การศึกษาดีเอนเอของไรโบโซมในหนอนพยาธิฟิลาเรียโดยวิธีพีซีอาร์อาร์เอฟแอลพี

นางสาว ทรงพรรณ แสงประการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1736-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STUDY OF RIBOSOMAL DNA IN FILARIAL NEMATODES BY PCR-RFLP

Miss Songpun Sangprakarn

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science
Program of Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2001

ISBN 974-03-1736-7

Thesis Title	STUDY OF RIBOSOMAL DNA IN FILARIAL NEMATODES BY PCR-RFLP
By	Miss Songpun Sangprakarn
Department	Medical Science
Thesis Advisor	Associate Professor Surang Nuchprayoon, M.D., M.P.H., Ph.D.
Thesis Co-advisor	Professor Yong Poovorawan, M.D.
	Associate Professor Suwannee Nithiuthai, D.V.M., M.V.Sc., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

.....Dean of Faculty of Medicine
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Vilai Chintanez, M.D., Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Surang Nuchprayoon, M.D., M.P.H, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Professor Yong Poovorawan, M.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Suwannee Nithiuthai, D.V.M., M.V.Sc., Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทรงพรรณ แสงประการ : การศึกษาดีเอนเอของไรโบโซมในหนอนพยาธิฟิลาเรียโดยวิธีพีซีอาร์อาร์เอฟแอลพี (STUDY OF RIBOSOMAL DNA IN FILARIAL NEMATODES BY PCR-RFLP) อ.ที่ปรึกษา: รศ.พญ.ดร. สุรางค์ นุชประยูร, อ. ที่ปรึกษา (ร่วม) : ศ.นพ. ยง ภู่วรวิรรณ, รศ.สพ.ญ.ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย,**43** หน้า. ISBN 974-03-1736-7

การแยกสปีชีส์ของหนอนพยาธิในกลุ่มฟิลาเรียจะใช้การย้อมสี Giemsa และการย้อมสีแบบพิเศษเพื่อทดสอบ acid phosphatase activity ของตัวอ่อนในระยะไมโครฟิลาเรียเป็นเกณฑ์ ซึ่งทั้งสองวิธีนี้ตัวอย่างเลือดที่ใช้ไม่ควรเก็บไว้นานเกินไป และต้องการผู้ที่มีความชำนาญสูงในการแยกสปีชีส์ ดังนั้นจึงได้มีการนำวิธี PCR-RFLP มาประยุกต์ใช้ในการแยกสปีชีส์ของหนอนพยาธิฟิลาเรียในบริเวณไรโบโซมอลดีเอนเอ เนื่องจากหนอนพยาธิฟิลาเรียที่นำมาศึกษาซึ่งได้แก่ *Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, B. pahangi* และ *Dirofilaria immitis* มีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกัน ดังนั้นวิธี PCR-RFLP จึงมีประโยชน์ในการแยกสปีชีส์ โดยทำการเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอนเอบริเวณ ITS1 และ ITS2 ของหนอนพยาธิฟิลาเรีย ซึ่งบริเวณ ITS1 จะถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonucleases) *Acc* I, *Ase* I หรือ *Hinf* I ส่วนบริเวณ ITS2 จะถูกตัดด้วย *Ase* I หรือ *Rsa* I พบว่าการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณ ITS1 ด้วย *Ase* I สามารถแยก *W. bancrofti, B. malayi, B. pahangi* และ *D. immitis* ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และไม่พบความแตกต่างของรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายในสปีชีส์เดียวกันของหนอนพยาธิฟิลาเรียในโฮสต์ที่ต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักสูตร วิทยาศาสตร์การแพทย์
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต.....ทรงพรรณ แสงประการ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

417 52175 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS: RIBOSOMAL DNA / FILARIAL NEMATODES / PCR-RFLP

SONGPUN SANGPRAKARN: STUDY OF RIBOSOMAL DNA IN FILARIAL NEMATODES BY PCR-RFLP. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SURANG NUCHPRAYOON, M.D., M.P.H., Ph.D., THESIS COADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., ASSOC. PROF. SUWANNEE NITHIUTHAI, D.V.M., M.V.Sc., Ph.D., 43 pp. ISBN 974-03-1736-7

The methods used for species differentiation of filarial nematodes are Giemsa stain and acid phosphatase activity. Although both methods are practical, they require fresh samples to perform. They also require an expert to examine. Polymerase chain reaction-linked restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) may be an alternative method for closely-related species differentiation that limits in morphology identification. Thus, the application of PCR-RFLP was used to study the polymorphism among of ribosomal DNA regions (rDNA) filarial species. This study was covered four species of filarial nematodes: *Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, B. pahangi* and *Dirofilaria immitis.* The first and second internal transcribed spacers (ITS1 & ITS2) of rDNA were selected to amplified and digested with restriction endonucleases separately: *Acc* I, *Ase* I or *Hinf* I for ITS1 region; *Ase* I or *Rsa* I for ITS2 region, respectively. In this study, the restriction patterns of ITS1 with *Ase* I could be used to distinguish filarial nematodes, *W. bancrofti, B. malayi, B. pahangi* and *D. immitis,* from one another. There were no variation detected in ITS1 and ITS2 RFLP patterns within the same filarial species although examined from the different hosts. This approach could be a useful tool for species differentiation in filarial nematodes.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study Medical Science
Academic year 2001

Student's signature.....Songpun Sangprakarn.....
Advisor's signature.....Surang Nuchprayoon.....
Co-advisor's signature.....Yong Poo-.....
Co-advisor's signature.....S. Nithiuthai.....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to Associate Professor Dr. Surang Nuchprayoon, my advisor for her valuable advice, guidance, understanding and intellectual inspiration throughout my study and during the preparation of this study. I also would like to express my gratefulness to my co-advisors, Professor Yong Poovorawan and Associate Professor Dr. Suwannee Nithiuthai for their constructive critism and valuable suggestions and especially their encouragement. They are always kind and helpful.

