



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทควบคุมของยีนแฟลเจลลาต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ  
เชื้อ *Helicobacter pylori*

โดย

อาจารย์ ดร.ปาหนัน ภัททิยธนี

สิงหาคม 2558

สัญญาเลขที่ MRG5580161

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

บทบาทควบคุมของยีนแฟลเจลลาต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ

*Helicobacter pylori*

อาจารย์ ดร.ปาหนัน ภัททิยธนี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : สัญญาเลขที่ MRG5580161  
ชื่อโครงการ : บทบาทควบคุมของยีนแฟลเจลลาต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Helicobacter pylori*  
ชื่อนักวิจัยหลักและสถาบัน : อาจารย์ ดร. ปาหนัน ภัททิยธนี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษาและสถาบัน : ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา มหาวิทยาลัยมหิดล  
E-mail address : panan\_etc@yahoo.com  
ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Helicobacter pylori* สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังในชั้นเยื่อเมือกกระเพาะอาหารของผู้ป่วยซึ่งยากต่อการรักษาและสามารถกลับมาติดเชื้อซ้ำได้ ปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกที่แน่ชัดในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่แฟลเจลลามีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าโปรตีนกลุ่มควบคุมการเคลื่อนที่ ประกอบด้วยโปรตีน FlgL, FlgE, FlgD, FlaA และ FlhD มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเชื้อ *H. pylori* ที่ดำรงอยู่ในสภาวะของไบโอฟิล์ม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของยีนแฟลเจลลาที่ควบคุมโปรตีนดังกล่าวข้างต้นในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* โดยทำการสร้างเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* และ *flhD* ด้วยเทคนิค inverse PCR mutagenesis ศึกษาการเคลื่อนที่และการยึดเกาะของเชื้อกับเซลล์เยื่อบุผิวของมนุษย์ด้วยวิธี motility assay และ adhesion assay โดยการย้อมสีเซลล์เชื้อด้วยสี fluorescein isothiocyanate ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ทำการประเมินการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี pellicle assay ทำการวัดปริมาณไบโอฟิล์มที่เชื้อ *H. pylori* สร้างขึ้นโดยทำการย้อมไบโอฟิล์มดังกล่าวด้วยสี crystal violet และศึกษาโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด การศึกษาสามารถสร้างเชื้อที่มียีน *flhD* กลายพันธุ์ได้เพียงสายพันธุ์เดียว พบว่ายีน *flhD* ไม่ส่งผลกระทบต่อความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของเซลล์ HEp-2 และการสร้างไบโอฟิล์ม แต่การกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวส่งผลให้เชื้อเคลื่อนที่ได้ลดลง สร้างไบโอฟิล์มช้าลง และยังคงผลต่อโครงสร้างที่สมบูรณ์ของไบโอฟิล์มที่เชื้อ *H. pylori* สร้างขึ้นอีกด้วย โดยเชื้อที่มียีน *flhD* กลายพันธุ์เกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ ภายในโครงสร้างไบโอฟิล์ม และพบการเชื่อมกันระหว่างตัวเชื้อด้วยเส้นใยจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ นอกจากนี้เชื้อ *H. pylori* ที่มียีน *flhD* กลายพันธุ์มีแฟลเจลลาที่สั้นกว่าปกติ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ถือเป็นหลักฐานขั้นต้นที่แสดงให้เห็นว่ายีน *flhD* มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม และจำเป็นสำหรับการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori*

คำหลัก : *Helicobacter pylori*, biofilm, flagella, *flhD*

## Abstract

---

**Project Code :** MRG5580161  
**Project Title :** Regulatory role of flagellar gene complex in *Helicobacter pylori* biofilm formation  
**Investigator :** Dr.Panan Pattiyathanee, Chulalongkorn University  
**Mentor :** Prof.Dr. Wanpen Chaicumpa, Mahidol University  
**E-mail Address :** panan\_etc@yahoo.com  
**Project Period :** 2 years

*Helicobacter pylori* biofilm formation is considered as a cause of difficult-to-treat, chronic and recurrent infections in gastric mucosa of patients. However, the regulation of *H. pylori* biofilm formation is still poorly understood. Flagella contribute to a biofilm formation by many bacteria. Previous study has shown an upregulation of movement controlling proteins during *H. pylori* biofilm mode of growth, including FlgL, FlgE, FlgD, FlaA and FliD. Here, role of flagellar genes in a regulation of biofilm formation of *H. pylori* was investigated. *H. pylori* *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* and *fliD* mutants were constructed by inverse PCR mutagenesis. Bacterial mobility and adhesion to human epithelial cells were assessed by motility assay and fluorescein isothiocyanate staining adhesion assay, respectively. Biofilm formation was evaluated both by pellicle assay and quantitatively by crystal violet staining. The cyto-architecture of biofilm was photographed by scanning electron microscopy. Only *fliD* mutant could be successfully constructed here. We observed no significantly different levels of bacterial adhesion and biofilm formation between the wild-type ATCC 43504 and the *fliD* mutant *H. pylori*. Apart from a poor motility, the *fliD* mutant had a slightly delayed biofilm formation as well as a remarkable incomplete cyto-architecture of biofilm. Bacterial cells residing in biofilm of the *fliD* mutant, compared to that of wild-type, showed a loose accumulation with less apparent cross-linking fibrils. Furthermore, most of the mutant cells had truncated flagella. This study provided preliminary evidences of *fliD* that potentially regulated biofilm formation and also was required for motility of *H. pylori*. Further works are being required in order to elucidate a precise molecular mechanism regulating biofilm formation of *H. pylori*.

**Keywords :** *Helicobacter pylori*, biofilm, flagella, *fliD*

## 1. บทสรุปผู้บริหาร

เชื้อ *Helicobacter pylori* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคในระบบทางเดินอาหาร อาทิเช่น โรคกระเพาะอาหารอักเสบ โรคแผลในกระเพาะอาหาร มะเร็งในกระเพาะอาหาร และมะเร็งของ mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) เชื้อสามารถผลิตไบโอฟิล์มซึ่งมีส่วนช่วยให้เชื้อสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นพิษและไม่พึงประสงค์ ทำให้เชื้อดำรงอยู่ในตัวผู้ป่วยได้เป็นระยะเวลาอันยาวนาน เกิดการติดเชื้อเรื้อรัง และทำให้การรักษาล้มเหลวตามมา ผู้วิจัยได้ศึกษากลุ่มยีนแฟลเจลลา ได้แก่ ยีน *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* และ *fljD* ถึงบทบาทต่อการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เนื่องจากจากการศึกษาที่ผ่านมาทางด้าน proteomics พบการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้ในเชื้อที่ดำรงอยู่ในสภาวะไบโอฟิล์ม อย่างไรก็ตามเมื่อทำให้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 กลายพันธุ์แล้วพบว่าไม่มีเพียงเชื้อหนึ่งสายพันธุ์ที่ประสบความสำเร็จในขั้นตอนดังกล่าว ได้แก่ เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* เมื่อนำเชื้อดังกล่าวไปทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มโดยเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน พบว่า *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 แต่การกลายพันธุ์ของยีน *fljD* มีผลต่อการชะลอการสร้างไบโอฟิล์มและการพัฒนาโครงสร้างที่สมบูรณ์ของไบโอฟิล์ม นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของยีน *fljD* มีผลต่อการเคลื่อนที่ที่ลดลงของเชื้อ *H. pylori* แต่ไม่พบว่ามีผลต่อการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุช่องท้อง HEp-2 อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายกลไกในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ได้อย่างครบถ้วน และยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

## 2. วัตถุประสงค์งานวิจัย

- 2.1 เพื่อสร้างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแฟลเจลลา ได้แก่ *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* และ *fljD*
- 2.2 เพื่อศึกษาบทบาทของยีนแฟลเจลลาในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori*

## 3. ระเบียบวิธีวิจัย

### 3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ATCC43504 บน Brain Heart Infusion (BHI) agar ที่มีส่วนผสมของเลือดแกะ 7% fetal bovine serum 10% และยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ยา vancomycin, amphotericin B, polymyxin B และ trimethoprim บ่มในสภาวะที่มีอากาศเฉื่อย (N<sub>2</sub> 85% O<sub>2</sub> 5% และ CO<sub>2</sub> 10%) ที่ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้ในการทดสอบต่างๆ ในขั้นต่อไป

### 3.2 การสร้างเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* และ *fljD* ด้วยเทคนิค Inverse PCR mutagenesis

#### 3.2.1 การสกัด chromosomal DNA ของเชื้อ *H. pylori* ATCC43504

นำโคลนของเชื้อ *H. pylori* ที่มีอายุ 3 วันมาสกัด chromosomal DNA ด้วยชุดสกัด QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue ตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และเก็บ DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้

#### 3.2.2 การเพิ่มจำนวนยีน *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* และ *fljD* ด้วยเทคนิค PCR

DNA ที่สกัดได้ข้างต้นถูกนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีน *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* และ *fljD* ซึ่งมีรายละเอียดของ primers และขนาด PCR products ของแต่ละยีนดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 1 ปฏิกริยา PCR ของแต่ละยีนในปริมาตร 100 µl ประกอบไปด้วย DNA ตั้งต้น 400 ng, forward primer และ reverse primer ปริมาณอย่างละ 1 µmol, 200 µM dNTP, 10× PCR buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub> และ Taq DNA polymerase 1.25 units ทำปฏิกริยาภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังแสดงในตารางที่ 2 ตรวจสอบผลที่เกิดขึ้นโดยนำ PCR product ที่ได้ไปแยกบน 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100-bp DNA ladder เป็น marker

ตารางที่ 1: Primers ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละชนิดของเชื้อ *H. pylori* ATCC43504 และขนาดของ PCR product

Gene	Primer name	Primer sequences (5'-3')	Product sizes (bp)	Inverse		
				PCR primer name	Product size (bp)	
<i>flgL</i>	<i>flgLF</i>	ACCAAGAAAGCGCGACTAAA	687	<i>InflgLF</i>	GGAGATCTCCGCTATTCCACTT	682
	<i>flgLR</i>	CGCTCGCGTTATTAGTGGGG		<i>InflgLR</i>	GGAGATCTTCTCGCTCAACTTGG	
<i>flgE</i>	<i>flgEF</i>	GAGCAAAACGGCTATCAAGC	199	<i>InflgEF</i>	GGAGATCTATCCTGAAATCGCGA	194
	<i>flgER</i>	CGATTAAAGCTTGCCCTGAG		<i>InflgER</i>	GGAGATCACTGAACGCTCCTAA	
<i>flgD</i>	<i>flgDF</i>	ATTCGGTGAGCATGATAGGC	247	<i>InflgDF</i>	GGAGATCGGACTTACTTTTGT	242
	<i>flgDR</i>	ACTTTTTCGCCCTTTTCGTT		<i>InflgDR</i>	GGAGATCAATCGCTGGCACTCC	
<i>flaA</i>	<i>flaAF</i>	GCGGATAAGGCTATGGATGA	842	<i>InflaAF</i>	GGAGATCTACAGGCGTTAAAGCC	818
	<i>flaAR</i>	GAGTCAGAAGCCGAAACGAC		<i>InflaAR</i>	GGAGATCTTCTGCTAACACGCC	
<i>fliD</i>	<i>fliDF</i>	GCTACCAATGGCGAAGTGAT	292	<i>InfliDF</i>	GGAGATCTATCCACGCTCACTAA	274
	<i>fliDR</i>	CTTTTTGGATTGCGGTGTTT		<i>InfliDR</i>	GGAGATCTTAGACTCGGTTGTCT	

ตารางที่ 2 : ปฏิบัติการและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR การทำ inverse PCR mutagenesis และการทำ colony PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิและเวลา			
	PCR	IPCRM	colony PCR	จำนวนรอบ
Pre-Denature	93 °C, 5 นาที	95 °C, 1 นาที	93 °C, 5 นาที	1
Denature	93 °C, 1 นาที	95 °C, 15 วินาที	93 °C, 1 นาที	
Annealing	55 °C, 1 นาที	55 °C, 15 วินาที	50 °C, 1 นาที	35
Extension	72 °C, 1 นาที	72 °C, 2 นาที	72 °C, 1 นาที	
Final extension	72 °C, 10 นาที	-	72 °C, 10 นาที	1
Hold temp		4		-

### 3.2.3 การโคลนยีนเข้าสู่ pGEM®-T Easy vector

นำ PCR product ของแต่ละยีนที่เพิ่มจำนวนได้ตั้งข้างต้น โคลนเข้าสู่ pGEM®-T Easy vector ตามขั้นตอนที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต ใช้ PCR product ของแต่ละยีนปริมาณ 10 µg ทำปฏิกิริยา ligation ที่มีส่วนประกอบของ pGEM® T-Easy vector 50 ng, 2 × rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 3 units ภายใต้อุณหภูมิ 10 °C และ incubate ข้ามคืนที่ 4 °C นำ ligation product โคลนเข้าสู่ *E. coli* DH5-α competent cells ด้วยวิธี heat-shock transformation และคัดเลือก competent cells ที่มีพลาสมิดบรรจุอยู่ด้วย blue/white colony screening assay บน Luria-Bertani (LB) agar ที่มี ampicillin 100 units/ml, IPTG 32 µl/ml และ X-gal 40 µl/ml โคลนที่มีการโคลนยีนเข้าสู่ competent cells ได้สำเร็จจะมีสีขาว ยืนยันความถูกต้องของยีนที่ถูกโคลนเข้าไปด้วยวิธี colony PCR amplification ด้วย primers ที่จำเพาะต่อ T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') และ SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') ยืนยันความถูกต้องของผลจากการทดสอบดังกล่าวด้วยการนำมาแยกบน 1.5% agarose gel electrophoresis เลือกโคโลนีของ competent cells ที่ให้ผลบวกจากการยืนยันทดสอบข้างต้น มาทำการเพิ่มจำนวน โดยเฉพาะเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 10 ml ที่มี ampicillin 100 units/ml ทำการ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นที่ 4,000 rpm, 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสทิ้ง และนำส่วนตะกอนไปแยกพลาสมิดด้วย QIAprep Spin Miniprep Kit ตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดที่มียีนที่โคลนเข้าไปอีกครั้งด้วยการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *NotI* ซึ่งจะให้ชิ้นส่วนที่ถูกตัดจำเพาะสองชิ้นส่วน คือส่วนของยีนที่โคลนเข้าไปและส่วนของ pGEM®-T Easy vector ซึ่งมีขนาด 3,015 bp ผลจากการทดสอบยืนยันความถูกต้องดังกล่าวถูกนำมาแยกบน 1% agarose gel electrophoresis พลาสมิดที่สกัดได้นี้ถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้

### 3.2.4 การทำ inverse PCR mutagenesis

พลาสมิดที่มียีนบรรจุอยู่จากขั้นตอนด้านบน ถูกนำมาทำ inverse PCR mutagenesis โดยใช้ primer ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งผลผลิตจากการทำ inverse PCR mutagenesis จะได้ยีนที่มีเบสหายไปจำนวน 5-18 คู่เบส และมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII* ปรากฏอยู่บริเวณกลางยีน ปฏิบัติการ inverse PCR mutagenesis ประกอบด้วยพลาสมิดที่มียีนจากขั้นตอนด้านบนปริมาณ 400 ng forward primer และ reverse primer อย่างละ 20 µmol สารละลาย MyFi mix ความเข้มข้น 2 เท่า ซึ่งประกอบด้วย MyFi DNA polymerase, dNTPs และ MgCl<sub>2</sub> ปริมาตร 50 µl ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 µl ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังแสดงในตารางที่ 2 นำผลผลิต inverse PCR mutagenesis ปริมาตร 15 µl มาตรวจสอบบน 1.5% agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 kb ผลผลิต inverse PCR mutagenesis ส่วนที่เหลือปริมาตร 85 µl ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิตตั้งที่ได้อธิบายในข้างต้น นำผลผลิต inverse PCR mutagenesis มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII* ความเข้มข้น 20 เท่า ในปริมาตรรวม 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจสอบชิ้นส่วนของผลผลิต inverse PCR mutagenesis ที่ถูกตัดบน 1.5% agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 kb

นำผลผลิต inverse PCR mutagenesis ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BglII* ปริมาณ 80 ng มาทำปฏิกิริยา self-ligation โดยใช้สารละลาย ligation buffer ความเข้มข้น 10 เท่า และเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 9 ยูนิต ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 µl ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ บ่มเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา self-ligation ที่ 4 °C ข้ามคืน ผลผลิตจากปฏิกิริยา self-ligation ปริมาตร 5 µl จะถูกนำเข้าสู่ *E. coli* DH5-α competent cells ปริมาตร 50 µl ด้วยวิธี heat-shock transformation และคัดเลือก competent cells ที่มีพลาสมิดที่มีผลผลิตจากปฏิกิริยา self-ligation บรรจุอยู่ด้วยวิธี blue/white colony screening assay ยืนยันความถูกต้อง

ของพลาสมิดที่ถูกโคลนเข้าไปด้วยวิธี colony PCR amplification และ restriction enzyme analysis ตามรายละเอียดที่กล่าวไว้ข้างต้น

### 3.2.5 การทำ inverse PCR mutagenesis

นำผลผลิตจาก inverse PCR mutagenesis ของยีนต่างๆ ที่อยู่ในพลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ความเข้มข้น 20 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำผลผลิตพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ปริมาณ 80 ng มาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้สารละลาย ligation buffer ความเข้มข้น 10 เท่า kanamycin resistance cassette ความเข้มข้น 10.4 ng/μl และเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 9 เท่า ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 μl ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ บ่มเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ligation ที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำมคืน นำผลผลิตจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 5 μl เข้าสู่ *E. coli* DH5-α competent cells ปริมาตร 50 μl ด้วยวิธี heat-shock transformation และคัดเลือก competent cells ที่มีพลาสมิดที่มีผลผลิตจากปฏิกิริยา ligation บรรจุอยู่ด้วยวิธี blue/white colony screening assay ยืนยันความถูกต้องของพลาสมิดที่ถูกโคลนเข้าไปด้วยวิธี colony PCR amplification และ restriction enzyme analysis ตามรายละเอียดที่กล่าวไว้ข้างต้น

### 3.2.6 การนำพลาสมิดที่มียีนกลายพันธุ์เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค natural transformation

เกลี้ยเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 ปริมาณหนึ่งลูป (ประมาณ  $10^8$  ถึง  $10^9$  เซลล์) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ที่แช่เย็น ที่มีส่วนผสมของเลือดแกะ 7% fetal bovine serum 10% ให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 mm บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง เปิดพลาสมิดที่มียีนกลายพันธุ์ปริมาณ 2 μg ลงบนเชื้อและบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง จากนั้นขูดเอาเชื้อทั้งหมดที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth ปริมาตร 500 μl และเปิดเชื้อปริมาตร 100 μl ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) agar ที่มีส่วนผสมของเลือดแกะ 7% fetal bovine serum 10% และยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ยา vancomycin, amphotericin B, polymyxin B และ trimethoprim และมียา kanamycin 20 μg/ml บ่มเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 3-5 วัน ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง ทดสอบยืนยันความสำเร็จในการทำ natural transformation ด้วยวิธี PCR โดยสกัด DNA ของเชื้อ ใช้ปริมาณ DNA ตั้งต้น 400 ng ในปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวม 100 μl ประกอบด้วย forward primer และ reverse primer ปริมาณอย่างละ 50 pmol dNTPs ความเข้มข้น 200 μl/ml PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 25 μmol/ml และเอนไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 1 หน่วย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาตามที่แสดงในตารางที่ 2 โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวอย่างควบคุมลบ นำผลผลิต PCR ปริมาตร 20 μl มาตรวจสอบบน 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100-bp DNA ladder เป็น marker ส่ง DNA ของเชื้อไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing ซึ่งมี บริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ เป็นผู้ทำการวิเคราะห์ โดยใช้ DNA ปริมาตร 100 μl และ forward primer และ reverse primer ปริมาณอย่างละ 50 pmol ในการวิเคราะห์ลำดับเบส

### 3.3 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อโดย Motility assay

เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแฟลเจลลาที่มีอายุ 3 วัน ถูกนำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Brucella* broth ปรับเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ  $10^8$  CFU/ml เปิดสารละลายของเชื้อปริมาตร 3 μl ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3% *Brucella* soft agar ที่มีส่วนผสมของ heat-inactivated fetal bovine serum 5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง สังเกตการเคลื่อนที่ของเชื้อโดยดู

จากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวงกว้างรอบจุดที่ปิเปตเชื้อลงไป วัดเส้นผ่านศูนย์กลางและคำนวณพื้นที่ของวงที่สังเกตเห็น ขนาดของพื้นที่วงแปรผันตรงกับระยะทางในการเคลื่อนที่ของเชื้อ การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

### 3.4 การทดสอบความสามารถของเชื้อในการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEp-2 โดยเทคนิค Adhesion assay

นำเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง (human laryngeal epithelial cells; HEp-2 cells) ที่เลี้ยงใน T75 tissue culture flask จนมีความหนาแน่นประมาณ 90 % ไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ dulbecco's modified of eagle's medium (DMEM) ผสมกับ fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 % และยาต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 1 % บรรจุอยู่หลุมละ 2  $\mu$ l และมี coverslip เส้นผ่านศูนย์กลาง 18 mm อยู่ที่ก้นหลุม ปรับปริมาณให้มีเซลล์บรรจุอยู่ในหลุม ๆ ละ 3 ล้านเซลล์ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และความชื้น 95 % จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและล้างเซลล์ด้วย dulbecco's phosphate buffer saline ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งมีเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแฟลเจลลาที่ถูกย้อมด้วย fluorescein isothiocyanate เจือจางอยู่ ปริมาตรหลุมละ 2 มิลลิลิตร เชื้อในแต่ละหลุมมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ  $10^8$  CFU/ml บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และความชื้น 95 % เมื่อครบเวลาบ่มเชื้อ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมทิ้งเพื่อกำจัดเชื้อที่ไม่ได้ยึดเกาะเซลล์ และล้างเซลล์ด้วย dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS) ปริมาตร 2  $\mu$ l จำนวน 3 ครั้ง วัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งจากตัวเชื้อ *H. pylori* ที่เกาะบนเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEp-2 ด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader (บริษัท Biotek Synergy Mx จำกัด สหรัฐอเมริกา) โดยแสงฟลูออเรสเซนซ์ถูกกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 485 nm และถูกตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 528 nm ปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้แปรผันตรงกับจำนวนที่เชื้อ *H. pylori* ยึดเกาะเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEp-2 การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ย หลุมที่มีเฉพาะเซลล์เยื่อบุกล่องเสียง HEp-2 ถูกเตรียมควบคู่ไปกับหลุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์กับเชื้อ เพื่อใช้วัดเป็นค่าเบคกราวด์ของการทดสอบในแต่ละครั้ง

### 3.5 การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ในหลอดทดลอง

#### 3.5.1 การสร้างไบโอฟิล์มด้วยเทคนิค pellicle assay

เจือจางเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแฟลเจลลาที่มีอายุ 3 วัน ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth ปริมาตร 10 ml ซึ่งมีส่วนผสมของ 2%  $\beta$ -cyclodextrin (BCD) ปรับให้เชื้อมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ  $10^8$  CFU/ml ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ในสภาวะอยู่กับที่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง

#### 3.5.2 การวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เชิงกึ่งปริมาณ

ศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแฟลเจลลาในเชิงคุณภาพ โดยสังเกตลักษณะไบโอฟิล์มที่เชื้อ *H. pylori* สร้างขึ้น ได้แก่ pellicle (คือลักษณะของไบโอฟิล์มที่จับตัวเป็นกลุ่ม ลอยบนผิวน้ำบริเวณระหว่างของเหลวและอากาศ และไม่สามารถยึดเกาะบนผิวแก้ว) และ attached biofilm (คือเซลล์แบคทีเรียที่เกาะบนผิวแก้วบริเวณระหว่างของเหลวและอากาศ) และบันทึกผลทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยบันทึกระดับการสร้างไบโอฟิล์มทั้งในรูปแบบของ pellicle และ attached biofilm ดังนี้ absent (-) หมายถึง ไม่สามารถสังเกตเห็นการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 2 รูปแบบดังที่กล่าวข้างต้น just visible (+) หมายถึง พบการสร้าง pellicle หรือ attached biofilm เป็นเยื่อบาง ๆ intermediate (++) หมายถึง พบการสร้าง pellicle ปกคลุมบริเวณส่วนกลาง

ของพื้นผิวของเหลว หรือพบการสร้าง attached biofilm ขนาดบาง extensive (+++) หมายถึง พบการสร้าง pellicle ปกคลุมทั่วทั้งพื้นผิวของเหลว หรือพบการสร้าง attached biofilm ขนาดหนา การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ชั่วโมง

### 3.5.3 การวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เชิงปริมาณโดยเทคนิคการย้อมสี crystal violet

ศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแฟลเจลลาร์ในเชิงปริมาณ ด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค pellicle assay ในหลอดทดลองครบ 7 วัน ดูดสารละลายทั้งหมดในหลอดทิ้ง คงเหลือแต่ส่วนของไบโอฟิล์มที่เกาะข้างพื้นผิวแก้วของหลอดทดลอง หรือ attached biofilm ล้างไบโอฟิล์มด้วยบัฟเฟอร์ phosphate buffer saline ปริมาตร 11 ml จำนวน 2 ครั้ง นำหลอดทดลองไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 0.1% crystal violet ปริมาตร 11 ml ลงไปในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้ไบโอฟิล์มติดสี ดูดสี crystal violet ทิ้งและนำหลอดทดลองไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างไบโอฟิล์มด้วยบัฟเฟอร์ phosphate buffer saline ปริมาตร 11 ml จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายเอทานอลต่ออะซิโตนในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ปริมาตร 11 ml และตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดสารละลายของสีที่ถูกชะออกมาใส่ใน cuvette และนำไปวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 570 nm ด้วยเครื่องวัดความเข้มของแสง (spectrophotometer; บริษัท Hitachi จำกัด ประเทศไทย) หลอดทดลองที่มีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth ปริมาตร 10 ml ซึ่งมีส่วนผสมของ 2%  $\beta$ -cyclodextrin ถูกเตรียมควบคุมไปกับหลอดทดลองที่ใส่เชื้อ เพื่อใช้วัดเป็นค่าแบคทีเรียของการทดสอบในแต่ละครั้ง ค่าความเข้มของแสงที่วัดได้แปรผันตรงกับปริมาณไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้น ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อถูกแสดงโดยค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่มีเชื้อหักลบกับค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่ไม่มีเชื้อ การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ชั่วโมงและหาค่าเฉลี่ย

## 3.6 การวิเคราะห์โครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM)

### 3.6.1 การเตรียมสิ่งตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ศึกษาโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแฟลเจลลาร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยเตรียมตัวอย่างสิ่งส่งตรวจดังนี้ เพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ทั้งสองสายพันธุ์ ด้วยเทคนิค pellicle assay ในหลอดทดลอง ให้มีอายุตั้งแต่ 1 ถึง 7 วัน เมื่อครบกำหนดระยะเวลาการบ่มเชื้อ ดูดเก็บ pellicle ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 7 ใส่ในหลอดใหม่ สำหรับหลอดทดลองที่ไม่มีการสร้าง pellicle ให้ดูดเก็บเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระที่ก้นหลอดใส่ในหลอดทดลองใหม่ นำทั้ง pellicle และเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวทิ้งและล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ PBS ปริมาตร 1 ml จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นส่งสิ่งตัวอย่างทั้งหมดไปทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

### 3.6.2 การวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

สิ่งตัวอย่างที่เตรียมในขั้นตอน 3.6.1 ถูกทำการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย ทำการตรึงสิ่งตัวอย่างด้วยสารละลาย 2.5% glutaraldehyde, 0.1% PBS pH 7.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างสิ่งตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่นอีก 1 ครั้ง ดูดสารละลาย

ของเหลวทั้งหมดทิ้ง ทำการขจัดน้ำออกจากสิ่งตัวอย่างโดยผ่านเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 30, 50, 70 และ 90 % ตามลำดับ ลำดับละ 10 นาที และที่ความเข้มข้น 100 % จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที นำสิ่งตัวอย่างไปทำให้แห้งที่จุดวิกฤตและวางบนแท่น เคลือบสิ่งตัวอย่างด้วยทองและแพลเลเดียม ทำการบันทึกภาพสามมิติของโครงสร้างไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รุ่น JSM-7610F บริษัท JEOL จำกัด ประเทศญี่ปุ่น)

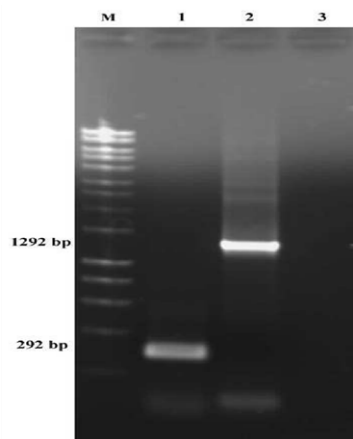
### 3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการทดสอบต่างๆ ระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 และสายพันธุ์ที่มียีน *fljD* กลายพันธุ์ถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดย Student's t-test โดยค่า p-value ที่ระดับมากกว่าหรือเท่ากับ 0.05 จะถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

## 4. ผลการวิจัย

### 4.1 เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* และ *fljD* ด้วยเทคนิค Inverse PCR mutagenesis

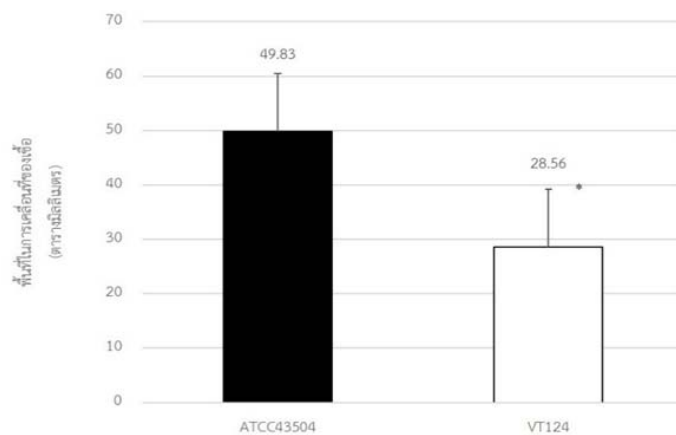
จากการสร้างเชื้อให้มีการกลายพันธุ์ของยีนแฟลเจลลา ได้แก่ ยีน *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* และ *fljD* ด้วยเทคนิค Inverse PCR mutagenesis มีเพียงเชื้อสายพันธุ์เดียวที่ประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ เชื้อที่มียีน *fljD* กลายพันธุ์ และได้ตั้งชื่อว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ VT 124 ซึ่งสามารถยืนยันความสำเร็จของการสร้างการกลายพันธุ์ของเชื้อนี้ด้วยการนำ DNA ที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *fljD* ได้แก่ *fljD* forward primer และ *fljD* reverse primer ดังที่แสดงรายละเอียดในตารางที่ 1 และใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เป็นตัวควบคุมบวก และนำกลิ่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนในข้อ 3.2.2 ตรวจสอบผลผลิต PCR บน 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 10 kb ladder เป็น marker พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 1,290 bp ขณะที่ยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีขนาดเท่ากับ 292 bp ดังที่แสดงในรูปที่ 1 ผลผลิต PCR ของยีน *fljD* ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ และนำผลมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 26695 (GenBank accession number HP0752) เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน *fljD* ด้วยโปรแกรม BioEdit Version 7.1.3 ผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับเบสของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีความสอดคล้องกับลำดับเบสอ้างอิงถึง 96 % ขณะที่ลำดับเบสของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ มีความสอดคล้องกับลำดับเบสอ้างอิง 99 %



รูปที่ 1 : ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบผลผลิต PCR บน 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 10 kb ladder เป็น marker แถวที่ 1 คือผลผลิต PCR ของยีน *fljD* เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 แถวที่ 2 คือผลผลิต PCR ของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ แถวที่ 3 คือตัวควบคุมลบ

#### 4.2 ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD*

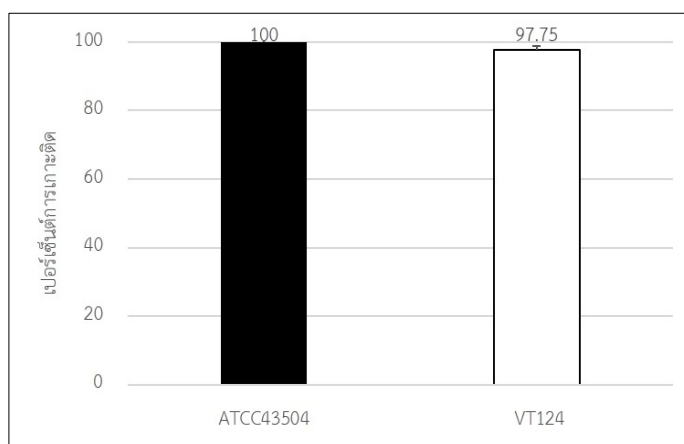
เปรียบเทียบการเคลื่อนที่ระหว่างเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.3% *Brucella* soft agar ภายหลังจากบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 5 วันภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถเคลื่อนที่ได้ ซึ่งสามารถสังเกตได้จากวงที่เกิดขึ้นจากการที่เชื้อเคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้นบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงดังกล่าวเพื่อคำนวณขนาดของพื้นที่ในการเคลื่อนที่ของเชื้อโดยมีหน่วยเป็น mm<sup>2</sup> ขนาดของพื้นที่ในการเคลื่อนที่ผันตรงกับระยะทางในการเคลื่อนที่ของเชื้อ พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* เคลื่อนที่ได้สั้นกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 อย่างมีนัยสำคัญ (p-value เท่ากับ 0.013) โดยที่เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* มีขนาดพื้นที่ของวงที่เชื้อเคลื่อนที่เท่ากับ 28.56 mm<sup>2</sup> ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 มีขนาดของวงที่เชื้อเคลื่อนที่เท่ากับ 48.83 mm<sup>2</sup> ดังที่แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 : ขนาดพื้นที่ในการเคลื่อนที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* กราฟแท่งสีดำแสดงพื้นที่ในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (ATCC43504) กราฟแท่งสีขาวแสดงพื้นที่ในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* (VT124) พื้นที่ในการเคลื่อนที่ (mm<sup>2</sup>) คำนวณจากเส้นผ่าศูนย์กลางของวงที่สังเกตเห็น ขนาดของพื้นที่ในการเคลื่อนที่แปรผันตรงกับระยะทางในการเคลื่อนที่ของเชื้อ การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย \*หมายถึง p-value ที่ระดับ 0.013 ซึ่งถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

#### 4.3 ความสามารถในการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD*

เปรียบเทียบการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 ระหว่างเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่ถูกย้อมด้วย fluorescein isothiocyanate ร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 วัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ซึ่งแปรผันตรงกับจำนวนเชื้อ *H. pylori* ที่ยึดเกาะเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* สามารถยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุผิว HEp-2 ซึ่งวัดได้เท่ากับ 354.5 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 วัดได้เท่ากับ 390 นำค่าที่ได้จากการวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะโดยเทียบกับการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* สามารถยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุผิว HEp-2 ไม่แตกต่างจากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (p-value มากกว่า 0.05) โดยที่เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* มีเปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะเท่ากับ 97.80 % เมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ที่เท่ากับ 100 % ดังที่แสดงในรูปที่ 3

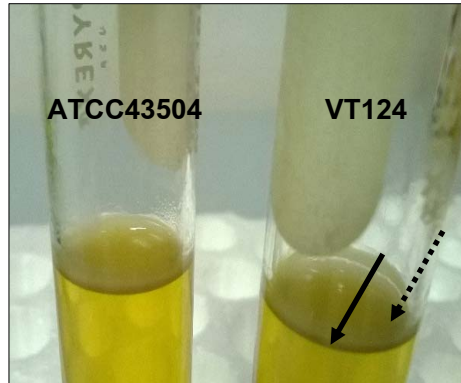


**รูปที่ 3 :** การยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุผิวกล่องเสียง HEp-2 ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* กราฟแท่งสีดำแสดงเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (ATCC43504) กราฟแท่งสีขาวแสดงเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* (VT124) เปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* คำนวณจากปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากตัวเชื้อโดยเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ และนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย

#### 4.4 ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD*

เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ด้วยเทคนิค pellicle assay พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถสร้างไบโอฟิล์ม ณ บริเวณรอยต่อระหว่างของเหลวกับอากาศ (air-liquid interface) โดยพบไบโอฟิล์ม 2 ลักษณะ ได้แก่ pellicle ซึ่งหมายถึงไบโอฟิล์มที่จับตัวเป็นกลุ่มลอยบนพื้นผิวของเหลวเชื้อ และ attached biofilm ซึ่งหมายถึงไบโอฟิล์มที่เกาะกับผิวแก้วด้านในหลอดทดลอง

รูปที่ 4 แสดงไบโอฟิล์มทั้ง 2 ลักษณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* สร้างขึ้น โดยบันทึกภาพไบโอฟิล์ม ณ วันที่ 7 ของการบ่มเชื้อที่ 37 °C



**รูปที่ 4** : ลักษณะไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 และเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ที่สร้างขึ้น ณ วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค pellicle assay ลูกศรเส้นทึบแสดงตำแหน่งของ pellicle หมายถึงไบโอฟิล์มที่จับตัวเป็นกลุ่มลอยบนพื้นผิวของเหลวบริเวณรอยต่อระหว่างของเหลวกับอากาศ ลูกศรเส้นประแสดงตำแหน่งของ attached biofilm หมายถึงไบโอฟิล์มที่เกาะกับผิวแก้วด้านในหลอดทดลองบริเวณรอยต่อระหว่างของเหลวกับอากาศ

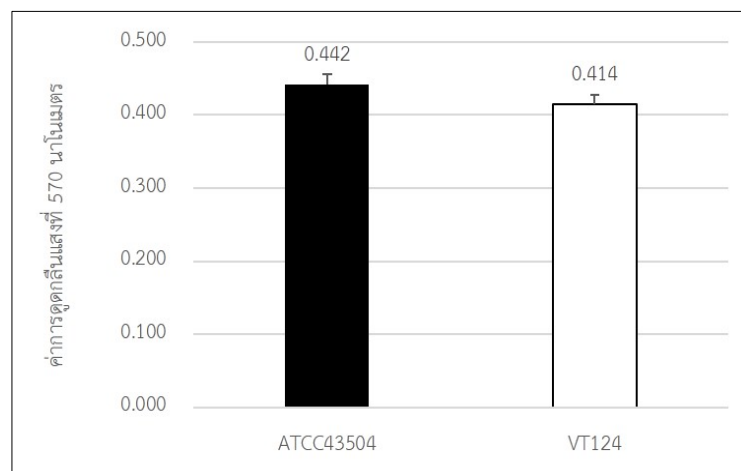
เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เชิงปริมาณระหว่างเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ภายหลังเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ด้วย pellicle assay โดยสังเกตและบันทึกระดับไบโอฟิล์มทั้งในลักษณะของ pellicle และ attached biofilm ทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เริ่มสร้าง pellicle และ attached biofilm ในวันที่ 3 ของการบ่ม และสามารถสร้าง pellicle และ attached biofilm ที่สมบูรณ์ในวันที่ 4 ของการบ่ม ขณะที่เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* เริ่มสร้าง pellicle และ attached biofilm ในวันที่ 4 ของการบ่ม ตารางที่ 3 แสดงระดับของไบโอฟิล์มทั้ง 2 ลักษณะที่บันทึกได้ในแต่ละวันของเชื้อ *H. pylori* ทั้งสองสายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เชิงปริมาณระหว่างเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ภายหลังเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ด้วย pellicle assay เป็นเวลา 7 วัน วัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* โดยการย้อม attached biofilm ด้วยสี crystal violet และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ค่าความเข้มของแสงที่วัดได้แปรผันตรงกับปริมาณไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้น ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อคำนวณจากค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่มีเชื้อหักลบกับค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่เป็นแบคทีเรีย พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* มีปริมาณไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นไม่แตกต่างจากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (p-value มากกว่า 0.05) โดยที่เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* มีปริมาณของไบโอฟิล์มที่วัดได้เท่ากับ 0.442 ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 มีปริมาณของไบโอฟิล์มที่วัดได้เท่ากับ 0.414 ดังที่แสดงในรูปที่ 5

**ตารางที่ 3 :** ระดับของ pellicle และ attached biofilm ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ที่ถูกสังเกตุและบันทึกในแต่ละวัน รวมระยะเวลา 7 วันของการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค pellicle assay

วันที่	เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504		เชื้อ <i>H. pylori</i> ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>flhD</i>	
	pellicle	attached biofilm	pellicle	attached biofilm
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	+	+	-	-
4	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++
6	+++	+++	+++	+++
7	+++	+++	+++	+++

หมายเหตุ: (-) หมายถึง ไม่สามารถสังเกตเห็นการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 2 รูปแบบตั้งที่กล่าวข้างต้น (+) หมายถึง พบการสร้าง pellicle หรือ attached biofilm เป็นเยื่อบางๆ (++) หมายถึง พบการสร้าง pellicle ปกคลุมบริเวณส่วนกลางของพื้นผิวของเหลว หรือพบการสร้าง attached biofilm ขนาดบาง (+++) หมายถึง พบการสร้าง pellicle ปกคลุมทั่วทั้งพื้นผิวของเหลว หรือพบการสร้าง attached biofilm ขนาดหนา เกณฑ์ดังกล่าวอ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Pattiyathane และคณะ (Effect of curcumin on *Helicobacter pylori* biofilm formation., African Journal of Biotechnology. 2009;8(19):5106-15.) การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ



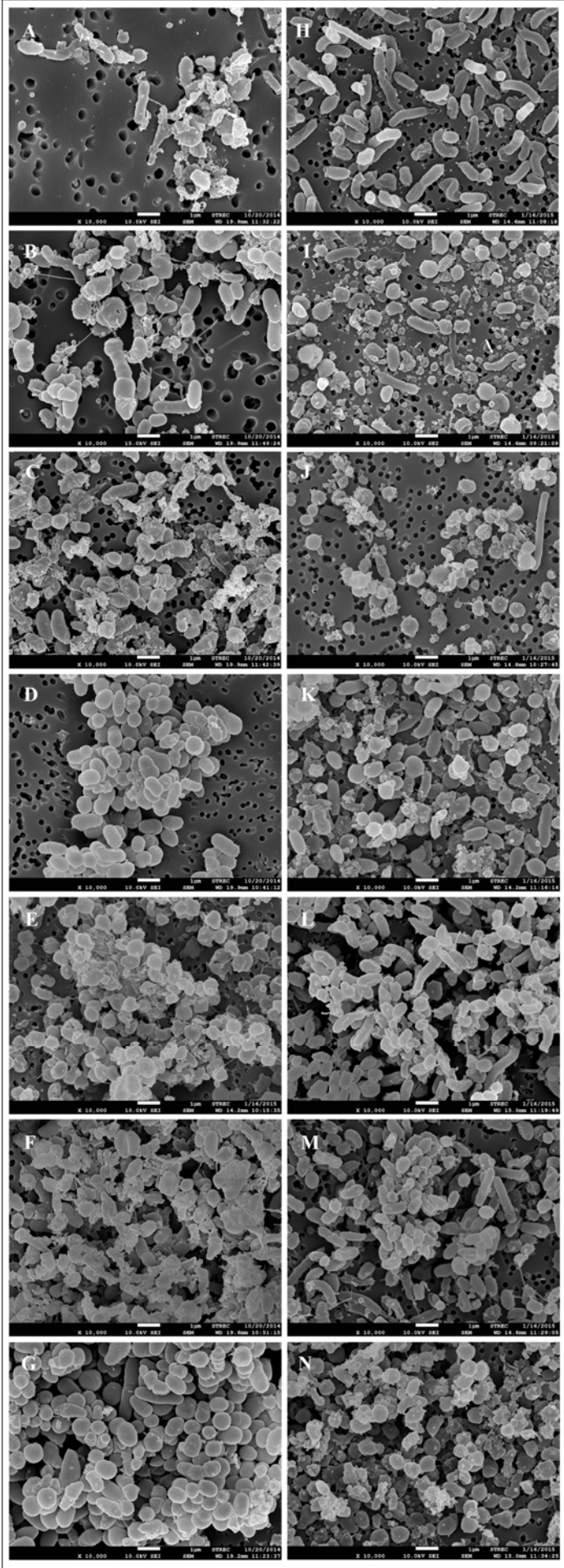
**รูปที่ 5 :** ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 และเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* กราฟแท่งสีดำแสดงปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (ATCC43504) กราฟแท่งสีขาวแสดงปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* (VT1244) ปริมาณไบโอฟิล์มของเชื้อคำนวณจากค่าความเข้มของแสงของหลอดทดลองที่มีเชื้อหักลบกับค่าความเข้มของแสงของ

หลอดทดลองที่เป็นแบคทีเรีย การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ และนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย

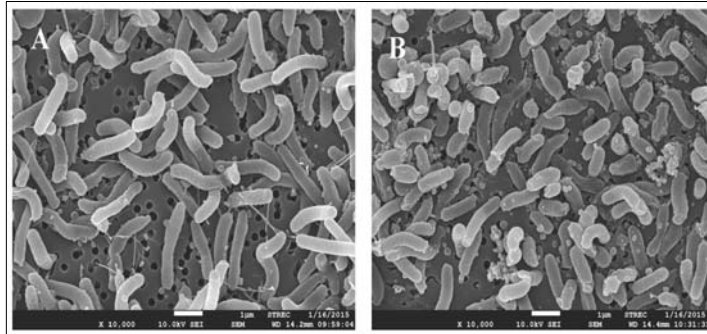
#### 4.5 ลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD*

เปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ระหว่างเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ภายหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ด้วย pellicle assay และเก็บ pellicle ของเชื้อที่สร้างขึ้นในแต่ละวัน ตั้งวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ของการบ่ม โดยเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 สามารถเก็บ pellicle ของวันที่ 3 ถึง 7 ของการบ่ม และสามารถเก็บเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระแทนการเก็บ pellicle ของวันที่ 1 และ 2 ของการบ่ม ขณะที่เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* สามารถเก็บ pellicle ของวันที่ 4 ถึง 7 ของการบ่ม และสามารถเก็บเชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระแทนการเก็บ pellicle ของวันที่ 1 ถึง 3 ของการบ่ม พบว่ารูปร่างของเชื้อ *H. pylori* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 (รูปที่ 6A ถึง 6G) และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* (รูปที่ 6H ถึง 6N) มีลักษณะเปลี่ยนจากรูปแท่งไปเป็นรูปกลมเมื่อไบโอฟิล์มมีอายุมากขึ้น เมื่อสังเกตลักษณะโครงสร้างสามมิติของเชื้อตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ไม่พบลักษณะโครงสร้างของไบโอฟิล์มในวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 6A และ 6B และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ไม่พบลักษณะโครงสร้างของไบโอฟิล์มในวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 6H ถึง 6J โดยเซลล์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เก็บมาศึกษา ณ วันดังกล่าวเป็นเซลล์เชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระ

ลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มสามารถพบได้ในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 ดังแสดงในรูปที่ 6C และ 6G โดยเชื้อมีรูปร่างกลมและเกาะกลุ่มกันอย่างหนาแน่นภายใต้โครงสร้างของ extracellular matrix ที่มีรูปร่างไม่แน่นอนซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยเส้นใยละเอียด และมีความหนาแน่นของโครงสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นเมื่อไบโอฟิล์มมีอายุมากขึ้น ขณะที่เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* มีโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มที่แตกต่างออกไป กล่าวคือเชื้อมีรูปร่างกลมเกาะเป็นกลุ่มหลวมอยู่แบบกระจายและมีปริมาณเส้นใยที่เชื่อมต่อกับแต่ละเซลล์ที่น้อยกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ดังแสดงในรูปที่ 6K และ 6N นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของลักษณะโครงสร้างสามมิติของรูปร่างเซลล์จากโคโลนีของเชื้อ *H. pylori* ที่มีอายุ 3 วันทั้งสองสายพันธุ์ โดยเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 มีเซลล์ที่เป็นแท่งยาวและมีแฟลเจลลาเป็นสายยาวจำนวนมาก (รูปที่ 7A) ขณะที่เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* มีเซลล์ที่เป็นแท่งสั้นและมีแฟลเจลลาเป็นสายสั้น (รูปที่ 7B)



**รูปที่ 6 :** ภาพสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 และเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ในช่วงระยะเวลาต่างๆ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 10,000 เท่า (A) และ (B) คือเซลล์เชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ณ วันที่ 1 และวันที่ 2 ตามลำดับ (C) ถึง (G) คือ pellicle ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ณ วันที่ 3 ถึงวันที่ 7 ตามลำดับ (H) ถึง (J) คือเซลล์เชื้อที่ลอยอยู่อย่างอิสระซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ณ วันที่ 1 ถึงวันที่ 3 ตามลำดับ (K) ถึง (N) คือ pellicle ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ณ วันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ตามลำดับ ขนาดของวัตถุที่เห็นในภาพเทียบได้กับสเกลขนาด 1  $\mu\text{m}$



**รูปที่ 7 :** ภาพสามมิติของรูปร่างเซลล์จากโคลนของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 และเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ที่มีอายุ 3 วันจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 10,000 เท่า (A) และ (B) คือเซลล์จากโคลนของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ที่มีอายุ 3 วันตามลำดับ ขนาดของวัตถุที่เห็นในภาพเทียบได้กับสเกล ขนาด 1  $\mu\text{m}$

## 5. สรุปผลและอภิปรายผล

สืบเนื่องมาจากความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียมีส่วนช่วยให้เชื้อสามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ตึงเครียดต่างๆ และยังป้องกันตัวเชื้อจากการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะและทำให้การรักษาการติดเชื้อเป็นไปได้ยากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการศึกษาที่เชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในขณะที่อยู่ในร่างกายของมนุษย์ (1) เป็นส่วนสำคัญที่อาจทำให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังหรือการรักษาที่ล้มเหลวตามมา (2) มีรายงานว่าพบไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ในแหล่งน้ำทั่วไปตามธรรมชาติ และยังสามารถพบได้ในระบบการจัดการน้ำประปาและน้ำดื่ม (3) จึงอาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อดังกล่าวจากสิ่งแวดล้อมสู่คนทางหนึ่ง ปัจจุบันได้มีการค้นพบและอธิบายกลไกในระดับโมเลกุลซึ่งควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *S. epidermidis* ถูกควบคุมโดย *icaADBC* operon ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ poly *N*-acetylglucosamine ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่มีความจำเป็นของไบโอฟิล์มของเชื่อดังกล่าว (4,5) ขณะที่การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *V. cholera* ถูกควบคุมโดยระบบ quorum sensing ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่ควบคุมการสังเคราะห์

exopolysacchhalide อาทิเช่น ยีน *hapR* และยีน *vpsR* (6) อย่างไรก็ตามการศึกษาอื่นที่มีความเกี่ยวข้องในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ยังมีจำกัดและไม่สามารถนำมาอธิบายกลไกในระดับโมเลกุลที่ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน

ความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวต่างๆ เป็นสิ่งจำเป็นในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ (7) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแฟลเจลลาไม่เพียงแต่มีหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย แต่ยังมีส่วนช่วยในการสัมผัสกับพื้นผิวทำให้เกิดการยึดเกาะระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับพื้นผิวนั้นๆ (8) โปรตีน flagellin เป็นโปรตีนหลักที่สำคัญของแฟลเจลลาของเชื้อแบคทีเรียและมีคุณสมบัติช่วยยึดเกาะที่กับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ (9) นอกจากนี้ยังพบว่าแฟลเจลลามีส่วนช่วยในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียในบางสายพันธุ์ อาทิเช่น เชื้อ *Vibrio* spp. (8) และเชื้อ *Aeromonas* spp. (10) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์สร้างเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแฟลเจลลา ได้แก่ ยีน *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* และ *flhD* ด้วยเทคนิค inverse PCR mutagenesis เพื่อศึกษาบทบาทของยีนแฟลเจลลาที่มีผลต่อการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* อย่างไรก็ตามกระบวนการสร้างเชื้อที่มียีน *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* ยังไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากไม่สามารถทำการ transform พลาสมิดที่มียีนดังกล่าวกลายพันธุ์เข้าสู่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ได้ ดังนั้นจึงมีเพียงเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* เพียงสายพันธุ์เดียวที่ถูกนำมาใช้ในการทดลองนี้

ยีน *flhD* มีหน้าที่ในการควบคุมการสร้างโปรตีน FlhD หรือโปรตีน HAP2 มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า capping protein หุ้มอยู่บริเวณส่วนปลายสุดของเส้นแฟลเจลลาของเชื้อแบคทีเรีย (11) มีความสำคัญในการกระตุ้นกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของโปรตีน flagellin ก่อให้เกิดเรียงตัวกันเป็นสายฟิลาเมนต์ที่สมบูรณ์ในการสร้างแฟลเจลลาของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* พบว่าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้แต่มีอัตราที่ช้าลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว (12) ในปี ค.ศ. 1999 Kim และคณะ (11) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *flhD* ของเชื้อ *H. pylori* ในการควบคุมการเคลื่อนที่และการอยู่อาศัยในชั้นเยื่อเมือกของกระเพาะอาหาร พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* มีแฟลเจลลาที่มีลักษณะรูปร่างผิดปกติ กล่าวคือมีแฟลเจลลาที่สั้นลงและกระเปราะที่อยู่ตรงส่วนปลายของแฟลเจลลาหายไป ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (13) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* มีความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงให้เห็นถึงแฟลเจลลาของเชื้อที่มีขนาดสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการที่เชื้อไม่สามารถผลิตโปรตีน FlhD ทำให้มีผลต่อกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของโปรตีน flagellin และเกิดการเรียงตัวของสายฟิลาเมนต์ที่ไม่สมบูรณ์ในการสร้างแฟลเจลลาของเชื้อแบคทีเรีย

นอกจากหน้าที่ในการเคลื่อนที่แล้ว ยีน *flhD* ยังมีส่วนช่วยในการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ (14) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* สามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุช่องเสียง HEp-2 ได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ข้อมูลจากการศึกษาในหลอดทดลองที่ผ่านมาของเชื้อ *Clostridium difficile* ที่มียีน *flhD* กลายพันธุ์ พบว่าเชื้อดังกล่าวยังสามารถยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุผิวเซลล์ลำไส้ได้ดีขึ้น (15) โดยอาจเกิดจากการที่เชื้อเคลื่อนที่ได้ช้าลงเนื่องมาจากการสร้างแฟลเจลลาที่ไม่สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ จึงมีโอกาสมัผัสกับเซลล์เยื่อบุผิวได้นานขึ้นและสามารถยึดเกาะเซลล์เยื่อบุผิวนั้นได้ (16) ในทางกลับกันการศึกษาในสัตว์ทดลองกลับพบว่าโปรตีน FlhD ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะบริเวณลำไส้ของหนูแฮมสเตอร์ เนื่องจากพบว่าเชื้อ *C. difficile* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* และเชื้อสายพันธุ์ปกติสามารถยึดเกาะบริเวณลำไส้ได้ไม่แตกต่างกัน (16) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้โปรตีน FlhD ของเชื้อ *H. pylori* อาจไม่มีปัจจัยในการช่วยยึดเกาะกับพื้นผิวของเซลล์เยื่อบุช่องเสียง HEp-2 นอกจากนี้ Clyne และคณะในปี ค.ศ. 2000 ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* กับการยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ/หรือ *flaB* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน flagellin ยังสามารถยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารได้ (17) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pattiyathane ในปี ค.ศ. 2009 ซึ่งพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* ของเชื้อ *H. pylori* ไม่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาการยึดเกาะของเชื้อบนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (18) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาดังกล่าวของ Clyne และคณะในปี ค.ศ. 2000 พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhA* ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์แฟลเจลลา ส่งผลให้เชื้อดังกล่าวยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารของมนุษย์ลดลงอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์เยื่อบุผิวอาจถูกควบคุมด้วยยีน *flhA* แต่แฟลเจลลาอาจไม่มีบทบาทโดยตรงในการควบคุมการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* (17) การกลายพันธุ์ของยีน *fljQ* ซึ่งมีความจำเป็นในกระบวนการสร้างแฟลเจลลาและการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* (19) ส่งผลให้การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* บนเซลล์เยื่อบุผิวกลองเสียง HEp-2 (18) และเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร AGS (19) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นยีน *flhA* และ *fljQ* อาจทำงานร่วมกันในการควบคุมการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* บนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร

ในการศึกษารุ่นนี้พบว่าเชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในหลอดทดลองเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค pellicle assay ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่สามารถพบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคดังกล่าว(20) รูปแบบของไบโอฟิล์มที่เชื้อ *H. pylori* สร้างขึ้นสามารถพบได้ทั้ง pellicle และ attached biofilm โดยเกิดขึ้นบริเวณรอยต่อระหว่างของเหลวกับอากาศ (20) ลักษณะของไบโอฟิล์มเกิดขึ้นในการศึกษารุ่นนี้ยังสามารถพบได้ในเชื้อ *Campylobacter jejuni* (21) เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (22) และเชื้อ *V. parahaemolyticus* (23) พบว่ายีน *fljD* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าในช่วงเริ่มต้นของการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* มีการแสดงออกของยีน *fljD* มากขึ้น (24) ขณะที่เชื้อ *Cronobacter sakazakii* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* มีปริมาณไบโอฟิล์มที่ลดลง 9 % เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ภายหลังจากวัดปริมาณไบโอฟิล์มด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet (25) นอกจากยีน *fljD* แล้ว ยีนอื่นๆ ที่อยู่บน *fljD* operon ได้แก่ ยีน *flaG* และ *fljS* ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์เช่นกัน มีการศึกษาพบว่าเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสองส่งผลให้เชื้อ *C. jejuni* สร้าง pellicle ได้ลดลง (21) อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ของยีน *fljS* กลับส่งผลให้เชื้อ *Yersinia pseudotuberculosis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้มากขึ้นบนพื้นผิวของหลอดแก้ว (26) ในการศึกษาเมื่อศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เชิงกึ่งปริมาณโดยสังเกตลักษณะไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้น ได้แก่ pellicle และ attached biofilm ด้วยเทคนิค pellicle assay พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* สร้างไบโอฟิล์มทั้งสองลักษณะช้ากว่าเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่มีการกลายพันธุ์ 1 วัน โดยเริ่มสังเกตเห็นการสร้าง pellicle และ attached biofilm ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 เริ่มสังเกตเห็นลักษณะไบโอฟิล์มทั้งสองในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. jejuni* ที่ยีนแฟลเจลลา ได้แก่ ยีน *fljA* ยีน *flaA* ยีน *flaB* และยีน *flaG* ถูกยับยั้งการทำงาน พบว่าเชื้อดังกล่าวยังคงสร้าง pellicle ได้ แต่เริ่มสร้างช้ากว่าเชื้อ *C. jejuni* สายพันธุ์ปกติ (21) ขณะที่การศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เชิงปริมาณด้วยเทคนิคการย้อมสี crystal violet ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค pellicle assay ในหลอดทดลองครบ 7 วัน พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* มีปริมาณไบโอฟิล์มที่สร้างขึ้นไม่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่มีการกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนอื่นๆ ของเชื้อ *H. pylori* ได้แก่ ยีน *clpA* ยีน *ppk* และยีน *hpaA* พบว่าเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวสร้างไบโอฟิล์มได้ไม่แตกต่างกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ (7) นอกจากนี้การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแฟลเจลลาบางชนิด ได้แก่ยีน *flgR* ยีน *fljQ* และยีน *flaA* พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *flgR* ส่งผลให้เชื้อ *H. pylori* สร้างไบโอฟิล์มลดลง ขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน *fljQ* และยีน *flaA* ไม่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าว(18) การกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* ในการศึกษานี้อาจส่งผลให้มีการสร้างสายพิลลาเมนต์ของแฟลเจลลาที่ไม่สมบูรณ์ (27) จึงมีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อที่ช้าลง

การศึกษารุ่นนี้ได้ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดทำการศึกษาโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ผลของการศึกษาแสดงให้เห็นถึงลักษณะเซลล์ของเชื้อที่เรียงตัวเกาะกลุ่มกันอยู่ในไบโอฟิล์มและถูกปกคลุมด้วย extracellular matrix เชื่อมต่อกันด้วยเส้นใยละเอียด ซึ่งถือเป็นลักษณะสำคัญของโครงสร้างไบโอฟิล์มที่เจริญเต็มที่ (7) ลักษณะโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (28) ภาพที่บันทึกได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐานที่ไม่มีการกลายพันธุ์

ซึ่งภายในประกอบไปด้วยเซลล์ของเชื้อรูปร่างกลม เกาะกันเป็นกลุ่มแน่น ผังตัวภายใต้ extracellular matrix และเชื่อมต่อกันด้วยเส้นใยละเอียดเป็นจำนวนมาก ในทางตรงกันข้ามการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ส่งผลต่อโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มที่สมบูรณ์ของเชื้อ *H. pylori* ในระดับเซลล์ กล่าวคือเซลล์ของเชื้อมีการเกาะกลุ่มกันแบบหลวมๆ ถูกปกคลุมด้วย extracellular matrix ที่ไม่หนาแน่น และเชื่อมต่อกันด้วยเส้นใยละเอียดจำนวนน้อย แม้ว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ยังคงสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ แต่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีผลต่อการพัฒนาโครงสร้างที่สมบูรณ์ของไบโอฟิล์ม จากการศึกษาท่อนหน้าพบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *napA* กับการพัฒนาโครงสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* เมื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *napA* ส่งผลให้โครงสร้างของไบโอฟิล์มจับกันแบบหลวมเมื่อเทียบกับไบโอฟิล์มของเชื้อสายพันธุ์ปกติ ซึ่งเกิดจากเซลล์ของเชื้อดังกล่าวสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะระหว่างกันภายในไบโอฟิล์ม (29)

การศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของยีน *fliD* ต่อการเคลื่อนที่ การยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อเมือกและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ยีน *fliD* มีหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน FliD ซึ่งมีความสำคัญในการสร้างแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ของเชื้อแบคทีเรีย การกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีผลต่อการเคลื่อนที่ที่ลดลงของเชื้อ *H. pylori* แต่ไม่พบว่ามีผลต่อการยึดเกาะต่อเซลล์เยื่อบุช่อง HEp-2 อย่างไรก็ตามแม้ว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 แต่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีผลต่อการชะลอการสร้างไบโอฟิล์มและการพัฒนาโครงสร้างที่สมบูรณ์ของไบโอฟิล์ม ทั้งนี้โปรตีน FliD มีแนวโน้มที่สามารถถูกนำมาใช้เป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการพัฒนายาหรือวัคซีนเพื่อใช้รักษาหรือป้องกันการติดเชื้อ *H. pylori* ที่มีสาเหตุมาจากการสร้างไบโอฟิล์มได้ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายกลไกในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ได้อย่างครบถ้วน และยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

#### เอกสารอ้างอิง

1. Cammarota G, Sanguinetti M, Gallo A, Posteraro B. Review article: biofilm formation by *Helicobacter pylori* as a target for eradication of resistant infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2012;36(3):222-30.
2. Cammarota G, Branca G, Ardito F, Sanguinetti M, Ianiro G, Cianci R, *et al.* Biofilm demolition and antibiotic treatment to eradicate resistant *Helicobacter pylori*: a clinical trial. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2010;8(9):817-20.e3.
3. Andersen L, Rasmussen L. *Helicobacter pylori* -coccioid forms and biofilm formation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2009;56:112-5.
4. Cue D, Lei MG, Lee CY. Activation of sarX by Rbf is required for biofilm formation and *icaADBC* expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 2013;195(7):1515-24.
5. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*. 1999;67(10):5427-33.
6. Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*. 2003;50(1):101-4.
7. Cole SP, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*. 2004;186(10):3124-32.
8. McCarter LL. Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001;65(3):445-62.

9. McSweegan E, Walker RI. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infection and Immunity*. 1986;53(1):141-8.
10. Santos PG, Santos PA, Bello AR, Freitas-Almeida AC. Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. *Letters in Applied Microbiology*. 2011;52(1):49-55.
11. Kim JS, Chang JH, Chung SI, Yum JS. Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *fljD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(22):6969-76.
12. McCarter LL. Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*. 1995;177(6):1595-609.
13. Sela S, Frank S, Belausov E, Pinto R. A mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(8):5653-8.
14. Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infection and Immunity*. 1998;66(3):1000-7.
15. Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, Delmée M, Collignon A, Bourlioux P, *et al.* Molecular characterization of *fljD* gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(3):1178-83.
16. Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infection and Immunity*. 2011;79(10):4061-7.
17. Clyne M, Ocroinin T, Suerbaum S, Josenhans C, Drumm B. Adherence of isogenic flagellum-negative mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* to human and ferret gastric epithelial cells. *Infection and Immunity*. 2000;68(7):4335-9.
18. Pattiyathane P, Vilaichone R, Chaichanawongsaroj N. Inhibitory activity of curcumin against *Helicobacter pylori* biofilms : the role of flagellar genes and comparative proteomics analysis. Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR): Chulalongkorn University; 2009.
19. Foynes S, Dorrell N, Ward SJ, Zhang ZW, McColm AA, Farthing MJ, *et al.* Functional analysis of the roles of FliQ and FliB in flagellar expression in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;174(1):33-9.
20. Spohn G, Scarlato V. Motility, Chemotaxis, and Flagella. In: Mobley H, Mendz G, Hazell S, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001.
21. Joshua GWP, Guthrie-Irons C, Karlyshev AV, Wren BW. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*. 2006;152(2):387-96.
22. Ude S, Arnold DL, Moon CD, Timms-Wilson T, Spiers AJ. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environmental Microbiology*. 2006;8(11):1997-2011.
23. Enos-Berlage JL, Guvener ZT, Keenan CE, McCarter LL. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*. 2005;55(4):1160-82.

24. Manos J, Arthur J, Rose B, Tingpej P, Fung C, Curtis M, *et al.* Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung. *Journal of Medical Microbiology*. 2008;57(12):1454-65.
25. Gerrits MM, van Vliet AHM, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *The Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(11):699-709.
26. Xu S, Peng Z, Cui B, Wang T, Song Y, Zhang L, *et al.* FliS modulates FlgM activity by acting as a non-canonical chaperone to control late flagellar gene expression, motility and biofilm formation in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Environmental Microbiology*. 2014;16(4):1090-104.
27. Spohn G, Scarlato V. Motility, Chemotaxis, and Flagella. In: Mobley H, Mendz G, Hazell S, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001.
28. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Traini T, Giulio MD, Lannutti SN, *et al.* Dynamic colonization of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2008;43(2):178-85.
29. Yang F-L, Hassanbhai AM, Chen H-Y, Huang Z-Y, Lin T-L, Wu S-H, *et al.* Proteomannans in biofilm of *Helicobacter pylori* ATCC 43504. *Helicobacter*. 2011; 16(2) :89-98.

## 6. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมกับยีนที่อยู่ใน operon เดียวกัน ได้แก่ ยีน ยีน *flaG* และ *fliS* ซึ่งอาจส่งผลการทำงานร่วมกับยีน *fliD* ในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* และควรทำ complementation strains ในการทดลองด้วย เพื่อให้ได้ผลที่น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

## 7. ภาคผนวก

**Ratthawongjirakul P., Thongkerd V., Chaicumpa W.** The impacts of a *fliD* mutation on the biofilm formation of *Helicobacter pylori*. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*. 2016. Article in press.

**Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.**

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ  
**Ratthawongjirakul P., Thongkerd V., Chaicumpa W.** The impacts of a *fliD* mutation on the biofilm formation of *Helicobacter pylori*. Asian pacific journal of tropical biomedicine. 2016. Article in press.
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์  
เอกสารแนบหมายเลข 4
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)  
ไม่มี

---

**Subject:** Fw: Please resubmit manuscript with APJTB\_2016\_232

---

**From:** Panan Pattiyathanee (panan\_etc@yahoo.com)

---

**To:** panan\_etc@yahoo.com;

---

**Date:** Wednesday, 15 June 2016, 19:36

---

Dear author,

Thanks for your kind email.

Your paper has been accepted, but not determined to be published in which issue yet. I will inform you if the decision is made.

Regards,  
Autumn

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

EVISE® Online submission

at [https://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=APJTB](https://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=APJTB)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/2020/>

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/22211691>

[www.apjtb.com](http://www.apjtb.com)

Email: [apjtbb@yahoo.com](mailto:apjtbb@yahoo.com), [apjtbb@apjtb.com](mailto:apjtbb@apjtb.com)

Tel: +86-898-36335723

Fax: +86-898-36335723

---

**From:** Panan Pattiyathanee <[panan\\_etc@yahoo.com](mailto:panan_etc@yahoo.com)>

**To:** Shunhai Qu <[apjtbb@yahoo.com](mailto:apjtbb@yahoo.com)>

**Sent:** Sunday, 5 June 2016, 13:13

**Subject:** Re: Please resubmit manuscript with APJTB\_2016\_232

Dear Autumn

Could you please update my re-submission status for manuscript number APJTB 2016 232, re-submitted since May 17 and paid for submission fee since May 22.

Best regards,

Panan Ratthawongjirakul Ph.D.

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Bangkok, Thailand

On 10 พ.ค. 2016, at 11:53, Shunhai Qu (Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine) <[EviseSupport@elsevier.com](mailto:EviseSupport@elsevier.com)> wrote:

Ref: APJTB\_2016\_232

Title: The impacts of a *fliD* mutation on the biofilm formation of *Helicobacter pylori*

Journal: Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

Dear Dr. Ratthawongjirakul,

After the preliminary review, your article “**The impacts of a *fliD* mutation on the biofilm formation of *Helicobacter pylori***” (APJTB\_2016\_232) was agreed to be published. Here attached the publishing agreement and the acceptance letter. Please reply us within 5 days.

Please revise your paper according to the following suggestions and highlight the revision with different color to facilitate our work:

1. Please provide a brief introduction for each author, including degree, title, etc.
2. Please delete Figure 1 and replace its data with words in the text.
3. Also, can Figures 2,3 and 5 be deleted and their data be included using words in the text? Because they are very simple.
4. Are there color Figures for Figures 6 and 7?
5. Are MRG5580161 and ASHCU57002 grant number?
6. Update the references and make sure half of the references are in recent 3 years!!!! (2012-2015), another one-fourth references are in recent 5 years (i.e. 2010-2015). Old references are better replaced with updated ones. References must meet these requirements!!! Citations should be labeled with square bracket and should appear in front of the period or comma at the end of the sentence/clause. All references should be cited. It is better to include citation from Pubmed, the more the better.

We suggest you search the key words on PMC and add new references to your paper.

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine is an international open-access journal. The publication fee is needed to make the article open-access. If you agree to pay the publication fee, please remit 500 USD (Excluding the transfer processing fee) to the following account by telegraphic transfer or Money Gram.

1. The details of telegraphic transfer account:

Swiftcode: BKCHCNBJ740

Account name: Haikou Yibai Culture Media Co., Ltd.

Bank of deposit: Feng Xiangxi Rd. Sub-branch, Qiongsan District, Bank of China

Account number: 2650 1595 3069

2. The details of Money Gram:

The First Name is Xiaojun, and the Last Name is Pan, the address is as follow:

Room 2202, Unit 2, Building No. B, Huarongfu, Feng Xiangxi Road 28. Qiongsan District, Haikou, China

Tel: +86-898-36335723

(After your payment, Please provide us your Money Gram reference number, the first name and Last name of the sender.)

3. The details of Western Union:

The First Name is Xiaojun, and the Last Name is Pan, the address is as follow:

Room 2202, Unit 2, Building No. B, Huarongfu, Feng Xiangxi Road 28. Qiongsan District, Haikou, China

Tel: +86-898-36335723

(After your payment, Please provide us your MTCN number, the first name and Last name of the sender.)

4. If you would like to pay through Paypal, please contact us for detailed payment information.

Attention: The publishing agreement must be signed by the remitter who pays for the fees.

Please mark the paper Ref. No. in the remittance details.

To speed up the publishing process, please pay the fee as soon as possible.

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

---

## Attachments

- Pic.pdf (101.00 KB)

1 **The impacts of a *fliD* mutation on the biofilm formation of *Helicobacter pylori***

2 **Running title:** *fliD* impacts on *Helicobacter pylori* biofilm

3 Panan Ratthwongjirakul Ph.D.<sup>a\*</sup>, Miss Vorraruthai Thongkerd<sup>b</sup>, Prof. Wanpen  
4 Chaicumpa Ph.D.<sup>c</sup>

5 <sup>a</sup>Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology, Faculty of Allied  
6 Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

7 <sup>b</sup>Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine,  
8 Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

9 <sup>c</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol  
10 University, Bangkok, Thailand

11

12 \*Corresponding author

13 154 Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Chulapat 1 Bldg.

14 Rama 1 Rd., Pathumwan, Bangkok, Thailand

15 Tel: +662-218-1084; Fax: +662-218-1083

16 E-mail: panan\_etc@yahoo.com

17

18

19

20

21

22

23 **Keywords:** *Helicobacter pylori*; biofilm; flagella; *fliD*

1 **Abstract**

2 **Objective:** To investigate the impact of the *fliD* gene on the biofilm formation of *H. pylori*.

3 **Methods:** *H. pylori fliD* mutant was constructed using inverse PCR mutagenesis. The  
4 mobility of the bacteria and its adhesion ability to human epithelial cells were assessed using  
5 a motility assay and a fluorescein isothiocyanate staining adhesion assay, respectively. The  
6 formation of its biofilm was evaluated using a pellicle assay and a crystal violet staining  
7 assay. The cyto-architecture of the biofilm was documented with scanning electron  
8 microscopy.

9 **Results:** It was found that there was no significant difference in the levels of bacterial  
10 adhesion and the biofilm formation between the wild-type ATCC 43504 and the *fliD* mutant.  
11 Apart from a poor motility, the *fliD* mutant had a slightly delayed formation of its biofilm and  
12 an incomplete cyto-architecture of its biofilm. The bacterial cells residing in the biofilm of  
13 the *fliD* mutant showed a loose accumulation with less apparent cross-linking fibrils. Most of  
14 the mutant cells had truncated flagella.

15 **Conclusions:** This study provides the preliminary evidences that *fliD* potentially regulates  
16 biofilm formation and is required for the motility of *H. pylori*. Further studies need to be  
17 performed in order to develop *fliD* as a novel target for vaccine or antimicrobial agent in  
18 future.

19

20

21

22

23

24

## 1 **1. Introduction**

2 Half of the world's population, especially in developing countries, is colonized by the  
3 microaerophilic, spiral-shaped bacterium *Helicobacter pylori* [1, 2]. Without treatment, the  
4 bacterial infection can develop into various upper gastrointestinal disorders, such as chronic  
5 gastritis, peptic ulcer disease, gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma,  
6 and gastric cancer [3, 4]. The bacteria were recognized as the first bacterial carcinogens and  
7 were classified by the International Agency for Research on Cancer, which is part of World  
8 Health Organization, as a class I carcinogen in 1994 [5].

9 Flagella-driven movement is important for the initial colonization of the stomach  
10 mucosa and is needed for full infection [6]. Flagella also play an important role in swarming,  
11 adhesion and biofilm formation by many bacteria [7-9]. To start the process of biofilm  
12 formation, some bacteria contact surfaces using flagella, resulting in cell-to-surface adhesion  
13 involving negative electrostatic reactions. Thus, flagella are thought to be one of the initial  
14 factors used by some bacterial species for cell-to-surface adhesion and biofilm formation  
15 [10].

16 *H. pylori* has an alternative life style as a biofilm. This bacterium enables to form  
17 biofilms both *in vitro*, including in the human body [9, 11, 12]. The biofilm formation of *H.*  
18 *pylori* seems to be a protective strategy for the bacteria. For example, *H. pylori* living in  
19 biofilms can survive the host immune defence mechanisms and conquer environmental  
20 stresses, such as the highly acidic conditions in the human stomach and reactive oxygen  
21 species from phagocytic cells. Furthermore, biofilms promote bacterial survival of  
22 antimicrobial drug treatment, resulting in drug resistance, therapeutic failure and chronic  
23 infections in human [11-13].

24 The *fliD* gene encodes a 76 kDa flagellar capping protein called FliD or HAP2. The  
25 *fliD* operon of *H. pylori* contains the *flaG*, *fliD*, and *fliS* genes that are under the control of a

1  $\sigma^{28}$ -dependent promoter [14]. The HAP2 protein controls the polymerization of endogenous  
2 flagellin, which forms a filament [15]. Based on studies of mice infected with an *H. pylori*  
3 *fliD* mutant, the FliD protein is an important protein for the *in vivo* colonization and the  
4 formation of functional flagella [14, 16].

5 Biofilm growth is most likely an important virulence factor in some bacteria and the  
6 specific molecular mechanisms controlling the formation of those bacterial biofilms have  
7 been thoroughly explored. However, in *H. pylori*, the precise molecular mechanisms of  
8 biofilm formation are still unclear. Various genes that are important for the biofilm formation  
9 by other bacteria do not seem to be involve in the biofilm formed by *H. pylori* [17]. A  
10 proteomic analysis recently reported that the flagellar protein complex, which includes FliD,  
11 is up-regulated in *H. pylori* during the mode of biofilm growth, compared with the expression  
12 of the complex during the planktonic growth mode [18]. Thus, the FliD protein may be an  
13 important factor for the formation of the biofilm of *H. pylori*. In the present study, a *H. pylori*  
14 *fliD* mutant was constructed to investigate the mutant's *in vitro* biofilm formation in  
15 comparison with that of the wild type. The biofilm architectures of both bacteria were  
16 assessed using scanning electron microscopy. Flagella not only control bacterial motility but  
17 also promote surface adhesion [8], and both processes are related to the formation of biofilms  
18 by other bacteria [10, 19]. Thus, our study also appraised the motility and the adhesive  
19 activity of the *fliD* mutant.

20

## 21 **2. Materials and Methods**

### 22 ***2.1 Bacterial strains and growth conditions***

23 The *H. pylori* strain ATCC 43504 (American Type Culture Collection, Manassas,  
24 VA, USA) was grown on brain-heart infusion (BHI) agar (Oxoid Limited, Cheshire, UK)

1 supplemented with 7% (v/v) sheep blood at 37 °C for 3 days under microaerobic conditions  
2 (N<sub>2</sub>: 85%, O<sub>2</sub>: 5%, CO<sub>2</sub>: 10%) using a gas generating kit (Mitsubishi, Japan).

### 3 **2.2 PCR amplification for *H. pylori* *fliD* gene**

4 *H. pylori* chromosomal DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit  
5 (QIAGEN, Venlo, Netherlands) following the manufacturer's instructions. The chromosomal  
6 DNA of *H. pylori* was used as the template for the amplification of *fliD* by PCR using the  
7 following *fliD* gene-specific primers: *fliDF* forward primer 5'-  
8 GCTACCAATGGCGAAGTGAT-3' and *fliDR* reverse primer 5'-  
9 CTTTTTGGATTGCGGTGTTT-3'. The PCR amplification was performed in 100 µl reaction  
10 mixtures containing 400 ng of the DNA template, 50 pmol of each specific gene primer, 200  
11 µM of each deoxynucleotide triphosphate, 1x PCR buffer, 25 µM MgCl<sub>2</sub>, and 1 U of *Taq*  
12 DNA polymerase under following conditions: 35 cycles of amplification (94 °C for 15 sec,  
13 50 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min) and a final extension at 72 °C for 7 min. Sterile  
14 distilled water was used as the negative control. The amplified PCR product was analyzed by  
15 electrophoresis using a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide.

### 16 **2.3 Construction of *H. pylori* isogenic *fliD* mutant**

17 A defined isogenic *H. pylori* ATCC 43504 mutant was constructed as described  
18 previously with some modification [20]. Briefly, the *fliD* amplified product was introduced  
19 into a pGEM<sup>®</sup> T-Easy vector (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and then  
20 transformed into *Escherichia coli* DH5α competent cells (New England Biolabs Inc.,  
21 Ipswich, MA, USA). The transformants were grown on Luria-Bertani (LB) agar containing  
22 100 µg/ml of ampicillin at 37 °C for 16 h. The positive colonies were distinguished by a  
23 blue/white colony screening assay. An 18-bp deletion and a unique *Bgl*II site were introduced  
24 into the cloned *fliD* gene fragment using inverse PCR mutagenesis (IPCRM) with the  
25 following primers: *InfliD* forward 5'-GGAGATCTATCCACGCTCACTAA-3' and *InfliD*

1 reverse 5'- GGAGATCTTAGACTCGGTTGTCT-3'. The mutagenesis product was inserted  
2 into a 1-kb kanamycin resistant (kan<sup>R</sup>) cassette with a *Bgl*III restriction site (kanamycin  
3 resistant cassette: Tn903) [21], synthesized from GeneArt<sup>®</sup> (Invitrogen, Grand Island, NY,  
4 USA) in the same orientation as the mutated gene. The constructed plasmid was introduced  
5 into *H. pylori* ATCC 43504 using a natural transformation. A double-crossover mutant was  
6 selected after 3 to 5 days of growth on complete BHI agar containing 20 µg/ml kanamycin.  
7 Successful recombination was assessed using PCR amplification with the *fliD* gene specific  
8 primers and gene sequencing (Bioneer Sequencing Service, South Korea).

#### 9 **2.4 Motility assay**

10 Three-day old colonies of wild-type *H. pylori* and the *fliD* mutant were suspended in  
11 BHI broth, and the final bacterial concentrations were adjusted equivalently for an optical  
12 density of 0.2 at 600 nm. An amount of 3 µl of the bacterial suspensions was spotted onto soft  
13 agar plates containing 0.3% (w/v) agar, 5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and  
14 2.8% (w/v) *Brucella* broth (Oxoid Limited, Cheshire, UK) [22]. The plates were incubated at  
15 37 °C under microaerobic condition for 5 days. The diameter of the area of outward  
16 migration was measured using vernier calipers. The results are expressed as the mean of the  
17 area over the zone of migration (in mm<sup>2</sup>). The experiments were performed in duplicate on  
18 three separated occasions.

#### 19 **2.5 Adhesion assay by FITC staining**

20 The ability of *H. pylori* to adhere to HEp-2 cells was assessed by FITC staining. The  
21 HEp-2 cells at 3 x 10<sup>6</sup> cells/well in complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM;  
22 Gibco, Carlsbad, CA, USA) were incubated in 6-well plates (Nunc; Thermo Fisher Scientific,  
23 Inc, USA) with sterile coverslips at the bottom of each well. The cells were left to adhere for  
24 24 h at 37 °C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The HEp-2 cells were washed twice with  
25 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA). Three-day old

1 colonies of wild-type *H. pylori* and *fliD* mutant were suspended in DMEM, and the final  
2 bacterial concentrations were adjusted equivalently to an optical density of 0.2 at 600 nm.  
3 The bacterial suspensions were then incubated with 0.1% (w/v) FITC (Sigma-Aldrich  
4 Chemical Co, St. Louis, MO, USA) and suspended in DMSO for 1 h under microaerobic  
5 condition at 37 °C in the dark. The FITC-labeled bacteria were washed three times with  
6 DMEM containing 0.1% Tween 20 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) using  
7 centrifugation. The HEp-2 cells were co-cultivated with 0.1% (w/v) FITC-labeled *H. pylori* at  
8 a density of  $3 \times 10^8$  CFU/ml per well for 2 h at 37 °C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.  
9 Subsequently, the co-cultures were washed three times with DPBS. The number of *H. pylori*  
10 cells adhering to the HEp-2 cells was measured using a microplate reader (Biotek Synergy  
11 Mx, USA) with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm.  
12 The wild-type strain values represented the control of 100% adhesion, and the mutant strain  
13 was calculated as the percent adhesion of the control. The experiments were performed in  
14 duplicate on three separate occasions.

## 15 **2.6 Biofilm culture condition**

16 The *H. pylori* biofilm was established *in vitro* using a pellicle formation assay as  
17 previously described [18, 23]. Briefly, 3-day-old colonies of wild-type *H. pylori* and the *fliD*  
18 mutant were suspended in 10 ml of BHI broth supplemented with 2% (w/v) β-cyclodextrin  
19 (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO, USA) in sterile glass test tubes. The final  
20 bacterial concentrations were adjusted equivalently to an optical density of 0.2 at 600 nm.  
21 The test tubes were left to stand for 7 days without shaking under microaerobic conditions at  
22 37 °C.

## 23 **2.7 Examination of biofilm formation**

24 The biofilm characteristics were described as follows: freely floating bacterial cells  
25 that formed at an air-liquid interface were designated as a pellicle, and bacterial cells attached

1 over the interior surface of glass test tube at an air-liquid interface were denoted as an  
2 attached biofilm. The development of the biofilm was examined as a blind test and scored  
3 daily over 7 days of incubation, as described by our previous study [23]. The levels of biofilm  
4 formation, either as a pellicle or an attached biofilm, were scored as follows: (-) neither form  
5 of biofilm was present; (+) a thin pellicle or a finely attached biofilm; (++) an accumulated  
6 pellicle or a thinly attached biofilm; or (++++) a mature pellicle covering the entire liquid  
7 surface or a dense attached biofilm. Experiments were performed in duplicate on three  
8 separate occasions.

### 9 ***2.8 Quantification of biofilm formation***

10 The *H. pylori* biofilm was quantified using a crystal violet staining technique as  
11 previously described [23]. The broth suspension was removed after allowing the formation of  
12 the biofilm over 7 days. The glass-attached biofilm was rinsed twice with PBS and dried at  
13 60 °C for 30 min. The attached biofilm was stained with 0.1% (w/v) crystal violet for 5 min  
14 at room temperature, washed with PBS three times, and dried at 60 °C for 15 min. The bound  
15 crystal violet was eluted with ethanol/acetone at 80:20 (v/v) for 1 min. The solution was  
16 transferred into 96-well plates, and the absorbance at 570 nm was measured using a  
17 spectrophotometer (Biotek Synergy Mx, USA). The level of the biofilm formation was  
18 determined by subtracting the mean optical density (OD) value of the blank from the value of  
19 the test samples. The BHI broth supplemented 2% (w/v)  $\beta$ -cyclodextrin served as a blank  
20 control. Experiments were performed in duplicate on three separate occasions.

### 21 ***2.9 Scanning Electron Microscopic analysis***

22 In order to observe the 3-dimensional structure among the different ages of bacterial  
23 biofilm, the bacteria were grown for 1 to 7 days using a pellicle formation assay as described  
24 above. After a defined incubation period, the culture broth was filtered through a Whatman®  
25 grade No.1 filter paper to isolate the pellicle for biofilm structural analysis using scanning

1 electron microscopy (SEM). If no apparent pellicle was observed, the planktonic cells were  
2 collected instead. The SEM was performed by the Scientific and Technological Research  
3 Equipment Center, Chulalongkorn University, Thailand. Briefly, the isolated pellicle was  
4 transferred to a vial, washed with PBS to remove the loosely attached bacteria, and fixed with  
5 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M PBS at pH 7.2. The samples were successively  
6 dehydrated through a graded series of ethanol washes with a 10-min incubation per step as  
7 follows: 30%, 50%, 70%, 90% and 100% thrice; (v/v). The samples were dried, coated with  
8 gold-palladium, and were examined with SEM (JEOL, Japan). Three-day old colonies of  
9 wild-type *H. pylori* and the *fliD* mutant grown on complete BHI agar were also collected for  
10 SEM analysis.

