STUDY OF HEMOLYSIN BL HETEROGENEITY IN *BACILLUS CEREUS* ISOLATED IN THAILAND

SUWICHA THAENTHANEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004

ISBN 974-04-5372-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาความแตกต่างของสารพิษ hemolysin BLที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus cereus* ที่แยกได้ในประเทศไทย (STUDY OF HEMOLYSIN BL HETEROGENEITY OF *BACILLUS CEREUS* ISOLATED IN THAILAND)

สุวิชา แทนธานี 4236967 SCBT/D

ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D.Eng., อภิญญา อัศวนิก, Ph.D., ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D., สุมาลี ตั้งประดับกุล, Ph.D.

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาการมีอยู่ของยีนที่ผลิตสารพิษ hemolysin BL ในเชื้อ *Bacillus cereus* จำนวน 339 สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยโดยใช้วิธี PCR สารพิษดังกล่าวประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด L_2, L_1, และ B ซึ่งสร้างจากยีน *hblC, hblD* และ *hblA* ตามลำดับ การศึกษาพบยีนทั้งสามในเชื้อจำนวน 222 สายพันธุ์ (65.5%) และพบว่าเชื้อสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงของแกะในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นรูปแบบ discontinuous hemolysis (DH) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ hemolysin BL สิ่งที่น่าสนใจคือเชื้อห้าสายพันธุ์ที่แสดง DH มีเพียงยีน *hblC* เท่านั้นที่สามารถตรวจพบได้ อย่างไรก็ตาม การใช้คู่ primer FHC-RHA_2 ให้ผลบวกโดยได้ PCR product ขนาด 2.82 kb และการตัดชิ้นยีนดังกล่าวด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II พบว่าได้ 5รูปแบบที่ได้มีความแตกต่างจากรูปแบบที่ได้จากสายพันธุ์อ้างอิง ได้ตรวจสอบการผลิตโปรตีน B, L_1, และ L_2 โดยวิธี Western blot analysis พบว่า เชื้อสามสายพันธุ์ (SS-00-15, F-00-25 และ NR-01-49) ผลิตโปรตีนทั้งสามชนิด ที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ F837/76 ในขณะที่หนึ่งสายพันธุ์ (TG-00-06) ให้ผลลบกับแอนติบอดีทั้งสามชนิด และหนึ่งสายพันธุ์ (TG-00-14) ให้ผลลบเฉพาะกับโปรตีน L_2 การตรวจหาโปรตีน L_2 ยังได้ทำโดยใช้ชุดตรวจสอบ RPLA kit พบว่าเชื้อที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดีทั้งสามชนิดได้ให้ผลบวกที่ titer > 64 ต่อการทดสอบ ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ TG-00-06 และ TG-00-14 ให้ผลบวกที่ titer 16 และ 32 ซึ่งเป็นผลบวกในระดับต่ำ จากการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่ได้จากการอ่านลำดับเบส พบว่าโปรตีน L ทั้งสองชนิดมีส่วนเหมือนกับโปรตีน L ของสายพันธุ์อ้างอิงประมาณ 72-77% ในขณะที่โปรตีน B มีความเหมือนประมาณ 84% การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *hbl* ทั้งสามยีนที่ได้จากเชื้อทั้งห้าสายพันธุ์กับยีนของสายพันธุ์อ้างอิงสองสายพันธุ์ พบว่าบริเวณที่จับกับ primer ในยีนของสายพันธุ์ทั้งห้ามีความแตกต่างจากในสายพันธุ์อ้างอิง เป็นผลให้ได้ผลลบในการทำ PCR กับทั้งห้าสายพันธุ์ จึงได้ออกแบบ primer ชุดใหม่ขึ้น (FHC_2-RHC_2, FHD-RHD_2, และ FHA_3-RHA_3 สำหรับตรวจหา *hblC*, *hblD* and *hblA* ตามลำดับ) โดยเลือกจากลำดับเบสที่ conserved ในทั้งเจ็ดสายพันธุ์ และพบว่าให้ผลบวกอย่างจำเพาะเจาะจงกับทั้งสามยีนในการทำ PCR ในเชื้อที่ให้ผลบวกกับ DH Western blot หรือ RPLA อย่างใดอย่างหนึ่ง

175 หน้า ISBN 974-04-5372-4

STUDY OF HEMOLYSIN BL HETEROGENEITY OF *BACILLUS CEREUS* ISOLATED IN THAILAND

SUWICHA THAENTHANEE 4236967 SCBT/D

Ph.D. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: WATANALAI PANBANGRED, D.Eng., APINYA ASSAVANIG, Ph.D., CHUENCHIT BOONCHIRD, Ph.D., SUMALEE TUNGPRADUBKUL, Ph.D.

ABSTRACT

The presence of hemolysin BL (HBL; components L_2, L_1, and B) encoding genes (*hblC, hblD and hblA*) from 339 *Bacillus cereus* strains isolated in Thailand was determined. PCR analysis showed that all three *hbl* genes were detected in 222 strains (65.5%). Among those strains in which all three *hbl* genes were detected, 210 (61.9%) displayed a discontinuous hemolysis (DH) characteristic of HBL producers, while 12 (3.5%) showed a continuous hemolytic (CH) pattern on sheep blood agar. Interestingly, five strains where only *hblC* was detected showed a DH. The *Hpa*II restriction profiles of 2.82 kp PCR fragments amplified from the *hblC-A* region in these five strains using *hblC* forward (FHC) and *hblA* reverse (RHA_2) primers displayed five heterogeneous patterns, which indicated sequence variation. Western blot analysis using polyclonal antibodies (Pab) raised against HBL components purified from strain F837/76 showed that three of the five strains produced all three components whereas strain TG-00-06 did not show any signal for any components and TG-00-14 was negative for L_2. By using Oxoid RPLA test which is specific to L_2, three strains gave high titers (>64) whereas the strains TG-00-06 and TG-00-14 showed lower titers of 16 and 32, respectively. The heterogeneity of *hbl* operons of those five strains was determined by sequencing of the PCR fragments. The deduced amino acid sequences of two lytic components (L_1 and L_2) showed 72-77% identity while binding components (B) showed 84% identity compared to those of reference strains. The comparisons of *hbl* operons in the five strains revealed the sequence variation at the primer binding sites such that the primers cannot anneal. A new set of PCR primers (FHC_2-RHC_2, FHD-RHD_2, and FHA_3-RHA_3 for *hblC*, *hblD* and *hblA*, respectively) was developed from the conserved regions in *hbl* operons of seven *B. cereus* strains.

The data show that HBL-encoding genes are prevalent among *B. cereus* isolated in Thailand and there is a high degree of heterogeneity in both the genes and proteins. Using new set of primers designed, all isolates which are positive by DH, Western blot analysis, or RPLA assay were all positive for three *hbl* genes by PCR. The results indicated the high specificity of these new set of primers for *hbl* genes of *B. cereus*.

KEY WORDS: HEMOLYSIN BL / *BACILLUS CEREUS* / HETEROGENEITY / PCR /
175 P. ISBN 974-04-5372-4