



11 MAY 1992

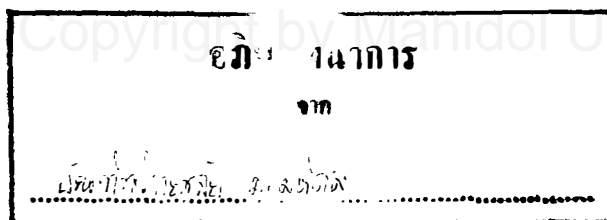
CHARACTERIZATION OF CONJUGATION-LIKE  
GENE TRANSFER PROCESS IN *BACILLUS THURINGIENSIS*  
SUBSPECIES *ISRAELENSIS*

CHANPEN WIWAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MICROBIOLOGY)

IN  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY

1991



18818

ชื่อวิทยานิพนธ์      คุณสมบัติของขบวนการถ่ายทอควีนโดยวิธี Conjugation-like ใน *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*

ผู้วิจัย              จันทรทิพย์ วิวัฒน์

ปริญญา              วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D.

สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา, Ph.D.

วัฒนาลัย บานบ้านเกร็ด, D. Eng.

ศกรณ์ มงคลสุข, Ph.D.

สกล พันธุ์เยี่ยม, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา

29 ตุลาคม พ.ศ. 2534

#### บทคัดย่อ

จากการศึกษาการถ่ายทอควีนส์โดยกระบวนการ Conjugation-like โดยวิธี broth mating พบว่าเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* สายพันธุ์ A084-16-194 สามารถส่งถ่ายพลาสมิด pBC16 และ pC194 ไปยัง *B. thuringiensis* สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวนทั้งหมด 25 subspecies อัตราการถ่ายทอพลาสมิดอยู่ในช่วง  $1.1 \times 10^{-9}$  ถึง  $9.8 \times 10^{-5}$  นอกจากนี้ยังพบว่าการถ่ายทอโครโมโซมใน *B. thuringiensis* จำนวน 10 subspecies จากทั้งหมด 25 subspecies ที่ได้ทำการทดลอง อย่างไรก็ตามอัตราการถ่ายทอโครโมโซมมีอัตราการถ่ายทอต่ำมาก ( $4.3 \times 10^{-9}$  ถึง  $3.7 \times 10^{-7}$ ) การถ่ายทอพลาสมิดภายใน subspecies เดียวกัน 8 คู่ พบว่าอัตราการถ่ายทอพลาสมิดสูงกว่าการถ่ายทอพลาสมิดระหว่าง subspecies จากผลการทดลองบ่งชี้ว่าความสามารถในการถ่ายทอพลาสมิดระหว่าง subspecies เหล่านี้ไม่ได้ขึ้นต่อการดำรงอยู่ของพลาสมิดเฉพาะชนิดหนึ่งชนิดใด และยังไม่ได้ขึ้นต่อรูปแบบของพลาสมิดทั้งในเซลล์ตัวให้และตัวรับด้วย

ปรากฏการณ์การเกาะกลุ่มระหว่างเซลล์ 2 ชนิดของเชื้อ *B. thuringiensis* อย่างจำเพาะ ทำให้สามารถจำแนกเชื้อ *B.t.i* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ทำการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (4Q2) และ กลุ่มที่ 2 (4Q272 และ c4Q272)

การถ่ายทอดพลาสมิด pBC16 ระหว่างสายพันธุ์ A084-16-194 และ c4Q272 สามารถถูกยับยั้งได้โดย 0.2 mM EDTA, 0.25 M MgCl<sub>2</sub>, 0.5 M MgSO<sub>4</sub> และ 0.05 M CaCl<sub>2</sub> และสารเคมีเหล่านี้ในความเข้มข้นเดียวกันสามารถลดปริมาณ (EDTA และ MgCl<sub>2</sub>) หรือยับยั้ง (MgSO<sub>4</sub>) การเกาะกลุ่มของเซลล์ได้อีกด้วย