## 11 **2.10 Statistical analysis**

12 The differences in the means of the results of the motility assay, the adhesion assay,  
13 and the crystal violet staining technique between wild-type *H. pylori* and the *fliD* mutant  
14 were analyzed by Student's *t*-test. The probability value of  $P \leq 0.05$  was considered  
15 significantly different.

16

## 17 **3. Results**

### 18 **3.1 Construction of *H. pylori fliD* mutant by inverse PCR mutagenesis**

19 Our study focused on the *fliD* gene, which encodes the filament capping protein  
20 known to control the polymerization of endogenous flagellin into a filament [14]. To  
21 investigate the possible role of the *H. pylori fliD* gene in biofilm formation, a *H. pylori fliD*  
22 mutant was constructed by allelic replacement. The kan<sup>R</sup> cassette containing the kanamycin  
23 phosphotransferase gene that confers kanamycin resistance was cloned into the unique *Bgl*II  
24 site situated in the middle of the *fliD* gene engineered by inverse PCR mutagenesis. The  
25 constructed plasmid was transformed into the wild-type *H. pylori* by a natural transformation.

1 PCR analysis using the primers *fliDF* and *fliDR* confirmed that a double recombination event  
2 had successfully occurred. PCR experiments with the primers *fliDF* and *fliDR* consistently  
3 amplified a single band of 292 and 1292 bp from the wild-type *H. pylori* and the *fliD* mutant  
4 chromosomal DNA, respectively. Sequencing analysis confirmed that a 1.29-kb fragment  
5 contained the 1-kb kan<sup>R</sup> cassette.

6

### 7 ***3.2 In vitro characteristics of the H. pylori fliD mutant***

8 When grown on complete BHI agar, the colony morphology and the growth rate of  
9 the *fliD* mutant showed no significant difference when compared with the wild-type strain.  
10 The impact of the *fliD* mutation on cell motility was investigated through observations of the  
11 cell movement through *Brucella* soft agar plates. The area over the zone of migration was  
12 measured after an incubation period of 5 days, and the results are presented in units of mm<sup>2</sup>.  
13 The zone of migration of the *fliD* mutant (28.56 mm<sup>2</sup>) was significantly smaller than the  
14 wild-type *H. pylori* strain (49.83) ( $P = 0.013$ ).

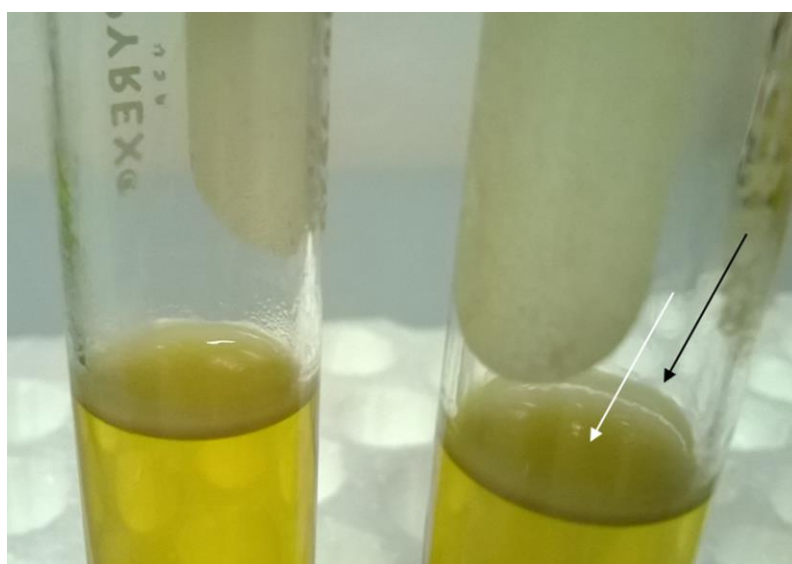
15 The adhesion of *H. pylori* to a surface seems to be the initial step for the biofilm  
16 formation of bacteria. A cell-to-cell adhesion assay was used to investigate the adhesive  
17 properties of the two *H. pylori* strains. The FITC-labeled wild-type strain and the *fliD* mutant  
18 strain were separately incubated with human HEp-2 cells. The adhesive activity of the wild-  
19 type cells was shown as 100%, and the percent adhesion of the *fliD* mutant relative to the  
20 wild-type control was 97.75%. The mutation had no significant effect on the ability of *H.*  
21 *pylori* to attach to the human cells.

22

### 23 ***3.3 Biofilm formation by the fliD mutant***

1           The biofilm formation at the air-liquid interface observed in the culture tube has two  
2 distinct characteristics that were designated as a pellicle or an attached biofilm. Figure 1  
3 shows the pellicle and the attached biofilm formed by the wild-type *H. pylori* strain and the  
4 *fliD* mutant strain after 7 days of culture. The biofilm development of the wild-type strain  
5 was first observed on day 3 and quickly became extensive on day 4 (Table 1). The biofilm  
6 formation of the *fliD* mutant was delayed by one day for both the pellicle and the attached  
7 biofilm. Both strains of *H. pylori* produced extensive biofilms at the end of the incubation  
8 period. Moreover, after 7 days of incubation, the adherent bacterial community considered as  
9 a biofilm was examined quantitatively by staining with crystal violet, and the absorbance was  
10 measured at 570 nm. The level of the formation of the biofilms was expressed as the mean of  
11 the blank OD at 570 nm subtracted from the mean of the tested ODs at 570 nm. The mutation  
12 had no significant effect on the biofilm production of *H. pylori*. The mean absorbance values  
13 obtained from the *fliD* mutant and the wild-type strain were  $0.414 \pm 0.051$  and  $0.442 \pm 0.040$ ,  
14 respectively.

15



16

17 **Figure 1. Photograph of day 7 biofilm formed by wild-type and *fliD* mutant *H. pylori*.**

18 The culture test tubes display the mature biofilms. Two biofilm characteristics were observed

1 at the air-liquid interface, including the pellicle (white arrow) and the attached biofilm (black  
2 arrow). The score of both types of biofilms shown is +++ extensive.

3

4 **Table 1. Biofilm formation by the wild-type and *fliD* mutant *H. pylori* strains cultured**  
5 **as measured by the pellicle formation assay and examined over 7 days.**

Days	Wild-type ATCC 43504		<i>fliD</i> Mutant	
	Pellicle*	Attached* biofilm	Pellicle	Attached biofilm
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	+	+	-	-
4	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++
6	+++	+++	+++	+++
7	+++	+++	+++	+++

6

7 \*(-) Neither form of biofilm was present; (+) Thin pellicle or a finely attached biofilm; (++) Accumulated  
8 pellicle or a thinly attached biofilm; (+++) A mature pellicle covering the entire liquid surface or a densely  
9 attached biofilm. Experiments were performed in duplicate on three separate occasions.

10

### 11 ***3.4 SEM analysis***

12 The 3-dimensional structure of the *H. pylori* biofilm was analyzed using SEM. The  
13 bacterial morphology of both wild-type (Figures 2A to G) and *fliD* mutant *H. pylori* strains  
14 (Figures 2H to N) changed from bacilli to cocci in the older biofilm cultures. There was no  
15 biofilm formation for the wild-type strain at days 1 and 2 (Figures 2A and B) and for the *fliD*

1 mutant strain at days 1 through 3 (Figures 2H to J), which agrees with the results found in  
2 Table 1. The pellicle architectures of the wild-type strain at days 3-7 (Figures 2C to G) were a  
3 dense accumulation of bacteria within an amorphous extracellular matrix that seemed to  
4 connect with each other through cross-linking fibrils. Although the biofilm architecture of the  
5 mutant strain appeared slightly dissimilar when compared with that of the wild-type strain,  
6 the fibril connections were lesser and had a loose accumulation (Figures 2K to N). Moreover,  
7 the wild-type cells were more rounded and more clumped (Figure 2E and F), whereas the *fliD*  
8 mutant cells were slightly dispersed and evenly distributed (Figure 2L and M). Many mature  
9 flagella were observed among the wild-type cells (Figure 3A), while fewer amounts of  
10 flagella with truncated fragments were observed among the *fliD* mutant cells (Figure 3B).

11

12

13

14

15

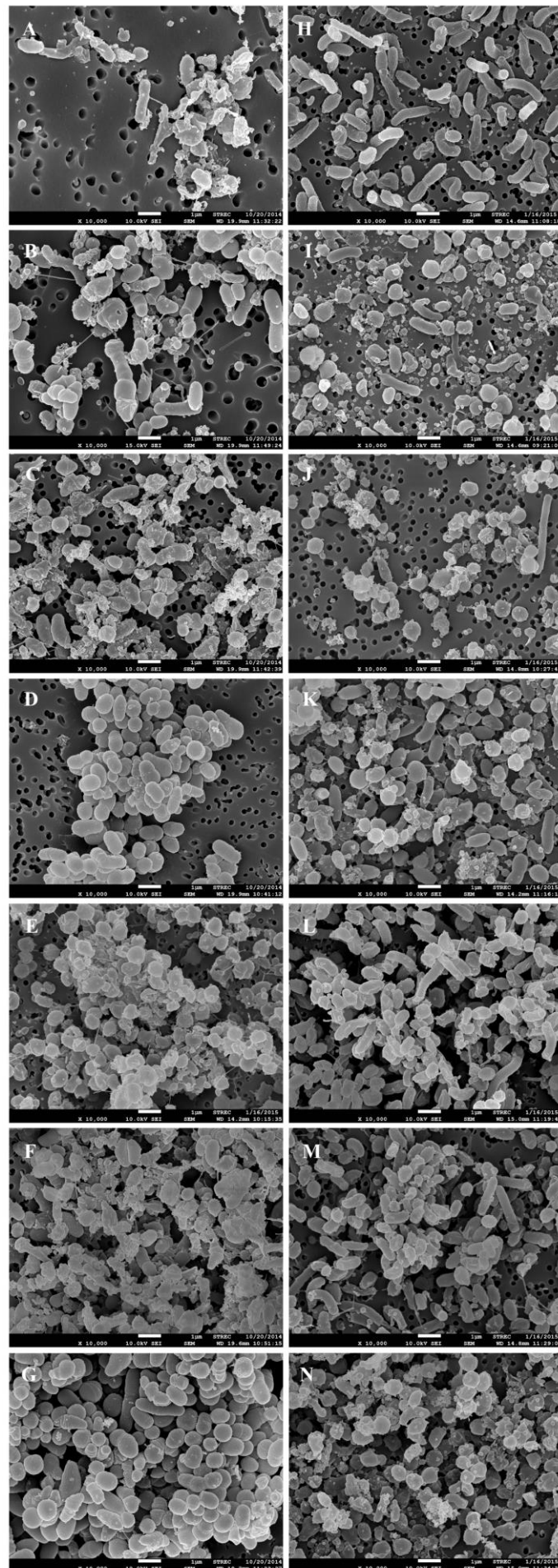
16

17

18

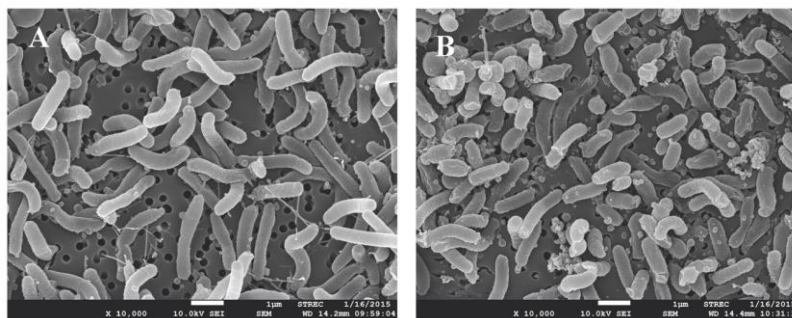
19

20



1 **Figure 2. Scanning electron microscopic photomicrographs of the pellicle biofilm**  
2 **development of the wild-type and *fliD* mutant *H. pylori* strains at a magnification of**  
3 **10,000X.** Planktonic cells taken from the wild-type strain from cultures at (A) day 1 and (B)  
4 day 2. (C-G) The pellicle cells of the wild-type strain taken from cultures at days 3-7,  
5 respectively. (H-J) The planktonic cells of the *fliD* mutant strain taken from cultures at days  
6 1-3, respectively. (K-N) The pellicle cells of the *fliD* mutant strain taken from cultures at  
7 days 4-7, respectively. Bars: 1  $\mu$ m.

8  
9



10

11 **Figure 3. Scanning electron microscopic photomicrographs of wild-type and *fliD***  
12 **mutant *H. pylori* cells at a magnification of 10,000X.** Bacterial cells of (A) the wild-type  
13 strain and (B) the *fliD* mutant strain from 3 day old colonies derived from complete BHI agar.  
14 Bars, 1  $\mu$ m.

15

#### 16 **4. Discussion**

17 Bacteria in the natural environment usually live in complex communities of  
18 microorganisms by attaching and proliferating on various surfaces and producing a matrix  
19 containing extracellular polymeric substances (EPS) to embed themselves in, called biofilms  
20 [11]. There are similar processes of biofilm formation in many bacteria and *H. pylori*. The  
21 bacteria initially attach irreversibly or reversibly to surfaces. Then, the bacterial cells

1 proliferate to form microcolonies within their own biofilms. The growth of biofilms can be  
2 either the proliferation of the bacteria within the biofilm or the attachment of other free living  
3 or planktonic cells, whereas the single cells can disperse from the biofilm and form new  
4 biofilms elsewhere, depending on the presence of suitable condition, including proper  
5 nutrient sources or attachment surfaces [11, 12]. Thus, the adherence to a surface is always  
6 one of the initial steps in the formation of biofilms. The bacteria use their flagella to make  
7 contact with the surfaces, leading to cell-to-surface adhesion [8, 10]. In many bacteria,  
8 flagellin acts as a bacterial adhesin that is required for its adhesion to epithelial cell [24].  
9 Flagella are not restricted to only the control of bacterial motility but are also involved in the  
10 adhesion and biofilm formation of *Vibrio* spp., *E. coli*, and *Aeromonas* spp. [19, 25, 26]. The  
11 molecular mechanisms of many bacteria that control biofilm formation have been explored.  
12 Poly-*N*-acetylglucosamine (PIA/PNAG), synthesized by the *icaADBC* operon has been  
13 shown to be required for the biofilm production of *Staphylococcus aureus* and  
14 *Staphylococcus epidermidis* [27, 28]. A quorum sensing system regulates the biofilm  
15 formation of *Vibrio cholerae* by directly controlling the expression of the EPS biosynthesis  
16 genes, including *hapR* and *vpsR* [29]. However, the specific molecular mechanisms that  
17 control the biofilm formation of *H. pylori* remains unclear.

