเชื้อ ตัวเชื้อวัณโรคเองไม่ได้สร้างสารพิษ อย่างไรก็ตาม กลไกการเกิดวัณโรคที่ชัดเจนยังไม่ทราบแน่ชัด คาดว่ามีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง

2.1.2.1 วัณโรคปฐมภูมิ (primary tuberculosis)

จุดที่เริ่มต้นการติดเชื้อมักจะเป็นปอด หลังจากที่หายใจเอาเชื้อวัณโรคเข้าไป เชื้อจะถูกมาโครฟาจในถุงลมจับเข้าไปในเซลล์ และเชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทำให้เกิดรอยโรคแรก เรียกว่า Ghon focus แบคทีเรียบางตัวจะถูกเซลล์กลืนกิน (phagocytic cell) นำไปสู่ต่อมน้ำเหลือง hilar ทำให้เกิดรอยโรคที่ต่อมน้ำเหลือง Ghon focus ร่วมกับต่อมน้ำเหลือง hilar ที่โตขึ้นนี้รวมเรียกว่า รอยโรคปฐมภูมิ (primary complex) นอกจากนี้ เชื้อยังสามารถกระจายทางเลือดและน้ำเหลืองไปสู่ปอดส่วนอื่นๆ และอวัยวะอื่นในร่างกายได้ หากมีการติดเชื้อที่ปาก เช่น กรณีดื่มนมที่ปนเปื้อนเชื้อ *M. bovis* รอยโรคปฐมภูมิจะประกอบด้วยต่อมทอนซิล (tonsil) กับต่อมน้ำเหลืองที่คอ (scrofula) หรือการติดเชื้อในลำไส้ ซึ่งมักพบบริเวณลำไส้เล็กต่อลำไส้ใหญ่ (ileocaecal) ร่วมกับต่อมน้ำเหลืองในช่องท้อง (mesenteric lymph node) เช่นเดียวกันรอยโรคปฐมภูมิสามารถเกิดที่ผิวหนังร่วมกับต่อมน้ำเหลืองบริเวณนั้นได้ วัณโรคที่ผิวหนังเรียกว่า prosector's wart มักพบในนักกายวิภาคและพยาธิแพทย์

ภายในระยะเวลา 10 วัน แอนติเจน (antigen) ของเชื้อวัณโรคจะถูกส่งผ่านกระบวนการของการนำเสนอแอนติเจน (antigen-presenting) ทำให้เซลล์ที-ลิมโฟไซท์ (T-lymphocyte) ที่จำเพาะมีการแบ่งตัว และที่เซลล์จะมีการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) โดยเฉพาะ แกมมาอินเตอร์เฟอรอน (interferon- γ), calcitriol เพื่อกระตุ้นมาโครฟาจ (macrophages) ทำให้มาโครฟาจมีการจับตัวเป็นกลุ่มเล็กเรียกว่าแกรนูโลมา (granuloma) บริเวณรอบๆ จุดที่มีการติดเชื้อ เนื่องจากเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์มีลักษณะคล้ายเซลล์เนื้อเยื่อผิว (epithelial cell) จึงเรียกว่าเซลล์ epithelioid เซลล์ epithelioid นี้บางเซลล์มีการรวมตัวกันเป็น multinucleate giant cell บริเวณใจกลางของแกรนูโลมา จะประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว (necrotic tissue) และเซลล์มาโครฟาจที่ตาย บริเวณนี้มีลักษณะคล้ายชีสจึงเรียกว่า caseation

เซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้น (activated macrophage) จะยับยั้งการเติบโตของเชื้อวัณโรค แต่ไม่มีหลักฐานว่าสามารถกำจัดเชื้อวัณโรคได้ จากการศึกษาที่มอดิรามตาบอริซิมสูง เซลล์มาโครฟาจในแกรนูโลมาจะมีการใช้ออกซิเจนเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจน (anoxia) และเป็นกรด (acidosis) ในบริเวณใจกลางของแกรนูโลมา ทำให้เชื้อวัณโรคส่วนใหญ่ตาย การเกิดแกรนูโลมา ส่วนมากมักเพียงพอในการควบคุมการติดเชื้อปฐมภูมิ รอยโรคจะสงบลง เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) ที่อยู่รอบๆ ทำให้เกิดแผลเป็นซึ่งต่อมาจะมีหินปูนมาเกาะ แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อวัณโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังไม่ตายทั้งหมด เชื่อสามารถมีชีวิตอยู่ในแกรนูโลมาได้โดยยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด และเมื่อเชื่อมีการแบ่งตัวอีกครั้งจะทำให้เกิดโรคหลังจากปฐมภูมิ (post-primary disease)

ในผู้ป่วยส่วนน้อย การติดเชื้อลุกลามจะมีการลุกลามมากขึ้นโดยเฉพาะในเด็กทารก มีการกระจายตัวของเชื้อวัณโรคไปยังอวัยวะต่างๆ ทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) เยื่อหุ้มปอดอักเสบ (pleurisy) วัณโรคที่ไต วัณโรคที่กระดูกสันหลัง (Pott's disease) เป็นต้น ถ้ารอยโรคปฐมภูมิจึงมีการแตกเข้าสู่กระแสเลือด เชื้อวัณโรคจะกระจายไปทั่วร่างกายทำให้เกิด granulomata จำนวนมาก ทำให้เกิดรอยโรคคล้ายเมล็ดข้าวเรียกว่า miliary tuberculosis

2.1.1.2 วัณโรคหลังจากปฐมภูมิ (post-primary tuberculosis)

ในคนส่วนมาก หลังจากที่ย่อยโรคปฐมภูมิหายไปก็จะไม่มีความผิดปกติเหลืออยู่ หลังจากเวลาผ่านไปหลายเดือนหรือหลายปี เชื้อวัณโรคที่แฝงตัวอยู่ในร่างกายจะเริ่มแบ่งตัวอีกครั้งหรือเกิดการติดเชื้อจากภายนอกซ้ำทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า วัณโรคหลังจากปฐมภูมิ ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปจากวัณโรคปฐมภูมิ การแบ่งตัวของเชื้อวัณโรคที่แฝงอยู่ในร่างกายอาจเกิดขึ้นเองหรือเกิดขึ้นเนื่องจากมีโรคอื่นแทรกซ้อนซึ่งมีผลทำให้ภูมิคุ้มกันลดต่ำลง การแบ่งตัวของเชื้อวัณโรคที่แอบแฝงอยู่นั้นมักจะเกิดขึ้นที่ปอดคลับบน (upper lobe) โดยไม่ทราบเหตุผลที่ชัดเจน การเกิดแกรนูโลมาจะเกิดขึ้นเหมือนกับวัณโรคปฐมภูมิ แต่จะมีเนื้อตาย (necrotic tissue) มากกว่า และกินบริเวณกว้างกว่าจึงเรียกว่า tuberculoma โปรตีเอส (protease) ที่หลั่งมาจากเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้น tumor necrosis factor และสารของระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ทำให้เกิดอาการไข้ ผอมและอ่อนแอลง

ภายใน tuberculoma จะมีความเป็นกรดสูง (acidic) และออกซิเจนต่ำ (anoxic) ทำให้มีเชื้อวัณโรคที่มีชีวิตเพียงเล็กน้อย แต่หลังจากนั้นรอยโรคจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ จนทะลุผนังหลอดเลือด ทำให้มีอากาศเข้าไปในรอยโรคได้ สภาพบรรยากาศภายในปอดซึ่งมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์สูงช่วยทำให้เชื้อวัณโรคเจริญได้ดี ในระยะนี้เราจะพบเชื้อวัณโรคเป็นจำนวนมากที่ผนังของโพรงวัณโรค ทำให้มีเชื้อปนออกมาเป็นเสมหะเป็นจำนวนมาก ในระยะนี้ผู้ป่วยจะสามารถแพร่เชื้อให้ผู้อื่นได้ ผู้ป่วยประมาณร้อยละ 20 ในระยะนี้จะสามารถหายได้เองโดยไม่ต้องได้รับการรักษา

ในวัณโรคหลังจากปฐมภูมิ การกระจายของเชื้อไปยังต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะอื่นพบได้ไม่บ่อย ส่วนมากจะเป็นการกระจายไปตามหลอดเลือดทำให้เกิดรอยโรคทุติยภูมิที่ปอดคลับล่าง ซึ่งรวมถึง หลอดลมส่วนต้น กล่องเสียงและปาก ในบางครั้ง เชื้อวัณโรคในเสมหะที่กลืนลงไปสามารถทำให้เกิดวัณโรคที่ลำไส้ได้ วัณโรคที่ผิวหนังระยะหลังจากปฐมภูมิเรียกว่า lupus vulgaris มักพบบริเวณหน้าและคอซึ่งมักเกิดจากเชื้อ *Mycobacterium bovis*

ความแตกต่างที่สำคัญระหว่างโรคปฐมภูมิและโรคหลังจากปฐมภูมิในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันปกติแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างที่สำคัญระหว่างโรคปฐุมภูมิและโรคหลังจากปฐุมภูมิในผู้ป่วยที่
ภูมิคุ้มกันปกติ (Greenwood et al., 2012)

ลักษณะ	โรคปฐุมภูมิ	โรคหลังจากปฐุมภูมิ
รอยโรคเริ่มแรก	เล็ก	ใหญ่
มีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลือง	ใช่	เล็กน้อย
การเป็น โพรง	ไม่ค่อยพบ	พบบ่อย
ความไวปฏิกิริยาทูเบอร์คิวลิน	ลบ (ในตอนแรก)	บวก
การแพร่เชื้อ	ไม่ค่อยมีการแพร่เชื้อ	มีการแพร่เชื้อ
บริเวณรอยโรค	พบได้ทั่วทั้งปอด	พบบริเวณปอดส่วนบน
การแพร่กระจายไปยังบริเวณ ใกล้เคียง	ไม่ค่อยพบ	พบบ่อย

2.1.2.3 วัณโรคในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง

การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อวัณโรคที่หลบซ่อนอยู่ในร่างกายมักเกิดขึ้นในกลุ่มคนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ในผู้สูงอายุ ผู้ที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะและผู้ป่วยโรคเอดส์ เชื้อวัณโรคจะร่วมกับเชื้อเอดส์ทำให้ภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยแยลงและเป็นข้อบ่งชี้ว่า ผู้ป่วยเป็นโรคเอดส์เต็มขั้นแล้ว ในกรณีนี้แม้ว่าจะให้การรักษาวัณโรคอย่างเต็มที่ อัตราตายยังสูงถึงร้อยละ 70 ถึง ร้อยละ 90 โดยมากผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตภายใน 4 เดือนหลังจากเริ่มมีอาการ ในผู้ป่วยที่ระดับภูมิคุ้มกันลดต่ำมากมักจะไม่มีอาการเกิดโพรงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระบบภูมิคุ้มกันมีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพนี้ ในผู้ป่วยกลุ่มนี้มักจะพบการกระจายของพยาธิสภาพทั่วไปทั้งปอด และมักพบการกระจายของเชื้อไปทางกระแสเลือดและน้ำเหลืองไปยังอวัยวะอื่นๆ ด้วยซึ่งไม่เหมือนกับวัณโรคหลังจากปฐุมภูมิในผู้ป่วยทั่วไป ในบางครั้งพบรอยโรคขนาดเล็กจำนวนมากเต็มไปด้วยเชื้อวัณโรคกระจายทั่วร่างกายเรียกว่า cryptic disseminated tuberculosis ซึ่งในกรณีนี้ผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว

2.2 การดื้อยาในเชื้อวัณโรค

เชื้อวัณโรคดื้อยาลาซนนาน (MDR-TB) มีรายงานพบในทุก ๆ ภูมิภาคของโลก ในปี พ.ศ. 2555 คาดว่ามีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาลาซนนานประมาณ 450,000 ราย ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 5 ของผู้ป่วยวัณโรคในแต่ละปี (Zignol et al., 2006; WHO, 2013) การรักษาวัณโรคดื้อยาลาซนนาน (MDR-TB) นั้นจำเป็นต้องใช้ยากลุ่มสำรอนและต้องใช้ระยะเวลารักษอย่างน้อย 24 เดือน ยากลุ่มสำรอนนี้มีราคาสูง มีความเป็นพิษ และบางตัวมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อวัณโรคต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มยาหลัก การ

ผู้ขายของเชื้อวัณโรคมีสาเหตุคล้ายกันกับโรคติดเชื้ออื่นๆ คือ ผู้ป่วยกินยาไม่สม่ำเสมอ ผู้รักษาจ่ายยาไม่ถูกต้อง ยาไม่มีคุณภาพ การกระจายแจกจ่ายยาไม่มีประสิทธิภาพ เป็นต้น

โครงสร้างของเซลล์และสรีรวิทยาของเชื้อวัณโรคทำให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น โดยธรรมชาติ การเข้าใจกลไกการดื้อยาโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) การค้นพบสารที่สามารถยับยั้งกลไกดังกล่าวทำให้สามารถทำนายที่ผ่านการทดสอบทางคลินิกแต่ไม่มีประสิทธิภาพต่อเชื้อวัณโรคมาใช้รักษาวัณโรคได้ การดื้อยาที่พบในเชื้อแบคทีเรียทั่วไปมีกลไกหลักๆ ได้แก่ 1) การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายยาอันเกิดจากการผ่าเหล่าของยีนที่สร้างเป้าหมายยาหรือมีการเติมหมู่เมทิลที่เป้าหมายยาทำให้ยาไม่สามารถจับกับเป้าหมายได้ 2) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือทำลายยาโดยเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้น ทำให้ยาหมดฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ 3) การผ่าเหล่าของยีนที่สร้างเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนยาให้เป็นสารออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ผลทำให้ยาไม่ถูกเปลี่ยนรูปและไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ 4) การเพิ่มปริมาณเป้าหมายยาจากการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้างเป้าหมายยา ทำให้เชื้ออยู่รอดได้ในภาวะที่มียาระดับหนึ่ง 5) เชื้อมีกลไกป้องกันยาเข้าเซลล์ (influx) หรือกลไกขับยาออกจากเซลล์ (efflux) และ 6) เชื้อมีกลไกทดแทนกลไกที่ถูกยับยั้งด้วยฤทธิ์ของยาหรือที่เรียกว่า กลไกทางเลี้ยว (bypass mechanism)

กลไกการดื้อยาของเชื้อวัณโรคที่รายงานพบส่วนใหญ่เกิดจากการผ่าเหล่าของยีนเป้าหมายยาและการผ่าเหล่าของยีนที่สร้างเอนไซม์เปลี่ยนรูปยาให้เป็นสารออกฤทธิ์ กลไกการดื้อยากลุ่มยาหลักที่ใช้รักษาวัณโรคในปัจจุบันสามารถสรุปได้ดังนี้

2.2.1 การดื้อยาไอโซไนอาซิด

ไอโซไนอาซิด (isoniazid; INH) เริ่มใช้รักษาผู้ป่วยวัณโรคครั้งแรกในปี ค.ศ. 1952 ยาออกฤทธิ์จำเพาะกับเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* และ *M. microti*) โดยมีค่า MIC 0.02-0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่มัคโคแบคทีเรียอื่นคือดื้อยาคชนิดนี้ ไอโซไนอาซิดใช้เป็นยาหลักร่วมกับไรแฟมพิซินในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคด้วยสูตรยาระยะสั้น (short-course chemotherapy) และใช้เป็นยาป้องกันวัณโรค (prophylactic drug) สำหรับผู้ติดเชื้อเอชไอวี ยาออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสังเคราะห์ mycolic acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของเชื้อ (Timmins and Deretic, 2006) ยางออกฤทธิ์ภายในเซลล์เมื่อถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ได้ (active form) โดยเอนไซม์ catalase-peroxidase ซึ่งสร้างโดยยีน *katG* กลไกการดื้อยาที่รายงานพบเกิดจากการผ่าเหล่าของยีน *katG* ทำให้ยาไม่สามารถเปลี่ยนรูปเป็นสารออกฤทธิ์ได้ การผ่าเหล่าชนิดนี้พบบากถึงร้อยละ 80 ของเชื้อดื้อยา การเพิ่มปริมาณโปรตีน InhA ที่เป็นหนึ่งในเป้าหมายของยา การแสดงออกมากผิดปกติของยีน *inhA* เป็นอีกกลไกหนึ่งพบประมาณร้อยละ 15-46 ของเชื้อดื้อยา นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การแสดงออกมากผิดปกติของยีน *ahpC* และการผ่าเหล่าของยีน *ndh* มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซไนอาซิด การศึกษาเชื้อวัณโรคคือยาในประเทศไทยพบว่า การคือยาไอโซไนอาซิดเกิดจากการผ่าเหล่าของยีน *katG* ร้อยละ 80.6 การแสดงออกมากผิดปกติของยีน *inhA* ร้อยละ 13.8 การแสดงออกมากผิดปกติของยีน *ahpC* ร้อยละ 2.5 และการผ่าเหล่าของยีน *ndh* ร้อยละ 0.6 (Prammananan, 2011)

2.2.2 การคือยาไรแฟมพิซิน

ไรแฟมพิซิน (rifampicin; RIF) เป็นยาที่มีประสิทธิภาพมากในการใช้รักษาวัณโรค เริ่มใช้ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1972 โดยนำมาใช้เป็นยาหลักร่วมกับไอโซไนอาซิดในการรักษาผู้ป่วยวัณโรค ด้วยสูตรยาระยะสั้น ยาออกฤทธิ์โดยจับกับ β subunit ของ bacterial RNA polymerase ซึ่งสร้างจากยีน *rpoB* และยับยั้งขบวนการถอดรหัส (transcription) ของเชื้อ (Ovchinnikov et al., 1981; Levin and Hatfull, 1993) จากรายงานในต่างประเทศพบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของเชื้อวัณโรคที่คือยาไรแฟมพิซิน มีการผ่าเหล่าของยีน *rpoB* ที่บริเวณเล็กๆ ประมาณ 81 คู่เบสใกล้ศูนย์กลางของยีน และการผ่าเหล่าส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นการกลายเฉพาะจุด (point mutation) (Cole, 1994) จากการศึกษาเชื้อวัณโรคคือยาในประเทศไทยพบการผ่าเหล่าที่บริเวณนี้ถึงร้อยละ 98.6 (Prammananan, 2011)