นอกเหนือจากการเกาะกลุ่มของเซลล์อย่างจำเพาะแล้ว ยังพบอีกว่าเชื้อสายพันธุ์ในกลุ่มที่ 1 (4Q2) คือต่อยาเพนิซิลลินมาก นั่นคือสายพันธุ์ 4Q2 มีค่า MIC 12.5 มก. โดยที่สายพันธุ์ในกลุ่มที่ 2 (4Q272 และ c4Q272) มีความไวต่อยาเพนิซิลลินมากโดยมี MIC 0.06 และ 0.03 มก. ตามลำดับ

ในการสกัดโปรตีนจากเชื้อ *B.t.i.* สายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วย 6 M urea พบว่ามีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจากเชื้อสายพันธุ์ 4Q2 ซึ่งไม่พบในสายพันธุ์ 4Q272 และ c4Q272 จึงคาดหมายว่าเป็น S-layer protein จึงได้เตรียมแอนติบอดีต่อ S-layer protein นั้น เพื่อใช้ทดสอบหาตำแหน่งของ S-layer protein บนเชื้อ *B.t.i.* โดยวิธี indirect immunofluorescent ความจำเพาะของแอนติบอดีที่เตรียมได้นี้ทำการทดสอบยืนยันโดยวิธี Immunodiffusion และ Western blot

แอนติบอดีต่อ S-layer protein ของ 4Q2 สามารถยับยั้งการถ่ายทอดพลาสมิด โดยกระบวนการ conjugation-like ระหว่าง *B.t.i.* สายพันธุ์ 4Q2-16 และ c4Q272 โดยอัตราการถ่ายทอดพลาสมิด pBC16 ลดลงจาก  $9.7 \times 10^{-6}$  เป็นน้อยกว่า  $1 \times 10^{-8}$  เมื่อไม่มีและมีแอนติบอดีต่อ S-layer protein ของสายพันธุ์ 4Q2 และแอนติบอดีนี้ยังทำให้อัตราการถ่ายทอดพลาสมิด pBC16 โดยกระบวนการ conjugation-like ระหว่าง *B.t.i.* สายพันธุ์ A084-16-194 และ c4Q272 ลดลงด้วย โดยที่อัตราการถ่ายทอดพลาสมิดจะลดลงจาก  $2.2 \times 10^{-5}$  เป็น  $1.2 \times 10^{-6}$  เมื่อไม่มีและมีแอนติบอดีตามลำดับ

ได้ทำการขยายยีนส์ที่ควบคุมการสร้าง S-layer protein จาก *B.t.i.* สายพันธุ์ 4Q2 โดยใช้ pBluescriptKS และ pUC12 เป็นดีเอ็นเอพาหะแล้ว transform เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  จากนั้นจึงใช้แอนติบอดีต่อ S-layer protein เป็นสารทดสอบ ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีนส์ควบคุมการสร้าง S-layer protein 3 โคลน ได้แก่ pAC1, pAC2 และ pAC3 จากนั้นได้ทำการ subcloned พลาสมิดลูกผสม pAC1 ต่อไปจนได้ pAC11, pAC111 และ pAC112 ตามลำดับ และได้ทดสอบโปรตีนที่ควบคุมการสร้างโดยยีนส์ขนาดต่าง ๆ ด้วยวิธี Western blot

ทำการทดสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง S-layer protein ขนาด 1.5 กิโลเบสที่อยู่ในพลาสมิดลูกผสม pAC111 โดยวิธี dideoxy chain-termination จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถชี้บ่งตำแหน่งที่น่าจะเป็น initiation codon, -10, -35 และ Shine-Dalgarno sequence

ในการทำ Southern blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอขนาด 5.2 กิโลเบสจาก pAC111 ติดฉลากด้วยไบโอดีเอ็นเอตรวจสอบได้บ่งชี้ว่ายีนที่ควบคุมการสร้าง S-layer protein อยู่บนโครโมโซมของ *B.t.i.* สายพันธุ์ 4Q2, 4Q272 และ c4Q272

Thesis Title: Characterization of Conjugation-like Gene Transfer Process in *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*

Name: Chanpen Wiwat

Degree: Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee:

Amaret Bhumiratana, Ph.D.

Somsak Pantuwatana, Ph.D.

Watanalai Panbangred, D.Eng.

Skorn Mongkolsuk, Ph.D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Date of Graduation:

29 October B.E. 2534 (1991)

#### ABSTRACT

The plasmids pBC16 and pC194 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains A084-16-194 were transferred to 25 subspecies of *B. thuringiensis* by a conjugation-like process using broth mating technique. The frequencies of transfer varied considerably between different mating pairs, ranging from  $1.1 \times 10^{-9}$  to  $9.8 \times 10^{-5}$ . Additionally, chromosomal transfer could also be demonstrated in ten *B. thuringiensis* subspecies with very low frequencies ( $4.3 \times 10^{-9}$  to  $3.7 \times 10^{-7}$ ). The matings within a group of eight subspecies gave higher frequencies of transfer than the matings between the subspecies indicating that the frequencies of transfer was higher in

the intrasubspecific than the intersubspecific transfers. The results indicated that the capability to transfer plasmids among these various subspecies did not depend on the presence of specific plasmids nor specific plasmid patterns in either donor or recipient cells.

The cell clumping phenomena appeared to be specific between certain pairs of *B. thuringiensis*. Among few strains being tested, wild type strain 4Q2 and its cured strains 4Q272 and c4Q272, clumping could be divided into two groups i.e. clumping group I (4Q2) and clumping group II (4Q272 and c4Q272).

The transfers of pBC16 plasmid from strain A084-16-194 into strain c4Q272 were found to be inhibited by 0.2 mM EDTA, 0.25 M  $MgCl_2$ , 0.5 M  $MgSO_4$  and 0.05 M  $CaCl_2$ . These chemicals, at the same concentrations, could be demonstrated to reduce (EDTA and  $MgCl_2$ ) or inhibit ( $MgSO_4$ ) the extent of clumping between strain A084-16-194 and c4Q272.

Beside the clumping phenomena, it was also found that strain in clumping group I (4Q2) possessed high level of penicillin G resistance. Strain 4Q2 was resistant to penicillin G at MIC of 12.5 mg, but strains in clumping group II (4Q272 and c4Q272) were quite susceptible to penicillin G with MIC of 0.06 and 0.03 ug, respectively.

Extraction of S-layer protein by treatment with a 6 M urea indicated that there appeared to be extra-high molecular weight protein in the extracts obtained from

*B.t.i.* strain 4Q2. This protein band was found to be absent in strains 4Q272 and c4Q272. The antibody toward this S-layer protein was prepared and used for locating of S-layer protein on *B.t.i.* cell by using indirect immunofluorescent technique. Immunodiffusion reaction and Western blot analysis confirmed the specificity of the anti-S-layer protein antibody.

It was found that the antibody against 4Q2 S-layer protein inhibited the plasmid transfer via the conjugation-like process between *B.t.i.* strain 4Q2-16 and c4Q272. The frequencies of transfer of pBC16 plasmid was found to reduce from  $9.7 \times 10^{-6}$  to less than  $1 \times 10^{-8}$  in the absence and presence of anti 4Q2-S-layer protein antibody, respectively. This antibody could also found to reduce the frequencies of transfer of pBC16 plasmid via conjugation-like process between *B.t.i.* strain A084-16-194 and c4Q272. The frequencies of transfer between the two latter strains were found to reduce from  $2.2 \times 10^{-5}$  to  $1.2 \times 10^{-6}$  in the absence and presence of the antibody, respectively.

Using antibody detection technique, S-layer protein gene from *B.t.i.* strain 4Q2 was cloned in pBluescriptKS and pUC12 of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Three positive clones namely pAC1, pAC2 and pAC3, containing the genes encoding for the S-layer protein were obtained. The pAC1 clone was subsequently subcloned to pAC11, pAC111 and pAC112. The presence of gene product was confirmed by using Western blot analysis.

The 1.5 kb fragment of the pAC111 plasmid was sequenced by using dideoxy chain-termination method. The nucleotide sequence showed the putative initiation codon (ATG), -10, -35 and Shine-Dalgarno sequence.

Southern blot hybridization using 5.2 kb fragment of the pAC11 as biotinylated probe indicated that the S-layer protein gene was located on chromosome of *B.t.i.* strains 4Q2, 4Q272 and c4Q272.