18 The *fliD* gene is important for flagellin polymerization during the flagellar  
19 biosynthesis of bacteria [30]. FliD, or HAP2, also known as a distal capping protein, is  
20 encoded by the *fliD* gene and localizes to the end of the flagellar filament. FliD plays a role in  
21 promoting the polymerization of flagellin subunits by capping the flagellin monomers at the  
22 distal end of the filament [31]. *Salmonella typhimurium* mutant strains that lack FliD were  
23 found to be non-motile and produce unassembled filament protein. The polymerization of  
24 flagellin is recovered when the FliD protein was added exogenously to the *fliD* mutant,  
25 resulting in the construction of complete flagella [32,33]. In contrast, *Vibrio*

1 *parahaemolyticus fliD* mutant strains reveal different phenotypes. The *fliD* mutant strains  
2 showed slow motility on a semisolid plate [34]. In a study done by Kim *et al.*, the *fliD* gene  
3 was assessed for a regulatory role in the motility and colonization of the strain in gastric  
4 mucosa [14]. It was found that the *H. pylori* KCTC0217BP isogenic *fliD* mutant strain  
5 possessed atypical flagellar morphogenesis and incomplete flagellar elongation with an  
6 absence of the terminal bulb at the end of the flagellin, resulting in non-motility [14]. The  
7 *fliD* mutant strain had fragile, short flagella and truncated flagellar fragments [35]. In our  
8 study, the *fliD* mutant *H. pylori* strain likely had truncated flagella. Although it still retained  
9 its motility, but a mutation of the *fliD* gene seemed to significantly diminish the movement of  
10 *H. pylori*.

11 The *fliD* gene was found to be involved in mucin adhesion by *Pseudomonas*  
12 *aeruginosa*. The *P. aeruginosa fliD* mutant strain was not able to adhere to mucin, but when  
13 the *fliD* gene was reinserted, the adhesive phenotype is restored [36]. In addition, FliD is an  
14 important factor for the adhesion of *Clostridium difficile* [37] and the colonization of gastric  
15 mucosa of the host mice by *H. pylori* [14]. However, our data showed that when tested with  
16 an *in vitro* adherence model, the mutation of the *fliD* gene had no significant effect on the  
17 adhesion of *H. pylori* to HEp-2 cells compared with the adhesion of the wild-type strain. A  
18 previous study demonstrated that *H. pylori* strains with mutations in *flaA* and/or *flaB* did not  
19 have impaired adherence to gastric epithelial cells [38]. While the *fliD* gene encodes for the  
20 flagellar capping protein, *flaA* and *flaB* encode for the major flagellar components. The  
21 results of a previous study combined with the results of our present study suggests that the  
22 genes involved in the regulation of the *H. pylori* structural components may not play a role in  
23 promoting the adherence of *H. pylori* to epithelial cells.

24 The *fliD* gene may contribute to the biofilm formation of many bacteria. Some  
25 evidence shows that the *fliD* gene expression is highly up-regulated during the early stage of

1 the biofilm formation of *P. aeruginosa* [39]. In *Cronobacter sakazakii*, a mutation of the *fliD*  
2 gene dramatically reduced the amount of biofilm, which was only 9% of the wild-type  
3 amount as detected by the crystal violet assay [35]. FliD has been found to be up-regulated in  
4 mature *H. pylori* biofilm cells in comparison with their planktonic counterparts [18]. In this  
5 present study, the *H. pylori fliD* mutant strain showed no significant reduction in the amount  
6 of biofilm as determined by the crystal violet assay compared with that of the wild-type  
7 strain. Both strains of *H. pylori* produced extensive amounts of biofilm at the end of the  
8 incubation period, when the biofilms were stained by the crystal violet. Nevertheless, the  
9 pellicle or the attached biofilm of the *fliD* mutant strain were one day slower in their  
10 formation than those observed for the wild-type strain. The inactivation of the flagellar genes,  
11 including *fliA*, *flaA*, *flaB*, and *flaG*, result in a delay in the pellicle formation of  
12 *Campylobacter jejuni* [40]. Because of this, we suggest that the *fliD* gene may play a critical  
13 role in promoting pellicle formation as well as in the initial attachment of *H. pylori* to a solid  
14 surface during biofilm formation. We noticed that there was a correlation between the level  
15 of pellicle and the attached biofilm during biofilm formation. Although a quantification of  
16 biofilm formation by a crystal violet staining assay was performed only with the attached  
17 biofilm compartment, this could be a representative level of biofilm in this study.

18 The biofilm structures of both wild-type and *fliD* mutant *H. pylori* strains were  
19 documented by SEM. The development of the biofilm formation of *H. pylori* mimics our  
20 previous report, beginning with individual bacteria adhering to the abiotic surface, its  
21 extension into microcolonies and the formation of a 3-dimensional structure [23]. SEM  
22 revealed that the wild-type biofilm consisted of a dense accumulations of cells covering with  
23 an abundant extracellular matrix and cross-linked fibrils, which is considered as a hallmark of  
24 a mature biofilm structure [17]. On the contrary, a mutation of the *fliD* gene affected the *H.*  
25 *pylori* biofilm at a cyto-architecture level. The *fliD* mutant biofilm had loosely aggregated

1 cells with a small amount of extracellular matrix and fibril connections. We postulate that the  
2 *fliD* gene may play a role in the maturation of the biofilm structure in *H. pylori*.

3 Our study concludes that the *fliD* gene is implicated in *H. pylori* biofilm development  
4 and structure. Protection against *H. pylori* biofilm infection will provide prophylactic  
5 benefits, particularly in developing countries with high prevalence of *H. pylori* infection.  
6 FliD protein may be a candidate as a novel target for drug or vaccine development. It is  
7 known that biofilm formation of bacteria depends on the stimulation or suppression by  
8 environmental factors or gene complexes, which are involved in adhesion, quorum sensing,  
9 and stress response [41]. Further study is required in order to elucidate a precise mechanism  
10 regulating biofilm formation in *H. pylori*.

11

## 12 **Acknowledgements**

13 This work was funded by the Thailand Research Fund (MRG5580161), the Research  
14 Fund Project (ASHCU57002), the Faculty of Allied Health Sciences at Chulalongkorn  
15 University and the Graduate School Thesis Grant of Chulalongkorn University. The HEP2-  
16 cells were kindly provided by Professor Dr. Pornthep Tiensiwakul. We would like to thank  
17 Professor Dr. Kathleen L. McCoy (Department of Microbiology and Immunology, School of  
18 Medicine, Virginia Commonwealth University) for her critical reading of this manuscript.  
19 She was financially supported by a grant for foreign academics and research to increase the  
20 amount of published articles in international journals, which was funded by the  
21 Chulalongkorn University Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund 2015.

22

## 23 **References**

24 [1] Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK. *Helicobacter pylori*: A poor man's gut  
25 pathogen?. *Gut Pathogens*. 2010; 2: 1-12.

- 1 [2] Zaidi SF. *Helicobacter pylori* associated Asian enigma: Does diet deserve  
2 distinction?. *World J Gastrointest Oncol*. 2016; 8: 341-50.
- 3 [3] Tsang J, Hoover TR. Requirement of the flagellar protein export apparatus  
4 component FliO for optimal expression of flagellar genes in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*.  
5 2014; 196: 2709-17.
- 6 [4] Lertsethtakarn P, Ottemann KM, Hendrixson DR. Motility and chemotaxis in  
7 *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol*. 2011; 65: 389-410.
- 8 [5] IARC Working Group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A  
9 review of human carcinogens. *IARC Monogr Evol Carcinog Risks Hum* 2012; 100B: 385-  
10 423.
- 11 [6] Kao C-Y, Sheu B-S, Wu J-J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of  
12 bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J*. 2016; 39: 14-23.
- 13 [7] Ke W-J, Hsueh Y-H, Cheng Y-C, Wu C-C, Liu S-T. Water surface tension  
14 modulates the swarming mechanics of *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol*. 2015; 6: 1017.
- 15 [8] Friedlander RS, Vogel N, Aizenberg J. Role of flagella in adhesion of *Escherichia*  
16 *coli* to abiotic surfaces. *Langmuir*. 2015; 31: 6137-44.
- 17 [9] Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kamiya S. Assessment of  
18 *in vitro* biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25: S90-  
19 S4.
- 20 [10] Myszka K, Schmidt MT, Białas W, Olkowicz M, Leja K, Czaczyk K. Role of  
21 gallic and p-coumaric acids in the AHL-dependent expression of *flgA* gene and in the process  
22 of biofilm formation in food-associated *Pseudomonas fluorescens* KM120. *J Sci Food Agric*.  
23 2016: n/a-n/a.

- 1 [11] Cammarota G, Sanguinetti M, Gallo A, Posteraro B. Review article: biofilm  
2 formation by *Helicobacter pylori* as a target for eradication of resistant infection. *Aliment*  
3 *Pharm Ther.* 2012; 36: 222-30.
- 4 [12] García A, Salas-Jara MJ, Herrera C, González C. Biofilm and *Helicobacter*  
5 *pylori*: from environment to human host. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 5632-8.
- 6 [13] Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and  
7 its involvement for antibiotic resistance. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 914791.
- 8 [14] Kim JS, Chang JH, Chung SI, Yum JS. Molecular cloning and characterization of  
9 the *Helicobacter pylori* *fliD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *J*  
10 *Bacteriol.* 1999; 181: 6969-76.
- 11 [15] Inaba S, Hashimoto M, Jyot J, Aizawa S-I. Exchangeability of the flagellin (FliC)  
12 and the cap protein (FliD) among different species in flagellar assembly. *Biopolymers.* 2013;  
13 99: 63-72.
- 14 [16] Khalifeh Gholi M, Kalali B, Formichella L, Göttner G, Shamsipour F, Zarnani  
15 Ah, et al. *Helicobacter pylori* FliD protein is a highly sensitive and specific marker for  
16 serologic diagnosis of *H. pylori* infection. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303: 618-23.
- 17 [17] Cole SP, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG. Characterization of monospecies  
18 biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2004; 186: 3124-32.
- 19 [18] Pattiyathanee P. Inhibitory activity of curcumin against *Helicobacter pylori*  
20 biofilms: the role of flagellar genes and comparative proteomics analysis. Bangkok, Thailand.  
21 2009: 253p. (Ph.D. Dissertation. Chulalongkorn University).
- 22 [19] Santos PG, Santos PA, Bello AR, Freitas-Almeida AC. Association of  
23 *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. *Lett Appl Microbiol.*  
24 2011; 52: 49-55.

- 1 [20] Dorrell N, Martino MC, Stabler RA, Ward SJ, Zhang ZW, McColm AA, et al.  
2 Characterization of *Helicobacter pylori* PldA, a phospholipase with a role in colonization of  
3 the gastric mucosa. *Gastroenterology*. 1999; 117: 1098-104.
- 4 [21] Young R, Grillo D, Isberg R, Way J, Syvanen M. Transposition of the  
5 kanamycin-resistance transposon Tn903. *Molec gen Genet*. 1980; 178: 681-9.
- 6 [22] Sanders L, Andermann TM, Ottemann KM. A supplemented soft agar  
7 chemotaxis assay demonstrates the *Helicobacter pylori* chemotactic response to zinc and  
8 nickel. *Microbiology*. 2013; 159: 46-57.
- 9 [23] Pattiyathane P, Vilaichone R-k, Chaichanawongsaroj N. Effect of curcumin on  
10 *Helicobacter pylori* biofilm formation. *Afr J Biotechnol*. 2009; 8: 5106-15.
- 11 [24] Johanna H, Benita WK. The role of the bacterial flagellum in adhesion and  
12 virulence. *Biology (Basel)* 2013; 2: 1242-67.
- 13 [25] Troge A, Scheppach W, Schroeder BO, Rund SA, Heuner K, Wehkamp J, et al.  
14 More than a marine propeller – the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle  
15 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. *Int J Med Microbiol*. 2012;  
16 302: 304-14.
- 17 [26] Boyd CD, O'Toole GA. Second messenger regulation of biofilm formation:  
18 breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;  
19 28: 439-62.
- 20 [27] Cue D, Lei MG, Lee CY. Activation of *sarX* by Rbf is required for biofilm  
21 formation and *icaADBC* expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2013; 195: 1515-  
22 24.
- 23 [28] Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis*  
24 biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol*.  
25 2015; 5: 14.

- 1 [29] Liu Z, Stirling FR, Zhu J. Temporal quorum-sensing induction regulates *Vibrio*  
2 *cholerae* biofilm architecture. *Infect Immun.* 2007; 75: 122-6.
- 3 [30] Apel D, Surette MG. Bringing order to a complex molecular machine: The  
4 assembly of the bacterial flagella. *BBA Biomembranes.* 2008; 1778: 1851-8.
- 5 [31] Sampaio SCF, Luiz WB, Vieira MAM, Ferreira RCC, Garcia BG, Sinigaglia-  
6 Coimbra R, et al. Flagellar cap protein FliD mediates adherence of atypical enteropathogenic  
7 *Escherichia coli* to enterocyte microvilli. *Infect Immun.* 2016; 84: 1112-22.
- 8 [32] Homma M, Iino T. Excretion of unassembled hook-associated proteins by  
9 *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1985; 164: 1370-2.
- 10 [33] Ikeda T, Yamaguchi S, Hotani H. Flagellar growth in a filament-less *Salmonella*  
11 *fliD* mutant supplemented with purified hook-associated protein 2. *J Biochem.* 1993; 114: 39-  
12 44.
- 13 [34] McCarter LL. Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of  
14 *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol.* 1995; 177: 1595-609.
- 15 [35] Hartmann I, Carranza P, Lehner A, Stephan R, Eberl L, Riedel K. Genes  
16 involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76:  
17 2251-61.
- 18 [36] Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. The *Pseudomonas*  
19 *aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect Immun.*  
20 1998; 66: 1000-7.
- 21 [37] Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium*  
22 *difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters.  
23 *Infect Immun.* 2011; 79: 4061-7.
- 24 [38] Marguerite C, Tadhg O, Sebastian S, Christine J, Brendan D. Adherence of  
25 isogenic flagellum-negative mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* to

1 human and ferret gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2000; 68: 4335-9.

2 [39] Manos J, Arthur J, Rose B, Tingpej P, Fung C, Curtis M, et al. Transcriptome  
3 analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the  
4 cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 1454-65.

5 [40] Kalmokoff M, Lanthier P, Tremblay T-L, Foss M, Lau PC, Sanders G, et al.  
6 Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility  
7 complex in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2006; 188: 4312-20.

8 [41] Burmølle M, Ren D, Bjarnsholt T, Sørensen SJ. Interactions in multispecies  
9 biofilms: Do they actually matter? *Trends Microbiol.* 2014; 22: 84-91.

10

11