การวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ Intergenic Spacer I ของเชื้อ *Pythium insidiosum*

นายวิชิต ทวีกาญจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SEQUENCE ANALYSIS IN INTERGENIC SPACER I REGION IN *PYTHIUM INSIDIOSUM*

Mr. Wichit Thaveekarn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Microbiology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

491001

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ Intergenic Spacer I ของเชื้อ *Pythium insidiosum*
โดย	นายวิชิต ทวีกาญจน์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินดามพร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธพรทิพย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. กัลยา ติงศภัทิย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมหญิง ธัมวาสร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินดามพร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธพรทิพย์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช)

วิชิต ทวีกาญจน์ : การวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ Intergenic Spacer I ของเชื้อ *Pythium insidiosum* (SEQUENCE ANALYSIS IN INTERGENIC SPACER I REGION IN *PYTHIUM INSIDIOSUM*). อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. อริยา จินดามพร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.จตุรงค์ พุทธพรทิพย์ 96 หน้า.

Pythium insidiosum จัดอยู่ใน Kingdom Straminipila, Phylum Oomycota, Order Peronosporales และ Family Pythiaceae เป็น aquatic fungus-like (มีลักษณะคล้ายเชื้อรา) อาศัยอยู่ในบริเวณน้ำนิ่ง เชื้อ *P. insidiosum* เป็นเพียงสปีชีส์เดียวที่สามารถก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงคน และเป็นสาเหตุของโรค pythiosis ปัจจุบันพบรายงานผู้ป่วยโรค pythiosis มากขึ้น การวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและแม่นยำจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์บริเวณ Intergenic spacer 1 (IGS-1) gene ตั้งอยู่ระหว่าง 28S rDNA และ 5S rDNA subunit ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความซ้ำกัน และมีความหลากหลายในลำดับเบส ลำดับเบสบริเวณนี้สามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อได้ถึงในระดับสปีชีส์ ในการศึกษานี้ได้ทำศึกษาเชื้อ *P. insidiosum* สายพันธุ์ในประเทศไทย 10 สายพันธุ์, เชื้อ *Pythium* 1 สายพันธุ์จากสิ่งแวดล้อมซึ่งได้จากน้ำในเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จ.ลพบุรี และเชื้อที่ก่อโรคในพืช 1 สายพันธุ์ คือ เชื้อ *P. graminicola* โดยเชื้อทั้งหมดได้พิสูจน์และยืนยันจากการศึกษาลักษณะมหสัณฐาน, จุลสัญฐาน และ การสร้าง zoospore ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาลำดับเบสในส่วน rRNA gene ตั้งแต่ 28S ถึง 5S ซึ่งครอบคลุมลำดับเบสบริเวณ IGS-1 ผลที่ได้พบว่าลำดับเบสในส่วนอนุรักษ์ 28S และ 5S มีความยาวประมาณ 2,500 คู่เบส และ 55 คู่เบส ตามลำดับ ในเชื้อ *P. insidiosum* 10 สายพันธุ์จากผู้ป่วย pythiosis, เชื้อ *Pythium*ที่แยกได้จากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ และ เชื้อ *Pythium* ที่ก่อโรคในพืช คือ *P. graminicola* ส่วนบริเวณ IGS-1 นั้นมีความยาวของลำดับเบสประมาณ 1,400-1,500 คู่เบส ในเชื้อ *P. insidiosum* 10 สายพันธุ์จากผู้ป่วย pythiosis และเชื้อ *Pythium*ที่แยกได้จากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ ส่วนเชื้อ *P. graminicola* มีความยาวประมาณ 1,000 คู่เบส และนำข้อมูลลำดับเบสบริเวณ IGS-1 มาวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Mega 3.1 พบว่าสามารถจัดจำแนกกลุ่มเชื้อ *P. insidiosum* ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ประกอบด้วย M17, PyCU3, PyCU7 และ 1 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากน้ำในเขื่อนป่าสัก คือ PyCU8, กลุ่ม 2 ประกอบด้วย PyCU1, PyCU2, และ PyCU5 และกลุ่ม 3 ประกอบด้วย PyCU6, MMC45P21-2, PyCU4 และ MMC44P21-1 ซึ่งเห็นได้ว่าเชื้อ *P. insidiosum* ในกลุ่ม 1 เป็นเชื้อที่มาจากผู้ป่วยทางภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคอีสาน, กลุ่ม 2 เป็นเชื้อที่มาจากผู้ป่วยทางภาคกลางของประเทศไทย และกลุ่ม 3 จากผู้ป่วยทางภาคเหนือ ของประเทศไทย

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต วิชิต ทวีกาญจน์

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อริยา จินดามพร

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม จตุรงค์ พุทธพรทิพย์

4689150920 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD : *PYTHIUM INSIDIOSUM* / PYTHIOSIS / INTERGENIC SPECER I

WICHIT THAVEEKARN : SEQUENCE ANALYSIS IN INTERGENIC SPACER I REGION IN *PYTHIUM INSIDIOSUM*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ARIYA CHINDAMPORN, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. CHATURONG PUTAPORNTIP, Ph.D., 96 pp.

Pythium insidiosum is classified in Kingdom Straminipila, Phylum Oomycota, Order Peronosporales and Family Pythiaceae based on the ribosomal DNA information, mainly. This organism, an aquatic parafungus, lives in stagnant water. Up to now, *P. insidiosum*, only one species in genus *Pythium*, has been reported as an etiologic agent of pythiosis in mammalian including human. The incidence of this disease has been increasing, so the rapid and accurate diagnosis is required. In this study, we focus on the analysis of Intergenic Spacer 1 (IGS-1) rRNA region. This region is located as a bridge between 28S rDNA and 5S rDNA subunits. This single locus is more variable than existing loci, resulting the advantage to exploit as a tool to differentiate the strains level. After confirming the tested strains which were isolated from patients with pythiosis, an environmental strain from Pasak Dam, and a strain of *P. graminicola* which is a plant pathogen, on the aspects of their morphology and zoospore production, all of their genomic DNAs were prepared for the IGS-1 analysis. Cloning and walking sequence of the PCR product using primers designed from 28S rDNA and 5S rDNA were the techniques using to analyse the IGS-1 region. The result demonstrated that the conserved sequences were revealed in the 2.5 Kb of 28S rRNA region and 55 bp of 5S rRNA region among the 10 strains from patients, a strain from environment and *P. graminicola* . It is of interesting that the DNA polymorphism was demonstrated in the region of IGS-1, 1.4-1.5 Kb, in 10 strains from pythiosis patients, a strain from environment, Pasak Dam and 1 Kb in *P. graminicola*. To demonstrate the relationship among these strains, the phylogenetic tree using program MEGA 3.1 was performed. The result showed that all these strains were separated into 3 groups. The first group (group 1) is composed of 3 strains from pythiosis patient, M17, PyCU3, PyCU7 and another strain, PyCU8 from environment. The second group (group 2) is composed of 3 strains of *Pythium* isolated from pythiosis patient, PyCU1, PyCU2 and PyCU5. The last group (group 3) is composed of 4 strains, PyCU4, MMC45P21-2, PyCU6 and MMC44P21-1, all were isolated from pythiosis patients too. The origin of group 2 and group 3 were derived from Central part and Northern part of Thailand, respectively, whereas that of group 1 was from Central, Northern and NorthEasthern part. Further study is required even this study imply that the source of the organism is one of the factor involving in the grouping. This preliminary result will be very useful for epidemiologic study and the differentiation in the strain level.

Field of study Medical Microbiology Student's signature Wichit Thaveekarn
Academic year 2006 Advisor's signature Ariya Chindamporn
Co-advisor's signature Chaturong Putaporntip

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลาย ๆ ฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. อริยา จินดามพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร. จตุรงค์ พุทธพรทิพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ท่านทั้งสองได้ให้ข้อคิดเห็น คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ถ่ายทอดความรู้ทางวิชาการ และประสานงานตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนจึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. สมหญิง ธัมวาสร และ รศ. ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช ที่กรุณาสละเวลาช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ และขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการทำวิจัย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ คอยสนับสนุน และช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 อณุกรมวิธาน และ ลักษณะของเชื้อ *P. insidiosum* 3

2.2 จรชีวิตของเชื้อ *P. insidiosum* 5

2.3 pythiosis 7

2.3.1 อุบัติการณ์ 7

2.3.2 พยาธิกำเนิด (pathogenesis) 9

2.3.2.1 ในคน 9

2.3.2.2 ในสัตว์ 11

2.4 การกระจายตัวของโรค pythiosis 13

2.5 Immunotherapy 15

2.6 การวินิจฉัยโรค pythiosis ทางห้องปฏิบัติการ 16

2.61 การวินิจฉัยโรค pythiosis ทางน้ำเหลืองวิทยา 17

2.7 การตรวจพิสูจน์เชื้อ *P. insidiosum* ทางวิธีอณูชีววิทยาโมเลกุล 18

3 วิธีดำเนินการวิจัย 27

3.1 เชื้อที่ใช้ ในการทดลอง 27

3.2 วิธีการทดลอง 28

3.2.1 ลักษณะทางมหสัณฐานและจุลสัณฐาน 28

3.2.2 การกระตุ้นการสร้าง zoospore 29
3.2.3 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) 29
3.2.4 การออกแบบสังเคราะห์ primer ช่วง Intergenic spacer 1 (IGS-1) ของเชื้อ *Pythium* 32
3.2.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) 34
3.2.5.1 การเตรียม template ด้วย PCR 34
3.2.5.2 การทำ clone gene 35
3.2.5.2.1 การเตรียม PCR product เพื่อทำการ insert gene 35
3.2.5.2.2 การสกัด PCR product 36
3.2.5.2.3 การ ligation ตามวิธีในคู่มือของ InsTAclone™ PCR Cloning Kit 38
3.2.5.2.4 การเตรียม transform cell (*E.coli* DH5α) 39
3.2.5.2.5 ขั้นตอนการ clone gene ด้วยวิธี Electro-transformation และการเตรียมการ 40
3.2.5.2.6 การคัดเลือก clone ที่มี IGS- 1 gene (Selection of IGS-1 inserted clone) 40
3.2.5.2.7 การสกัด Plasmids ด้วยวิธีตามคู่มือของ High-Speed Plasmid Mini kit 41
3.2.6 การหาลำดับเบส (DNA sequencing) 44
3.2.6.1 การ Purify PCR product ใช้ชุด QIAquick PCR Purification Kit 44
3.2.6.2 การหาลำดับเบส 46
3.2.6.3 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส 46
4 ผลการวิเคราะห์ 47
4.1 ลักษณะทางมหสัณฐานและจุลสัณฐาน 47
4.2 ผลการกระตุ้นการสร้าง zoospore 49
4.3 ผลการออกแบบสังเคราะห์ และทดสอบ primer เพื่อหาช่วง Intergenic spacer 1 (IGS-1) ของเชื้อ *Pythium* 51
4.4 ผล PCR จาก genomic DNA ของเชื้อ *Pythium* ด้วย primer PI28SF และ PI5SF (ครอบคลุมในบริเวณ 28S ถึง 5S) ด้วยวิธี PCR 53

4.5 ผล PCR product ของ inserted IGS-1 สำหรับการ cloning จาก genomic DNA ของเชื้อ *Pythium* 54
4.6 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส 55
5 สรุปผลการศึกษา อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 75
รายการอ้างอิง 82
ภาคผนวก 88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 96

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายชื่อเชื้อ *Pythium* ในการศึกษา	28
2	แสดง primers ที่ใช้หาลำดับเบสในช่วง IGS-1 gene	52
3	แสดงข้อมูลลำดับเบส IGS-1 ในแต่ละกลุ่ม	74
4	แสดงข้อมูลเชื้อ *P. insidiosum* จากผู้ป่วย Pythiosis ที่ใช้ในการศึกษา	75
5	แสดงการวิเคราะห์ จำนวนเบสที่แตกต่าง และ เปอร์เซ็นต์ความเหมือน(homology) ในส่วนลำดับเบสอนุรักษ์ 28S subunit เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ M17	78

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA)	4
2	แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อ *P. insidiosum*บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA	4
3	แสดงการย้อม Gomori methenamine silver stain (GMS) จากชิ้นเนื้อ cutaneous pythiosis	5
4	แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ *P. insidiosum*	6
5	แสดง orbital pythiosis (subcutaneous pythiosis) ในเด็กชาย จากมลรัฐเท็กซัส	10
6	แสดง human arterial pythiosis ซึ่งผู้ป่วยถูกตัดขาขวาทิ้ง	11
7	แสดง cutaneous pythiosis ในม้าบริเวณหัวไหล่ ตรงกลางแผลจะเห็นลักษณะก้อนกลมที่เรียกว่า kunker	12
8	แสดงก้อน kunker ที่นำออกมาจากแผลในม้า ข้างในจะมีเส้นใยของเชื้อ *P. insidiosum* ที่มีชีวิตอยู่	12
9	แสดงลักษณะ cutaneous pythiosis ในสุนัข บริเวณ ปาก, สะโพก และ ขา	13
10	แสดงการกระจายตัวของโรค pythiosis ในบริเวณประเทศที่มีอุณหภูมิอบอุ่นและประเทศแถบเส้นศูนย์สูตร	14
11	แสดงการกระจายตัวของโรค pythiosis ในผู้ป่วยในประเทศไทยตามภูมิภาคต่างๆ จำนวน 88 ราย(ที่สามารถตามประวัติได้) ตั้งแต่เดือน มกราคม ค.ศ.1985 ถึง มิถุนายน ค.ศ. 2003	14
12	แสดงรูปจำลองระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *P. insidiosum* และ antigen ที่ใช้เป็น immunotherapy ในม้า	15
13	แสดงส่วนประกอบ ribosomal RNA (rRNA) geneและ ตำแหน่ง primer ที่ใช้ในงานวิจัย ของ Groosters และ Gee ปี 2002	18
14	แสดงลักษณะรอยโรค pythiosis ในสุนัข อายุ 8 เดือน พันธุ์ German Shepherd บริเวณ สะโพก ด้านขวา	20
15	แสดง Phylogenetic relationships diagram ของเชื้อ *P. insidiosum* และเชื้อต่างๆ ใน ส่วน ITS จาก rDNA	22

