บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei and *Burkholderia thailandensis* แบคทีเรียทั้ง 3 นี้จัดอยู่ใน Genus เดียวกัน ที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจบางประการคล้ายคลึงกัน แบคทีเรีย *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่ก่อโรคเมลิออยโดสิสในคนและสัตว์บ้าง ส่วน *B. mallei* เป็นสาเหตุของโรคมองคล่อพิษในสัตว์และพบบ้างในคน สำหรับ *B. thailandensis* เป็นชนิดที่ไม่ก่อโรค ซึ่งมีคุณสมบัติที่เป็น Ara+ ในขณะที่ *B. pseudomallei* มีคุณสมบัติที่เป็น Ara- ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรค มีความรุนแรงของการก่อโรค ซึ่งน่าจะมียีนและผลผลิตของยีนที่แตกต่างจาก *B. thailandensis* โครงการวิจัยนี้จึงศึกษาโดยดูผลผลิตโปรตีนของแบคทีเรียทั้ง 2 ที่ระยะการเจริญเติบโตต่างกัน (5 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง) ผ่านการวิเคราะห์ด้วย SDS-Gel และ 2-D gel electrophoresis เพื่อเป็นแนวทางในการตั้งสมมุติฐานของความแตกต่างที่พบ จากนั้นจึงใช้เทคนิค Differential Display RT-PCR เพื่อแยกยีนที่แตกต่างที่พบใน *B. pseudomallei* แต่ไม่พบใน *B. thailandensis* จากการวิจัยนี้สามารถแยกยีนที่พบใน *B. pseudomallei* ซึ่งยีนดังกล่าวเมื่อหาลำดับเบสพบเป็นยีนที่มีลักษณะเป็นยีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน โดยมีรหัสเหมือนกับยีน Transposase (Tn10) ที่พบในเชื้อ *Salmonella typhi* จากการเปรียบเทียบจำนวนซ้ำและการกระจายตัวของยีนนี้ในกลุ่มแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด โดยวิธี Southern blot hybridization พบว่ายีนดังกล่าวมีจำนวนซ้ำและการกระจายตัวในยีโนมที่มีแบบแผนต่างกัน และที่มีนัยสำคัญคือสามารถตรวจวัดยีนนี้ได้ในเชื้อที่ก่อโรค ส่วนเชื้อที่ไม่ก่อโรคจะไม่สามารถตรวจสอบได้ แสดงว่ายีนดังกล่าวน่าจะมีความเกี่ยวพันธ์กับการก่อโรคของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังได้อาศัยข้อมูลเกี่ยวกับยีโนมของ *B. pseudomallei* เพื่อสืบหายีนที่น่าจะมีบทบาทในการก่อโรคของแบคทีเรียนี้ โดยได้นำเอาข้อมูลของยีน sigma S ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวกับการอยู่ในสภาวะที่ตึงเครียส และทำการศึกษาการทำงานของยีนดังกล่าวนี้ว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกลุ่มยีนใดบ้าง โดยใช้วิธีการ knock out ยีนในแบคทีเรีย *B. pseudomallei* เพื่อให้เกิดสายพันธ์ที่เป็น mutant และเปรียบเทียบคุณสมบัติการทนอยู่ของสภาวะต่างๆเพื่อเข้าใจกลไกการเกี่ยวข้องกับกลุ่มยีน จากผลการศึกษาพบว่า sigma S น่าจะมีความสำคัญต่อแบคทีเรีย ในสภาวะที่สามารถทนทานต่อกรดอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นยีน sigma S ซึ่งเป็นยีนควบคุมยีนหนึ่งที่น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมกลุ่มยีนที่ก่อความรุนแรงในเชื้อนี้

Abstract

Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei and *Burkholderia thailandensis* are in the same genus and share some interesting properties. The former species is the zoonostic agent of glander, while the second is an etiologic agent of melioidosis. Due to *B. pseudomallei* (Ara^-) has more virulent than *B. thailandensis* (Ara^+), thus the studying of differential gene expressed in virulence factors has been performed. The studying of whole cells protein patterns in SDS-PAGE and 2-D gel electrophoresis revealed the differentially expressed of some proteins between the different growth stages and between these two different species at the same growth stage (5^{th} and 12^{th} hr). The information of protein patterns used to be a preliminary data in the studying of gene expression, which performed by the new technique, Differential display RT-PCR (DDRT-PCR). In this report, the entire coding sequence of a transposase-like gene was first identified in *Burkholderia pseudomallei* NF10/38. The gene was 100% homologous to the Tn10 transposase gene from *Salmonella typhi*. In order to compare the gene localization among the three species (*B. mallei, B. pseudomallei* and *B. thailandensis*), Southern blot hybridization was performed. The hybridization pattern revealed differences in gene distribution and in copy number with the virulent species showing a higher copy number than in the non-virulent species. This finding indicate an indirect relationship between a transposase and the virulent nature of the bacteria. In addition, we also study a functional sigma S gene function in *Burkholderia pseudomallei*. The gene sequence was picked up from genome database of *B. pseudomallei* and was used for gene knock out to produce a mutant *B. pseudomallei*. The sigma S factor is a regulator protein that involves in the regulation of the bacteria survival in acid condition. The gene therefore should be a key factor for regulation of other virulence factors of the bacteria.