CLONING, SEQUENCING AND CYTOTOXICITY ASSAYS OF ENTEROTOXIN FM GENE FROM *BACILLUS CEREUS* ISOLATED FROM VARIOUS FOOD SOURCES

NUDJAREE BOONCHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005

ISBN 974-04-5782-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การโคลน, การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และการทดสอบความเป็นพิษของยีน Enterotoxin FM ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากอาหาร (CLONING, SEQUENCING AND CYTOTOXICITY ASSAYS OF ENTEROTOXIN FM GENE FROM *BACILLUS CEREUS* ISOLATED FROM VARIOUS FOOD SOURCES)

นุจรี บุญชัย 4136388 PYBS/D

ปร.ด. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์, ปร.ด. (จุลชีววิทยา), เบญจมาส ถนอมทรัพย์, ปร.ด. (จุลชีววิทยา), มัลลิกา ชมนาวัง, ปร.ด. (จุลชีววิทยา),

บทคัดย่อ

เชื้อ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นสองชนิดคือ ชนิด emetic ที่ก่อให้เกิดอาการอาเจียน และชนิด diarrheal ที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสีย ในชนิด diarrheal พบว่ามีสาเหตุมาจาก enterotoxin ซึ่งเป็นสารพิษจากแบคทีเรีย โดยได้มีการจำแนก enterotoxin ที่สร้างจากเชื้อ *B. cereus* เป็น 5 ชนิด ได้แก่ hemolysinBL (HBL), non-hemolysin (NHE), Cytotoxin K (Cyt K), enterotoxin T (bceT) และ enterotoxin FM (entFM) ใน enterotoxin 3 ชนิดแรกได้มีการศึกษาและรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดอาหารเป็นพิษ สำหรับ enterotoxin T มีรายงานว่าอาจจะไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง และ enterotoxin FM นั้นยังไม่มีการรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้อง

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการศึกษาเชื้อ *B. cereus* จำนวน 11 ตัวอย่างที่แยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ รวมทั้งสายพันธ์มาตรฐาน ATCC 14579 โดยได้ทำการตรวจหายีน *ent* FM โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ซึ่งมีขนาดความยาว 1.2 กิโลเบส จากการทดลองพบว่า เชื้อ *B. cereus* ทั้ง 11 ตัวอย่างสามารถตรวจพบยีน *ent* FM จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน *ent*FM ทั้ง 11 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกัน 90-99 % โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการรายงานไว้ใน GenBank และพบลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำ (Repeating sequence) คือ “TCAAAC” ซึ่งคาดว่าลำดับเบสซ้ำนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษต่อเซลของ enterotoxin FM

ทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ ของ enterotoxin ที่ได้จาก crude supernantant ของเชื้อ *B. cereus* ทำการทดสอบในสภาวะที่มีและไม่มีแอนติ้บอดี้ของ enterotoxin HBL, NHE และ ent FM โดยทดสอบความเป็นพิษต่อ Vero cell พบว่าทุกตัวอย่างสามารถตรวจพบ enterotoxin NHE ในขณะที่ 3 ตัวอย่างสามารถตรวจพบ enterotoxin FM จากผลที่ได้เป็นข้อบ่งชี้ว่า enterotoxin FM มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ และความรุนแรงของความเป็นพิษของ enterotoxin ชนิดนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

144 หน้า ISBN 974-04-5782-7

CLONING, SEQUENCING AND CYTOTOXICITY ASSAYS OF ENTEROTOXIN FM GENE FROM *BACILLUS CEREUS* ISOLATED FROM VARIOUS FOOD SOURCES

NUDJAREE BOONCHAI 4136388 PYBS/D

Ph.D. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISORS: CHANPEN WIWAT, Ph.D. (Microbiology), BANJAMAS THANOMSUB, Ph.D. (Microbiology), MULLIKA CHOMNAWANG, Ph.D. (Microbiology)

ABSTRACT

Bacillus cereus is a food borne pathogen which causes two types of foodborne illness: the emetic type and diarrheal type. The diarrheal type resulting in diarrhea is caused by enterotoxins. At present, five different enterotoxins have been described from various strains of *B. cereus*, hemolysin BL (HBL), non–hemolytic enterotoxin (NHE), cytotoxin K (Cyt K), enterotoxin T (bceT) and enterotoxin FM. The first three enterotoxin(HBL, NHE and Cyt K) have all been proven to be involved in food poisoning and enterotoxin T has been reported but probably does not contribute, while the last one (ent FM) is still unclear.

In this study, eleven *B. cereus* strains isolated from various food sources were assessed for the presence of *ent* FM. The polymerase chain reaction of this gene generated the 1.2 kb PCR fragment of *ent* FM in all *B. cereus* isolates. The 1.2 kb fragment of *ent* FM of *B. cereus* isolate strains were cloned, sequenced and compared with published sequences. The results showed that nucleotide sequences of all tested isolates were homologous within investigated isolates and published strains (*B .cereus* Ae10, *B. cereus* Cx5 and *B. cereus* FM1) and the percentage of sequence homology was 90-99 %. Interestingly, the investigation demonstrated the *ent* FM gene in some isolates have repeating sequences “TCAAAC” which probably correlated with a cytotoxicity activity of enterotoxin FM of *Bacillus* strains.

The biological activities of crude supernatants with and without antibodies against HBL, NHE and ent FM enterotoxins were tested using Vero cell assay. A test for cytotoxic activity revealed that eleven and three of *B. cereus* strains were positive for NHE enterotoxin and for ent FM enterotoxin, respectively. This is the first evidence indicating that ent FM enterotoxin from *B. cereus* involved in foodborne illness and degree of cytotoxicity depends on the bacterial strain.

KEY WORDS: *BACILLUS CEREUS*/ ENTEROTOXIN FM/ FOOD POISONING / CYTOTOXICITY/ SEQUENCING

144 P. ISBN 974-04-5782-7