

วัณโรคเป็นโรคติดเชื้อที่สามารถรักษาให้หายได้ด้วยยาปฏิชีวนะ โดยจะต้องใช้ยา 4 ชนิดคือ ไอโซไนอะซิด ริแฟมปีซิน สเตรปโตมัยซิน และ ไพราซิनाไมด์ร่วมกันเป็นเวลา 4 เดือน และใช้ยา ไอโซไนอะซิด และ ริแฟมปีซิน ร่วมกัน 2 เดือน ผนังเซลล์ของ mycobacteria มีคุณสมบัติต่างจากแบคทีเรียอื่นคือ มีไขมันอยู่ถึง 40% ของน้ำหนักแห้ง องค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญในผนังเซลล์คือ mycolic acids ในเชื้อวัณโรค องค์ประกอบนี้อยู่ในรูป cyclopropane mycolic acid เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้เอนไซม์หนึ่งคือ cyclopropane mycolic acid synthase 2 (CMA-2) ยีนที่ code ให้เอนไซม์ CMA-2 คือยีน *cma2* มีรายงานว่าพบ repetitive sequence อยู่บริเวณ 5' upstream ของยีน *cma2*

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของ repetitive sequence ที่อยู่บริเวณ 5' upstream region ของยีน *cma2* ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการ transcription ของยีน *cma2* หรือไม่ โดยอาศัย GFP เป็นตัวติดตาม จากการสร้าง GFP reporter plasmid ที่มี 5' upstream region ขนาดต่างๆ ของยีน *cma2* เป็นส่วนที่ควบคุมการถอดรหัสของยีน *gfp* ได้พลาสมิดทั้งหมด 5 ชนิดคือ พลาสมิด pMSX1 pMMRR pMRR2 pMSX2 และ pMRR pMSX1 pMMRR และ pMRR2 เป็นพลาสมิดที่มี 5' upstream region ของยีน *cma2* แต่ไม่มี repetitive sequence มีขนาด 0.48 0.55 และ 0.09 กิโลเบสตามลำดับ pMSX2 และ pMRR เป็น plasmid ที่มี 5' upstream region ที่มี repetitive sequence มีขนาด 0.64 และ 0.71 กิโลเบส เมื่อนำ GFP reporter plasmid เข้าสู่ *M.smegmatis* โดยวิธี Electroporation และคัดเลือก transformants โดยเทคนิค PCR ใช้วิธี GFP microplate assay (GFPMA) ในการวัด activity ของ GFP ผลการศึกษาพบว่า *M.smegmatis* ที่มีพลาสมิด pMSX2 และ pMRR มี activity เป็น 5.418 และ 5.819 มีค่ามากกว่า 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *M.smegmatis* ที่มีพลาสมิด pMSX1 pMMRR และ pMRR2 เมื่อนำเซลล์ไปศึกษาการเรืองแสงด้วย fluorescence microscope พบว่า *M.smegmatis* ที่มีพลาสมิด pMSX2 และ pMRR จะเรืองแสงสีเขียว ในขณะที่ *M.smegmatis* ที่มีพลาสมิด pMSX1 pMMRR และ pMRR2 ไม่เห็นการเรืองแสง สรุปผลการทดลองในขั้นนี้ว่า repetitive sequence เป็น positive regulator ในกระบวนการ Transcription

คำสำคัญ : *cma2*/GFP/Mycolic Acid/*M.smegmatis*/Repetitive Sequence

Abstract

Tuberculosis is an infectious disease which can be cured by antibiotics. Regimen is isoniazid, rifampicin, streptomycin and piracinamide for 4 months then isoniazid and rifampicin for another 2 months. The mycobacterial cell membrane is different from other bacterial cell wall. It contains high lipid, up to 40% of dry cell weight. Mycolic acid is an important component in the mycobacterial cell wall. The cyclopropanation is one step of the *M.tuberculosis* mycolic acid modification. One of the modification enzyme involves in this process is cyclopropane mycolic acid synthase 2 (CMA-2) which is coded by *cma2* gene. It was reported that 5' upstream region of *cma2* gene contain repetitive sequence.

This research is to study the role of the 5' upstream region of *cma2* repetitive sequence in transcription of *cma2* gene by using GFP as a reporter. The GFP reporter plasmid with the sequence of the 5' upstream region of the *cma2* gene are named plasmid pMSX1, pMMRR, pMRR2, pMSX2 and pMRR. Plasmid pMSX1, pMMRR and pMRR2 contain the 5' upstream region of *cma2* gene but not the repetitive sequence. Plasmid pMSX2 and pMRR contain the 5' upstream region with the repetitive sequence. The 5' upstream region in these plasmids are 0.48, 0.55, 0.09, 0.64 and 0.71 kb in length, respectively. The GFP reporter plasmid was introduced into *M.smegmatis* by electroporation. Screening for transformants was performed by PCR technique. Activity of GFP was measured by GFP microplate assay (GFPMA). As the result of GFP microplate assay, the activities of *M.smegmatis* with plasmid pMSX2 and pMRR are 5.418 and 5.819 which are approximately 2 times higher than that of *M.smegmatis* with plasmid pMSX1, pMMRR and pMRR2. Fluorescence microscope shows that *M.smegmatis* with plasmid pMSX2 and pMRR are fluorescent in green light. *M.smegmatis* with pMSX1, pMMRR and pMRR2 are not fluorescent under the same condition. These results show that the repetitive sequence is related with a positive regulator in the transcription process.

Keywords : *cma2*/GFP/Mycolic Acid/*M.smegmatis*/Repetitive Sequence