



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การกระจายของยีนกลุ่ม *hlyA* family และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
ในแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่คัดแยกจากอาหารทะเล

Distribution of genes in *hlyA* family and genetic relationship
among *Vibrio* spp. isolated from seafood samples

คณะนักวิจัย

ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาหาร	คณะวิทยาศาสตร์
ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์	คณะวิทยาศาสตร์
ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล	คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ SCI560037S

ชื่อโครงการวิจัย การกระจายของยีนกลุ่ม *hlyA* family และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
ในแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่คัดแยกจากอาหารทะเล
Distribution of genes in *hlyA* family and genetic relationship
among *Vibrio* spp. isolated from seafood samples

คณะนักวิจัย ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาหาร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	i
รายการภาพ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
บทคัดย่อ	
ภาษาไทย	iv
ภาษาอังกฤษ	iv
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
การตรวจเอกสาร	3
วิธีการทดลอง	8
ผลการทดลองและวิจารณ์	12
สรุปผลการทดลอง	17
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	
ผลการดำเนินการที่ไม่สามารถเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้	24
ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะในส่วนที่ไม่สามารถดำเนินการวิจัยได้ตามวัตถุประสงค์	24
Abstract การเผยแพร่ผลงานในงานประชุมวิชาการ	25
การสร้าง phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของยีนโดยใช้โปรแกรม BioEdit และ MEGA6	26

รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แบคทีเรียกลุ่ม <i>Vibrio</i> spp. ที่แยกได้ครั้งแรกจากตะกอนดิน, น้ำทะเล และสิ่งมีชีวิตในทะเล	3
ตารางที่ 2	แบคทีเรียกลุ่ม <i>Vibrio</i> spp. ที่ก่อโรคในคนกับอาการที่ปรากฏ	7
ตารางที่ 3	รายละเอียด primers ที่ใช้ในการจำแนก <i>Vibrio cholerae</i> โดยวิธี PCR	8
ตารางที่ 4	รายละเอียด <i>hlyA</i> primers ที่ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับสังเคราะห์ hybridization probe	9
ตารางที่ 5	รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA	10
ตารางที่ 6	ลักษณะของ <i>Vibrio harveyi</i> PSU2529, PSU3282, PSU3283 และ PSU3284	11
ตารางที่ 7	รายละเอียด <i>hhl</i> primers	11
ตารางที่ 8	จำนวนเชื้อ non-cholera vibrios ที่แยกได้จากอาหารทะเลประเภทต่างๆ	12
ตารางที่ 9	แสดงผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแกะโดย Tube Hemolysin assay	14

รายการภาพ

	หน้า	
รูปที่ 1	ความสัมพันธ์ทางนิเวศวิทยาของแบคทีเรียกลุ่ม <i>Vibrio</i> spp. และการก่อโรคในคน	5
รูปที่ 2	ความจำเพาะของ <i>hlyA</i> probe. หมายเลข 1 ถึง 5, <i>hlyA</i> ⁺ <i>Vibrio cholerae</i> , <i>hlyA</i> ⁻ <i>Vibrio cholerae</i> , <i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁻ <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻ <i>V. parahaemolyticus</i> และ <i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁺ <i>V. parahaemolyticus</i> ตามลำดับ	13
รูปที่ 3	Colony blot hybridization เพื่อตรวจหายีน <i>hlyA</i> ใน non-cholera vibrios; หมายเลข 1-4 เรียงตามลำดับ: <i>V. cholerae</i> O1, El Tor (<i>hlyA</i> ⁺), <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 (<i>hlyA</i> ⁻), <i>Vibrio</i> spp. ไอโซเลทหมายเลข 40 และ 55	13
รูปที่ 4	แผนภูมิต้นไม้ของยีนกลุ่ม <i>hlyA</i> ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ neighbor-joining (NJ) และประเมินค่าความเชื่อมั่นทางสถิติด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ	15
รูปที่ 5	ศึกษาการแสดงออกของยีน <i>hhl</i> ใน <i>Vibrio harveyi</i> โดยวิธี RT-PCR	16

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่
SCI560037S

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

HlyA hemolysin สร้างโดยยีน *hlyA* เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของ *Vibrio cholerae* ซึ่งทำให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารในคน การปรากฏของยีน *hlyA* ใน *V. cholerae* ได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามการปรากฏของยีนดังกล่าวใน *Vibrio* spp. อื่น ๆ ยังมีรายงานน้อย การศึกษานี้ได้รายงานการค้นพบยีน *hlyA* ใน *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล นอกจากนี้ยังได้นำ *V. harveyi* จำนวน 4 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งมียีน *hlyA*-like hemolysin (*hhl*) มาศึกษาการแสดงออกของยีน *hhl* ด้วยวิธี reverse transcriptase PCR (RT-PCR) ผลการศึกษาพบว่าบางสายพันธุ์มีการแสดงออก โดยสายพันธุ์ที่แยกได้จากกุ้งเป็นโรคมีการแสดงออกของยีน *hhl* ที่เทียบเท่ากับการแสดงออกของยีน *hlyA* ใน *V. cholerae* และการแสดงออกของยีน *hhl* ยังมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทำให้กุ้งตายอีกด้วย การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่รายงานการปรากฏของยีน *hlyA* ใน *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* และการศึกษาลักษณะของยีน *hhl* ใน *V. harveyi* ก็ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การที่แบคทีเรียกลุ่ม vibrios อื่น ๆ ในสิ่งแวดล้อมมียีนก่อโรคที่สำคัญของเชื้อก่อโรคในคน vibrios เหล่านั้นอาจทำหน้าที่ในการเป็นแหล่งเก็บสะสมยีนก่อโรคและถ่ายทอดไปยังสปีชีส์อื่น ๆ ได้

Abstract

HlyA hemolysin, encoded by *hlyA* gene, is the important virulence factor of *Vibrio cholerae* that associated with gastrointestinal disease in humans. The presence of *hlyA* gene in *V. cholerae* has been well documented. However, reports on the presence of *hlyA* gene in non-*V. cholerae* vibrios isolated from the seafood samples are scanty. This study demonstrated the presence of *hlyA* gene in various species of non-*V. cholerae* vibrios isolated from seafood including *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*. For transcriptional analysis, four *V. harveyi* strains isolated from previously study which were known to harbor the *hlyA*-like hemolysin gene (*hhl*) were used. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) showed that the *hhl* genes in some *V. harveyi* isolates were found to be functional. The expression of *hhl* gene in *V. harveyi* isolated from diseased shrimp was seemed to be equivalent to that of *V. cholerae hlyA*. Moreover, the RT-PCR results were correlated with the ability to cause shrimp death. To our knowledge, this study appears to be the first description on the presence of *hlyA*-like hemolysin gene in *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*, and also the characteristics of *hhl* gene in *V. harveyi* has not been reported. Since the environmental vibrio isolates contain an important virulence gene of human pathogen, they may also serve as progenitors for other disease-causing species by lateral transfer of virulence genes.