การใช้ POLYMERASE CHAIN REACTION เพิ่มจำนวน P1-GENE เพื่อตรวจหาเชื้อ *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

นางสาวสุมาณี ศิริเลิศพรรณา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-938-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17057176

AMPLIFICATION OF P1-GENE BY POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

MISS SUMANEE SIRILERTPANRANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

INTER-DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY

GRADUATE SCHOOL

CHULALONGKORN UNIVERSITY

1995

ISBN 974-632-938-3

Thesis Title	Amplification of P1-gene by Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma pneumoniae*
By	Miss Sumanee Sirilertpanrana
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Instructor Nibondh Udomsantisuk, M.Sc.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for Master's Degree.

Santi Thoongsuwan.....Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan,Ph.D.)

Thesis Committee :

.....Somjai Reimprayoon.....Chairman

(Associate Professor Somjai Reimprayoon, M.D.)

.....Somying Tumwasorn.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)

Nibondh Udomsantisuk.....Thesis Co-advisor

(Instructor Nibondh Udomsantisuk, M.Sc.)

.....Siriporn Sittipraneed.....Member

(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

Copyright of the Graduate school, Chulalongkorn University

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นางสาวสุมาณี ศิริเลิศพรรณา : การใช้ polymerase chain reaction เพิ่มจำนวน P1 gene เพื่อตรวจหาเชื้อ Mycoplasma pneumoniae (AMPLIFICATION OF P1 GENE BY POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF MYCOPLASMA PNEUMONIAE) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.นพ. สมหญิง ธัมวาสร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ. นิพนธ อุดมสันติสุข, 79 หน้า. ISBN 974-632-938-3

Mycoplasma pneumoniae เป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินหายใจและปอด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กและวัยหนุ่มสาว ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงได้ หากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม ดังนั้น การตรวจวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพและป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนดังกล่าว การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทั้งการเพาะเชื้อและการทดสอบทางซีโรโลยีให้ผลช้า ความไว และ ความจำเพาะต่ำ ด้วยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีด้าน ดีเอ็นเอ มีการนำเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) มาใช้ในการตรวจหาเชื้อในสิ่งส่งตรวจ และแสดงให้เห็นว่าสามารถให้ผลการตรวจรวดเร็ว ความไว ความจำเพาะสูง มีรายงานการนำ PCR มาใช้ในการตรวจหา M. pneumoniae แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องการใช้สารรังสี และ amplicon carryover

เพื่อนำวิธี PCR มาใช้สำหรับตรวจหา DNA ของ M. pneumoniae ได้คัดเลือก primers จาก gene ที่ควบคุมการสราง P1 protein ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการเกาะติดเซลล์ ทำสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ PCR พบว่า PCR มีความไวในการตรวจหา DNA ของ M. pneumoniae ได้ในปริมาณต่ำสุด 10 fg เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis และตรวจวิเคราะห์ได้ถึง 1 fg เมื่อวิเคราะห์ด้วย fluorescein-labelled probe โดย dot blot hybridization หรือ nested PCR ทำการทดสอบความจำเพาะของ PCR โดยใช้ DNA ที่สกัดจากเชื้อ Mycoplasma species อื่นๆ และแบคทีเรียต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินหายใจ รวมทั้ง DNA จากเม็ดเลือดขาวคน พบว่าให้ผลลบทั้งหมด นอกจากนี้เพื่อป้องกัน amplicon carryover ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของผลบวกเทียม จึงใช้ dUTP (deoxyuridine 5'-triphosphate) แทนที่ dTTP (deoxythimidine 5'-triphosphate) รวมกับเอ็นไซม์ uracil-N-glycosylase (UNG) ใน PCR reaction mixture ก่อนทำ PCR เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจหา M. pneumoniae จากสิ่งส่งตรวจ ได้ใช้ PCR ตรวจ simulated samples 10 ตัวอย่าง พบว่าสามารถหาปริมาณ M. pneumoniae DNA ต่ำสุดใน pooled simulated samples ได้ 100 fg

เมื่อพิจารณาถึง ความรวดเร็ว ความไว ความจำเพาะ ความปลอดภัยจากการใช้สารรังสี รวมทั้งการป้องกันการเกิดผลบวกเทียมจาก amplicon carryover วิธีการเพิ่มจำนวน P1 gene ด้วยเทคนิค PCR ที่ศึกษานี้ จึงเหมาะสมกับการนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ M. pneumoniae

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

##C545376 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: MYCOPLASMA PNEUMONIAE/ P1 GENE/ POLYMERASE CHAIN REACTION
SUMANEE SIRILERTPANRANA : AMPLIFICATION OF P1 GENE BY POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF MYCOPLASMA PNEUMONIAE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SOMYING TUMWASORN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : INSTRUCTOR NIBONDH UDOMSANTISUK, M.Sc. 79 pp. ISBN 974-632-938-3

Mycoplasma pneumoniae is the causative agent of respiratory and lung infection, especially in children and young adults. Severe complications frequently occur when appropriate antibiotic treatment is not administered. Correct diagnosis is, therefore, important effective treatment and the prevention of complications. Laboratory diagnostic methods such as culture and serological tests are time-consuming, insensitive and nonspecific. With the advent of DNA technology, polymerase chain reaction(PCR) was applied in the detection of microorganisms in clinical specimens and demonstrated to provide rapid, sensitive and specific results. Many studies for detecting M. pneumoniae by PCR have been reported but still have limitation of using radioisotope and the amplicon carryover.