2.2.3 การคือยาอีแทมบูทอล

อีแทมบูทอล (ethambutol; EMB) ออกฤทธิ์ยับยั้งขบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อในขั้นตอนการสร้าง arabinogalactan โดยยาสามารถจับกับเอนไซม์ arabinosyl transferase (Takayama and Kilburn, 1989; Belanger et al., 1996) Belanger และคณะในปี ค.ศ. 1996 รายงานพบกลุ่มของยีนที่สร้าง arabinosyl transferases ใน *M. avium* ซึ่งประกอบด้วยยีน *embA*, *embB* และ *embR* (Belanger et al., 1996) และหนึ่งปีต่อมา Telenti และคณะ (1997) รายงานพบกลุ่มของยีนที่คล้ายคลึงกันใน *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* และ *M. leprae* โดยประกอบด้วยยีน *embC*, *embA* และ *embB* โดยไม่พบยีน *embR* ในเชื้อเหล่านี้ Sreevatsan และคณะในปี ค.ศ. 1997 ทำการศึกษายีน *embB* ของเชื้อวัณโรคที่คือยาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไวต่อยา พบว่า มากกว่าร้อยละ 60 ของเชื้อคือยามีการผ่าเหล่าเกิดขึ้นที่ยีนนี้ โดยส่วนมากการผ่าเหล่าเกิดที่บริเวณลำดับกรดอะมิโนที่ 306 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปจากเมไทโอนีน (methionine) เป็นลิวซีน (leucine) วาลีน (valine) หรือ ไอโซลิวซีน (isoleucine) (Sreevatsan et al., 1997)

2.2.4 การคือยาไพราซิनाไมด์

ไพราซิनाไมด์ (pyrazinamide; PZA) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างคล้ายนิโคตินาไมด์ (nicotinamide) ถูกค้นพบว่ามียฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและรายงานเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1952 แต่นำมาใช้ร่วมกับไอโซไนอาซิดและไรแฟมพิซิน เมื่อกลางทศวรรษที่ 80 ยานี้มีผลต่อเชื้อที่อยู่ในสภาวะกึ่งสงบ (semidormancy) และออกฤทธิ์ได้ดีที่สภาวะเป็นกรด (pH 4.8-5.6) ซึ่งเป็นสภาวะที่พบในมาโครฟาจ ยามีฤทธิ์จำเพาะกับเชื้อ *M. tuberculosis* โดยไม่มีผลกับเชื้อมัคโคแบคทีเรียอื่นๆ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมทั้ง *M. bovis* กลไกการออกฤทธิ์ของยา ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่ายาไปมีผลกับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยยับยั้งการส่งผ่านสารเข้าและออกจากเซลล์ (Zhang et al., 2003) ยา นี้ คล้ายกับยาไอโซไนอาซิด โดยถูกนำเข้าสู่เซลล์ในรูปที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (prodrug) และจะถูกเปลี่ยนเป็น pyrazinoic acid ซึ่งเป็นรูปที่ออกฤทธิ์ได้ (active form) ของยาโดยเอนไซม์ pyrazinamidase (Mackness, 1956; Konno et al., 1967) กลไกการคือยาส่วนใหญ่เกิดจากการผ่าเหล่าของยีน *pnca* ที่สร้างเอนไซม์ pyrazinamidase ผลที่เกิดขึ้นทำให้ยาไม่สามารถเปลี่ยนเป็นสารที่ออกฤทธิ์ได้ โดยพบกลไกนี้ประมาณร้อยละ 72-97 เชื้อคือยาที่แยกได้ในประเทศไทยพบกลไกนี้ประมาณร้อยละ 78 (Prammananan, 2011)

2.2.5 การดื้อยาสเตรปโตมัยซิน และยาในกลุ่ม 2-deoxystreptamine aminoglycosides

สเตรปโตมัยซิน (streptomycin; SM) และยาในกลุ่ม 2-deoxystreptamine aminoglycoside เช่น กานามัยซิน (kanamycin) อะมิคาซิน (amikacin) เจนตามัยซิน (gentamicin) และโทบรามัยซิน (tobramycin) เป็นต้น จัดเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม pseudosaccharide ที่ออกฤทธิ์ได้กว้าง ใช้รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ยกเว้นสเตรปโตมัยซิน มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและเป็นยาตัวแรกที่น่ามาใช้รักษาวัณโรคเมื่อปี ค.ศ. 1944 ยาสามารถจับกับ 16S rRNA ที่ 30S ribosomal subunit และยับยั้งขบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อ Finken และคณะทำการศึกษาเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยและคือยา SM พบการผ่าเหล่าของยีนที่สร้าง ribosomal protein S12 (*rpsL*) และยีนที่สร้าง 16S rRNA (*rrs*) มีผลทำให้เชื้อคือยา ทั้งนี้สันนิษฐานว่าการผ่าเหล่าของ *rpsL* หรือ 16S rRNA ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือโครงสร้างของเป้าหมายและมีผลทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Finken et al., 1993)

การผ่าเหล่าของ *rpsL* จะพบในเชื้อที่คือยาในระดับสูง (>500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยพบการผ่าเหล่าบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่ 42 (Lys→Arg หรือ Lys→Thr) และลำดับกรดอะมิโนที่ 87 (Lys→Arg) ในขณะที่การผ่าเหล่าของ 16S rRNA จะพบในเชื้อที่คือยาในระดับปานกลาง (50-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยพบการผ่าเหล่าบริเวณที่เรียกว่า 530 loop (ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 501C→T 522C→T 523A→C/T และ 526C→T โดยเลขลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นของ *E. coli*) และบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ 912C→A/G และ 913A→G (Böttger, 1994; Honoré and Cole, 1994; Meier et al., 1994) ซึ่งอยู่ในบริเวณที่สันนิษฐานว่าเป็นบริเวณที่จับกับยา (Moazed and Noller, 1987) อย่างไรก็ตามยังพบเชื้อคือยาในระดับต่ำ (25-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งไม่มีความผิดปกติของ *rpsL* และ 16S rRNA โดยสันนิษฐานว่าเชื้อกลุ่มนี้มีการเปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึมผ่านได้ (permeability) ของผนังเซลล์ ทำให้การส่งผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ผิดปกติไป (Meier et al., 1996)

เป็นที่น่าสังเกตว่าการผ่าเหล่าที่กล่าวมาข้างต้นมีความจำเพาะกับการดื้อยาสเตรปโตมัยซิน แต่ไม่มีผลกับยาในกลุ่ม 2-deoxystreptamine aminoglycoside จากการศึกษากลไกที่ทำให้เชื้อคือ

ต่อมาในกลุ่มนี้พบว่า การผ่าเหล่าของยีน *rrs* บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1408A→G (เลขลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *E. coli*) ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นบริเวณตำแหน่งจับของยา มีผลให้เชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้ โดยมีรายงานพบได้ทั้งในเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยและในเชื้อมัคโคแบคทีเรียอื่นๆ เช่น *M. abscessus*, *M. chelonae* และ *M. smegmatis* (Taniguchi et al., 1997; Alangaden et al., 1998; Prammananan et al., 1998; Prammananan et al., 1999)

การสรุปยีนที่เกี่ยวข้องกับการกลไกการดื้อยาของเชื้อวัณโรคแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 กลไกการดื้อยาของเชื้อวัณโรค

ยาต้านวัณโรค	กลไกการออกฤทธิ์	ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา
Isoniazid	ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์	<i>katG, inhA, ahpC, ndh</i>
Ethambutol	ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์	<i>embB</i>
Rifampicin	ยับยั้งขบวนการถอดรหัส	<i>rpoB</i>
Fluoroquinolone	ยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase	<i>gyrA, gyrB</i>
Streptomycin	ยับยั้งขบวนการสังเคราะห์โปรตีน	<i>rpsL, rrs</i>
2-deoxystreptomine	ยับยั้งขบวนการสังเคราะห์โปรตีน	<i>rrs</i>
Pyrazinamide	ยังไม่ทราบแน่ชัด	<i>pncA</i>

2.3 ยีน *whiB*

การค้นพบยีน *whi* (*whiA-I*) เกิดขึ้นครั้งแรกในการศึกษาการสร้างสปอร์ของ *Streptomyces coelicolor* (Hopwood et al., 1970; Chater, 1972) การกลายพันธุ์จะเห็นโคโลนีสีขาวปกคลุมด้วยกลุ่มใยราในอากาศคล้ายเส้นด้าย ซึ่งไม่สามารถแบ่งตัวและเติบโตเป็นสปอร์ได้ ต่อมาได้ค้นพบว่า โลกัส *whiB* เป็นปัจจัยการถอดรหัส (transcription factor) ใหม่ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์เท่านั้น แต่ยังมีบทบาทในการแบ่งเซลล์ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Actinomycete อีกด้วย (Davis and Chater, 1992; Soliveri et al., 1993) ยีน *whiB* ใน *S. coelicolor* เป็นต้นแบบการศึกษาของ WhiB family ที่ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัส (transcription regulator) ของเชื้อกลุ่ม Actinomycete (และ actinophage อย่างน้อย 1 ชนิด) รวมถึงมัคโคแบคทีเรีย ยีน *whiB* พบได้หลายชนิดในจีโนมของเชื้อ (Soliveri et al., 1993; Soliveri et al., 2000) กลุ่มยีน *whiB* ยังมีบทบาทอื่นที่สำคัญนอกเหนือจากการแบ่งตัวอีกด้วย เช่น การสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะ และการรักษาสมดุลรีดอกซ์ มีการศึกษาจำนวนมากในกลุ่มยีน *whiB7* ในเชื้อ *M. tuberculosis*

WhiB1 เป็นโปรตีนควบคุมการถอดรหัสที่สำคัญ มีความไวต่อไนตริกออกไซด์ และเป็นตัวลดการถอดรหัสของโปรโมเตอร์ของตนเองด้วยเช่นเดียวกับยีน chaperonin *groEL2* (Smith et al.,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2010; Stapleton et al., 2012) ยีน *whiB1* มีการแสดงออกตลอดเวลาของการเติบโตของเชื้อ และจะมีการแสดงออกมากขึ้นโดยผ่าน Rv3676 ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนกระตุ้นการถอดรหัสโดยอาศัย cAMP (Rickman et al., 2005; Agarwal et al., 2009) โดยที่ cAMP ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นการถอดรหัสของ *whiB1* ในขณะที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการถอดรหัส (Stapleton et al., 2010) เป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อ *M. tuberculosis* จะมีการผลิต cAMP จำนวนมากเมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์มาโครฟาจซึ่งอาจมีส่วนทำให้เชื้อสามารถดำรงอยู่ได้ในภาวะที่ไม่เหมาะสมในฟาโกโซม (phagosome) นอกจากนี้ยีน Rv3676 ยังมีผลทำให้ยีน *rpfA* มีการแสดงออกมากขึ้น (Rickman et al., 2005) ยีนนี้เป็นปัจจัยหนึ่งในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ *M. tuberculosis* ในระยะคงที่ (stationary phase) (Mukamolova et al., 2002) นอกจากนี้ยีน *whiB1* จะมีหน้าที่สำคัญในการเจริญเติบโตตามปกติแล้ว ยังมีบทบาทในการร่วมควบคุมยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับารอยู่รอดและการกลับมาเติบโตของเชื้อ *M. tuberculosis* ในระยะแฝงในเซลล์มาโครฟาจ

ยีน *whiB2* เป็นยีนที่มีหน้าที่เหมือนยีน *whiB* ใน *S. coelicolor* เป็นยีนที่จำเป็นในเชื้อ *M. tuberculosis* และมีบทบาทในการสร้างผนังกันเซลล์ มีการควบคุมการแสดงออกด้วยตนเอง (Gomez and Bishai, 2000; Raghunand and Bishai, 2006; Rybniker et al., 2010) การถอดรหัสของยีน *whiB2* จะมากขึ้นเมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะคงที่ การขาดแคลนสารอาหารและยับยั้งการสร้างผนังเซลล์จะกระตุ้นการถอดรหัสของยีน *whiB2* (Geiman et al., 2006)

WhiB3 มีบทบาทสำคัญในการก่อโรค เนื่องจากการทำงานที่ไวต่อสภาวะรีดอกซ์และเป็นตัวควบคุมการถอดรหัส (Steyn et al., 2002) หน้าที่การควบคุมการถอดรหัสนั้นขึ้นอยู่กับสภาวะทางรีดอกซ์ที่หลากหลายและความสามารถในการจับกับตัวร่วม 2 อย่างคือ ลำดับดีเอ็นเอในโปรโมเตอร์เป้าหมาย (Singh et al., 2007; Singh et al., 2009) และ Sig A ซึ่งเป็นซิกมาแฟกเตอร์ (sigma factor) พื้นฐานของเชื้อ *M. tuberculosis* (Steyn et al., 2002) โอโปโปรตีน WhiB3 ในรูปถูกออกซิไดส์จะสามารถจับกับดีเอ็นเอได้ แต่ในรูปถูกรีดิวซ์ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ โซโลโปรตีน WhiB3 (ประกอบด้วยกลุ่ม iron-sulfur) จะสามารถจับกับดีเอ็นเอได้อย่างหลวมๆ โดยไม่ขึ้นกับสภาวะรีดอกซ์ (Singh et al., 2007; Singh et al., 2009) ยังไม่มีการศึกษาผลของสภาวะรีดอกซ์ต่อการจับตัวของ WhiB3 กับ Sig A การยับยั้งกระบวนการหายใจโดยไนตริกออกไซด์หรือภาวะออกซิเจนต่ำร่วมกับการออกซิเดชันของกรดไขมันในการติดเชื้อในมาโครฟาจเชื่อว่าทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมแบบรีดอกซ์ ซึ่งย้อนกลับได้โดยกระบวนการสังเคราะห์ไขมันสะสมและพอลิคีทาอิด (polyketide) ซึ่งถือว่าเป็นตัวรับสมคูลรีดอกซ์ (Singh et al., 2007; Singh et al., 2009) ยังไม่มีการพิสูจน์ทางชีวเคมีถึงหน้าที่ที่แท้จริงของ WhiB3 ในการกระตุ้นหรือยับยั้งการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย แต่จากการคัดกรองจุดที่ WhiB3 สามารถจับได้ ทำให้คาดว่า WhiB3 กระตุ้นการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดไขมันและการตอบสนองต่อความเครียด (Guo et al., 2009) ยีน *whiB3* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมากในอาหารเหลวในช่วงท้ายระยะคงที่ (late stationary phase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และภายใต้ความเครียดจากกรด (Geiman et al., 2006)

ยีน *whiB4* มีการแสดงออกตลอดทุกช่วงเวลาของการเจริญเติบโต (Geiman et al., 2006) และอาจอยู่ภายใต้การควบคุมของปัจจัยซิกมา F ซึ่งจะกระตุ้นการแสดงออกของยีนโดยตอบสนองต่อตัวกระตุ้นความเครียดหลายชนิด (Hümpel et al., 2010)

ยีน *whiB5* มีการแสดงออกตลอดทุกช่วงเวลาของการเจริญเติบโต มีการแสดงออกลดลงในช่วงทำระยะคงที่ และถูกยับยั้งเมื่อมีความเครียดต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (Geiman et al., 2006) เมื่อไม่นานมานี้เชื่อว่ายีน *whiB5* มีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของ *M. tuberculosis* และการกลับมาเป็นโรครื้อ และยังมีอิทธิพลต่อการกระตุ้นการถอดรหัสของยีน 58 ยีนและอาจจะยับยั้งโปรโมเตอร์ของตัวเอง (Casonato et al., 2012)

ยีน *whiB6* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมากภายใต้ความเครียดต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (การผสม SDS และเอทานอล การช็อกด้วยความร้อน) (Geiman et al., 2006) รวมถึงอาจจะมึบทบาทในการกระตุ้น ESX-1 ซึ่งเป็นระบบการหลั่งที่สำคัญในการก่อโรคและการหลุดออกจากเซลล์มาโครฟาจ (Das et al., 2011)

ยีน *whiB7* มีความสำคัญในการกระตุ้นระบบการดื้อยาโดยธรรมชาติหลายระบบ และเป็นหนึ่งในไม่กี่ยีน (รวมถึง *whiB3*) ที่มีการแสดงออกมากขึ้นในเชื้อ *M. tuberculosis* complex ภายในเซลล์มาโครฟาจของหนูทั้งในขณะปกติและถูกกระตุ้น (Morris et al., 2005; Homolka et al., 2010) มีความสนใจในยีน *whiB7* เป็นพิเศษเนื่องจากมีส่วนทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างหลากหลายทั้งในระดับต่ำหรือสูง (4-64 เท่า) สายพันธุ์กลายของยีน *whiB7* มีความไวมากขึ้นต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ แมคโครไลด์ เตตราไซคลิก ลินโคซาไมด์ และอะมิโนไกลโคไซด์ บางตัว (Burian et al., 2012a) การยับยั้งระบบการดื้อยาโดยธรรมชาติเช่น ยีนในระบบของ *whiB7* จะทำให้สามารถใช้ยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ในปัจจุบันจำนวนมากรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.4 การกระตุ้นการแสดงออกของยีน *whiB7*

สายพันธุ์กลายของยีน *whiB7* ใน *M. tuberculosis* จะมีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ที่ไรโบโซมที่มีโครงสร้างหลากหลาย (แมคโครไลด์ เตตราไซคลิก ลินโคซาไมด์ และอะมิโนไกลโคไซด์) มากขึ้นและยาเหล่านี้ทำให้มีการถอดรหัสของยีน *whiB7* มากขึ้น (Morris et al., 2005) การศึกษาด้วยวิธีไมโครแอเรย์ (microarray) ช่วยสนับสนุนข้อสรุปดังกล่าวและยังพบว่า ยาวาลิโนมายซิน (ionophore valinomycin) และ โอฟลอกซาซิน (ofloxacin) เป็นยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน เพิ่มการถอดรหัสของยีน *whiB7* (Boshoff et al., 2004) มีการศึกษาตัวชักนำยีน *whiB7* อย่างกว้างขวาง พลาสมิดที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ของ *whiB7* ร่วมกับโปรตีนเรืองแสงสีเขียวซึ่งใช้เป็นตัวรายงานเพื่อคัดกรองยาประมาณ 600 ตัว ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ในปัจจุบันส่วนมาก (ประมาณ 500 ตัว) รวมถึงสารทางชีววิทยาอื่นๆ พบว่ามีสาร 86 ชนิดที่สามารถชักนำโปรโมเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ *whiB7* ได้สามารถจัดกลุ่มทางโครงสร้างได้ 25 กลุ่ม สารเหล่านี้ทำงานที่เป้าหมายที่หลากหลาย ไม่จำกัดเพียงแต่ไรโบโซมเท่านั้น (Burian et al., 2012b) และที่สำคัญคือ ไม่ใช่ตัวชักนำทุกตัวที่จะสามารถยับยั้งสายพันธุกรรมของยีน *whiB7* อย่างมีประสิทธิภาพได้มากขึ้น ผลที่ได้สรุปได้ว่าความสามารถของสารในการชักนำโปรโมเตอร์ของ *whiB7* นั้นไม่ขึ้นอยู่กับโครงสร้าง เป้าหมายหรือประสิทธิภาพในการยับยั้งสายพันธุกรรมของยีน *whiB7* (Burian et al., 2012b)

คาดว่ากลไกการถอดรหัสของ *whiB7* เกิดขึ้นตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงทางเมแทบอลิซึมที่เกิดจากยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่แตกต่างกัน มีข้อสังเกตว่าสารที่มีเป้าหมายที่การสร้างผนังเซลล์ไม่การกระตุ้นการถอดรหัสของ *whiB7* ซึ่งคัดค้านแนวคิดเรื่องผนังเซลล์ที่เสียหายกระตุ้นการถอดรหัสของ *whiB7* นอกจากนี้ *whiB7* ยังถูกชักนำให้ตอบสนองต่อความเครียดทางสรีรวิทยาหลายชนิด ได้แก่ การเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) การขาดเหล็ก และการช็อกด้วยความร้อน (แต่ไม่ใช่ภาวะกรด [พีเอช 4.5] หรือ การผสม SDS หรือ เปอร้ออกไซด์) (Geiman et al., 2006) ดังนั้นหน้าที่ของระบบการตอบสนองต่อความเครียดที่ประสานงานโดย *whiB7* ไม่จำกัดเพียงแต่การตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะเท่านั้น แต่ยังรวมถึงการปรับตัวในการเจริญเติบโตหรือภายในเซลล์เจ้าบ้าน ตัวอย่างเช่น ยีน *tap* ซึ่งอยู่ในภายใต้การควบคุมของ *whiB7* (*whiB7* regulon) ซึ่งจำเป็นทั้งสำหรับการอยู่รอดในระยะคงที่และการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ (Ramón-García et al., 2012) จากข้อเท็จจริงที่มีการชักนำการแสดงออกของยีน *whiB7* อย่างมากหลังจากถูกกินโดยมาโครฟาจได้ไม่นาน ทำให้เชื่อว่า ยีน *whiB7* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคและการอยู่รอดของเชื้อในเซลล์เจ้าบ้าน (Homolka et al., 2010) acivicin เป็นตัวเหนี่ยวนำ *whiB7* ที่น่าสนใจโดย acivicin เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ glutamine amidotransferase ซึ่งทำให้เกิดการตอบสนองต่อความเครียด (Smulski et al., 2001) ในเชื้อ *M. smegmatis* นั้น acivicin ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ตรวจพบได้ภายใต้ภาวะที่ทดลอง แต่ acivicin สามารถกระตุ้นการถอดรหัสของ *whiB7* ได้อย่างมาก (Burian et al., 2012b) นอกจากนี้การถอดรหัสของยีน *whiB7* ยังตอบสนองต่อระดับของกรดอะมิโนภายในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งช่วยให้เห็นถึงอิทธิพลของเมแทบอลิซึมในเซลล์ต่อการทำงานของ *whiB7* (Burian et al., 2012b)

2.5 ยีนภายใต้การควบคุมของ WhiB7

ยีน *whiB7* เป็นตัวกำหนดการคือยาหลายชนิดในเชื้อ *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. smegmatis* และ *Streptomyces lividans* (Morris et al., 2005) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไมโครอาร์เรย์ ในเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ค้นพบยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ WhiB7 ซึ่งประกอบด้วย ยีนคือยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นที่รู้จักอยู่ก่อนแล้ว และคาดว่า WhiB7 มีการควบคุมโดยตนเอง (Morris et al., 2005) ยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมประกอบด้วย *eis* (Rv2416c), *tap* (Rv1258c), *ermMT* (Rv1988) และยั้งรวมถึงยีนอื่นๆ ซึ่งมีหน้าที่ที่ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการคือยาปฏิชีวนะ การวิเคราะห์การถอดรหัสดังกล่าวยังช่วยสนับสนุนหลักฐานเพิ่มเติมว่า WhiB7 มีการควบคุมโดยตนเองและยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค้นพบลักษณะจำเพาะของโปรโมเตอร์ซึ่งจำเป็นในการกระตุ้นการถอดรหัสของ *WhiB7* ที่อยู่บริเวณเหนือยีน *whiB7*, *eis*, *tap* และ *ermMT* (Burian et al., 2012b) จากการวิเคราะห์โปรตีนของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เจริญในระยะ exponential phase ในอาหารเหลว พบโปรตีนประมาณร้อยละ 80 ของยีนที่ทำนายไว้ (Kelkar et al., 2011) แต่ไม่พบโปรตีน *WhiB* จึงสนับสนุนหลักการว่า โปรตีน *WhiB* ต้องอาศัยสภาวะความเครียดจำเพาะในการเพิ่มการแสดงออก และที่น่าสนใจคือ มีการตรวจพบ *eis* แต่ไม่พบ *tap* หรือ *ermMT* บ่งบอกว่ายีนภายใต้การควบคุมของ *WhiB7* อยู่ภายใต้การควบคุมของกลไกที่หลากหลาย

ในครั้งแรก มีความเข้าใจว่ายีน *eis* ช่วยให้เชื้อมัคโคแบคทีเรียสามารถอยู่รอดภายในเซลล์มาโครฟาจได้ (Wei et al., 2000) *Eis* ทำหน้าที่ acetylate โปรตีน DUSP16/MKP-7 ของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ลดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Kim et al., 2012) เป็นที่น่าสนใจว่า *Eis* สามารถทำให้เกิดการติดต่อยาปฏิชีวนะ โดย acetylate ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Chen et al., 2011; Kim et al., 2012) ในเชื้อมัคโคแบคทีเรีย การถอดรหัสยีน *eis* เกิดขึ้นจากโปรโมเตอร์ที่จดจำได้โดยปัจจัยซิกมา A (Zaunbrecher et al., 2009; Burian et al., 2012a) โปรโมเตอร์นี้เหมือนกับโปรโมเตอร์พื้นฐานทั่วไป (vegetative promoter) ในเชื้อ *Mycobacterium* และเชื้อ *E. coli* และเหมือนกับโปรโมเตอร์เบื้องต้น (minimal promoter) ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบส hexamer -10 และ -35 การกลายพันธุ์ที่โปรโมเตอร์ดังกล่าวของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ติดต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ ทำให้มีการถอดรหัสของ *eis* เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากและทำให้เกิดการติดต่อยากานามัยซิน (Zaunbrecher et al., 2009) นอกจากนี้ระดับของ SigA ยังสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการกระตุ้นยีน *eis* (Wu et al., 2009)

โปรตีน *Tap* เป็นตัวปั๊มออกซึ่งทำให้เกิดการติดต่อยากกลุ่มเตตราไซคลิน, สเปคทีโนมายซิน (spectinomycin) และยาปฏิชีวนะอื่นอีกหลายตัว (Ainsa et al., 1998; Ramón-García et al., 2006; Ramón-García et al., 2012) และที่สำคัญยีน *tap* ยังมีบทบาททางสรีรวิทยาสำหรับการผ่านเข้าออกเซลล์ของสารในอาหารเหลว และการกำจัดสารพิษในไซโทพลาซึมเมื่อเข้าสู่ระยะคงที่ (Ramón-García et al., 2012) การที่มีตัวปั๊มออกมากเกินไปทำให้เกิดการติดต่อยาหลายขนานทั้งในเชื้อมัคโคแบคทีเรียและเชื้อก่อโรคชนิดอื่น (Nishino et al., 2009; da Silva et al., 2011) มีการศึกษาความสำคัญทางคลินิกของตัวปั๊มออกโดย Louw et al., พบว่ายาไรแฟมพิซิน กระตุ้นให้เกิดตัวปั๊มออกจำนวนมากในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ติดต่อยาไรแฟมพิซิน และมีผลทำให้เกิดการติดต่อยาข้ามไปยังกลุ่มฟลูโอโรควิโนโลน คือ โอฟลอกซาซินด้วย (Louw et al., 2011)

โปรตีน *Erm* คือเอนไซม์ ribosomal RNA methyltransferase ซึ่งทำให้เกิดการติดต่อยากกลุ่มแมคโครไลด์ (Buriánková et al., 2004) การให้ยาปฏิชีวนะกลุ่มแมคโครไลด์ กับเชื้อ *M. smegmatis* ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าที่จะยับยั้งเชื้อได้ทำให้เพิ่มการติดต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มแมคโครไลด์ อย่างมีนัยสำคัญผ่านกลไกที่ใช้ยีน *erm* และยีน *whiB7* (Nash, 2003; Burian et al., 2012b) เช่นเดียวกันกับในเชื้อ *M. tuberculosis* โปรโมเตอร์ของยีน *erm* ขึ้นอยู่กับ *WhiB7* ดังนั้นการให้สาร acivicin ซึ่ง

เป็นสารกระตุ้น *whiB7* ที่ไม่อยู่ในกลุ่มแมคโครไลด์ จะทำให้เกิดการติดต่อของกลุ่มแมคโครไลด์ ได้ (Burian et al., 2012b) จากข้อเท็จจริงที่ว่าสาร acivicin ซึ่งเป็นยาที่ก่อความเมแทบอลิซึมโดยไม่ยับยั้งการเจริญเติบโต สามารถเพิ่มการติดต่อของกลุ่มแมคโครไลด์ได้ ทำให้คาดการณ์ว่าสภาวะทางเมแทบอลิซึมมีบทบาทในการกำหนดการติดต่อยาโดยธรรมชาติ

2.6 โครงสร้างและหน้าที่ของ WhiB7

โปรตีนกลุ่ม WhiB มีโครงสร้างหลักที่คล้ายคลึงกันหลายประการ โปรตีน WhiB7 เหมือนกันกับโปรตีนกลุ่ม WhiB ตัวอื่นๆ ประกอบด้วยซิสเทอีน 4 ตัวซึ่งจะจับกับกลุ่มของ iron-sulfur ที่ไวต่อสภาวะทางรีดอกซ์ รวมถึง จุดหัก G(V/I)WGG ที่ประกอบด้วย tryptophan และมีลักษณะจำเพาะ (Soliveri et al., 2000; Morris et al., 2005; Alam et al., 2009) โปรตีน WhiB ทุกตัวมีกรดอะมิโนในกลุ่มเบสใกล้เคียงกับปลายด้านคาร์บอกซิลซึ่งคาดว่าทำหน้าที่จับกับกับดีเอ็นเอ (Soliveri et al., 2000) ในกรณีของ WhiB7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลายด้านคาร์บอกซิลจะมีโครงสร้างเป็น AT-hook ซึ่ง motif นี้ พบได้บ่อยในปัจจัยการถอดรหัสของยูแคริโอต ทำหน้าที่จับกับร่องเล็กในส่วนของดีเอ็นเอที่มี AT มาก (Reeves and Nissen, 1990; Morris et al., 2005) จากการศึกษาทางโครงสร้างของโปรตีน WhiB ชนิดอื่นๆ พบว่า การมีซิสเทอีน 4 ตัว จุดหัก และ motif AT-hook มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ของ WhiB7 (Davis and Chater, 1992; Raghunand and Bishai, 2006)

การศึกษาโปรตีน WhiB ทำได้ยากจากข้อเท็จจริงที่ซิสเทอีนสามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์หรือรับเอาหมู่ iron-sulfur cluster เข้ามาได้ทำให้มีสภาวะทางรีดอกซ์ได้หลายรูปแบบซึ่งมีความสำคัญทางโครงสร้างและหน้าที่ต่างกันออกไป (Singh et al., 2007) ซิสเทอีนทั้งสี่ตัวในโปรตีน WhiB สามารถถูกรีดิวซ์หรือออกซิไดซ์ได้อย่างเต็มที่ทำให้มีโครงสร้างที่พับหรือไม่พับแตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ซิสเทอีนทั้งสี่ตัวยังสามารถจับกับหมู่ iron-sulfur cluster ได้อีกด้วยภายในเซลล์โปรตีน WhiB มีโครงสร้างและหน้าที่ที่หลากหลายเพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมทางรีดอกซ์

จากบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีน WhiB คือ บริเวณที่เป็นจุดหัก เป็นจุดที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นเป้าหมายทางคลินิกในการยับยั้ง WhiB7 ยาที่ยับยั้งการทำงานของบริเวณอนุรักษ์อีก 2 โครงสร้าง (ซิสเทอีนที่จับกับหมู่ iron-sulfur cluster และ AT-hook) น่าจะมีความเป็นพิษในมนุษย์ในเซลล์ยูแคริโอต หมู่ iron-sulfur cluster มีหน้าที่ทางรีดอกซ์ที่สำคัญหลายประการ และลักษณะ AT-hook พบได้บนโปรตีนกลุ่มที่มี high mobility ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องในปฏิกริยาระหว่างโปรตีนกับจีโนมที่หลากหลายในยูแคริโอต (Cleynen and Van de Ven, 2008) บริเวณที่ทำนายว่าเป็นจุดหักนี้มีลักษณะจำเพาะ มีแนวโน้มที่จะอยู่ภายนอกโมเลกุลและมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัส (Davis and Chater, 1992 ; Soliveri et al., 1993) นอกจากนี้ ยาที่สามารถจับและยับยั้งการทำงานของบริเวณนี้น่าจะสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน WhiB ที่สำคัญตัวอื่นๆ ในเชื้อ *M. tuberculosis* ได้อีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วย เป็นที่น่าสนใจว่าโปรตีน WhiB3 จับกับ SigA บริเวณตำแหน่ง 4.2 ซึ่งทราบว่าเป็นจุดที่มีปฏิสัมพันธ์กับตัวควบคุมการถอดรหัสตัวอื่นๆ (Dove et al., 2003) SigA ที่มีการกลายพันธุ์บริเวณตำแหน่ง 4.2 (Arg515His) จะไม่สามารถจับกับ WhiB3 ได้ เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของ *whiB3* หรือ SigA (Arg515His) จะมีความรุนแรงในการก่อโรคลดลง (Collins et al., 1995; Singh et al., 2007; Singh et al., 2009) เชื้อกลายพันธุ์ Arg515His สามารถมีชีวิตอยู่ได้แสดงว่า WhiB1 และ WhiB2 ยังสามารถทำงานได้ ซึ่งแสดงว่า โปรตีน WhiB ทุกชนิดไม่ได้มีปฏิสัมพันธ์กับกลไกการถอดรหัสในรูปแบบเดียวกันและซิกมาแฟกเตอร์ที่แตกต่างกันอาจมีบทบาทเกี่ยวข้อง

นอกจากการทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสแล้ว โปรตีน WhiB อาจมีหน้าที่เป็นเอนไซม์ด้วย ในเชื้อ *M. tuberculosis* โปรตีน apo-WhiB ทุกตัวในรูปไดเมอร์ ยกเว้น WhiB2 สามารถรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ได้โดยมีประสิทธิภาพแตกต่างกันออกไป (Alam et al., 2009) ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยารีดอกซ์ซึ่งขึ้นอยู่กับไดโรโอซิริทอล (dithiothreitol) และ สารแต่งเติมอื่นๆ อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า WhiB1 มีความสามารถของ thioreductase ต่อโปรตีน GlgB ในเชื้อ *M. tuberculosis* (Garg et al., 2009)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย

3.1.1 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 และ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 ได้รับจากห้องปฏิบัติการวิจัยวัณโรค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.1.2 *Mycobacterium tuberculosis* DS3214, FT068, DS1053 และ DS1641 ได้รับจากทุนวิจัยวัณโรคต่อเยื่อหุ้มสมอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

3.1.3 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 ได้รับจาก Prof.Dr. Erik C. Böttger สถาบันจุลชีววิทยาทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยซูริก ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (Snapper et al., 1990)

3.1.4 *Escherichia coli* NEB5-alpha (NEB, USA)

3.2 พลาสมิด

3.2.1 pSMT1 (Snewin et al., 1999) (ภาคผนวก ก) เป็น replicative shuttle vector พัฒนามาจาก replicative vector pMV261 มียีนต่อเยื่อหุ้มเซลล์ไฮโกรไมซิน บี และยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescence protein) ใช้สำหรับการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย

3.2.2 pDrive (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ก) เป็น TA cloning vector ใช้สำหรับโคลนยีน

3.3 สารเคมี

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 อาหาร Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ข) (BBL, Becton-Dickinson, USA)

3.3.1.2 อาหาร Middlebrook 7H10 (ภาคผนวก ข) (BBL, Becton-Dickinson, USA)

3.3.1.3 อาหาร SOC (ภาคผนวก ข) (NEB, USA)

3.3.2 ยาปฏิชีวนะ

3.3.2.1 ไฮโกรไมซิน บี (Sigma, USA)

3.3.2.2 คลาริโทรัมัยซิน (Sandoz, Germany)

3.3.2.3 กานามัยซิน (Sigma, USA)

3.3.3 เอนไซม์

3.3.3.1 *Taq* DNA polymerase (Intron, South Korea)

3.3.3.2 *Bam*HI HF (NEB, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.3.3 *Hind*III HF (NEB, USA)
- 3.3.3.4 T4 DNA ligase (Takara, Japan)
- 3.3.3.5 Alkaline Phosphatase (Calf Intestinal) (NEB, USA)
- 3.3.3.6 *Pfu* DNA polymerase (Promega, USA)
- 3.3.3.7 RNase inhibitor (Biolabs, USA)
- 3.3.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker)
 - 3.3.4.1 2-Log DNA Ladder (NEB, USA)
- 3.3.5 สารเคมีอื่นๆ
 - 3.3.5.1 อะกาโรส (agarose) (Research Organic, USA)
 - 3.3.5.2 ฐุ่น (bacteriological agar) (BBL, Becton-Dickinson, USA)
 - 3.3.5.3 dNTPs (Intron, South Korea)
 - 3.3.5.4 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) (Bio Basic, Canada)
 - 3.3.5.5 Trizol reagent (Invitrogen, USA)
- 3.3.6 ชุดสำเร็จ
 - 3.3.6.1 ชุด NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany)
 - 3.3.6.2 ชุด Omniscript reverse transcription (Qiagen, Germany)
 - 3.3.6.3 ชุด RNeasy (Qiagen, Germany)
 - 3.3.6.4 ชุด Quantitect SYBR Green PCR (Qiagen, Germany)
 - 3.3.6.5 ชุด Plasmid DNA extraction mini kit (Favorgen, Taiwan)

3.4 เครื่องมือ

- 3.4.1 หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) (Hirayama, Japan)
- 3.4.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) (Eppendorf, USA)
- 3.4.3 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) (MJ Research, USA)
- 3.4.4 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ real-time PCR ABI7500 (Applied Biosystem, USA)
- 3.4.5 เครื่องถ่ายภาพเจล (Documentation gel analysis) (Syngene, Germany)
- 3.4.6 ชุดเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) (Mupid, Japan)
- 3.4.7 เครื่องแก้ว (Pyrex, USA)
- 3.4.8 ตู้เลี้ยงเชื้อ (Binder control, Scientific Promotion, Japan)
- 3.4.9 ตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (Innova, New Brunswick Scientific, USA)
- 3.4.10 เครื่องทำความร้อน (Thermoblock) (TBD-120 Thermostat, Biosan, Germany)
- 3.4.11 เครื่องเขย่า (Vortex) (Genie2, Scientific Industries, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการ

3.5.1 การเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* และ *M. smegmatis* ในอาหาร LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หรือ 2-3 วัน สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *M. smegmatis* ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *M. tuberculosis* จะเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น Middlebrook 7H10 หรือในอาหารเหลว Middlebrook 7H9 ผสมด้วย OADC (oleic acid-albumin-dextrose-salt complex) ร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีพลาสติกที่ต้องการ จะใช้ยาไฮโครไมซิน บี ผสมในอาหารโดยให้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเชื้อ *E. coli* และ *M. smegmatis* และความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเชื้อ *M. tuberculosis*

3.5.2 การเตรียม crude DNA จากเชื้อ *M. tuberculosis*

นำโคโลนีเชื้อ *M. tuberculosis* ปริมาณ 1 ลูกบาศก์ จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ละลายในบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเคือดเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที โดยเฉพาะส่วนใสด้านบนสำหรับไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.3 การออกแบบไพรเมอร์

ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *whiB7* (Rv3197A), *erm* (RV1988) และ *sigA* (Rv2703) ที่อ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ในฐานะข้อมูล Genbank มาออกแบบไพรเมอร์ ตาราง 3.1 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	วัตถุประสงค์
Rv3197A (<i>whiB7</i>)	3197AFH	AAAAAGCTTGTGTCGGTACTGACAGTCC	Cloning
	3197ARH	AAAAAGCTTCTATGCAACAGCATCCTTGC	Cloning
	Rv3197A-F	CGATCTGTGGTTCGCCGA	PCR
	Rv3197A-R	GTGACTCACGATCGAGCC	PCR
	Rv3197A-RT	CAGCATCCTTGCGCGGAC	RT
Rv1988 (<i>erm</i>)	Rv1988-F	GCTGCTGGCACCCAACAG	PCR
	Rv1988-R	CACCGCGGAATCCACATG	PCR
	Rv1988-RT	CCTGCCAGTCACCGCACT	RT
Rv2703 (<i>sigA</i>)	Rv2703-F	CGATCTCGTTGGACCAGA	PCR
	Rv2703-R	TCGGATGGCGCAACTTCGAC	PCR
	Rv2703-RT	CAGTCCAGGTAGTCGCGC	RT

*บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ จุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ *HindIII*

3.5.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (Polymerase chain reaction; PCR)

การเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส ใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และใช้ crude DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv เป็นต้นแบบ (template) ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สแสดงในตารางที่ 3.2 สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ การแยกดีเอ็นเอสายคู่เริ่มต้น (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที การแยกดีเอ็นเอสายคู่ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที การจับของไพรเมอร์ (primer annealing) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ การสร้างสายดีเอ็นเอ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และการสร้างสายดีเอ็นเอครั้งสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

การเพิ่มปริมาณยีน *whiB7* เพื่อใช้สำหรับการโคลนยีนจะใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase แทน *Taq* DNA polymerase

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	5
dNTP (2.5 มิลลิโมลาร์ แต่ละตัว)	5
Primer-F (10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1
Primer-R (10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.2
Crude DNA	5
น้ำ	32.8
รวม	50

3.5.5 การตรวจหาผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเจลอะกาโรส

ตรวจหาผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเจลอะกาโรส ร้อยละ 2 ในเจล ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ประกอบด้วยอะกาโรส 0.3 กรัมละลายในบัฟเฟอร์ TAE 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เจลแข็ง นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรส ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ปริมาณ 500 นาโนกรัม สำหรับใช้เป็นขนาดมาตรฐาน หยอดลงไปในแต่ละหลุมของเจล ใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกขนาด 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร (100 โวลต์) หลังจากนั้นจึงย้อมสีเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นานประมาณ 1-2 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำสะอาดนาน 5-10 นาที ก่อนนำเจลไปถ่ายรูปลงกระดาษอัลตราไวโอเลต

3.5.6 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III-HF หรือ *Bam*HI-HF ทำโดยใช้เอนไซม์ 10 หน่วยต่อดีเอ็นเอ ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ใน NEB Buffer 4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเจลอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis) ใช้อะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 0.8-1

3.5.7 การทำสารละลายดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์และการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรส

การทำให้สารละลายดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรส ใช้ชุดสำเร็จ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ตามวิธีการของผู้ผลิตดังนี้ สำหรับเจลอะกาโรส ใช้บัฟเฟอร์ NTI 200 ไมโครลิตร ต่อเจลอะกาโรส 100 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex จนเจลอะกาโรสละลายจนมองไม่เห็นในสารละลาย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการทำให้สารละลายดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ ใช้บัฟเฟอร์ NTI 2 เท่าของปริมาตรสารละลายเริ่มต้น ผสมให้เข้ากัน นำไปผ่านลงในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านออกมาไป ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งบัฟเฟอร์ NT3 ที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไป ล้างซ้ำอีก 1 ครั้งเช่นเดิมเพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนของเกลือให้น้อยที่สุด ต่อมาทำให้คอลัมน์แห้งโดยนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทำให้เอทานอลระเหยไปโดยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนสุดท้าย เติมบัฟเฟอร์ NE ลงไปในคอลัมน์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (ในกรณีที่สายดีเอ็นเอมีความยาวมากกว่า 1,000 คู่เบส) ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที) นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายที่ได้ออกมาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

3.5.8 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตจากพลาสมิด (dephosphorylation)

หลังจากตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์แล้ว จึงนำมากำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้าน 5' ของดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, calf intestinal; CIP) โดยเติม NEB buffer ความเข้มข้น 10 เท่าลงในสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอ จนได้สารละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า เติม CIP 0.5 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นจึงทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์อีกครั้ง ตามวิธีในข้อ 3.5.7

3.5.9 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (DNA ligation)

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ เตรียมโดยนำพลาสมิด pSMT1 Δ rfp ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และผ่านการกำจัดหมู่ฟอสเฟตจากพลาสมิดปริมาณ 50 นาโนกรัม และ ชิ้นส่วนของยีน *whiB7* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันปริมาณ 6 นาโนกรัม (อัตราส่วนโมลาร์ของชิ้นส่วนยีน *whiB7* ต่อพลาสมิดเท่ากับ 3 ต่อ 1) เติมบัฟเฟอร์ 10 เท่า ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 DNA ligase 350 ยูนิต (1 ไมโครลิตร) และเติมน้ำจนได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลง นำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 5-10 วินาที หลังจากนั้น แช่ไว้ในน้ำอุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ก่อนนำมาทำการทรานสฟอร์มเมชัน

3.5.10 การทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) หรือการนำดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่เซลล์

สำหรับการทรานสฟอร์มเมชันเชื้อ *E. coli* ทำได้โดยนำสารละลาย competent ของ *E. coli* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเติมสารละลายที่ได้จากปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอ ลงไปปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเคาะหลอดเบาๆ 4-5 ครั้ง แช่หลอดไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตีเอ็นเอเข้าเซลล์โดยกระตุ้นด้วยความร้อน (Heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที นำหลอดไปแช่น้ำแข็งอีกเป็นเวลา 5 นาที เติมหาอาหาร SOC ลงไป 950 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ผสมเซลล์ให้เข้ากันและทำการเจือจางเชื้อด้วยอัตรา 10^{-1} และ 10^{-2} ในอาหาร SOC นำไป spread บนอาหาร LB ที่มียาไฮโกรไมซิน บี เก็บงานเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

สำหรับการทรานสฟอร์มเชื้อมัคโคแบคทีเรีย เตรียมเซลล์ competent ของ *M. smegmatis* mc²155 หรือ *M. tuberculosis* H37Ra โดยเตรียมกล้าเชื้อ (seed culture) ในอาหารเหลว Middlebrook 7H9 ที่มี OADC ร้อยละ 10 และ Tween 80 ร้อยละ 0.05 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-5 วัน หรือ 7-10 วัน สำหรับเชื้อ *M. smegmatis* mc²155 และ *M. tuberculosis* H37Ra ตามลำดับ ต่อมานำเชื้อที่เลี้ยงได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว Middlebrook 7H9 ที่มี OADC ร้อยละ 10 และ Tween 80 ร้อยละ 0.05 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 17 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *M. smegmatis* หรือประมาณ 10 วันสำหรับเชื้อ *M. tuberculosis* จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 0.5-1.0 แช่เซลล์ในน้ำแข็งเป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ล้างเซลล์ด้วยกลีเซอรอล ร้อยละ 10 ที่เย็นจัด 3 ครั้ง และละลายเซลล์ในกลีเซอรอล ร้อยละ 10 ที่เย็นจัดปริมาตร 2 มิลลิลิตร

นำพลาสมิดที่เตรียมไว้ปริมาณ 1 ไมโครกรัมผสมกับเซลล์ competent 100 ไมโครลิตร สำหรับเชื้อ *M. smegmatis* หรือ 400 ไมโครลิตร สำหรับเชื้อ *M. tuberculosis* แช่ทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปใส่ใน คิวเวตต์ (cuvette) (ระยะห่าง 0.2 เซนติเมตร) สำหรับการทำ electroporation นำคิวเวตต์ไปใส่ในเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ทำการปล่อยกระแสไฟฟ้า 1 ครั้งขนาด 2.5 กิโลโวลต์ 25 ไมโครฟารัด โดยตั้งค่าควบคุมความต้านทานไว้ที่ 1,000 โอห์ม หลังจากกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแล้ว แช่คิวเวตต์ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เติมหาอาหารเหลว Middlebrook 7H9 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *M. smegmatis* หรือ 5 มิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *M. tuberculosis* นำไปถ่ายใส่หลอดปราศจากเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือ 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *M. smegmatis* หรือ *M. tuberculosis* ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ไป spread บนอาหาร Middlebrook 7H10 ที่มียาไฮโกรไมซิน บี ความเข้มข้นสุดท้าย 75 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน หรือ 4 สัปดาห์ สำหรับเชื้อ *M. smegmatis* หรือ *M. tuberculosis* ตามลำดับ

3.5.11 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ทำโดยใช้ชุดสำเร็จ Favorprep Plasmid DNA extraction mini kit โดยเตรียมบัฟเฟอร์ FAPD1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด ใส่เชื้อลงไปปริมาณ 1 ลูบ ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex จนไม่เห็นก้อนของเซลล์อีก ต่อมาเติมบัฟเฟอร์ FAPD2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดคว่ำไปมาเบาๆ 5 ครั้งเพื่อให้เซลล์แตก ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เติมบัฟเฟอร์ FAPD3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร พลิกหลอดคว่ำไปมาเบาๆ 5 ครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสใส่ในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไป ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลาย W1 ไป ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ Wash ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลาย Wash ไป ต่อมาทำให้คอลัมน์แห้งโดยนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 xg เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนสุดท้าย เติมน้ำ หรือ elution buffer ลงไปใน คอลัมน์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายที่ได้ออกมาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

3.5.12 การตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ตารางที่ 3.1 และ 3.2) ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Rv โดยใช้โปรแกรม ClustalW

3.5.13 การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย

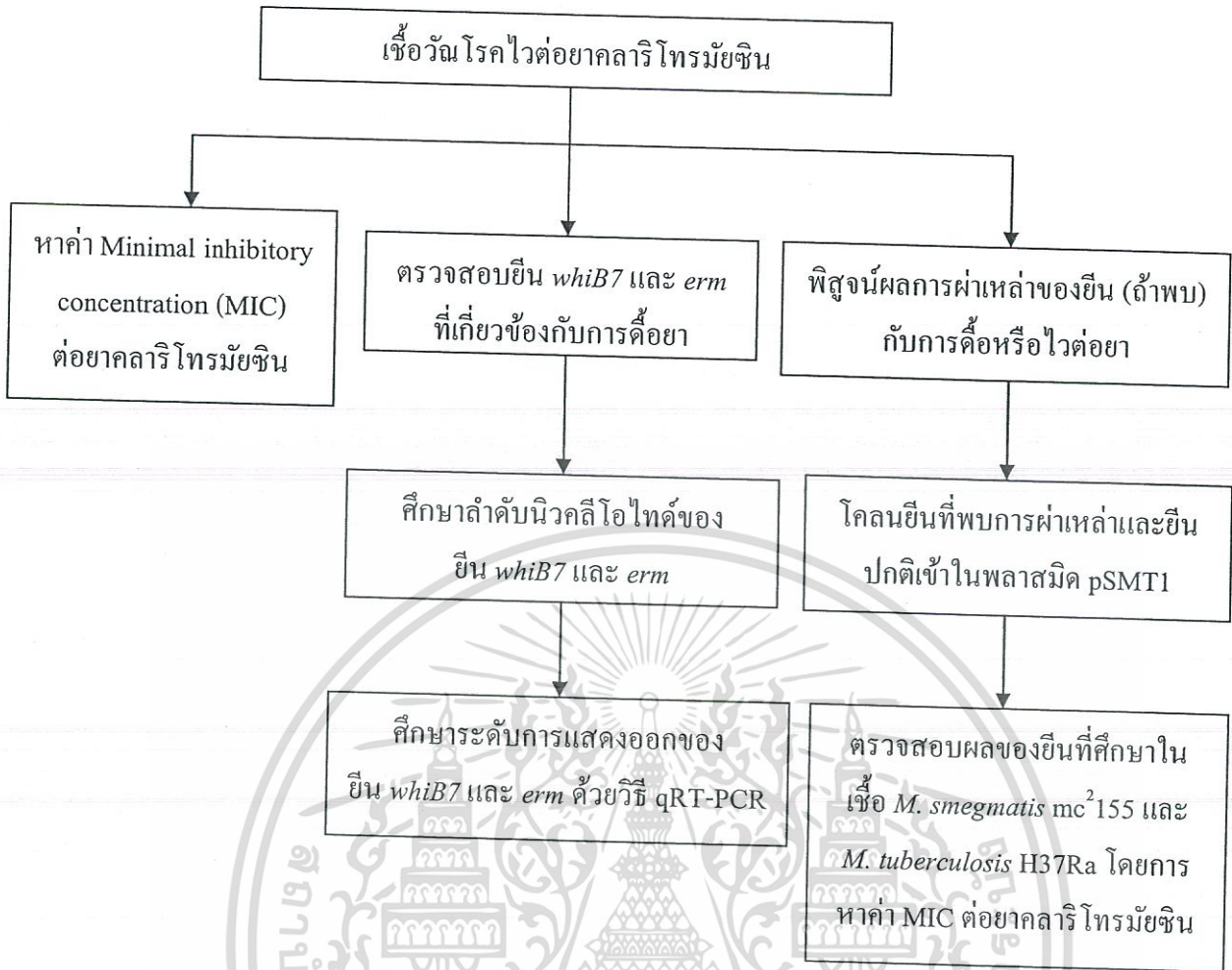
การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อมัคโคแบคทีเรียจะทำโดยหาค่า MIC (Minimal inhibitory concentration) ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (เป็นตัวควบคุม) และสายพันธุ์อื่นๆ ที่ต้องการทดสอบต่อยาด้วยวิธี agar dilution ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI former NCCLS) (NCCLS, 2003) โดยมีวิธีทำคร่าวๆ ดังนี้ เตรียมเชื้อที่ต้องการทดสอบให้ได้จำนวน 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบกับยาที่ความเข้มข้นต่างๆ (two-fold dilution) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Middlebrook 7H10 ที่มี OADC ร้อยละ 10 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน สำหรับเชื้อ *M. smegmatis* หรือ 2-3 สัปดาห์สำหรับเชื้อ *M. tuberculosis* อ่านค่า MIC โดยค่า MIC คือค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

3.5.14 Quantitative Real-time reverse transcription PCR

เลี้ยงเชื้อวัณโรคในอาหารเหลว Middlebrook 7H9 ที่มี OADC (oleic acid-albumin-dextrose-salt complex) ร้อยละ 10 กลีเซอรอล ร้อยละ 0.5 และ tween 80 ร้อยละ 0.05 เป็นส่วนประกอบ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.4 หลังจากนั้นสำหรับกลุ่มทดลอง นำเชื้อมาบ่มกับยาคลาโรโทรมัซอินความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน DMSO สำหรับกลุ่มควบคุม นำเชื้อมาบ่มกับ dimethylsulfoxide (DMSO) ที่ไม่มียาคลาโรโทรมัซอิน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง การสกัด RNA ใช้ยา Trizol[®] (Invitrogen) ร่วมกับ Zirconia/glass bead ตามวิธีการของผู้ผลิต และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด RNeasy kit (Qiagen) ต่อมาจึงทำการสร้างสาย cDNA (reverse transcription) โดยใช้ชุดสำเร็จ OmniScript reverse transcription (Qiagen) ปฏิบัติที่มีปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย RNA 500 นาโนกรัม ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 1 ไมโครโมลาร์ (ตารางที่ 3.1), RNase inhibitor 10 หน่วย dNTP mix 0.5 มิลลิโมลาร์ Omniscript reverse transcriptase enzyme 4 หน่วย น้ำที่ปราศจาก RNase และบัพเฟอร์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในปฏิริยา Real-time PCR แต่ละปฏิริยา จะนำ cDNA ที่ได้มาใช้ปฏิริยาละ 2 ไมโครลิตร

การทำ quantitative PCR ใช้ชุด Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) ปฏิบัติ 30 ไมโครลิตร จะประกอบด้วย cDNA 2 ไมโครลิตร, Quantitect SYBR Green PCR Master Mix เจือจางจนได้ความเข้มข้น 1 เท่า ไพรเมอร์ 0.3 ไมโครโมลาร์ และน้ำที่ปราศจาก RNase หลังจากผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันจึงนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง ABI7500 (Applied Biosystem) โดยกำหนดสภาวะการทำงานไว้ดังนี้ เริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีเพื่อกระตุ้นการทำงานของ HotStarTaq[®] DNA polymerase ต่อด้วย denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที primer annealing 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกัน (melting curve) การวัดปริมาณ RNA ทำโดยวิธีการหาปริมาณสัมพัทธ์ (Relative Quantification) โดยใช้ *SigA* RNA เป็นตัวอ้างอิงในการเปรียบเทียบปริมาณ RNA (normalization) การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้งในเวลาต่างกัน หลังจากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของยีนเทียบกับแสดงออกของยีนในเชื้อที่ไม่ได้สัมผัสยาคลาโรโทรมัซอิน

ขั้นตอนการศึกษาวิจัยโดยรวมทั้งหมดสรุปตามรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนภาพสรุปขั้นตอนการศึกษาวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคทั้งสี่สายพันธุ์ต่อยาคลาริโทรมัซซิน

จากการทดสอบความไวต่อยาคลาริโทรมัซซินของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งสี่สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ DS3214, FT068, DS1053 และ DS1641 พบว่า เชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งสี่สายพันธุ์มีค่า MIC ต่อยาคลาริโทรมัซซินเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.1) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่นำมาศึกษาทั้งสี่สายพันธุ์ไวต่อยาคลาริโทรมัซซิน จากนั้น จึงนำเชื้อทั้งสี่สายพันธุ์ไปทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *whiB7* และยีน *ermMT* ต่อไป

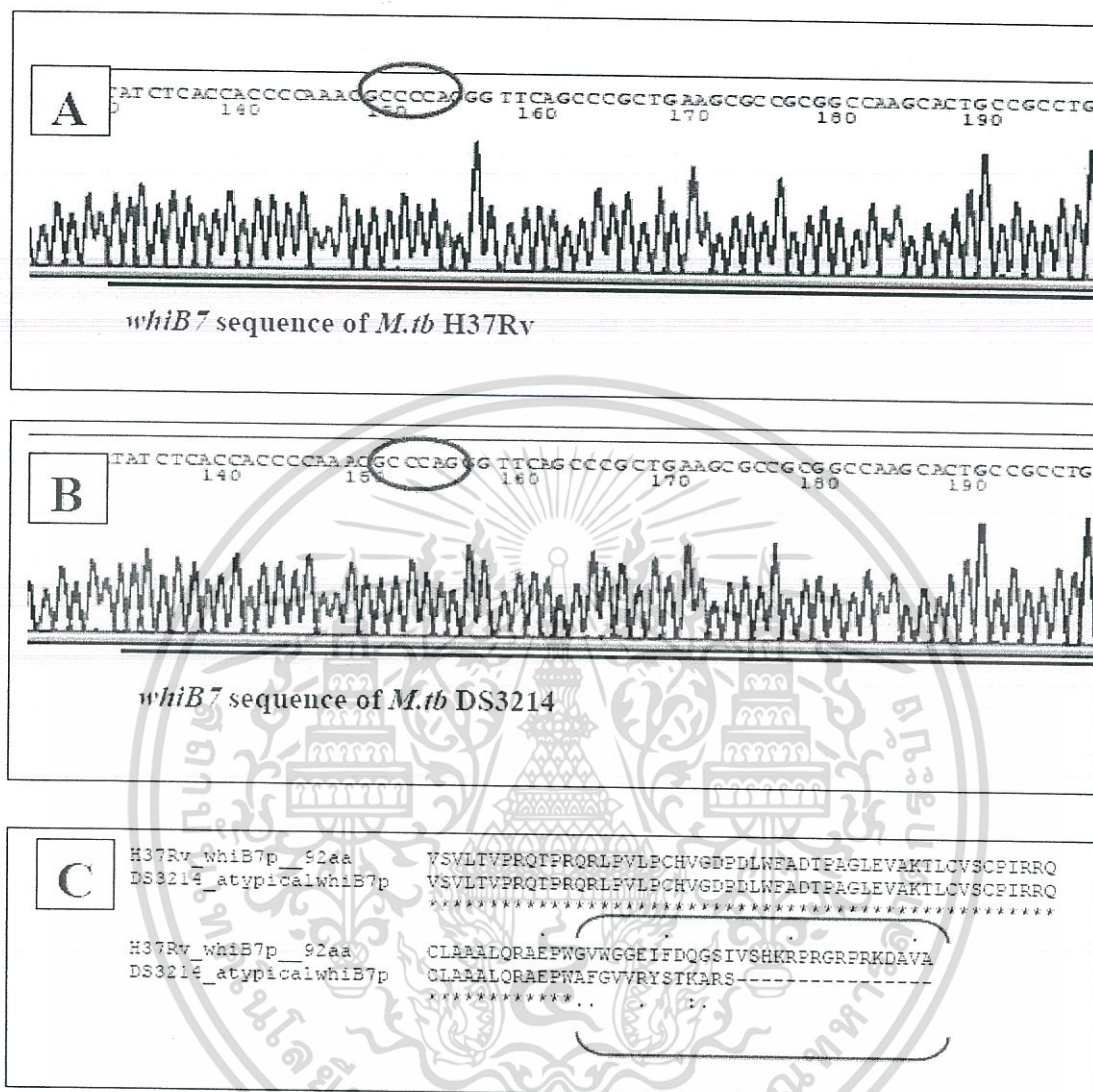
ตารางที่ 4.1 แสดงค่า MIC ของเชื้อวัณโรคทั้งสี่สายพันธุ์ต่อยาคลาริโทรมัซซิน

สายพันธุ์	MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
H37Rv	16
DS3214	1
FT068	1
DS1053	1
DS1641	1

4.2 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *whiB7* และ *ermMT* ในเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยาคลาริโทรมัซซิน

จากการนำเชื้อ *M. tuberculosis* 4 สายพันธุ์ที่ไวต่อยาคลาริโทรมัซซินมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *whiB7* และ *ermMT* รวมถึงส่วนที่ไม่แปลรหัสด้าน 5' (5'untranslated region, UTR) ของยีน *ermMT* จำนวน 211 คู่เบสและส่วนที่ไม่แปลรหัสด้าน 5' (5'UTR) ของยีน *whiB7* จำนวน 474 คู่เบส เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Rv โดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่า มีเชื้อ *M. tuberculosis* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ FT068, DS1053 และ DS1641 ที่มีลำดับเบสของยีน *whiB7* และ *ermMT* รวมถึงส่วนที่ไม่แปลรหัสด้าน 5' เหมือนกับสายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv ทุกประการ ยกเว้นสายพันธุ์ DS3214 ที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *whiB7* ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 189 โดยพบว่ามีเบสกวีนีน (guanine) หายไปหนึ่งเบส (deletion) ทำ

ให้โปรตีน WhiB7 ของเชื้อสายพันธุ์นี้ มีกรดอะมิโนเปลี่ยนไป 13 ตัว และมีกรดอะมิโนสั้นกว่าโปรตีนปกติอยู่ 16 ตัว (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ลำดับเบสของยีน *whiB7* เปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ DS3214 และสายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv ภาพ A และ B แสดงบริเวณยีน *whiB7* ของดีเอ็นเอสายต้นแบบ (template stand หรือ non-coding stand) ที่พบการกลายพันธุ์ในสายพันธุ์ DS3214 ภาพ C แสดงลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน WhiB7 ที่มีการกลายพันธุ์ แสดงให้เห็นกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป 13 ตัว และกรดอะมิโนที่หายไป 16 ตัว ข้อมูลลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *whiB7* ได้มาจากรฐานข้อมูล Genbank หมายเลข BX842582 และ NCBI reference sequence YP_177940 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษาของ Morris และคณะ (2005) ในเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย (mutant strain) ที่ไม่มียีน *whiB7* จะมีค่า MIC ต่อยาคลาริโพรมัยซินเท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ควบคุมและสายพันธุ์ที่มีการเพิ่มการแสดงออก (over-expression) ของยีน *whiB7* จะมีค่า MIC ต่อยาคลาริโพรมัยซินเท่ากับ 6.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแสดงให้เห็นว่ายีน *whiB7* มีบทบาทที่สำคัญต่อการดื้อยาคลาริโพรมัยซิน จากผลการตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า เชื้อ *M. tuberculosis* DS3214 มีการกลายพันธุ์ของยีน *whiB7* โดยมีนิวคลีโอไทด์หายไป 1 คู่เบสทำให้เกิดการเคลื่อนของรหัสพันธุกรรม (frameshift mutation) มีผลให้โปรตีนที่ได้จากการแปลรหัสมีความผิดปกติไปจากเดิมและอาจส่งผลต่อการทำงานของโปรตีนทำให้เชื้อมีความไวต่อยาคลาริโพรมัยซินต่างจากสายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv

โปรตีนกลุ่ม WhiB มีโครงสร้างหลักที่คล้ายคลึงกันหลายประการ โปรตีน WhiB7 มีโครงสร้างที่เหมือนกันกับโปรตีนกลุ่ม WhiB ชนิดอื่นๆ (รูปที่ 4.2) โดยประกอบด้วยซิสเทอีน 4 ตัว ซึ่งจะจับกับกลุ่มของเหล็ก-กำมะถันที่ไวต่อสภาวะทางรีดอกซ์ รวมถึง จุดหัก (turn) G(V/I)WGG ที่ประกอบด้วยทริปโตเฟน (tryptophan) และมีลักษณะจำเพาะ (Soliveri et al., 2000; Morris et al., 2005; Alam et al., 2009) โปรตีน WhiB ทุกตัวมีกรดอะมิโนบริเวณปลายด้านคาร์บอกซิลทำหน้าที่จับกับสายดีเอ็นเอ (Soliveri et al., 2000) ในกรณีของ WhiB7 ลำดับเบสนี้คือ AT-hook ซึ่งมักพบได้บ่อยใน transcriptional factor ของสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต โดยทำหน้าที่จับกับสายของดีเอ็นเอบริเวณร่องเล็ก (minor groove) ที่มีเบส AT จำนวนมาก (Reeves and Nissen, 1990; Morris et al., 2005) จากการศึกษาทางโครงสร้างของโปรตีน WhiB ชนิดอื่นๆ พบว่าลักษณะทั้ง 3 นี้มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ของ WhiB7 (Davis and Chater, 1992; Raghunand and Bishai, 2006) บริเวณที่ทำนายว่าเป็นจุดหักนี้มีลักษณะจำเพาะ มีแนวโน้มที่จะอยู่ด้านนอกและมีปฏิสัมพันธ์กับส่วนที่เป็นพื้นฐานของกลไกการถอดรหัส (Davis and Chater, 1992; Soliveri et al., 1993) นอกจากนี้ เป็นที่น่าสนใจว่าโปรตีน WhiB3 จับกับ SigA บริเวณตำแหน่ง 4.2 ซึ่งทราบว่าเป็นจุดที่มีปฏิสัมพันธ์ควบคุมการถอดรหัสตัวอื่นๆ (Dove et al., 2003) SigA ที่มีการกลายพันธุ์บริเวณตำแหน่ง 4.2 (Arg515His) จะไม่สามารถจับกับ WhiB3 ได้ และเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของ *whiB3* หรือ SigA (Arg515His) จะมีความรุนแรงในการก่อโรคลดลง (Collins et al., 1995; Singh et al., 2007; Singh et al., 2009)

โดยปกติแล้ว ในแบคทีเรียชนิดอื่น การถอดรหัสตอบสนองต่อความเครียดมักจะใช้ จิกมาแพกเตอร์ที่จำเพาะเป็นพิเศษเพื่อกระตุ้นการตอบสนองทั่วไปหรือการตอบสนองที่จำเพาะต่อความเครียดนั้น แต่อย่างไรก็ตาม ลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของ *WhiB7* ซึ่งคล้ายกันในกลุ่มของ actinomycete บ่งบอกว่ายีน *whiB7* ถอดรหัสโดยโปรตีน SigA (Burian et al., 2012b) โปรโมเตอร์ของยีนภายใต้การควบคุมของ *whiB7* (*eis*, *erm* และ *tap*) ก็มีลำดับเบสในรูปแบบเดียวกันนี้ โปรโมเตอร์ของยีนกลุ่มนี้จะมีลำดับเบสที่มี AT 5 คู่เบสอยู่ด้านหน้าของ -35 hexamer อยู่ 3 คู่เบส ในขณะที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *whiB7* และ *ermMT*

จากการนำเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไวต่อยาคลาริโทรมัยซินทั้งสี่สายพันธุ์ มาศึกษาการแสดงออกของยีน *whiB7* และยีน *ermMT* โดยวิธี real-time reverse transcription PCR พบว่า เชื้อสามสายพันธุ์ ได้แก่ DS3214, FT068 และ DS1641 มีการแสดงออกของยีน *whiB7* มากขึ้น 2-15 เท่า หลังจากสัมผัสกับยาคลาริโทรมัยซินเป็นเวลา 4 ชั่วโมงแต่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ควบคุม H37Rv ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *whiB7* มากขึ้น 73 เท่าหลังจากสัมผัสกับยาคลาริโทรมัยซินเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ DS1053 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของยีน *whiB7* หลังจากสัมผัสกับยาคลาริโทรมัยซินเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.2)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *ermMT* ในเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไวต่อยาคลาริโทรมัยซินสามสายพันธุ์ DS3214, DS1053 และ DS1641 ไม่มีความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *ermMT* อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) กับสายพันธุ์ควบคุม H37Rv โดยพบว่า มีระดับการแสดงออกของยีน *ermMT* มากขึ้น 2.2-4.3 เท่าหลังจากสัมผัสกับยาคลาริโทรมัยซิน ในขณะที่สายพันธุ์ควบคุม H37Rv มีระดับการแสดงออกของยีน *ermMT* มากขึ้น 5.1 เท่าหลังจากสัมผัสกับยาคลาริโทรมัยซิน

ตารางที่ 4.2 ระดับการแสดงออกของยีน *whiB7* และ *ermMT* ก่อนและหลังสัมผัสกับยาคลาริโทรมัยซิน

สายพันธุ์	ระดับการแสดงออกของยีนเมื่อเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้สัมผัสกับยาคลาริโทรมัยซินที่เวลาเริ่มต้นและหลังจากสัมผัสยา 4 ชั่วโมง			
	<i>whiB7</i> (Rv3197A)		<i>ermMT</i> (Rv1988)	
	0 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง
H37Rv	1.6 ± 0.7	117.6 ± 0.4	1.2 ± 0.5	6.1 ± 3.2
DS3214	1.0 ± 1.0	2.0 ± 1.2	1.8 ± 0.8	4.1 ± 1.6
FT068	1.9 ± 1.0	29.2 ± 3.0	1.1 ± 0.4	1.8 ± 0.5
DS1053	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.6	3.2 ± 2.6
DS1641	1.9 ± 1.0	17.2 ± 1.0	1.7 ± 0.9	7.4 ± 3.2

จากหลักฐานที่มีอยู่ในปัจจุบันบ่งชี้ว่าทั้งยีน *whiB7* และยีน *ermMT* มีบทบาทสำคัญในการดื้อยาคลาริโทรมัยซินโดยธรรมชาติของเชื้อ *M. tuberculosis* (Burian et al., 2012a) จากการที่เชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งสี่สายพันธุ์ที่ไวต่อยาคลาริโทรมัยซินมีค่า MIC 1-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำ

ให้ตั้งสมมุติฐานได้ว่าอาจมีความผิดปกติในระดับนิวคลีโอไทด์หรือมีความผิดปกติของระดับการแสดงออกของยีนใดยีนหนึ่งจากทั้งสองยีนในเชื้อทั้งสี่สายพันธุ์ดังกล่าว และมีผลทำให้เชื้อมีความไวต่อยาคลาริโทรมัยซินเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ DS3214 มีการกลายพันธุ์ของยีน *whiB7* ตำแหน่งเบสที่ 189 โดยมีเบสกวีนินหายไปหนึ่งเบส (รูปที่ 4.1) ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุทำให้เชื้อไวต่อยาคลาริโทรมัยซิน

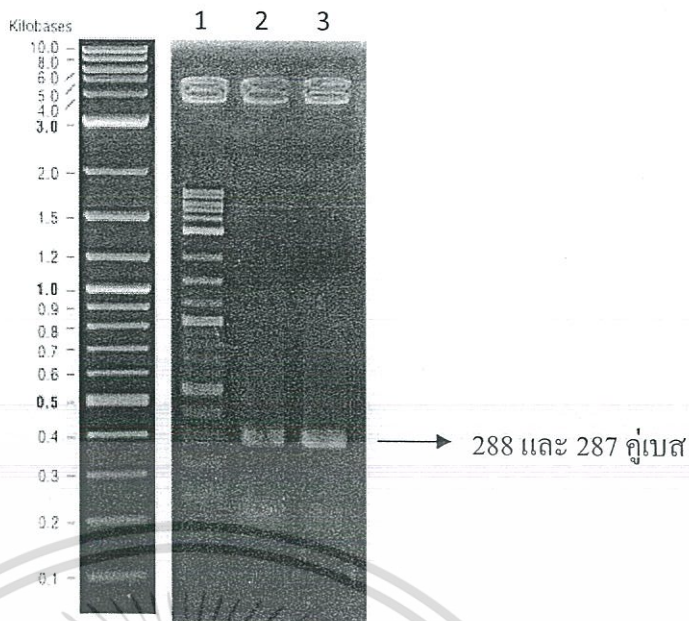
ในส่วนของเชื้อ *M. tuberculosis* อีกสามสายพันธุ์ที่เหลือไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *whiB7* และยีน *ermMT* รวมทั้งในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัสด้าน 5' (5' UTR) แต่จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน *whiB7* เมื่อสัมผัสกับยาคลาริโทรมัยซินลดลงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ควบคุม H37Rv ทำให้คาดว่าอาจจะมีการกลายพันธุ์ของโปรโมเตอร์ส่วนที่อยู่ไกลออกไป (distal promoter) หรือมีการกลายพันธุ์ที่ยีนอื่นซึ่งมีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *whiB7* และทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งสามสายพันธุ์นี้ไวต่อยาคลาริโทรมัยซินต่างจากสายพันธุ์ควบคุม H37Rv

แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ามี การแสดงออกของยีน *ermMT* ในเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งสี่สายพันธุ์นี้เพิ่มมากขึ้นหลังสัมผัสกับยาคลาริโทรมัยซิน ทำให้สันนิษฐานว่ายีน *ermMT* ไม่ได้อยู่ภายใต้การควบคุมของยีน *whiB7* เพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Nash (2003) ที่พบว่าค่า MIC ของเชื้อ *M. smegmatis* ต่อยาคลาริโทรมัยซินยังคงมีค่าเท่าเดิม หลังสัมผัสกับยาอะมิคาซิน (amikacin) หรือยาไซโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) ซึ่งยาทั้งสองตัวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *whiB7* ได้ (Burian et al., 2012b)

4.4 การโคลนยีน *whiB7* ของเชื้อวัณโรค

4.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

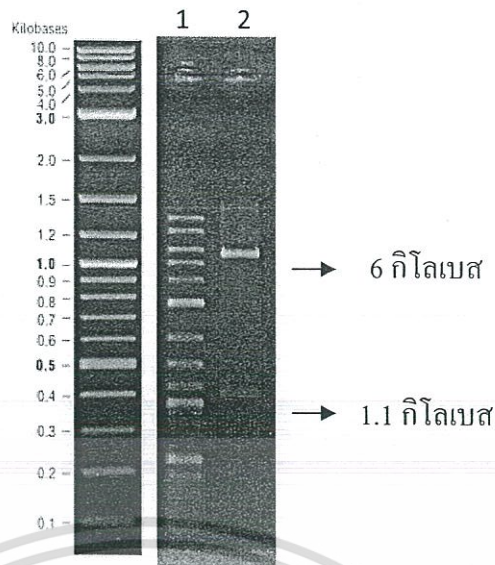
ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *whiB7* ที่ปกติ (จากสายพันธุ์ H37Rv) และยีน *whiB7* ที่มีการกลายพันธุ์ (จากสายพันธุ์ DS3214) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ *HindIII* ที่ปลายด้าน 5' ทั้งคู่ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของทั้งสองยีนเพียง 1 แถบ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้ไปเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-Log DNA Ladder พบว่า ผลิตภัณฑ์มีขนาด 288 และ 287 คู่เบส (รูปที่ 4.3) หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* จึงได้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียว (sticky end) ที่มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ *HindIII* ทั้งสองด้าน



รูปที่ 4.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *whiB7* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส บนเจลอะกาโรส ร้อยละ 2 ช่องที่ 1 คือเอนเอมาตรฐาน 2-Log DNA Ladder (NEB); ช่องที่ 2 ยีน *whiB7* ปกติ; ช่องที่ 3 ยีน *whiB7* ที่มีการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง 189

4.4.2 การเตรียมพลาสมิด pSMT1

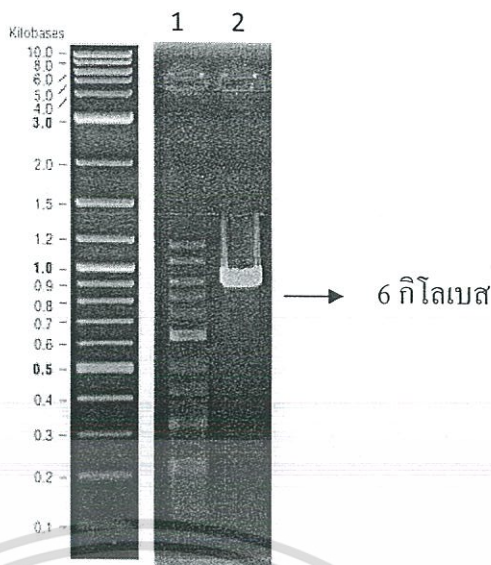
จากการนำพลาสมิด pSMT1 ที่มียีน *luxAB* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดไปวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเจลอะกาโรส ร้อยละ 1 พบแถบชั้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อย 2 แถบคือ แถบของพลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งเป็น plasmid backbone ที่มีขนาดประมาณ 6 กิโลเบส และแถบของยีน *luxAB* ที่ได้จากการตัดพลาสมิด pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ที่มีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส (รูปที่ 4.4) จากนั้นจึงทำการแยกพลาสมิด pSMT1 Δ *luxAB* ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 4.4 ผลลัพท์ที่ได้จากการตัดพลาสมิด pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI บนเจลอะกาโรสร้อยละ 1 ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-Log DNA Ladder (NEB); ช่องที่ 2 พลาสมิด pSMT1 หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

4.4.3 การทำพลาสมิด pSMT1 Δ *luxAB* ให้บริสุทธิ์โดยการตัดออกจากเจลอะกาโรส

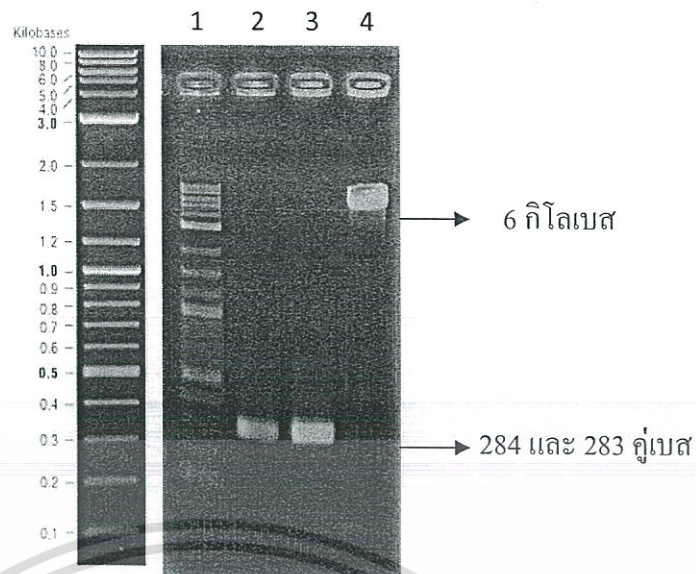
จากการนำพลาสมิด pSMT1 Δ *luxAB* มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จ NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up พบแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดที่ได้ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์ เพียง 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 6 กิโลเบส (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่า พลาสมิด pSMT1 Δ *luxAB* มีความบริสุทธิ์ หลังจากนั้นจึงนำพลาสมิดที่ได้ไปเชื่อมต่อกันเอง (religation) และทำการทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม เข้าสู่เซลล์ NEB 5-alpha Competent *E. coli* ต่อไป



รูปที่ 4.5 พลาสมิด pSMT1 $\Delta luxAB$ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว บนเจลอะกาโรสร้อยละ 1 ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-Log DNA Ladder (NEB); ช่องที่ 2 พลาสมิด pSMT1 $\Delta luxAB$ ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว

4.4.4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

หลังจากนำพลาสมิด pSMT1 $\Delta luxAB$ และชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *whiB7* ที่ปกติและยีน *whiB7* ที่มีการกลายพันธุ์ ไปทำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และนำพลาสมิดที่ได้จากการตัดไปกำจัดหมู่ฟอสเฟต (dephosphorylation) ด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, calf intestinal; CIP) แล้วจึงนำชิ้นส่วนทุกชิ้นไปทำให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเจลอะกาโรส พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 $\Delta luxAB$ และชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *whiB7* ที่ปกติและที่มีการกลายพันธุ์ มีความบริสุทธิ์และได้ขนาดตรงตามที่ต้องการคือ 6 กิโลเบส, 284 คู่เบสและ 283 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 4.6) หลังจากนั้นนำพลาสมิด pSMT1 $\Delta luxAB$ ที่ได้มาทำปฏิกิริยาต่อสายดีเอ็นเอกับยีน *whiB7* ปกติและยีน *whiB7* ที่มีการกลายพันธุ์ แล้วจึงนำไปทำทรานส์ฟอร์เมชัน (transformation) เข้าสู่เซลล์ NEB 5-alpha Competent *E. coli* ทำการคัดเลือกพลาสมิดถูกผสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาไฮโครไมซิน บี ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบหาทรานส์ฟอร์แมนต์ที่ถูกต้องด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์



รูปที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *whiB7* ปกติ, ยีน *whiB7* ที่มีการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง 189 และ พลาสมิด pSMT1 Δ *luxAB* บนเจลอะกาโรสร้อยละ 2 ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-Log DNA Ladder (NEB) ปริมาณ 200 นาโนกรัม; ช่องที่ 2 ชิ้นส่วนของยีน *whiB7* ปกติขนาด 284 คู่เบส; ช่องที่ 3 *whiB7* ที่มีการกลายพันธุ์บนตำแหน่ง 189 ขนาด 283 คู่เบส; ช่องที่ 4 พลาสมิด pSMT1 Δ *luxAB* ขนาดประมาณ 6 กิโลเบส

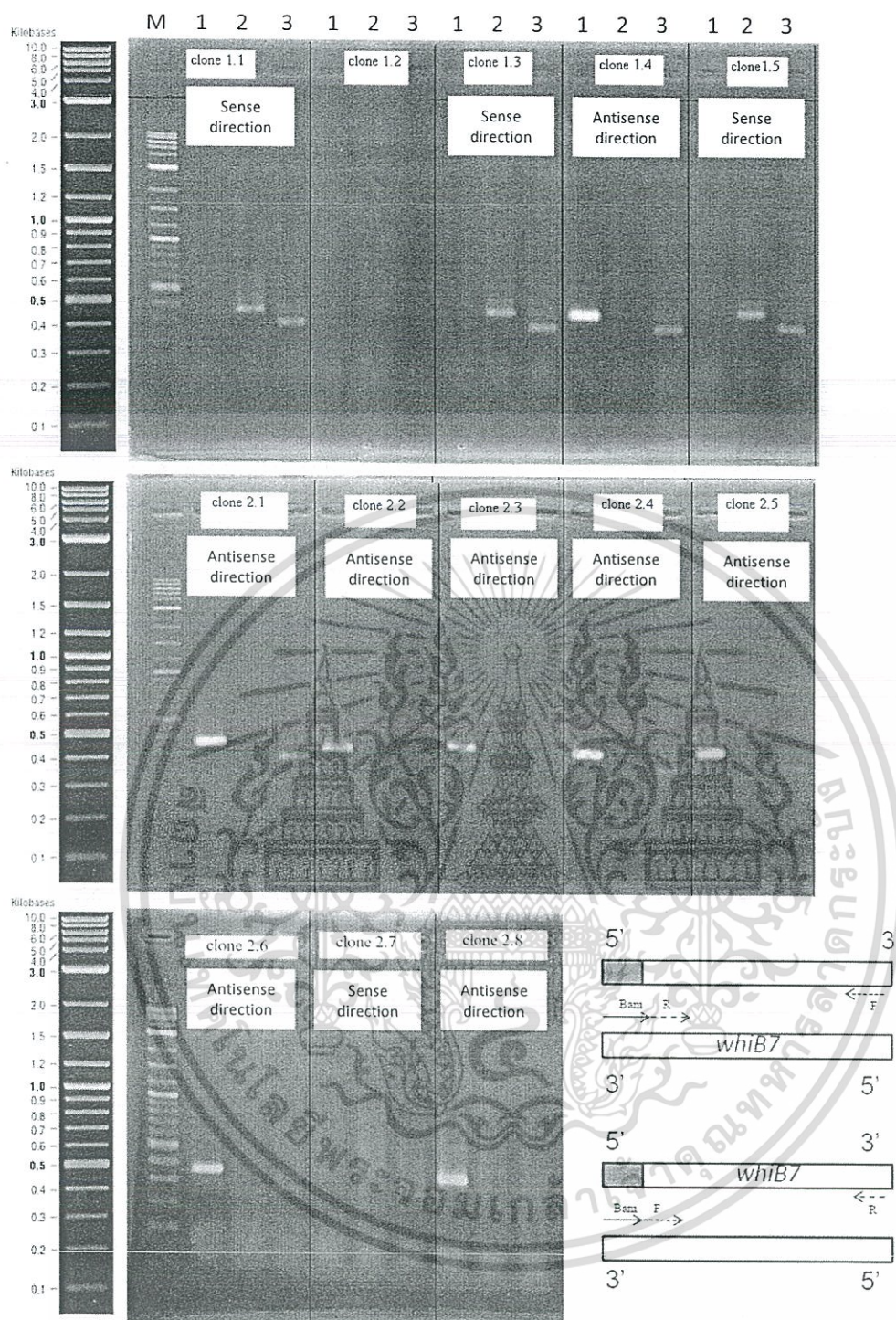
4.4.5 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

นำทรานสฟอร์มแมนต์ที่เจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะมาตรวจสอบพลาสมิดที่มียีน *whiB7* ในทิศทางการแปลรหัส (sense direction) และทิศทางตรงข้ามการแปลรหัส (antisense direction) โดยสกัดดีเอ็นเอจากโคลนลูกผสม นำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จับบริเวณโปรโมเตอร์บนโครงสร้างพลาสมิด และไพรเมอร์ที่จับบริเวณยีน นำผลิตภัณฑ์จากเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ ไปวิเคราะห์บนเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งหากสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จับบริเวณโปรโมเตอร์บนโครงสร้างพลาสมิดกับไพรเมอร์ที่จับบริเวณยีนแสดงว่าพลาสมิดนั้นมียีนในทิศทางปกติ หากสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จับบริเวณโปรโมเตอร์บนโครงสร้างพลาสมิดกับไพรเมอร์ แสดงว่าพลาสมิดนั้นมียีนในทิศทางตรงกันข้ามการแปลรหัส จากการนำทรานสฟอร์มแมนต์จำนวน 13 โคลนมาทดสอบพบว่า โคลนที่ 1.1 พบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เกิดขึ้นเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ระหว่าง Bam กับ Rv3197A-R แสดงให้เห็นว่ามียีน *whiB7* แทรกอยู่ในทิศทางการแปลรหัส (sense direction) โคลนที่ 1.4 พบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เกิดขึ้นเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ระหว่าง Bam กับ Rv3197A-F แสดงให้เห็นว่ามียีน *whiB7* แทรกอยู่ในทิศทางตรงข้ามการแปลรหัส (antisense direction) โคลนที่ 2.7 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญูญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ระหว่าง Bam กับ Rv3197A-R แสดงให้เห็นว่ามียีน *whiB7* ที่มีการกลายพันธุ์แทรกอยู่ในทิศทางการแปลรหัส (sense direction) และ โคลนที่ 2.8 พบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ระหว่าง Bam กับ Rv3197A-F แสดงให้เห็นว่ามียีน *whiB7* ที่มีการกลายพันธุ์แทรกอยู่ในทิศทางตรงข้ามการแปลรหัส (antisense direction) (รูปที่ 4.7)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของทรานสฟอร์มแมนต์ที่ได้บนเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 2 ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-Log DNA Ladder (NEB); ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 350 คู่เบสจากไพรเมอร์ที่จับบริเวณโปรโมเตอร์ของพลาสมิด (Bam; \rightarrow) กับฟอร์เวอร์ด์ไพรเมอร์บริเวณยีน (Rv3197A-F; $\cdots\rightarrow$); ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากไพรเมอร์ Bam รีเวอร์สไพรเมอร์ (Rv3197A-R; $---\rightarrow$); ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากไพรเมอร์ Rv3197A-F และไพรเมอร์ Rv3197A-R

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.6 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมหมายเลข 1.1, 1.4, 2.7 และ 2.8 โดยไพรมอร์ที่จับบริเวณ โปรโมเตอร์ของพลาสมิด (Bam) ตั้งชื่อพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสี่ตัวว่า พลาสมิด pWhiB1, pWhiB2, pWhiB3 และ pWhiB4 ตามลำดับ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Rv พบว่า pWhiB1 และ pWhiB2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *whiB7* ในพลาสมิดตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *whiB7* ในเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Rv โดยมีทิศทางการแปลรหัส (sense direction) และทิศทางตรงข้ามการแปลรหัส (antisense direction) ตามลำดับ ส่วนพลาสมิด pWhiB3 และ pWhiB4 มียีน *whiB7* ที่มีการกลายพันธุ์ในทิศทางการแปลรหัส (sense direction) และทิศทางตรงข้ามการแปลรหัส (antisense direction) ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 ถึง 4.11)

```

>pWhiB1
Query 13      Start codon
              GTGTCGGTACTGACAGTCCCCAGACAGACCCCGAGACAAAGATTGCCGGTTTTGCCGTGC 72
Sbjct 3568676 GTGTCGGTACTGACAGTCCCCAGACAGACCCCGAGACAAAGATTGCCGGTTTTGCCGTGC 3568617

Query 73      CACGTCGGTGATCCCGATCTGTGGTTCCGCCGATACCCCGCCGGTCTCGAGGTAGCCAAG 132
Sbjct 3568616 CACGTCGGTGATCCCGATCTGTGGTTCCGCCGATACCCCGCCGGTCTCGAGGTAGCCAAG 3568557

Query 133     ACACGTGTGTGAGCTGCCGATCAGGCGGCAGTGCTTGCCCGCGCGCTTCAGCGGGCT 192
Sbjct 3568556 ACACGTGTGTGAGCTGCCGATCAGGCGGCAGTGCTTGCCCGCGCGCTTCAGCGGGCT 3568497

Query 193     GAACCTGGGGCGTTTGGGGTGGTGAGATATTCGACCAAGGCTCGATCGTGAGTCACAAG 252
Sbjct 3568496 GAACCTGGGGCGTTTGGGGTGGTGAGATATTCGACCAAGGCTCGATCGTGAGTCACAAG 3568437

Query 253     CGTCCGCGCGGACGTCCGCGCAAGGATGCTGTTGCATAG 291
Sbjct 3568436 CGTCCGCGCGGACGTCCGCGCAAGGATGCTGTTGCATAG 3568398
              Stop codon
  
```

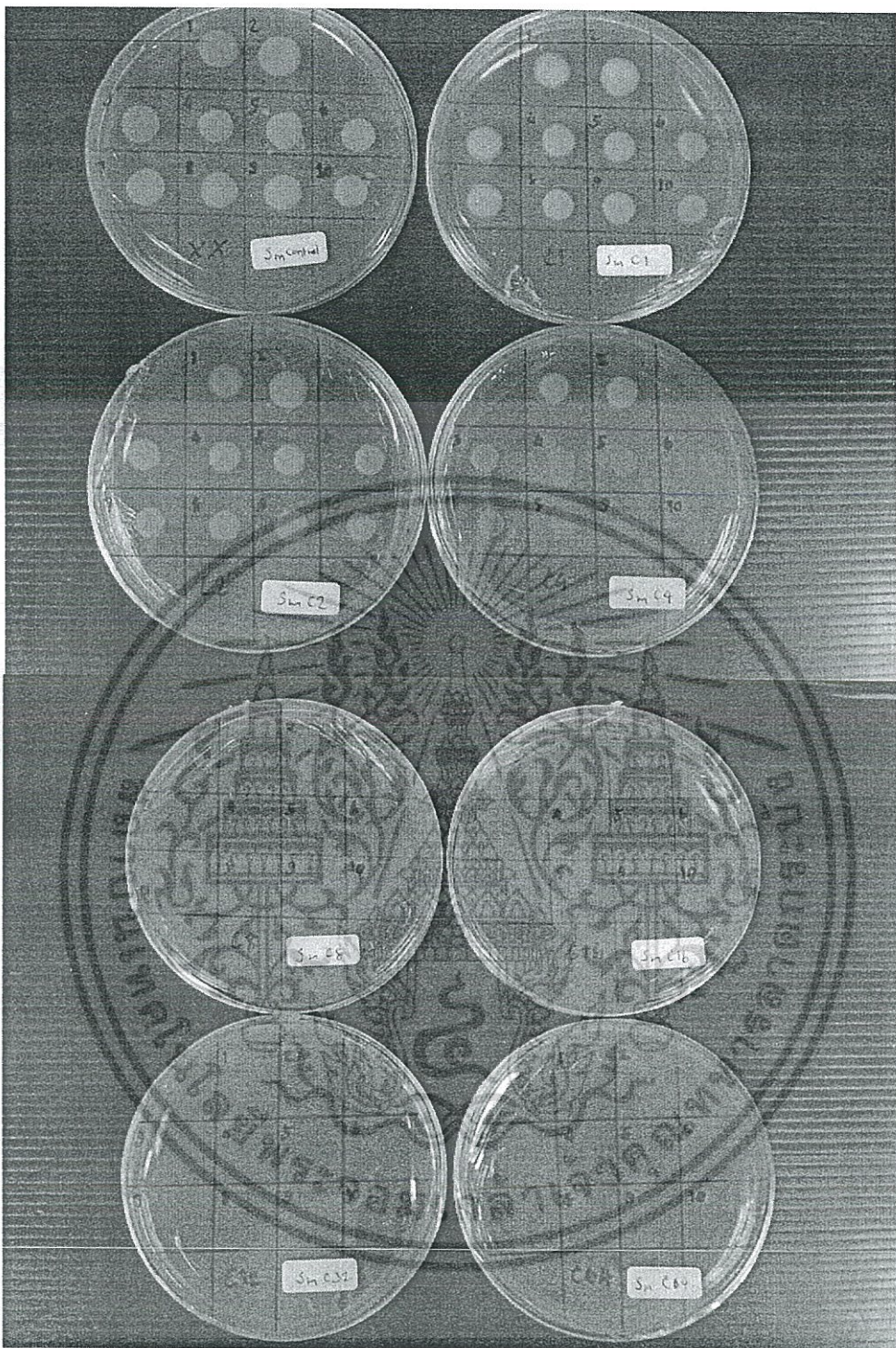
รูปที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pWhiB1 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับยีน *whiB7* ทิศทางเดียวกับการแปลรหัส (sense direction)

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่สรุปว่า การแสดงออกที่มากขึ้นของยีน *whiB7* ทำให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มแมโครไลด์ และกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์มากขึ้นผ่านทางกลไกของยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ *WhiB7* ซึ่งประกอบด้วยยีน *eis* (Rv2416c) และยีน *ermMT* (Rv1988) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์และกลุ่มแมโครไลด์ ตามลำดับ (Morris et al., 2005) และจากการศึกษาของ Reeves และคณะ (2013) รายงานว่าการกลายพันธุ์ที่ส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *whiB7* บนตำแหน่งที่แตกต่างกัน 8 ตำแหน่งบริเวณ 281 คู่เบสเหนือต่อยีน (5'UTR) ทั้งในรูปแบบของการขาดหายไป (deletion) การแทรก (insertion) และการเปลี่ยนเบส (transversion) มีผลทำให้การแสดงออกของยีน *whiB7* มากขึ้น 23-145 เท่าและมีผลต่อยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุม เช่น *eis* (Rv2416c) และ *tap* (Rv1258c) โดยทำให้มีการแสดงออกของยีนมากขึ้น การแสดงออกของยีน *eis* ที่มากขึ้นทำให้เชื้อดื้อต่อยากานามัยซิน ส่วนการแสดงออกของยีน *tap* ที่มากขึ้นทำให้เชื้อดื้อต่อยาเตริปโตมัยซิน จากการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่ายีน *whiB7* ไม่ได้มีผลต่อการดื้อยาโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) เท่านั้น แต่ยังมีผลต่อการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคในปัจจุบันอีกด้วย ในทางตรงข้าม ถ้ามีปัจจัยที่ทำให้การแสดงออกของยีน *whiB7* ลดลง จะมีผลต่อการแสดงออกของกลุ่มยีนดังกล่าวและจะส่งผลให้เชื้อไวต่อยาที่เกี่ยวข้อง ดังแสดงในการศึกษานี้และเป็นรายงานแรกที่พบเชื้อวัณโรคไวต่อยาคลาริโทรมัยซินที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *whiB7* และส่งผลให้เชื่อนั้นไวต่อยา

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาคลาริโทรมัยซินและกานามัยซิน

สายพันธุ์	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	คลาริโทรมัยซิน	กานามัยซิน
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155		
mc ² 155::pWhiB1	16	4
mc ² 155::pWhiB2	8	2
mc ² 155::pWhiB3	8	2
mc ² 155::pWhiB4	8	2
mc ² 155::pSMT1 Δ <i>luxAB</i>	8	2
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra		
Ra::pWhiB1	32	16
Ra::pWhiB2	16	8
Ra::pWhiB3	16	8
Ra::pWhiB4	16	8
Ra::pSMT1 Δ <i>luxAB</i>	16	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ตัวอย่างแสดงค่า MIC ต่อยาคลาริโทรมัยซินของเชื้อ *M. smegmatis* mc²155 โดย โคลนที่ 1 และ 2 มีพลาสมิด pSMT1 ที่มียีน *whiB7* ปกติในทิศทางการแปลรหัส (sense direction) โคลนที่ 3 และ 4 มีพลาสมิด pSMT1 ที่มียีน *whiB7* ปกติในทิศทางตรงข้ามการแปลรหัส (antisense direction) โคลนที่ 5 และ 6 มีพลาสมิด pSMT1 ที่มียีน *whiB7* กลายพันธุ์ ในทิศทางการแปลรหัส (sense direction) โคลนที่ 7 และ 8 มีพลาสมิด pSMT1 ที่มียีน *whiB7* กลายพันธุ์ ในทิศทางตรงข้ามการแปลรหัส (antisense direction)

โคลนที่ 9 และ 10 มีพลาสมิด pSMT1 Δ luxAB ความคุมที่ไม่มียีน *whiB7* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

บทสรุป

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะศึกษาเชื้อวัณโรคที่มีคุณสมบัติไวต่อยาคลาริโทรมัซซิน โดยมุ่งศึกษาผลของยีน *whiB7* และ *ermMT* ต่อความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 4 สายพันธุ์ โดยทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *whiB7* และ *ermMT* รวมทั้งส่วนโปรโมเตอร์ และระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ในกรณีที่พบความผิดปกติของยีนเหล่านี้จะทำการพิสูจน์การทำหน้าที่ของยีนนั้นเปรียบเทียบกับยีนปกติ โดยวัดระดับความไวของเชื้อต่อยาคลาริโทรมัซซินและกานามัยซิน ผลการทดลองพบว่าเชื้อวัณโรคไวต่อยาคลาริโทรมัซซินทั้งหมดมีระดับการแสดงออกของยีน *whiB7* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *ermMT* ในเชื้อเกือบทั้งหมดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ควบคุม นอกจากนี้การศึกษาลำดับเบสของยีน *whiB7* และ *ermMT* กลับไม่พบการกลายพันธุ์ ยกเว้นเชื้อสายพันธุ์ DS3214 ที่พบการหายไปของเบสกวีนินที่ตำแหน่งเบสที่ 189 ส่งผลให้โปรตีน WhiB7 ที่แปลรหัสได้มีขนาดสั้นกว่าโปรตีนปกติ 16 กรดอะมิโน และยังมี การเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนอีก 13 ตำแหน่งทางตอนท้ายของโปรตีน และผลการพิสูจน์หน้าที่ของโปรตีนกลายพันธุ์นี้ พบว่าไม่สามารถทำงานได้เหมือนกับโปรตีนปกติและทำให้เชื้อสายพันธุ์นี้ไวต่อยาคลาริโทรมัซซิน

จากผลการศึกษาดังกล่าวการกลายพันธุ์ของยีน *whiB7* ดังที่พบในเชื้อสายพันธุ์ DS3214 มีผลต่อการทำหน้าที่ของโปรตีน WhiB7 และทำให้เชื้อวัณโรคสายพันธุ์นี้ไวต่อยาคลาริโทรมัซซิน นอกจากนี้ยังยืนยันผลการศึกษาก่อนหน้านี้ว่ายีน *whiB7* และ *ermMT* มีผลต่อการดื้อยาคลาริโทรมัซซินตามธรรมชาติในเชื้อวัณโรค และการแสดงออกของยีน *ermMT* ไม่ได้ขึ้นอยู่กับยีน *whiB7* แต่เพียงอย่างเดียว

การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่พบเชื้อวัณโรคไวต่อยาคลาริโทรมัซซินที่ยีน *whiB7* มีการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ บ่งชี้ถึงความสำคัญของยีน *whiB7* ที่มีบทบาทต่อการดื้อยาของเชื้อวัณโรค โดยเฉพาะยาคลาริโทรมัซซินและยาแกมมาไมซินองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะมีประโยชน์ในการวิจัยและพัฒนาต่อยอดเพื่อหายาต้านวัณโรคชนิดใหม่ หรือเพิ่มความเป็นไปได้ในการใช้ยากลุ่มแมโครไลด์ร่วมกับยาต้านวัณโรคตัวอื่นสำหรับการรักษาวัณโรค โดยเฉพาะวัณโรคคือยา

บรรณานุกรม

- Agarwal N, Lamichhane G, Gupta R, Nolan S & Bishai WR. 2009. "Cyclic AMP intoxication of macrophages by a *Mycobacterium tuberculosis* adenylate cyclase." **Nature** 460(7251):98-102.
- Alam MS, Garg SK & Agrawal P. 2009. "Studies on structural and functional divergence among seven WhiB proteins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv." **FEBS Journal** 276(1):76-93.
- Alangaden GJ, Kreiswirth BN, Aouad A, Khetarpal M, Igno FR, Moghazeh SL, Manavathu EK & Lerner SA. 1998. "Mechanism of Resistance to Amikacin and Kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 42(5):1295-1297.
- Aínsa JA, Blokpoel MCJ, Otal I, Young DB, De Smet KAL & Martín C. 1998. "Molecular Cloning and Characterization of Tap, a Putative Multidrug Efflux Pump Present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*." **Journal of Bacteriology** 180(22):5836-5843.
- Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusová K, Belisle JT, Brennan PJ & Inamine JM. 1996. "The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 93(21):11919-11924.
- Bizzini A, Zhao C, Auffray Y & Hartke A. 2009. "The *Enterococcus faecalis* superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin." **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 64(6):1196-1202.
- Boshoff HIM, Myers TG, Copp BR, McNeil MR, Wilson MA & Barry CE. 2004. "The Transcriptional Responses of *Mycobacterium tuberculosis* to Inhibitors of Metabolism: Novel Insights into Drug Mechanisms of Action." **Journal of Biological Chemistry** 279(38):40174-40184.
- Boshoff HIM, Xu X, Tahlan K, Dowd CS, Pethe K, Camacho LR, Park T-H, Yun C-S, Schnappinger D, Ehrt S, Williams KJ & Barry CE. 2008. "Biosynthesis and Recycling of Nicotinamide Cofactors in *Mycobacterium tuberculosis*: An Essential Role for NAD in Nonreplicating Bacilli." **Journal of Biological Chemistry** 283(28):19329-19341.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Böttger EC. 1994. "Resistance to drugs targeting protein synthesis in mycobacteria." **Trends in Microbiology** 2(10):416-421.
- Burian J, Ramón-García S, Howes CG & Thompson CJ. 2012a. "WhiB7, a transcriptional activator that coordinates physiology with intrinsic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." **Expert Review of Anti-infective Therapy** 10(9):1037-1047.
- Burian J, Ramón-García S, Sweet G, Gómez-Velasco A, Av-Gay Y & Thompson CJ. 2012b. "The Mycobacterial Transcriptional Regulator *whiB7* Gene Links Redox Homeostasis and Intrinsic Antibiotic Resistance." **Journal of Biological Chemistry** 287(1):299-310.
- Buriánková K, Doucet-Populaire F, Dorson O, Gondran A, Ghnassia J-C, Weiser J & Pernodet J-L. 2004. "Molecular Basis of Intrinsic Macrolide Resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48(1):143-150.
- Casonato S, Cervantes Sánchez A, Haruki H, Rengifo González M, Provvedi R, Dainese E, Jaouen T, Gola S, Bini E, Vicente M, Johnsson K, Ghisotti D, Palù G, Hernández-Pando R & Manganeli R. 2012. "WhiB5, a Transcriptional Regulator That Contributes to *Mycobacterium tuberculosis* Virulence and Reactivation." **Infection and Immunity** 80(9):3132-3144.
- Chater KF. 1972. "A Morphological and Genetic Mapping Study of White Colony Mutants of *Streptomyces coelicolor*." **Journal of General Microbiology** 72(1):9-28.
- Chen W, Biswas T, Porter VR, Tsodikov OV & Garneau-Tsodikova S. 2011. "Unusual regioversatility of acetyltransferase Eis, a cause of drug resistance in XDR-TB." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 108(24):9804-9808.
- Cleynen I & Van de Ven WJ. 2008. "The HMGA proteins: a myriad of functions (Review)." **Int J Oncol** 32(2):289-305.
- Cole ST. 1994. "*Mycobacterium tuberculosis* : drug-resistance mechanisms." **Trends in Microbiology** 2(10):411-415.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- K, Whitehead S & Barrell BG. 1998. "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." **Nature** 393(6685):537-544.
- Collins DM, Kawakami RP, de Lisle GW, Pascopella L, Bloom BR & Jacobs WR. 1995. "Mutation of the principal sigma factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 92(17):8036-8040.
- Collins L & Franzblau SG. 1997. "Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 41(5):1004-1009.
- da Silva PEA, Von Groll A, Martin A & Palomino JC. 2011. "Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." **FEMS Immunology & Medical Microbiology** 63(1):1-9.
- Das C, Ghosh TS & Mande SS. 2011. "Computational Analysis of the ESX-1 Region of *Mycobacterium tuberculosis* : Insights into the Mechanism of Type VII Secretion System." **PLoS ONE** 6(11):e27980.
- Davis NK & Chater KF. 1992. "The *Streptomyces coelicolor* whiB gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation." **Molecular and General Genetics MGG** 232(3):351-358.
- Dove SL, Darst SA & Hochschild A. 2003. "Region 4 of σ as a target for transcription regulation." **Molecular Microbiology** 48(4):863-874.
- Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, Galán JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tümmler B, Baquero F & Martínez JL. 2008. "The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens." **PLoS ONE** 3(2):e1619.
- Feld L, Knudsen GM & Gram L. 2012. "Bactericidal Antibiotics Do Not Appear To Cause Oxidative Stress in *Listeria monocytogenes*." **Applied and Environmental Microbiology** 78(12):4353-4357.
- Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A & Böttger EC. 1993. "Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot." **Molecular Microbiology** 9(6):1239-1246.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gallagher LA, Shendure J & Manoil C. 2011. "Genome-Scale Identification of Resistance Functions in *Pseudomonas aeruginosa* Using Tn-seq." **mBio** 2(1).
- Garg S, Alam MS, Bajpai R, Kishan KR & Agrawal P. 2009. "Redox biology of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: protein-protein interaction between GlgB and WhiB1 involves exchange of thiol-disulfide." **BMC Biochemistry** 10(1):1.
- Geiman DE, Raghunand TR, Agarwal N & Bishai WR. 2006. "Differential Gene Expression in Response to Exposure to Antimycobacterial Agents and Other Stress Conditions among Seven *Mycobacterium tuberculosis* whiB-Like Genes." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 50(8):2836-2841.
- Girgis HS, Hottes AK & Tavazoie S. 2009. "Genetic Architecture of Intrinsic Antibiotic Susceptibility." **PLoS ONE** 4(5):e5629.
- Goh E-B, Yim G, Tsui W, McClure J, Surette MG & Davies J. 2002. "Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 99(26):17025-17030.
- Gomez JE & Bishai WR. 2000. "*whmD* is an essential mycobacterial gene required for proper septation and cell division." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 97(15):8554-8559.
- Gomez MJ & Neyfakh AA. 2006. "Genes Involved in Intrinsic Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baylyi*." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 50(11):3562-3567.
- Greenwood D, Slack R, Barer MR & Irving W. 2012. **Medical microbiology: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control**, 18 ed.: Churchill Livingstone.
- Guo M, Feng H, Zhang J, Wang W, Wang Y, Li Y, Gao C, Chen H, Feng Y & He Z-G. 2009. "Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system." **Genome Research** 19(7):1301-1308.
- Holmes DJ, Caso JL & Thompson CJ. 1993. "Autogenous transcriptional activation of a thioStrepton-induced gene in *Streptomyces lividans*." **The EMBO journal** 12(8):3183-3191.
- Homolka S, Niemann S, Russell DG & Rohde KH. 2010. "Functional Genetic Diversity among *Mycobacterium tuberculosis* Complex Clinical Isolates: Delineation of Conserved Core

- and Lineage-Specific Transcriptomes during Intracellular Survival.” **PLoS Pathog** 6(7):e1000988.
- Honoré N & Cole ST. 1994. “Streptomycin resistance in mycobacteria.” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 38(2):238-242.
- Hopwood DA, Wildermuth H & Palmer HM. 1970. “Mutants of *Streptomyces coelicolor* Defective in Sporulation.” **Journal of General Microbiology** 61(3):397-408.
- Hümpel A, Gebhard S, Cook GM & Berney M. 2010. “The SigF Regulon in *Mycobacterium smegmatis* Reveals Roles in Adaptation to Stationary Phase, Heat, and Oxidative Stress.” **Journal of Bacteriology** 192(10):2491-2502.
- Imlay JA. 2003. “Pathways of Oxidative Damage.” **Annual Review of Microbiology** 57(1):395-418.
- Johnson DC, Dean DR, Smith AD & Johnson MK. 2005. “Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters.” **Annual Review of Biochemistry** 74(1):247-281.
- Kelkar DS, Kumar D, Kumar P, Balakrishnan L, Muthusamy B, Yadav AK, Shrivastava P, Marimuthu A, Anand S, Sundaram H, Kingsbury R, Harsha HC, Nair B, Prasad TSK, Chauhan DS, Katoch K, Katoch VM, Kumar P, Chaerkady R, Ramachandran S, Dash D & Pandey A. 2011. “Proteogenomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* By High Resolution Mass Spectrometry.” **Molecular & Cellular Proteomics** 10(12).
- Kim KH, An DR, Song J, Yoon JY, Kim HS, Yoon HJ, Im HN, Kim J, Kim DJ, Lee SJ, Kim K-H, Lee H-M, Kim H-J, Jo E-K, Lee JY & Suh SW. 2012. “*Mycobacterium tuberculosis* Eis protein initiates suppression of host immune responses by acetylation of DUSP16/MKP-7.” **Proceedings of the National Academy of Sciences** 109(20):7729-7734.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA & Collins JJ. 2007. “A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics.” **Cell** 130(5):797-810.
- Konno K, Feldmann FM & McDermott W. 1967. “Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli.” **American Review of Respiratory Disease** 95: 461-469.
- Levin ME & Hatfull GF. 1993. “*Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance.” **Molecular Microbiology** 8(2):277-285.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC, Leon R, Jimenez A, Hernandez-Pando R, McEvoy CRE, Grobbelaar M, Murray M, van Helden PD & Victor TC. 2011. "Rifampicin Reduces Susceptibility to Ofloxacin in Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* through Efflux." **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 184(2):269-276.
- Mackness GB. 1956. "The intracellular activation of pyrazinamide and nicotinamide." **American review of tuberculosis** 74(5):718-728.
- Meier A, Kirschner P, Bange FC, Vogel U & Böttger EC. 1994. "Genetic alterations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: mapping of mutations conferring resistance." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 38(2):228-233.
- Meier A, Sander P, Schaper KJ, Scholz M & Böttger EC. 1996. "Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 40(11):2452-2454.
- Moazed D & Noller HF. 1987. "Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA." **Nature** 327(6121):389-394.
- Morris RP, Nguyen L, Gatfield J, Visconti K, Nguyen K, Schnappinger D, Ehrt S, Liu Y, Heifets L, Pieters J, Schoolnik G & Thompson CJ. 2005. "Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 102(34):12200-12205.
- Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, Kaprelyants AS, Kell DB & Young M. 2002. "A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*." **Molecular Microbiology** 46(3):623-635.
- Murphy MP. 2009. "How mitochondria produce reactive oxygen species." **Biochem J** 417(1):1-13.
- Nash KA. 2003. "Intrinsic Macrolide Resistance in *Mycobacterium smegmatis* Is Conferred by a Novel *erm* Gene, *erm*(38)." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 47(10):3053-3060.
- Nguyen L, Chinnapapagari S & Thompson CJ. 2005. "FbpA-Dependent Biosynthesis of Trehalose Dimycolate Is Required for the Intrinsic Multidrug Resistance, Cell Wall

- Structure, and Colonial Morphology of *Mycobacterium smegmatis*.” **Journal of Bacteriology** 187(19):6603-6611.
- Nguyen L & Thompson CJ. 2006. “Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm.” **Trends in Microbiology** 14(7):304-312.
- Nishino K, Nikaïdo E & Yamaguchi A. 2009. “Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*.” **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics** 1794(5):834-843.
- Novotna J, Vohradsky J, Berndt P, Gramajo H, Langen H, Li X-M, Minas W, Orsaria L, Roeder D & Thompson CJ. 2003. “Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes.” **Molecular Microbiology** 48(5):1289-1303.
- Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Lipkin VM, Sverdlov ED, Kiver IF, Bass IA, Mindlin SZ, Danilevskaya ON & Khesin RB. 1981. “Primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase nucleotide substitution in the beta subunit gene of the rifampicin resistant *rpoB255* mutant.” **Molecular and General Genetics MGG** 184(3):536-538.
- Philalay JS, Palermo CO, Hauge KA, Rustad TR & Cangelosi GA. 2004. “Genes Required for Intrinsic Multidrug Resistance in *Mycobacterium avium*.” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48(9):3412-3418.
- Prammananan T. 2011. “Distribution of Drug-Resistant Genes Among Thai Multidrug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* (MDR-TB) Clinical Isolates.” **Siriraj Medical Journal** 63(3):102-105.
- Prammananan T, Sander P, Brown BA, Frischkorn K, Onyi GO, Zhang Y, Böttger EC & Wallace RJ. 1998. “A Single 16S Ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*.” **Journal of Infectious Diseases** 177(6):1573-1581.
- Prammananan T, Sander P, Springer B & Böttger EC. 1999. “RecA-mediated gene conversion and aminoglycoside resistance in strains heterozygous for rRNA.” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 43(3):447-453.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Raghunand TR & Bishai WR. 2006. "Mapping Essential Domains of *Mycobacterium smegmatis* WhmD: Insights into WhiB Structure and Function." **Journal of Bacteriology** 188(19):6966-6976.
- Ramón-García S, Martín C, Aínsa JA & De Rossi E. 2006. "Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*." **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 57(2):252-259.
- Ramón-García S, Mick V, Dainese E, Martín C, Thompson CJ, De Rossi E, Manganelli R & Aínsa JA. 2012. "Functional and Genetic Characterization of the Tap Efflux Pump in *Mycobacterium bovis* BCG." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 56(4):2074-2083.
- Rawat M, Newton GL, Ko M, Martinez GJ, Fahey RC & Av-Gay Y. 2002. "Mycothioli-Deficient *Mycobacterium smegmatis* Mutants Are Hypersensitive to Alkylating Agents, Free Radicals, and Antibiotics." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 46(11):3348-3355.
- Reeves AZ, Campbell PJ, Sultana R, Malik S, Murray M, Plikaytis BB, Shinnick TM & Posey JE. 2013. "Aminoglycoside Cross-Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Due to Mutations in the 5' Untranslated Region of *whiB7*." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 57(4):1857-1865.
- Reeves R & Nissen MS. 1990. "The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure." **Journal of Biological Chemistry** 265(15):8573-8582.
- Ren H & Liu J. 2006. "AsnB Is Involved in Natural Resistance of *Mycobacterium smegmatis* to Multiple Drugs." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 50(1):250-255.
- Rickman L, Scott C, Hunt DM, Hutchinson T, Menéndez MC, Whalan R, Hinds J, Colston MJ, Green J & Buxton RS. 2005. "A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor." **Molecular Microbiology** 56(5):1274-1286.
- Rybniker J, Nowag A, Van Gumpel E, Nissen N, Robinson N, Plum G & Hartmann P. 2010. "Insights into the function of the WhiB-like protein of mycobacteriophage TM4 – a transcriptional inhibitor of WhiB2." **Molecular Microbiology** 77(3):642-657.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Shatalin K, Shatalina E, Mironov A & Nudler E. 2011. "H₂S: A Universal Defense Against Antibiotics in Bacteria." *Science* 334(6058):986-990.
- Singh A, Crossman DK, Mai D, Guidry L, Voskuil MI, Renfrow MB & Steyn AJC. 2009. "Mycobacterium tuberculosis WhiB3 Maintains Redox Homeostasis by Regulating Virulence Lipid Anabolism to Modulate Macrophage Response." *PLoS Pathog* 5(8):e1000545.
- Singh A, Guidry L, Narasimhulu KV, Mai D, Trombley J, Redding KE, Giles GI, Lancaster JR & Steyn AJC. 2007. "Mycobacterium tuberculosis WhiB3 responds to O₂ and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(28):11562-11567.
- Smith LJ, Stapleton MR, Fullstone GJM, Crack JC, Thomson AJ, Le Brun NE, Hunt DM, Harvey E, Adinolfi, Buxton RS & Green J. 2010. "Mycobacterium tuberculosis WhiB1 is an essential DNA-binding protein with a nitric oxide-sensitive iron-sulfur cluster." *Biochemical Journal* 432(3):417-427.
- Smulski DR, Huang LL, McCluskey MP, Reeve MJG, Vollmer AC, Van Dyk TK & LaRossa RA. 2001. "Combined, Functional Genomic-Biochemical Approach to Intermediary Metabolism: Interaction of Acivicin, a Glutamine Amidotransferase Inhibitor, with *Escherichia coli* K-12." *Journal of Bacteriology* 183(11):3353-3364.
- Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T & Jr WRJ. 1990. "Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*." *Molecular Microbiology* 4(11):1911-1919.
- Snewin VA, Gares M-P, ÓGaora P, Hasan Z, Brown IN & Young DB. 1999. "Assessment of Immunity to Mycobacterial Infection with Luciferase Reporter Constructs." *Infection and Immunity* 67(9):4586-4593.
- Soliveri J, Vijgenboom E, Granozzi C, Plaskitt KA & Chater KF. 1993. "Functional and evolutionary implications of a survey of various actinomycetes for homologues of two *Streptomyces coelicolor* sporulation genes." *Journal of General Microbiology* 139(11):2569-2578.
- Soliveri JA, Gomez J, Bishai WR & Chater KF. 2000. "Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene *whiB* are present in *Streptomyces* and other actinomycetes." *Microbiology* 146(2):333-343.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR, Telenti A & Musser JM. 1997. "Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 41(8):1677-1681.
- Stapleton M, Haq I, Hunt DM, Arnvig KB, Artymiuk PJ, Buxton RS & Green J. 2010. "Mycobacterium tuberculosis cAMP Receptor Protein (Rv3676) Differs from the *Escherichia coli* Paradigm in Its cAMP Binding and DNA Binding Properties and Transcription Activation Properties." **Journal of Biological Chemistry** 285(10):7016-7027.
- Stapleton MR, Smith LJ, Hunt DM, Buxton RS & Green J. 2012. "Mycobacterium tuberculosis WhiB1 represses transcription of the essential chaperonin GroEL2." **Tuberculosis** 92(4):328-332.
- Steyn AJC, Collins DM, Hondalus MK, Jacobs WR, Kawakami RP & Bloom BR. 2002. "Mycobacterium tuberculosis WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for *in vivo* growth." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 99(5):3147-3152.
- Takayama K & Kilburn JO. 1989. "Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*." **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 33(9):1493-1499.
- Taniguchi H, Chang B, Abe C, Nikaido Y, Mizuguchi Y & Yoshida SI. 1997. "Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system." **Journal of Bacteriology** 179(15):4795-4801.
- Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM & Jacobs WR. 1997. "The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol." **Nature Medicine** 3(5):567-570.
- Timmins GS & Deretic V. 2006. "Mechanisms of action of isoniazid." **Molecular Microbiology** 62(5):1220-1227.
- VanBogelen RA & Neidhardt FC. 1990. "Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 87(15):5589-5593.
- Varshochi M, Najafian H, Moaddab SR & Nagili B. 2012. "In vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to clarithromycin." **African Journal of Pharmacy and Pharmacology** 6(43):3000-3004.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Venketaraman V, Dayaram YK, Talaue MT & Connell ND. 2005. "Glutathione and Nitrosoglutathione in Macrophage Defense against *Mycobacterium tuberculosis*." **Infection and Immunity** 73(3):1886-1889.
- Vohradsky J, Li X-M, Dale G, Folcher M, Nguyen L, Viollier PH & Thompson CJ. 2000. "Developmental Control of Stress Stimulons in *Streptomyces coelicolor* Revealed by Statistical Analyses of Global Gene Expression Patterns." **Journal of Bacteriology** 182(17):4979-4986.
- Votyakova TV & Reynolds IJ. 2004. "Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation." **Archives of Biochemistry and Biophysics** 431(1):138-144.
- Wei J, Dahl JL, Moulder JW, Roberts EA, O'Gaora P, Young DB & Friedman RL. 2000. "Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* Gene That Enhances Mycobacterial Survival in Macrophages." **Journal of Bacteriology** 182(2):377-384.
- WHO. 2013. **Global tuberculosis report 2013**. [online]. Available : http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html.
- Wikimedia Foundation. 2009. *Mycobacterium tuberculosis*. [online]. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis.
- Woods GL, Brown-Elliott B, Desmond EP, Hall GS, Heifets L, Pfyffer GE, Ridderhof JC, Wallace Jr RJ, Warren NG & Witebsky FG. 2003. **Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes: approved standard**. NCCLS.
- Wu S, Barnes PF, Samten B, Pang X, Rodrigue S, Ghanny S, Soteropoulos P, Gaudreau L & Howard ST. 2009. "Activation of the *eis* gene in a W-Beijing strain of *Mycobacterium tuberculosis* correlates with increased SigA levels and enhanced intracellular growth." **Microbiology** 155(4):1272-1281.
- Zaunbrecher MA, Sikes RD, Metchock B, Shinnick TM & Posey JE. 2009. "Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 106(47):20004-20009.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H & Sun Z. 2003. "Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid." **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 52(5):790-795.

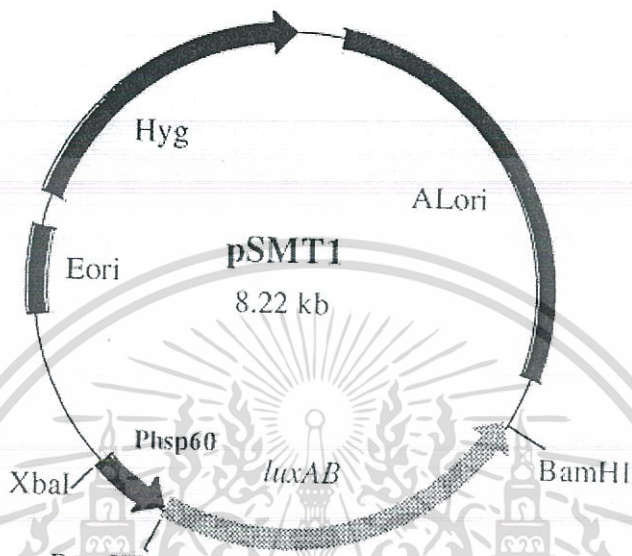
Zignol M, Hosseini MS, Wright A, Weezenbeek CLv, Nunn P, Watt CJ, Williams BG & Dye C. 2006. "Global Incidence of Multidrug-Resistant Tuberculosis." **Journal of Infectious Diseases** 194(4):479-485.



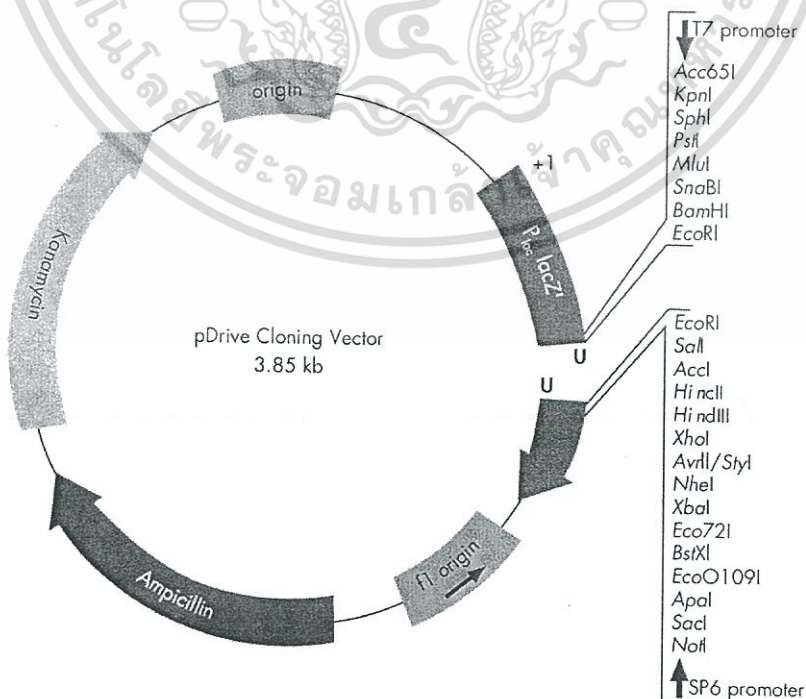
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. พลาสมิด pSMT1



2. พลาสมิด pDrive



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

อาหารเหลว ประกอบด้วย Tryptone 10 กรัมต่อลิตร Yeast extract 5 กรัมต่อลิตร และ NaCl 10 กรัมต่อลิตร อาหารวุ้นประกอบด้วย Tryptone 10 กรัมต่อลิตร Yeast extract 5 กรัมต่อลิตร NaCl 10 กรัมต่อลิตร และ Agar 15 กรัมต่อลิตร ทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Middlebrook 7H10 (M7H10)

ประกอบด้วย Ammonium sulfate 0.5 กรัมต่อลิตร, L-glutamic acid 0.5 กรัมต่อลิตร, Monopotassium phosphate 1.5 กรัมต่อลิตร Disodium phosphate 1.5 กรัมต่อลิตร Sodium citrate 0.4 กรัมต่อลิตร Ferric ammonium citrate 0.04 กรัมต่อลิตร Magnesium sulfate 0.025 กรัมต่อลิตร Calcium chloride 0.0005 กรัมต่อลิตร Zinc sulphate 0.001 กรัมต่อลิตร Copper sulfate 0.001 กรัมต่อลิตร Pyridoxine hydrochloride 0.001 กรัมต่อลิตร Biotin 0.0005 กรัมต่อลิตร Malachite green 0.00025 กรัมต่อลิตร และ Agar 15 กรัมต่อลิตร ทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC (NEB)

ประกอบด้วย Vegetable Peptone ร้อยละ 2 Yeast Extract ร้อยละ 0.5 NaCl 10 มิลลิโมลาร์ KCl 2.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ $MgSO_4$ 10 มิลลิโมลาร์ Glucose 20 มิลลิโมลาร์

ประวัติผู้เขียน

นายชัยทัศน์ จิตแย้ม เกิดวันที่ 5 ตุลาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ จากมหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2547 หลังจบการศึกษาได้ทำงานเป็นพนักงานมหาวิทยาลัยที่ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย หลังจากนั้นจึงได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษาที่ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และได้ไปนำเสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง Genetic characterization of clarithromycin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 15 วันศุกร์ที่ 28 มีนาคม 2557 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำเสนอเป็นแบบโปสเตอร์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้