16 แสดงตำแหน่ง primer ที่ใช้ในการสร้าง 2,500 bp-LSU rRNA gene probe คือ LR1 และLR2 รวมทั้งแสดง ตำแหน่งของ primer Q และ SR ในช่วงครอบคลุม IGS-1 ที่ใช้ในการสร้าง specific DNA probe และ HinfI restriction site ซึ่งอยู่ในส่วน IGS-1 ของเชื้อ *P. insidiosum* ที่นำมาเป็น specific DNA probe 23

17 แสดงผลการทำ dot blot hybridization ต่อ genomic DNA *Pythium* spp. 104 สายพันธุ์ 24

18 แสดงผลการทำ dot bot dot blot hybridization ต่อ genomic DNA ของเชื้อ *P. insidiosum* และเชื้อที่ก่อโรคคล้าย pythiosis 25

19 แสดงผลการ hybridization ด้วย 530-bp HinfI fragment specific probe ต่อ genomic สารDNA 22 สายพันธุ์ของเชื้อ *P. insidiosum* ที่มาจากภูมิภาคต่างๆทั่วโลก ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 clade ตามความเข้มของการ hybridization 26

20 แสดงแผนผัง rRNA gene 1 unit 33

21 แสดงตำแหน่ง primer 6 primers ในการออกแบบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน IGS-1 33

22 แสดงตำแหน่ง primers คู่แรก PI28SF และ PI5SF ในการทำ PCR 34

23 แสดงตำแหน่ง primers PI28SF(3) และ PI5SF ในการทำ PCR เพื่อ insert ในการ clone gene 36

24 แสดงผังสรุปตำแหน่ง primers 6 primers ที่ใช้ในการหาลำดับเบส 46

25 แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อ *Pythium* บนอาหาร SDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 4 วัน 47

26 แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อ *Pythium* (ย้อม LCB) ผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 48

27 แสดงลักษณะ sporangium ของเชื้อ *Pythium* ใน induction medium ผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 49

28 แสดงลักษณะการสร้าง zoospore ใน induction medium ของเชื้อ *Pythium* ssp. ผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 50

29 แสดงตำแหน่ง primers ที่ใช้ในการหาลำดับเบสของช่วง IGS-1 gene 51

30 แสดง PCR product band ของเชื้อ *Pythium* ช่วงบริเวณของ primer PI28SF ถึง PI5SF 53

31 แสดง PCR product band ของเชื้อ *Pythium* ด้วย primers PI28SF(3) และ PI5SF เพื่อเป็น inserted gene ในขั้นตอน clone gene 54

32 แสดงผลการ alignment ลำดับเบสในบริเวณ IGS-1ของเชื้อ *Pythium* 12 สายพันธุ์ 56

33 แสดง Phylogenetic tree diagram ของลำดับเบส IGS-1 ของเชื้อ *P. insidiosum* เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่น 63

34 แสดงรูปผังการ alignment ในส่วนลำดับเบส IGS-1 ในภาพรวมในแต่ละกลุ่มของเชื้อ *Pythium* 64

35 แสดงผลการ alignment ในส่วนลำดับเบส IGS-1 ในแต่ละกลุ่มของเชื้อ *Pythium* 65

36 แสดงภาพรวมของการ alignment 73

37 แสดง Phylogenetic tree ในส่วนลำดับเบสอนุรักษ์ 28S subunit (2,500 คู่เบส) ของเชื้อ *Pythium* 12 สายพันธุ์ 79