การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นางสาวศุภรินทร์ จิรสุขประเสริฐ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-6039-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I22170467

THE ANALYSIS OF GENETIC VARIATIONS OF *Trypanosoma evansi* BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Miss Supparin Jirasukprasert

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-6039-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
โดย	นางสาวศุภรินทร์ จิรสุขประเสริฐ
อาจารย์ที่ปรึกษา	สัตวแพทย์หญิง ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทร์ศิริ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา ไศละสูต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(สัตวแพทย์หญิง ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทร์ศิริ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.มีนา สาริกะภูติ)

ศุภรินทร์ จิรสุขประเสริฐ : การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส. (THE ANALYSIS OF GENETIC VARIATIONS OF *Trypanosoma evansi* BY POLYMERASE CHAIN REACTION). อ. ที่ปรึกษา: สพ.ญ. ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร.โกสุม จันทร์ศิริ. 75 หน้า. ISBN 974-17-6039-6

โรคเซอราเกิดจากเชื้อ*Trypanosoma evansi* ซึ่งเป็นโปรโตซัวที่เป็นปรสิตในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่หลากหลายตั้งแต่ การติดเชื้อแบบเรื้อรังในสุนัขหรือสุกร จนถึงการติดเชื้อแบบเฉียบพลันรุนแรงในม้า ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาเชื้อ *T. evansi* ที่พบในประเทศไทย 5 isolates โดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยาด้วยกัน 3 การทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการในการจำแนกความหลากหลายภายในชนิดของเชื้อ *T. evansi* ด้วยสารพันธุกรรม ในขั้นตอนแรกคือการหาลำดับเบสขนาด 511 คู่เบส ในส่วนของ ITS1 และนำมาวิเคราะห์ phylogenetic เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของเชื้อ *T. evansi* ใน GenBank ทำให้สามารถแยกกลุ่มของเชื้อที่ทำการศึกษาออกได้เป็น 5 กลุ่ม ต่อมาเป็นการพัฒนาวิธี Amplification Fragment Length Polymorphism (AFLP) โดยใช้ primer 122-2/122-3 พบว่าสามารถแสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในรูปแบบของแถบ DNA ที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis และสุดท้าย ได้นำเอาเชื้อ *T. evansi* VPh03 ซึ่งเป็นเชื้อจากม้า มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการผ่านเชื้อสู่หนูทดลอง 3 ครั้ง นำเชื้อที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นมาทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของ ITS1 พบว่า VPh03 ประกอบด้วย genotype อย่างน้อย 4 genotypes คือ f, g, j และ k ในขณะที่เมื่อนำมาวิเคราะห์ AFLP พบว่ามี AFLP fingerprint 2 รูปแบบ จากผลการทดลองยังพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสของ ITS1 และรูปแบบของ AFLP สรุปได้ว่า VPh03 เป็นเชื้อที่มีการผสมกันของเชื้ออย่างน้อย 4 ประชากรเชื้อ และ genotype f เป็นประชากรเชื้อสามัญของเชื้อที่พบในประเทศไทย

ภาควิชาพยาธิวิทยา	ลายมือชื่อนิสิต.....ศุภรินทร์ จิรสุขประเสริฐ.....
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2548	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4575569831: MAJOR PATHOLOGY

KEYWORD: *Trypanosoma evansi*, AFLP, GENOTYPE, PARASITE CLONING

SUPPARIN JIRASUKPRASERT: THE ANALYSIS OF GENETIC VARIATIONS OF *Trypanosoma evansi* BY POLYMERASE CHAIN REACTION. THESIS ADVISOR: NAREERAT VISESHAKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. KOSUM CHANSIRI, Ph.D. 75 pp. ISBN 974-17-6039-6

Surra in animals is a result of infection by the protozoan *Trypanosoma evansi*, a haemoflagellated parasite. The disease shows considerable diversity of clinical signs from a mild chronic infection in dogs or swine to the fatally acute disease in horses. In this study, we genetically characterized four isolates and one cloned *T. evansi* in Thailand by three molecular approaches. Aims are to develop the method of genetic identification of *T. evansi* using VPh03 which was isolated from the infected horse. Firstly, the 511 bp sequences of the ITS1 region have been analyzed phylogenetically compared to the *T. evansi* sequences retrieved from GenBank database. Results showed that the Thai isolates were clustered into a group of at least five genotypes. Secondly, the method of Amplification Fragment Length Polymorphisms (AFLP) was developed. Using primer 122-2/122 in the AFLP reaction was able to detect the genetic variations showing a banding pattern on the agarose gel electrophoresis. Lastly, *T. evansi* parasites from VPh03 was cloned and subsequently passed onto mice up to three passages. By all means, cloned VPh03 comprised at least four genotypes, f, g, j and k, analyzed by the ITS1 region. However, there are only two AFLP fingerprint patterns detected. By using all methods and although there were no correlations between ITS1 sequences and the AFLP pattern, our conclusion is that VPh03 is a mixture of at least four *T. evansi* populations. Moreover, genotype f is the major population among Thai isolates.