In order to apply PCR for detection of M. pneumoniae, primers were selected from the gene encoding P1 protein which is responsible for cell adherence. PCR conditions were determined. When the amplified product was analysed by gel electrophoresis, the PCR had a sensitivity of 10 fg purified M. pneumoniae DNA. The sensitivity of the PCR was increased to 1 fg when the amplified products were analysed by fluorescein-labelled probes with dot blot hybridization or nested PCR. The specificity of PCR was determined by using DNAs from other Mycoplasma species, bacterial isolates from respiratory infected patients, and also human leukocytes. It was found that no amplification occurred. The false-positive due to amplicon carryover was prevented by the incorporation of dUTP instead of dTTP and adding the uracil-N-glycosylase(UNG) in reaction mixture prior to PCR. The efficiency of PCR for detection of M. pneumoniae in simulated specimens was determined and found that sensitivity was 100 fg of spiked M. pneumoniae DNA.

Considering of speed, sensitivity, specificity, the use of nonradioisotope-labelled probe and the use of enzymatic pre-PCR sterilization, the developed PCR-based protocol was more suitable and reliable for laboratory diagnosis of M. pneumoniae.

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep gratitude to the following individuals who helped in making this thesis possible :

Assistant Professor Dr. Somying Tumwasorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her kindness and indispensable help in supervising this thesis.

Instructor Nibondh Udomsantisuk, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for his invaluable advice and assistance.

Associate Professor Dr. Somjai Reinprayoon, the chairman of thesis committee and Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed, the member of thesis committee for their constructive criticisms.

Associate Professor Pongpun Nunthapisud, Assistant Professor Dr. Ariya chindamporn, Asistant Professor Dr. Somchai Jongwutiwes, for their kindness and discussions and technical assistance.

Graduate school and Research Affairs, Chulalongkorn University, for research assistant grant.

Sincere thanks go to the staffs of the Department of Microbiology and the fellow students for providing facilities and encouragement. Finally, I am deeply indepted to my parents, brother and sisters for their love, concern, help, encouragement and understanding.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....i

ENGLISH ABSTRACT.....ii

ACKNOWLEDGEMENTS.....iii

CONTENTS.....iv

LIST OF TABLES.....v

LIST OF FIGURES.....vi

ABBREVIATIONS.....viii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II LITERATURE REVIEW

HISTORY.....4

ORGANISM.....5

EPIDEMIOLOGY.....5

CLINICAL FEATURES.....5

PATHOGENESIS.....6

LABORATORY DIAGNOSIS.....8

III MATERIALS AND METHODS.....20

IV RESULTS.....29

V DISCUSSION.....54

VI CONCLUSION.....58

REFERENCES.....59

APPENDIX I.....71

APPENDIX II.....74

APPENDIX III.....76

BIOGRAPHY.....79

LIST OF TABLES

Table — Page

I Mycoplasma species used for evaluation of the specificity of the PCR detection method.....27

II Bacterial species used for evaluation of the specificity of the PCR detection method.....28

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Oligonucleotide primers on P1 gene of *Mycoplasma pneumoniae* used for the detection of *M. pneumoniae* by PCR.....30
2. Nested oligonucleotide primers on P1 gene of *M. pneumoniae* used for the confirmation of PCR product of *M. pneumoniae*.....31
3. Effect of $MgCl_2$ concentration on yield of the amplified product.....34
4. Effect of *Taq* polymerase on yield of the amplified product.....35
5. Effect of the number of PCR cycles on the yield of the amplified product.....36
6. Determination of PCR sensitivity analysed by agarose gel electrophoresis.....37
7. Determination of PCR sensitivity analysed by agarose gel electrophoresis and dot blot hybridization.....38
8. Determination of PCR sensitivity, using nested primers and analysed by agarose gel electrophoresis.....39
9. Determination of PCR specificity tested with *Mycoplasma* species and analysed by gel electrophoresis and dot blot hybridization.....43
10. Determination of PCR specificity tested with other bacterial DNAs and analysed by gel electrophoresis and dot blot hybridization.....44
11. Determination of PCR specificity tested with human leukocytes DNAs and analysed by gel electrophoresis and dot blot hybridization.....45

Figure Page

12. The PCR results of using dUTP instead of dTTP in the PCR reaction.....46

13. Effect of $MgCl_2$ concentration on yield of the amplified product when concentration of dNTP was changed.....47

14. Determination of dU-PCR sensitivity analysed by gel electrophoresis and dot blot hybridization.....48

15. Determination of dU-PCR sensitivity, using nested primers and analysed by gel electrophoresis.....49

16. Determination of UNG ability.....50

17. Determination of dU-PCR specificity by testing with simulated samples analysed by gel electrophoresis and dot blot hybridization.....51

18. Determination of dU-PCR specificity by testing with simulated samples spiked with *M. pneumoniae* DNA, analysed by gel electrophoresis and dot blot hybridization....52

19. Determination of dU-PCR sensitivity in pooled simulated specimens, analysed by gel electrophoresis and dot blot hybridization.....53

ABBREVIATIONS

bp	base pair
° C	degree celsius
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
ddw, DDW	double distilled water
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside 5'-triphosphate
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
dUTP	deoxyuridine 5'-triphosphate
EIA	Enzyme Immunoassay
et al.	et alii
fg	femtogram
g	gram
xg	gravity (centrifugal force)
HCl	hydrochloric acid
hr	hour
hrs	hours
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
KCl	potassium chloride
M	molar
mg	milligram
$MgCl_2$	magnesium chloride

min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
ng	nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulphate
SSC	Saline Sodium Citrate
STE	Sodium Tris-EDTA buffer
TE	Tris-EDTA buffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
U	Unit
ug	microgram
ul	microliter
uM	micromolar
UV	Ultraviolet
V	Voltage
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume