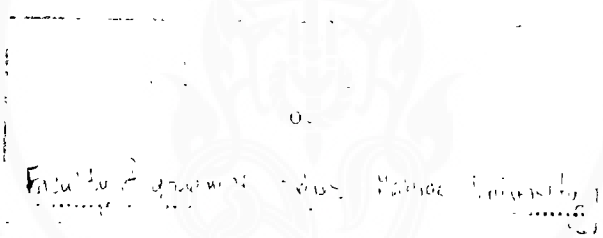
DETECTION OF *Escherichia coli* IN WATER AND FOOD BY USING DNA PROBE AND POLYMERASE CHAIN REACTION

CHONTICHA KLUNGTHONG



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

TH
C048d
1996

Copyright © by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบการปนเปื้อนของ เชื้อ *Escherichia coli* ในน้ำและอาหาร โดยการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบและเทคนิค polymerase chain reaction
ผู้วิจัย	ชลธิชา คลังทอง
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด Dr.Eng.
	พนิดา ชัยเนตร, M.D.
	ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D.
วันสำเร็จการศึกษา	21 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2539

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้นำดีเอ็นเอโพรบและวิธีการทำ PCR มาใช้ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* ในน้ำและอาหาร ดีเอ็นเอโพรบ 4 ขนาดที่ใช้เป็นส่วนของยีน *uidA* ของ *E. coli* K12 ซึ่งสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase (GUS) เมื่อติดฉลากดีเอ็นเอโพรบเหล่านี้ด้วย digoxigenin และนำไปทดสอบกับแบคทีเรียต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค dot blot hybridization ผลการทำไฮบริไดเซชันพบว่า ดีเอ็นเอโพรบทั้ง 4 สามารถไฮบริไดซ์กับ *E. coli* ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 120 สายพันธุ์ โดยไม่ขึ้นอยู่กับ การสร้างเอนไซม์ GUS และให้ผลลบ กับเอ็นเตอริคแบคทีเรียตัวอื่นๆ คือ *Citrobacter, Enterobacter, Edwardsiella, Morganella, Klebsiella, Proteus* และ *Salmonella* รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ที่ใช้ในการทดสอบคือ *Bacillus* และ *Staphylococcus* แต่ให้ผลบวกกับ *Shigella* จำนวน 11 สายพันธุ์ทั้งที่สร้าง และไม่สร้างเอนไซม์ GUS การใช้เทคนิค PCR โดยใช้ primer 2 คู่ ที่ได้จากส่วนของยีน *uidA* คือ GAL-301 กับ GAR-432 ซึ่งจะให้ product ขนาด 0.153 kb และ GAL-301 กับ GAR-806 ซึ่งจะให้ product ขนาด 0.527 kb เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันว่า primer จากส่วนของยีนดังกล่าวมีความจำเพาะสูงในการตรวจสอบเชื้อ *E. coli* จากผลการทดสอบ ความจำเพาะแสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอโพรบทั้ง 4 คือ GA153, GA527, GA175 และ GA549 และ primer ทั้ง 3 คือ GAL-301, GAR-432 และ GAR-806 มีความจำเพาะสูงในการใช้ตรวจสอบ *E. coli* และ *Shigella* ทุกสายพันธุ์ทั้งที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ GUS การทดสอบความไวของวิธีการพบว่า เทคนิค dot blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบติดฉลากด้วย digoxigenin มีความไวในการตรวจสอบ เชื้อได้ประมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