Department Veterinary Pathology
Field of study Veterinary Pathobiology
Academic Year 2005

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล ที่ให้ความรู้ทางด้านอณูชีววิทยาแก่ผู้วิจัย รวมทั้งคำแนะนำและคำปรึกษาตลอดการทำวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทร์ศิริ และกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง มีนา สาริกะภูติ ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษามาโดยตลอด

และการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์ ภาคการศึกษาต้น ปีการศึกษา 2547 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ คุณสุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ ,คุณจุฑามาศ ดอนทอง และบุคลากรในหน่วยปรสิตทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นิสิตปริญญาโททุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจด้วยดีตลอดมา

และขอขอบคุณสัตว์ทดลองทุกตัวที่อุทิศร่างกายเพื่อใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่เป็นกำลังใจ ในการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญภาพ.....ญ

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีสำคัญ หรือสมมติฐาน.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....3

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....4

บทที่ 3 ระเบียบวิจัย.....12

3.1 เชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่ใช้ในการทดลอง.....12

3.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อในหนูทดลอง (mice).....13

3.3 การแยกเชื้อด้วยวิธี Anion-exchange chromatography (Lanham and Godrey, 1970).....13

3.4 การสกัด DNA 13

3.5 การหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ.....14

3.5.1 การเพิ่มสารพันธุกรรมบริเวณ small subunit rRNA gene ด้วยวิธี PCR.....15

3.5.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis.....15

3.5.3 การทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ขึ้น.....15

3.5.4 การโคลน (clone) ผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด (plasmid).....15

3.5.4.1 การ ligate ผลิตภัณฑ์ PCR.....15

3.5.4.2 ขั้นตอน transformation.....15

3.5.4.3 การสกัดพลาสมิดจาก *Escherichia coli*.....16

3.5.4.4 การตรวจสอบ recombinant พลาสมิด.....16

3.5.4.5 การส่งตรวจหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene.....17
3.5.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส.....17
3.6 การหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR 17
3.6.1 ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer NV4 และ NV5.....18
3.6.2 ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer 122-2 และ 122-3.....18
3.6.3 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis.....18
3.6.4 การคำนวณค่า similarity coefficient โดยวิธีของ Nei และ Li (1979).....19
3.7 การทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น.....20
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....22
4.1 ผลการหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆ.....22
4.2 ผลการหาความแตกต่างของ minisatellite ด้วยวิธี PCR.....34
4.2.1 primer NV4 และ NV5.....34
4.2.2 primer 122-2 และ 122-3.....34
4.3 ผลการทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น.....38
4.3.1 ผลการหาลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ isolate VPh03 ที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้น.....40
4.3.2 ผลการหาความแตกต่างของ minisatellite DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer 122-2 และ 122-3 ของเชื้อ isolate VPh03 ที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้น.....40
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....49
5.1 สรุปผลการวิจัย.....49
5.2 อภิปรายผล.....50
5.3 ข้อเสนอแนะ.....53
รายการอ้างอิง.....54
ภาคผนวก.....59
ภาคผนวก ก.....60
ภาคผนวก ข.....64
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....65

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 ประวัติของเชื้อ *T. evansi* ที่ใช้ในการทดลอง..... 12

4.1 ข้อมูลลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆ ที่นำมาศึกษา..... 24

4.2 ผลการ alignment ของ small subunit rRNA gene ด้วยโปรแกรม ClustalW ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆที่ทำการศึกษา และ *T. evansi* และ *T. brucei* ที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank..... 29

4.3 รูปแบบ genotype ของ small subunit rRNA geneของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆ ที่ทำการศึกษา และ *T. evansi* และ *T. brucei* ที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank..... 32

4.4 ผลการคำนวณค่า similarity coefficient ระหว่างเชื้อแต่ละ isolate..... 38

4.5 ลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง..... 41

4.6 ผลการ alignment ของ small subunit rRNA geneด้วยโปรแกรม ClustalW ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ไม่ผ่านและผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง..... 44

4.7 รูปแบบ genotype ต่างๆของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง..... 46

4.8 ผลการคำนวณค่า similarity coefficient ระหว่างเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ไม่ผ่านและผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้นทั้ง 3 ครั้ง..... 48

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 ภาพถ่ายสไลด์เลือดหนูทดลองที่มีเชื้อ *T. evansi* ที่ย้อมด้วยสี 10% giemsa..... 5

2.2 แสดง organelles ส่วนต่างๆของเชื้อ trypanosome..... 5

2.3 Ribosomal RNA genes..... 11

2.4 กระบวนการของ pre-rRNA..... 11

3.1 การเพิ่มสารพันธุกรรมบริเวณ small subunit rRNA geneของเชื้อ..... 19

3.2 ตำแหน่งของ primer ที่เข้าเกาะบริเวณ minisatellite ที่มีขนาด 122 คู่เบส..... 19

3.3 การทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น..... 21

4.1 (ก) ผลจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR โดยการใช้ primer 18S-F และ 18S-R ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 510 คู่เบส..... 23

(ข) ผลการวิเคราะห์ผลการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จะได้ DNA 2 ขนาดคือ 3,000 คู่เบส และ 510 คู่เบส..... 23

4.2 phylogenetic tree ของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆ ที่ทำการศึกษา และ *T. evansi* และ *T. brucei* ที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank..... 33

4.3 ผลจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer NV4 และ NV5 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis..... 35

4.4 (ก) การตรวจหา DNA ของสัตว์ชนิดต่างๆด้วยวิธี agarose gel electrophoresis..... 36

(ข) ผลจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer 122-2 และ 122-3 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis..... 36

4.5 (ก) การตรวจหา DNA ของเชื้อ *T. evansi* isolate ต่างๆด้วยวิธี agarose gel electrophoresis..... 37

(ข) ผลจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ primer 122-2 และ 122-3 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis..... 37

4.6 แผนผังการทำให้เชื้อ isolate VPh03 บริสุทธิ์ขึ้น..... 39

4.7 phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับเบสของ small subunit rRNA gene ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้น..... 46

สารบัญภาพ(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.8 (ก) การตรวจหา DNA ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ไม่ผ่านและผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้น..... 47

(ข) การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ primer 122-2 และ 122-3 ของเชื้อ *T. evansi* isolate VPh03 ที่ไม่ผ่านและผ่านการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ขึ้น.....47