Thesis Title Analysis of Group A Streptococcal M Protein Genes by Polymerase Chain Reaction

Author Ms. Piyaorn Samerwong

M.Sc. Microbiology

Examining Committee: Assistant Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn Chairman
Associate Prof. Dr. Niwat Maneekarn Member
Assistant Prof. Dr. Pichart Uparanukraw Member

Abstract

Group A streptococci (GAS) cause many serious and life-threatening infections. M protein is a major virulence factor and unique surface antigen in each M type of GAS. For the epidemiological study of GAS, M typing has been used worldwide. However, the serological method of M typing has some limitations of the sensitivity and variation of the test. More than 80% of GAS isolated from patients in Thailand are nontypable. Several methods have been tested to improve the M typing. However, there is no conclusion as to which is the most appropriate method for M typing. In order to compare the homology of the M protein genes (*emm* genes) of GAS isolated from Thailand which are nontypable by conventional method, the Polymerase Chain Reaction (PCR) was used in this study to amplify the *emm* genes from 21 GAS isolated from patients and 22 standard strains and then digested with a suitable restriction enzyme, *Mbo*I. The digested fragments were compared within the strains and correlated with the percent homology of N-terminal sequences of *emm* genes.

The Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method was also used to analyse the genomic DNA of these GAS.

The PCR products varied from 900 to 1,600 base pairs (bp) depending on the M types. These products were digested with various restriction enzymes, *Sal*I, *Hind*III, *Kpn*I, *Bgl*II, *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, and *Mbo*I. *Mbo*I can digest 37 out of 43 *emm* genes. The digested fragments of the PCR products from standard M types were different. In nontypable strains of GAS isolated from Thailand, the digested fragments could be categorized into 14 patterns. Sixteen of 18 pairs of GAS having more than 90% homology of N-terminal sequences of *emm* genes showed identical *Mbo*I digestion pattrens of the PCR products. On the contrary, those having less than 90% homology of the *emm* gene sequences showed totally different patterns of the digested fragments. The *Mbo*I digestion patterns correlated with the homology of chromosomal DNA by RFLP method. Analysis of GAS strains by *Mbo*I digestion of the PCR products is easy to perform and interpret and may provide a practical alternative way for genomic typing of GAS.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ยีนควบคุมการสร้าง M Protein ของเชื้อสเตรพโตคอคคัส กลุ่มเอ โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

ชื่อผู้เขียน นางสาว ปิยะอร เสมอวงศ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์: ผศ.ดร.สุมาลี พฤกษากร ประธานกรรมการ
รศ.ดร.นิวัตน์ มณีกาญจน์ กรรมการ
ผศ.นพ.พิชาติ อุปรานุเคราะห์ กรรมการ

บทคัดย่อ

เชื้อสเตรพโตคอคคัส กลุ่มเอ เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่ทำให้เกิดอาการรุนแรงและคุกคามชีวิตหลายโรค โดยมีปัจจัยก่อโรคที่สำคัญคือ โปรตีนเอ็ม(M protein) ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ และมีความจำเพาะในเชื้อสเตรพโตคอคคัส กลุ่มเอ แต่ละชนิด (M type) จึงมีการใช้ M protein นี้ในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อสเตรพโตคอคคัส กลุ่มเอ อย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตาม การแบ่งเชื้อโดยอาศัย M protein โดยวิธีการตรวจทางน้ำเหลือง (Serological method) ยังมีข้อจำกัดในด้านความไวและความไม่แน่นอนของการตรวจ และพบว่าเชื้อ สเตรพโตคอคคัส กลุ่มเอ ที่แยกได้จากประเทศไทยมากกว่าร้อยละ 80 ไม่สามารถจัดแบ่งได้โดยวิธีนี้ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการแบ่งชนิดของเชื้อสเตรพโตคอคคัส กลุ่มเอ โดยอาศัย M protein หลายวิธีด้วยกัน แต่ยังไม่พบข้อสรุปว่าวิธีใดเหมาะสมที่สุด เพื่อที่จะศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนกันของยีนที่ควบคุมการสร้าง M

protein (*emm* gene) จากเชื้อสเตรพโตคอคคัส กลุ่มเอ ที่แยกจากประเทศไทย และเป็นเชื้อที่ไม่สามารถจัดแบ่งได้ ตามวิธีมาตรฐานนี้ ในการศึกษานี้ จึงใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณ *emm* gene จากเชื้อสเตรพโตคอคคัส กลุ่มเอ ที่แยกจากผู้ป่วยจำนวน 21 สายพันธุ์ และจากเชื้อมาตรฐาน จำนวน 22 สายพันธุ์ นำยีนที่เพิ่มจำนวนได้ (PCR product) มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease enzyme) ที่เหมาะสม คือ เอ็นไซม์ *Mbo*I จากนั้นนำชิ้นส่วนของยีนที่ถูกตัดมาเปรียบเทียบกันในระหว่างเชื้อที่นำมาทดสอบ และนำไปหาความสัมพันธ์กับค่าร้อยละของความเหมือนกันทางด้าน N-terminus ของ *emm* gene ทำการวิเคราะห์โครโมโซมของเชื้อ สเตรพโตคอคคัส กลุ่มเอ โดยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ร่วมด้วย

PCR product ที่ได้มีขนาดต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 900 จนถึง 1,600 คู่เบส (bp) ทั้งนี้ขึ้นกับ ชนิดของเชื้อตาม M type จากการตัด PCR product เหล่านั้นด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะหลายตัวคือ *Sal*I, *Hind*III, *Kpn*I, *Bgl*II, *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI และ *Mbo*I พบว่าเอ็นไซม์ *Mbo*I สามารถตัด *emm* gene ของเชื้อ 37 สายพันธุ์ จาก 43 สายพันธุ์ที่ทำการทดลอง เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ต่าง M type กัน ถูกตัดได้แตกต่างกัน ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถแบ่งได้ตามวิธีมาตรฐาน ที่แยกได้จากประเทศไทย สามารถจัดแบ่งรูปแบบของยีนที่ถูกตัดได้เป็น 14 รูปแบบ เชื้อคู่ที่มี *emm* gene ทางด้าน N-termius เหมือนกัน มากกว่าร้อยละ 90 จำนวน 16 คู่ จาก 18 คู่ จะให้รูปแบบของยีนที่ถูกตัดเหมือนกัน แต่เชื้อคู่ที่มี *emm* gene ด้าน N-termius เหมือนกันน้อยกว่าร้อยละ 90 พบว่าให้รูปแบบของยีนที่ถูกตัดต่างกันทั้งหมด ซึ่งสัมพันธ์กับความเหมือนกันของโครโมโซมของเชื้อที่ศึกษาโดยวิธี RFLP การใช้เทคนิค PCR และการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo*I เป็นวิธีการที่ทำและแปลผลได้ง่าย และอาจเป็นทางเลือกในการจัดแบ่งเชื้อสเตรพโตคอคคัส กลุ่มเอ โดยอาศัยสารพันธุกรรมได้