

วัณโรคเป็นโรคที่มีความสำคัญในประเทศไทย และประเทศทั่วโลก รายงานขององค์การอนามัยโลกมีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้เป็นจำนวนถึง 2 ล้านคนในแต่ละปี การแพร่ระบาดของวัณโรค ร่วมกับโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง และการปรากฏของวัณโรคดื้อยา ทำให้โรคนี้เป็นปัญหาใหญ่ในการบริการสาธารณสุข และทำให้สถานการณ์ของโรคนี้เลวร้ายมากขึ้น

การสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการค้นคว้ายาขนานใหม่ เป้าหมายที่สำคัญในผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรคคือ mycolic acids ซึ่งมีความแตกต่างจากแบคทีเรียอื่น ได้มีรายงานว่า การ cyclopropanation ที่ตำแหน่ง proximal มีผลทำให้ fluidity ของผนังเซลล์ลดลง เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงนี้คือ cyclopropane mycolic acid synthase 2 (CMA-2)

โครงการนี้ได้ clone และแสดงออกของเอนไซม์ CMA-2 ใน *E.coli* โดยเพิ่มจำนวนยีน *cma 2* จากโครโมโซมของเชื้อวัณโรค และตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าเป็นยีนที่ทำให้เกิดการ cyclopropanation โดยนำเข้าสู่ *M.smegmatis* ซึ่งในธรรมชาติไม่มี cyclopropane ring ใน mycolic acid ส่วนของ cyclopropane mycolic acid จะแยกออกจาก unsaturated mycolic acids ได้บน thin layer chromatography ทำให้ตรวจสอบได้ จากนั้นจึงนำยีน *cma 2* นี้เข้าไปแสดงออกใน *E.coli* และทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออก และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ ได้ฉีดโปรตีน CMA-2 ที่สกัดแล้วเข้าสู่กระต่ายเพื่อให้ได้แอนติบอดีต่อโปรตีนนี้ พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อโปรตีน CMA-2 ในเชื้อวัณโรค แต่ไม่ทำปฏิกิริยาต่อโปรตีนของ *M.smegmatis* เอนไซม์นี้น่าจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนายาขนานใหม่ในอนาคต และ/หรือมีประโยชน์ในการจำแนกเชื้อ mycobacterium

Tuberculosis is an important disease in Thailand and worldwide. World health organization reported 2 million people die from this curable disease each year. The breakdown in health services, the spread of HIV/AIDS and the emergence of multidrug-resistant TB are contributing to the worsening impact of this disease.

Bacterial cell-wall biosynthesis is a proven target for new antibacterial drugs. An important drug target in mycobacterial cell wall is mycolic acids which is distinct from other bacteria. Previous report revealed effect of the proximal cyclopropanation on decreasing fluidity of the cell wall. Cyclopropane mycolic acid synthase 2 (CMA-2) is a modifying enzyme involved in the mycolic acid synthesis process.

In this project, we cloned and expressed the CMA-2 enzyme in *E.coli*. The amplified *cma 2* gene from *M.tuberculosis* chromosomal DNA was verified the function by introducing into *Mycobacterium smegmatis* which originally did not contained cyclopropane ring in its mycolic acids. The mycolic acids were extracted and isolated by thin layer chromatography to detect the cyclopropane mycolic acid in *M.smegmatis* carrying *cma-2*. The *cma-2* gene was then cloned into the *E.coli* expression plasmids. CMA-2 enzyme was purified and used to immunize a rabbit to obtain anti-CMA-2. The anti-CMA-2 was confirmed for the specificity to the crude extract of *M.tuberculosis* but no cross-reaction with that of *M.smegmatis* was detected. The CMA-2 enzyme should be useful for new mycobacterial drug developing in the future and/or mycobacterial classification.