10^5 CFU/dot ขณะที่ เทคนิค PCR จะสามารถตรวจพบเชื้อได้ถ้ามีเชื้อ 1-10 เซลล์ต่อหนึ่งปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟเรซิส ได้ทำการตรวจสอบ *E. coli* ในน้ำโดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับเทคนิคการกรองน้ำด้วย FHLP membrane (Millipore Corp.) พบว่าตรวจไม่พบ *E. coli* ในน้ำดื่ม 10 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ได้ใช้เทคนิคการทำ PCR โดยตรงและการใช้ PCR ร่วมกับเทคนิคการกรองมาใช้ตรวจสอบ *E. coli* ในตัวอย่างอาหาร จากการทดสอบพบว่า ขั้นตอน preenrichment สามารถเพิ่มจำนวน PCR products ซึ่งแสดงถึงจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจากการบ่ม อย่างไรก็ตามมีผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค PCR สามารถตรวจพบ DNA อิสระ (1 นาโนกรัม) ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอาหารได้ แม้ว่าจะผ่าน การบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 0, 30 และ 60 นาที แล้วก็ตาม ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่ การใช้เทคนิค PCR จะสามารถตรวจพบ DNA อิสระ หรือ DNA ที่มาจากเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบได้ ดังนั้นการแปลผลการตรวจสอบแบคทีเรียในน้ำและอาหารด้วยเทคนิค PCR จึงต้องมีปัจจัยควบคุมที่เฉพาะเจาะจง

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Detection of *Escherichia coli* in Water and Food by using DNA probe and Polymerase Chain Reaction.

Name Chonticha Klungthong

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Watanalai Panbangred, Dr.Eng.

Panida Jayanetra, M.D.

Chuenchit boonchird, Ph.D.

Date of Graduation 21 February B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

To develop the alternative method for detection of *Escherichia coli* in water and food, specific DNA probes and polymerase chain reaction methods for monitoring the presence of this bacteria were studied. The four digoxigenin labeled DNA probes derived from *uidA* gene of *E. coli* K12 which encodes β-glucuronidase (GUS) namely GA153, GA527, GA175, and GA549 were used in dot blot hybridization with bacterial cultures. These four probes hybridized and gave positive signal to all 120 strains of *E. coli* tested in this study independent of GUS phenotype. Other enteric bacteria except *Shigella* such as *Citrobacter, Enterobacter, Edwardsiella, Morganella, Klebsiella, Proteus* and *Salmonella* and other gram positive bacteria including *Bacillus* and *Staphylococcus* were not reactive with these probes. All 11 strains of *Shigella* which are both GUS positive and negative could hybridize well with the four probes. PCR amplification with two specific sets of primers derived from

Copyright by Mahidol University

uidA gene, GAL-301 with GAR-432 and GAL-301 with GAR-806 which gave product of 0.153 kb and 0.527 kb, respectively also confirmed the high specificity of detection of *E. coli* using primers from such gene. The observed data demonstrated that the use of either one of the four probes, GA153, GA527, GA175 and GA549, or the 2 pairs of the three primers, GAL-301, GAR-432 and GAL-806 proven to be highly specific for detection of *E. coli* and *Shigella* which may or may not have GUS activity. The dot blot hybridization technique, using digoxigenin labeled probes could detect *E. coli* at 10^5 CFU/dot and the sensitivity could be brought down to detect only 1 to 10 bacteria per reaction if the PCR technique was used. Detection of *E. coli* in water sample could be done using PCR amplification together with filtration technique with FHLP membrane (Millipore Corp.). The detection of *E. coli* in 10 brands of drinking water was performed by such combined technique. The result showed that *E. coli* was not found in all the ten brands of drinking water samples. Direct PCR amplification and PCR combined with filtration method to detect *E. coli* in food sample were tested. The preenrichment step increased the yield of PCR products which indicated the increase of bacterial cells upon incubation. However there was evidence demonstrated that PCR amplification could detect DNA (1 ng) which was contaminated in food sample even after incubation at 37°C for 0, 30 and 60 min. Such finding indicated that if the sample contaminated with nonviable cells or intact DNA, there was possibility that PCR technique will be able to detect DNA released from those cells or free DNA that was present in the sample. Therefore, it is suggested that the interpretation of bacteria detection in water or food by PCR technique samples requires specific monitoring factors.