My grateful appreciation is extended to Associate Professor Dr. Vilai Chintanez for serving as my Committee and for her valuable discussion and suggestions. I also would like to extend my appreciation to Associate Professor Dr. Apiwat Mutirangura for his helpful suggestion on laboratory technique and for his serving as my thesis committee.

I am really thankful to Dr. Saravudh Suvannadabba, Dr. Suvith Thampaolo, Ms. Kobkarn Kanjanopas, Ms. Sumas Loymak and officers at Filariasis Division and regional officers. I wish to express my special thanks to Ms. Sudchit Chungpivat, staffs at Parasitology Unit, Department of Pathology, Faculty of Veterinary, and staffs at Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their kind assistance. I also wish to express my appreciation to Ms. Benjawan Sichnasai and her colleagues from Rabies Control Section, Bangkok Metropolitans for their generous assistance.

I feel deeply indebted to Mr. Arkhom Sai-ngam, Ms. Suwanna Noppornpan, Ms. Sunee Sirivichayakul, Ms. Vivornpun Sanprasert, Ms. Montamas Suntravat and Ms. Woraporn Sukhumawasi for their assistance, sincerity and friendship, which will be an everlasting memory. Specials thanks to staffs, scientists and graduate students in Hepatitis Research Unit, Oncology Unit, Snake Venom Project and Elephantiasis Research Unit for their help and encouragement. If I lacked them, this work would not be accomplished.

I would like to thank venerable Dr. Mettanando Bhikkhu of Wat Rajaorasaram, Bangkok, Ms. Pisanee Saikalin and Ms. Apiradee Theamboonlers for editing this thesis. This thesis was partially supported by Affairs Thesis grants for graduate students in Public Universities, Graduate school, Chulalongkorn University, and the Thailand Research Funds, Senior Research Scholar to Professor Yong Poovorawan.

Finally, I will not forget to give special thanks to my lovely family and my friends, whose names cannot be fully listed, for their support during my graduate study and their understanding all the time; thank you very much.

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

TABLE OF CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

LIST OF ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I. INTRODUCTION

- Background and Rationale.....1
- Research Questions.....5
- Limitation of the study.....5
- Objective of this research.....5
- Key words.....5
- Expected Benefits and Applications.....5
- Research Methodology.....6
- Administration and Time Schedule.....6

II. LITERATURE REVIEW

- Lymphatic filariasis.....7
- Signs and symptoms of lymphatic filariasis.....7
- Diagnosis of lymphatic filariasis.....10
- Ribosomal RNA gene in organisms.....10
- Species differentiation with rDNA.....11
- Polymorphism detection assays.....13

III. MATERIALS AND METHODS

1. Materials.....15
   - Population study.....15
   - Collecting specimen.....15

2. Methods.....15
- Giemsa stain.....15
- Histochemical stain for acid phosphatase activity of microfilariae....16
- Extraction of filarial DNA from blood sample.....16
- DNA purification.....16
- Oligonucleotide primers.....17
- Semi-nested PCR amplification.....19
- PCR product precipitation.....20
- Restriction fragment length polymorphism (RFLP).....20
- Agarose gel electrophoresis.....21

IV. RESULTS
- Identification of filarial parasites.....22
- PCR products of ITS1 and ITS2.....22
- Restriction fragment length polymorphism analysis.....24

V. DISCUSSION AND CONCLUSION.....28
REFERENCES.....31
APPENDIX.....39
APPENDIX.....40
BIOGRAPHY.....43

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table page

1. Administration and time schedule.....6
2. Restriction enzymes with their recognition sites, recommended buffer and manufacturer.....34

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure page

1. Distribution of lymphatic filariasis.....2
2. Geographic distribution of lymphatic filariasis in Thailand.....3
3. Life cycle of lymphatic filarial parasites.....8
4. Organization of the genes for 18S, 5.8S, and 28S ribosomal RNA.....12
5. Schematic representation of the rDNA unit showing regions where forward and reverse primers were designed for use in PCR.....18
6. PCR products of filarial ITS1 and ITS2 23
7. PCR-RFLP analysis of filarial ITS1 PCR products digested by *Acc* I 25
8. PCR-RFLP analysis of filarial ITS1 PCR products digested by *Ase* I.....26
9. PCR-RFLP analysis of filarial ITS2 PCR products digested by *Ase* I.....27

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pair
°C	Degree Celcius
cm	Centimeter
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
g	Gram
HCl	Hydrochloric acid
ITS1	First internal transcribed spacer
ITS2	Second internal transcribed spacer
Kb	Kilobase
mg	Milligram
$MgCl_2$	Magnesium chloride
mL	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction linked Restriction Fragment Length Polymorphism
rDNA	Ribosomal DNA
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Round per minutes
rRNA	Ribosomal RNA
UV	Ultraviolet
µg	Microgram
µL	Microliter
V	Volt
WHO	World Health Organization

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย