



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ
ต่อโปรตีนของระบบมัลติดรัคซ์อีพรัคซ์
ในเชื้อสูดโมนาส แดรูจิโนซา

สถาบันวิทยบริการ
โดย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

อินทิรา กระหม่อมทอง

สิงหาคม 2549

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของ
ระบบมัลติดรั๊กซ์อีฟรักซ์ในเชื้อสเตรปโตคอคคัส แอโรจิโนซา

โดย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น

อินทิรา กระหม่อมทอง

สิงหาคม 2549

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุมัติเงินทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2548 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.น.สพ.ดร. อลงกร อมรศิลป์ (ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานด้านอณูชีววิทยา รศ.สพ.ญ.ดร. มีนา สาริกะภูติ (หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สำหรับคำแนะนำในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย รวมถึง Dr. Herbert P. Schweizer (Department of Microbiology Immunology and Pathology, Colorado state University) ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อควบคุม และ Dr. Nobuhisa Masuda (Biological Research Laboratories, Sabko CO., Ltd., Kyoto, Japan) ที่ให้แอนติบอดีต่อ MexX

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย เจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการและจัดทำรายงานการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของระบบ
มัลติดริคซ้อฟรักซ์ในเชื้อสเตรปโตโมนาส แอรูจิโนซา

ชื่อผู้วิจัย ผศ.สพ.ญ.ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
รศ.สพ.ญ. อินทิรา กระหม่อมทอง

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ สิงหาคม 2549

บทคัดย่อ

ระบบ Multidrug efflux systems ได้แก่ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY เป็นกลไกสำคัญของการดื้อต่อยาหลายชนิดพร้อมกันในสเตรปโตโมนาส แอรูจิโนซา ในการวิจัยครั้งนี้ได้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ OprM OprN และ OprJ เพื่อใช้ตรวจการแสดงออกของระบบด้วยเทคนิค Western blot analysis โดยฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่ายด้วยเปปไทด์สังเคราะห์ ทำการทดสอบคุณภาพของไฮเปอร์อิมมูนซีรัมด้วยการทำ Western blot โดยใช้โปรตีนที่เตรียมได้จากเชื้อที่มีและไม่มีแสดงออกของระบบที่เกี่ยวข้องเป็นตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบ จากผลการวิจัยพบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ตรวจหาการแสดงออกของ OprM OprN และ OprJ ในการทดสอบปฏิกิริยาข้าม พบว่า OprJ polyclonal antibody ให้แถบขนาดประมาณ 53 Mda ต่อโปรตีนจาก OCR1 และ PAO7H ควรศึกษาเพิ่มเติมว่าเป็นปฏิกิริยาข้ามกับ OprM และ OprN จริงหรือไม่ รวมทั้งควรมีการสกัดโพลีโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นและความจำเพาะ นอกจากนี้ได้สร้าง $\Delta(mexXY)$ null mutant ที่สามารถใช้เป็นตัวควบคุมลบสำหรับการทดสอบการแสดงออกของ MexX ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project title	Preparation of specific-polyclonal antibodies against protein of multidrug efflux systems in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Name of Investigators	Assistant Professor Dr. Rungtip Chuanchuen Associate Professor Dr. Indhira Kramomtong
Year	August 2006

Abstract

The multidrug efflux systems including MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and MexXY are the main responsible mechanisms for resistance to multiple antimicrobial agents in *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, polyclonal antisera against OprM, OprN and OprJ were generated for determination of expression by Western blot analysis. The rabbit hyperimmune antisera were raised by injecting specific ioligopeptides and the quality was determined by Western blots. Whole cell protein prepared from the strains overproducing and lacking the coresponded outer membrane proteins were used as positive and negative control, respectively. The results showed that rabbit polyclonal antisera generated could be used to determine expression of OprM, OprN, and OprJ. In cross-reactivity test, OprJ polyclonal antisera yield ~53 Mda bands in both OCR1 and PA07H. Further studies are suggested to prove if they were from cross-reaction with OprM and OprN. Polyclonal antibodies should be further purified to increase concentration and specificity. In addition, $\Delta(mexXY)$ null mutant was constructed and efficiently used as a negative control in MexX detection assay.

สารบัญ

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	v
รายการภาพประกอบ	vi
รายการสัญลักษณ์	vii
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
รายงานการดื้อยาของ <i>P. aeruginosa</i> ในประเทศไทย	7
รายงานการวิจัยเกี่ยวกับระบบ MEX ใน <i>P. aeruginosa</i>	7
การนำข้อมูลเกี่ยวกับระบบ MEX ไปใช้เพื่อการวิจัย	8
วิธีการวิจัย	10
ระยะที่ 1 การเตรียมแอนติเจนที่จำเพาะต่อโปรตีน OprM OprN และ OprJ	10
ระยะที่ 2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน OprM OprN และ OprJ ในกระต่าย	21
ระยะที่ 3 การทดสอบคุณภาพของ polyclonal antisera	23
ผลการวิจัย	26
ระยะที่ 1 การเตรียมแอนติเจนที่จำเพาะต่อโปรตีน OprM OprN และ OprJ	26
ระยะที่ 2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน OprM OprN และ OprJ ในกระต่าย	31
ระยะที่ 3 การทดสอบคุณภาพของ polyclonal antisera	31
การอภิปรายผล	40
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	46
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก	53

รายการตารางประกอบ

		หน้าที่
ตารางที่ 1	Antimicrobial agents ที่ส่งออกโดยระบบ MEX	3
ตารางที่ 2	แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการวิจัย	11
ตารางที่ 3	ลำดับเบสของ Primers ที่ใช้ในการวิจัย	13
ตารางที่ 4	กำหนดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเก็บซีรัม	22
ตารางที่ 5	การแสดงผลของระบบ MEX ในเชื้อควบคุม	24
ตารางที่ 6	ลำดับกรดอะมิโนและตำแหน่งของเปปไทด์สังเคราะห์ที่ใช้ในการวิจัย	31



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

		หน้าที่
ภาพที่ 1	ชุดยีนระบบ MEX (the multidrug efflux operons) ที่พบว่ามี ความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์	5
ภาพที่ 2	แบบจำลองโครงสร้างของระบบ MEX	6
ภาพที่ 3	การสร้าง pJS001	16
ภาพที่ 4	Genetic map ของ pJS002 และ pJS003	17
ภาพที่ 5	การสร้าง pJS004	18
ภาพที่ 6	Genetic map ของ pJS005 และ pJS006	19
ภาพที่ 7	การตัด <i>mexXY</i> บนโครโมโซม PA3579 ด้วยเทคนิค gene replacement	25
ภาพที่ 8	Whole cell protein ของ BL21DE3/pJS004, pJS005 และ pJS006	27
ภาพที่ 9	Cell envelope ของ BL21DE3/pJS004, pJS005 และ pJS006	28
ภาพที่ 10	โปรตีนสกัด OprM-His ₆ OprN-His ₆ และ OprJ-His ₆	29
ภาพที่ 11	Potential antigenic peptides ของโปรตีน OprM, OprN และ OprJ	30
ภาพที่ 12	การใช้ OprM polyclonal antisera เพื่อตรวจการแสดงออกของ OprM	33
ภาพที่ 13	การใช้ OprN polyclonal antisera เพื่อตรวจการแสดงออกของ OprN	34
ภาพที่ 14	การใช้ OprJ polyclonal antisera เพื่อตรวจการแสดงออกของ OprJ	35
ภาพที่ 15	การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ polyclonal antisera ด้วย Western blot analysis	36
ภาพที่ 16	การตรวจการแสดงออกของ MexX ด้วย MexX polyclonal antisera	37
ภาพที่ 17	การเปลี่ยนแปลงขนาดของ <i>mexXY</i> ระหว่างการทำ gene knockout ที่ยืนยันได้ด้วยเทคนิค PCR	39

รายการสัญลักษณ์

$A_{540\text{nm}}$	absorbance at 540 nm
$A_{600\text{nm}}$	absorbance at 600 nm
Ap	ampicillin
β -Gal	β -galactosidase
<i>bla</i>	β -lactamase encoding gene
bp	base pair(s)
Cb	carbenicillin
$^{\circ}\text{C}$	degree(s) Celcius
Cip	ciprofloxacin
cm	centimeter(s)
Cm	chloramphenicol
Da	Dalton(s)
DNA	deoxyribonucleic acid(s)
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate(s)
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EPI	efflux pump inhibitors
Ery	Erythromycin
<i>FRT</i>	Flp recombinase target
Gm	gentamycin
His ₆	hexahistidine-containing peptide
h	hour(s)
IMP	inner membrane protein
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kb	kilobase(s) or 1000 bp
kDa	kilodalton(s)
Km	kanamycin
l	liter(s)

<i>lacI</i>	<i>E. coli lac</i> repressor structural gene
<i>lacZ</i>	β -galactosidase encoding gene
LB	Luria-Bertani medium
LBAp100	Luria-Bertani medium containing 100 μ g/ml ampicillin
log	logarithmic growth phase
Mb	megabasepairs
M	molar
mM	millimolar
MCAC	metal chelation affinity chromatography
MCS	multiple cloning site(s)
MDR	multidrug resistance
MEX	multidrug efflux system
MFP	membrane fusion protein
MFS	major facilitator superfamily
mg	milligram(s)
MIC	minimal inhibitory concentrations
min	minute(s)
ml	milliliter(s)
ng	nanogram(s)
nm	nanometer(s);
OPM	outer membrane protein
OprM-His ₆ ,	6x histidine tagged OprM
OprN-His ₆	6x histidine tagged OprN
OprJ-His ₆	6x histidine tagged OprJ
<i>ori</i>	origin of replication
<i>oriT</i>	origin of transfer
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
P_{lac}	<i>E. coli lac</i> operon promoter
P_{lacUV5}	<i>E. coli lac</i> operon UV5 promoter

P_{trc}	<i>E. coli trp-lac</i> hybrid promoter
PCR	polymerase chain reaction
PMF	proton motive force
r	resistance/resistant
RND	resistance – nodulation-division family
RT	room temperature
s	sensitive/susceptible
<i>sacB</i>	<i>Bacillus subtilis</i> gene encoding levansucrase
sec	seconds
SDS	sodium dodecyl sulfate
Sm	streptomycin
Suc	sucrose
Tc	tetracycline
<i>tet</i>	tetracycline-resistance encoding gene
u	unit(s)
μ l	microliter
μ M	micromolar
μ g	microgram(s)
v/v	volume by volume
VBMM	Vogel-Bonner Minimum medium
VBMMCb ₂₀₀	VBMM containing 200 μ g/ml carbenicillim
VBMMGm ₅₀	VBMM containing 50 μ g/ml gentamycin
VBMM5%Suc	VBMM containing 5% sucrose
WT	wild-type
+	overexpression

บทนำ

เชื้อสเตรปโตโมนาส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ที่พบการติดเชื้อได้ทั้งในคนและสัตว์ อาการของการติดเชื้อมีทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง รวมถึงการติดเชื้อในกระแสโลหิต ในสัตว์ มักพบการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในหูชั้นนอกที่มีอาการอักเสบของหูชั้นนอกแบบเรื้อรังและไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (Otitis Externa) (Martin Barrasa, et al., 2000) รวมทั้ง ในสุนัขที่มีความผิดปกติของไตแบบเรื้อรัง ในวัวนม *Pseudomonas mastitis* เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบที่ไม่แสดงอาการ มักเป็นการติดเชื้อซ้ำและมีสาเหตุมาจากเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม (Daly, et al., 1999; Las Heras, et al., 1999) ในขณะเดียวกัน อาจเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบที่มีเนื้อตาย เรียกว่า gangrene mastitis ซึ่งพบไม่บ่อยนัก แต่ถ้าพบมักมีอาการรุนแรงมากและทำให้สัตว์เสียชีวิตหรือถูกคัตทิ้ง (Cutler, 2003) ในคน *P. aeruginosa* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อแทรกซ้อนที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล (nosocomial infection) มักพบเป็นเชื้อโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้แก่ ผู้ป่วยโรคเอดส์ โรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาว ผู้ป่วยที่ได้รับยาสเตียรอยด์เป็นเวลานาน ผู้ที่มีแผลไฟไหม้ ผู้ป่วยที่มีแผลผ่าตัด เป็นต้น ในปัจจุบันนี้ แหล่งที่มาและกลไกของการติดเชื้อนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เพราะเชืochenidนี้มีการกระจายตัวอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป และถึงแม้ว่ายังไม่มีการยืนยันการติดเชื้อ *P. aeruginosa* จากสัตว์สู่คน แต่ไม่อาจมองข้ามการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและเพิ่มโอกาสของการติดเชื้อนี้

การติดเชื้อ *P. aeruginosa* มักเป็นแบบเรื้อรังและไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ เชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยาหลายชนิดพร้อมกัน (multiple drug resistance, MDR) โดยพันธุกรรม และสามารถพัฒนาการดื้อยาขึ้นได้ในระหว่างการรักษา ดังนั้นจึงตอบสนองต่อยาแต่ละชนิดเพียงชั่วคราวระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น ส่งผลให้ต้องใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า เพิ่มระยะเวลาในการรักษา และสูญเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น การรักษาอาจล้มเหลวและส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ในที่สุด *P. aeruginosa* มีกลไกการดื้อยาหลายกลไกเช่นเดียวกับแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ แต่ในปัจจุบันเป็นที่ทราบดีว่า สาเหตุสำคัญของการดื้อยาในระดับสูงและหลายชนิดพร้อมกันของเชืochenidนี้เป็น การผสมผสานระหว่างการที่ผนังเซลล์ไม่ยอมให้โมเลกุลของยาปฏิชีวนะจากภายนอกเข้าสู่เซลล์และการแสดงออกของระบบมัลติดรั๊ก อีฟลักซ์ (Multidrug Efflux Pumps, MEX) ที่ขับโมเลกุลของยา

ออกนอกเซลล์ (Putman, et al., 2000; Schweizer, 2003) ส่งผลให้ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ไม่เพียงพอที่จะทำลายเชื้อได้

ระบบ MEX ใน *P. aeruginosa* สร้างปัญหาการดื้อยาเป็นอันดับ 2 รองจากเอนไซม์ดื้อยาที่ผลิตโดยแบคทีเรียเอง (ดูรายละเอียดของระบบ MEX) โดยทั่วไป กลไกดื้อยาในแบคทีเรียทำให้เกิดการดื้อยาจำเพาะ 1 ชนิดหรือ 1 กลุ่ม แต่ระบบ MEX ทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดในเวลาเดียวกัน โดยที่ยาเหล่านี้ไม่มีความสัมพันธ์ทางโครงสร้างเลย แบคทีเรียชนิดนี้มีชุดยีนควบคุมการแสดงออกของระบบ MEX มากถึง 12 ชุดบนโครโมโซม โดยระบบที่พบว่ามีผลสำคัญต่อการดื้อยาใน clinical isolates คือ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY ซึ่งแต่ละระบบขับออกยาได้มากกว่า 1 ชนิด และยาแต่ละชนิดอาจถูกขับออกได้ด้วยหลายระบบ (ตารางที่ 1) ผลเสียหายจะรุนแรงมากขึ้น ถ้ามีการแสดงออกของระบบ MEX มากกว่า 1 ระบบพร้อมกันหรือร่วมกับกลไกดื้อยาอื่นๆ (Schweizer, 2001) ซึ่งสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน MEX คือการใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็นอย่างต่อเนื่องและขาดความระมัดระวัง (Moellering, 1998) ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ทำให้มีการแสดงออกของระบบ ในปัจจุบันได้มีการศึกษาระบบ MEX ใน *P. aeruginosa* อย่างกว้างขวาง โดยเน้นการศึกษากลไกการทำงานและหาแนวทางในการยับยั้งการทำงานของระบบเพื่อให้สามารถใช้ยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ในการรักษาได้อีก แต่การศึกษาเหล่านี้ยังจำกัดอยู่ในเชื้อที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการ การศึกษาในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลมีไม่มากนักและข้อมูลการศึกษาวิจัยในเชื้อที่แยกได้จากสัตว์ป่วยมีน้อยมาก (Mazel and Davies, 1999) รวมทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาระบบนี้ในเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทย

ในประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างกว้างขวางทั้งในวงการแพทย์และสัตวแพทย์ ในขณะที่ *P. aeruginosa* เป็นสาเหตุอันดับ 2 ของการติดเชื้อแทรกซ้อนและเชื้อที่แยกได้มักดื้อยาหลายชนิด จึงมีความเป็นไปได้ว่า การดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยเกิดจากการแสดงออกของระบบ MEX ดังนั้น จึงควรมีการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับระบบนี้ใน *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจความสำคัญของระบบต่อการดื้อยาและเป็นรากฐานสำคัญของการวิจัยต่อไปในอนาคต เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ก่อโรคในคนและสัตว์ การศึกษาอิทธิพลของการใช้ยาฆ่าเชื้อในฟาร์ม คลินิกและโรงพยาบาลต่อการพัฒนาการดื้อยาปฏิชีวนะที่มีสาเหตุเชื่อมโยงมาจากระบบ การพัฒนาเทคนิคที่ใช้ตรวจการแสดงออกของระบบที่ให้ผลรวดเร็วและ

ตารางที่ 1 Antimicrobial agents ที่ส่งออกโดยระบบ MEX

ระบบ MEX	Antimicrobial agents ที่ถูกส่งออก
MexAB-OprM	β -lactams, β -lactamase inhibitors, chloramphenicol, fluoroquinolones, macrolides, novobiocin, tetracycline, triclosan, trimethoprim, aromatic hydrocarbons, thiolactomycin, cerulenin
MexCD-OprJ	β -lactams, chloramphenicol, fluoroquinolones, macrolides, novobiocin, tetracycline, triclosan, trimethoprim, aromatic hydrocarbons, crystal violet, acriflavine
MexEF-OprN	Chloramphenicol, fluoroquinolones, triclosan, trimethoprim, aromatic hydrocarbons
MexXY-OprM	Fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracycline, erythromycin

แม่นยำ เพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจในการเลือกใช้ยาในรายที่ไม่ตอบสนองต่อยาที่ใช้ในการรักษา รวมถึงการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้สารสกัดจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการทำงานของระบบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยาที่ใช้ในการรักษา ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อวงการแพทย์ และสัตวแพทย์

ในการเริ่มต้นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับระบบ MEX ต้องมีการเก็บตัวอย่างเชื้อที่ติดต่อยาหลายชนิดและมีการแสดงออกของระบบ รวมทั้งเก็บข้อมูลที่แท้จริงเกี่ยวกับลักษณะการแสดงออกของระบบ เพราะความแตกต่างของสภาพแวดล้อมส่งผลให้เชื้อมีการแสดงออกของระบบที่แตกต่างกันด้วย ในปัจจุบัน ได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของยีน (gene expression) ได้แก่ RT-PCR, real time PCR, Microarray analysis, gene fusion เป็นต้น ถึงแม้ว่า เทคนิคเหล่านี้สามารถทำได้รวดเร็วและแม่นยำ แต่สามารถตรวจวัดการแสดงออกของยีนในระดับการแปลรหัส (transcription level) ซึ่งการศึกษาการแสดงออกของยีนควรศึกษาในระดับการถอดรหัส (translation level) หรือการสร้างโปรตีน เพราะทำให้ทราบว่ายีนนั้นมีการทำหน้าที่จริง Western

blot analysis เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจหาการแสดงออกในระดับโปรตีน ซึ่งวิธีนี้ไม่ซับซ้อน ให้ผลที่เชื่อถือได้และทำได้สะดวกเมื่อมีตัวอย่างเชื้อจำนวนมาก จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาการทำงานของระบบ อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้มีความต้องการแอนติบอดี (antibody) ที่จำเพาะต่อโปรตีนของระบบ ซึ่งไม่มีการจำหน่าย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการผลิตโพลีโคลนอล แอนติบอดี (polyclonal antibody) ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของระบบ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิต Polyclonal antibodies ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของระบบ MEX ที่มีข้อมูลสนับสนุนความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ คือ OprM, OprN, OprJ และ MexX และพัฒนาสถานะในห้องปฏิบัติการ สำหรับ Western blot analysis ที่สามารถตรวจการแสดงออกของระบบด้วย polyclonal antibodies ที่ผลิตขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

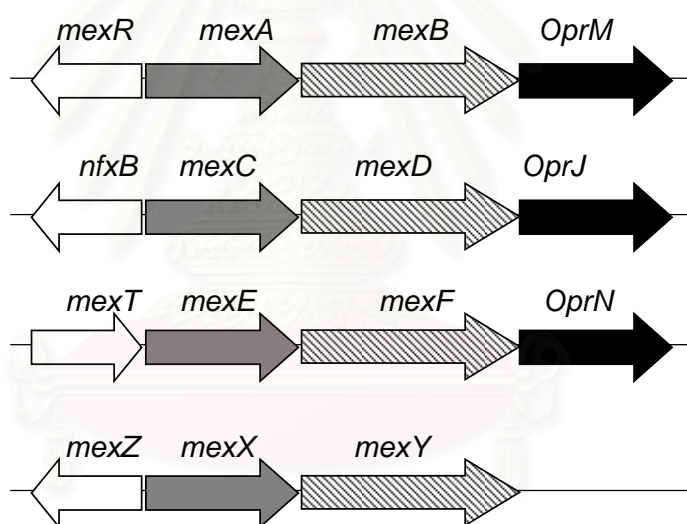
ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการผลิตและทดสอบคุณภาพของ polyclonal antibody ต่อ OprM, OprN และ OprJ สำหรับ Anti-MexX ได้รับการอนุเคราะห์จาก Dr. N. Masuda จึงทำการสร้าง mutant ที่ไม่มีการแสดงออกของ MexX เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมลบ เมื่อทำการทดสอบการแสดงออกของ MexX

ระบบ MEX ใน *P. aeruginosa*

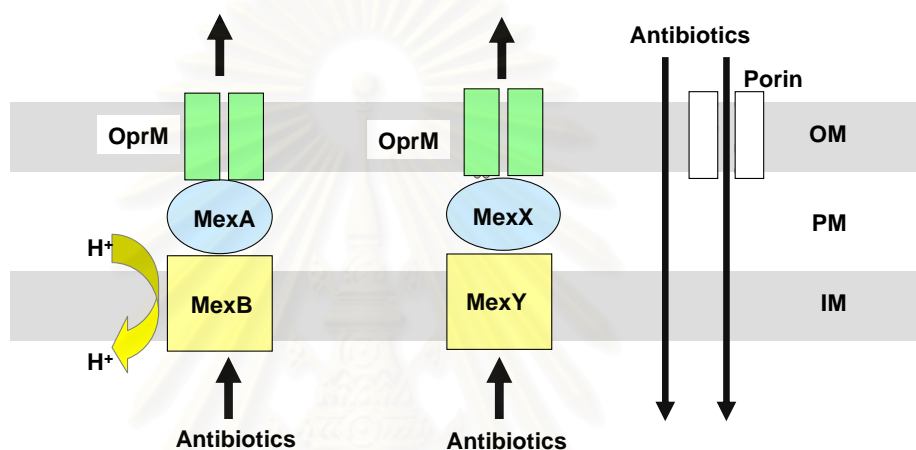
ระบบ MEX เป็นกลไกการดื้อยาที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางในทศวรรษที่ผ่านมา โดยระบบที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดต่อการดื้อยาใน *P. aeruginosa* อยู่ในวงศ์ตระกูล the Resistance Nodulation and Cell Division (RND) ซึ่งมีทั้งหมด 12 ระบบและที่พบว่ามีมีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ คือ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY ระบบเหล่านี้มียีนควบคุมการแสดงออกอยู่บนชุดยีน (operon) เดียวกัน (ภาพที่ 1) และ transcribe จาก promoter ที่อยู่ทางปลาย 5' ของยีนตัวแรก (Koronakis, et al., 1997)

เนื่องจาก *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ชั้นนอก และชั้นในแยกกันด้วยช่องว่างระหว่างผนังเซลล์ (Nakae, 1997; Nikaido, 1994) ทำให้เป็นที่ยอมรับว่า การทำงานของระบบเหล่านี้เป็นแบบ tripartite systems (ภาพที่ 2) เพื่อที่จะส่งยาข้ามผนังเซลล์ถึง 2 ชั้นได้ โดยประกอบด้วย ตัวขนส่งที่ผนังเซลล์ชั้นใน (inner membrane transporters, IMP) ได้แก่ MexB, MexD, MexF, MexY ทำหน้าที่จับยาที่ผ่านเข้าไปในเซลล์โปรตีนผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane protein, OMP) ได้แก่ OprM, OprJ, OprN เพื่อเป็นทางออกสู่ภายนอกของยาและมี lipoprotein ในชั้น periplasm เรียกว่า membrane fusion protein, MFP ได้แก่ MexA, MexC,

MexE และ MexX ซึ่งเชื่อว่าทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมต่อระหว่าง IMP และ OMP ระบบ MEX สามารถจับยาหลายชนิดภายในเซลล์และส่งผ่านผนังเซลล์ออกไปสู่ภายนอกในขั้นตอนเดียวคล้ายกับปั๊มสูบน้ำ โดยใช้พลังงานจากการแลกเปลี่ยนไฮโดรเจนไอออน (proton motive force, PMF) ซึ่งหลังจากที่ IMP ยาภายในเซลล์ถูกจับที่ตำแหน่งจำเพาะต่อการจับยา (drug-binding domain) แล้ว MFP จะดึง IMP และ OMP ให้มาอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมและยาจะถูกส่งจาก IMP ไปยัง OMP เพื่อออกนอกเซลล์ (Poole, 2001) สำหรับ MexXY ไม่มี OMP เป็นของตัวเอง แต่ใช้ OprM ในการขับออกยา (Masuda, et al., 2000)



ภาพที่ 1 ชุดยีนของระบบ MEX (the multidrug efflux operons) ที่พบว่ามีผลสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ โดยปกติเรียงตัวแบบเดียวกันจากด้าน 5' ไปยัง 3' คือ ยีนสำหรับ MFP (ลูกระสีเทา) ได้แก่ *mexA*, *mexC*, *mexE* และ *mexX* ตามด้วยยีนสำหรับ IMP (ลูกระสีดำ) ได้แก่ *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY* และยีนสำหรับ outer membrane protein (ลูกระสีดำ) ได้แก่ *oprM*, *oprJ*, *oprN* โดยที่ *mexXY* ไม่มียีนสำหรับ OMP อยู่บนชุดยีน ในแต่ละชุดยีนจะมี regulatory gene (ลูกระสีขาว) อยู่ที่ปลาย 5' ของยีนตัวแรก ทิศทางของลูกระสีแสดงทิศทางของการแปลรหัส



ภาพที่ 2 แบบจำลองโครงสร้างของระบบ MEX ใน *P. aeruginosa* ประกอบด้วย IMP, MFP และ OMP หลังจากที่ยาเข้าสู่เซลล์ IMP (MexB หรือ MexY) จับยาที่ตำแหน่ง drug-binding domain แล้ว MFP (MexA หรือ MexX) จะดึง IMP และ OMP ให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมและยาจะถูกส่งจาก IMP ไปยัง OMP (OprM) เพื่อผ่านออกนอกเซลล์ โดยใช้พลังงานจากการแลกเปลี่ยนไฮโดรเจนไอออน สำหรับ MexXY ใช้ OprM ในการขับออกยา ลูกศรสีดำแสดงทิศทางในการขนส่งยา คำย่อ: IMP, inner membrane transporter; MFP,

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดโดยพันธุกรรมและสามารถพัฒนาการดื้อยาได้เองระหว่างการรักษา โดยมีระบบ Mex เป็นกลไกสำคัญของการดื้อยา (Schweizer, 2003)

รายงานการดื้อยาของ *P. aeruginosa* ในประเทศไทยและต่างประเทศ

ในประเทศไทย เกรียงศักดิ์ สายธนูและเกรียงศักดิ์ พูนสุข (2522) ทำการเก็บข้อมูลการดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากคนและสัตว์ พบว่าเชื้อดื้อยา kanamycin bacithracin tetracycline (เกรียงศักดิ์ สายธนูและเกรียงศักดิ์ พูนสุข 2522) โอปารและคณะ (2541) รายงานว่า *P. aeruginosa* เป็นเชื้อที่แยกได้มากที่สุด (62%) จากสุนัขที่มีอาการหุ้กเสบที่เข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเชื้อดื้อยา ampicillin cephalixin chloramphenicol neomycin nitrofurantoin oxytetracycline penicillin polymyxin-B และ sulphamethoxazole-trimetroprim (โอปารและคณะ 2541)

สมศักดิ์ โสเลขา (2544) รายงานว่าเชื้อนี้ดื้อยาทุกตัวและเป็นปัญหาสำคัญของผู้ป่วยในโรงพยาบาลรามาริบัติตังแสดงในรูปที่ 3 (สมศักดิ์ โสเลขา 2544) โดยสุรางค์ เดชศิริเลิศ (2544) รายงานว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล 32 แห่งในช่วงเดือนมกราคม ธันวาคม 2543 มีความไวต่อยา aztreonam, ceftazidime, co-trimoxazole, cefoperazone/sulbactam nitrofurantoin และ norfloxacin ลดลง (สุรางค์ เดชศิริเลิศ 2544)

Normand *et al* (2000) รายงานการดื้อยาของ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสัตว์ป่วยในประเทศอังกฤษเพิ่มขึ้นจาก 12% ในปี 1989 จนถึง 60% ในปี 1997 (Normand, *et al.*, 2000) เมื่อเร็ว ๆ นี้ Guerin-Fauble *et al* (2003) พบว่า *P. aeruginosa* จากโคนมที่เป็นโรคเต้านม-อักเสบในประเทศฝรั่งเศสดื้อต่อยา ampicillin cephalixin cefazolin cephapirin neomycin และ colistin (Guerin-Fauble, *et al.*, 2003) Peterson *et al* (2002) รายงานการแยกเชื้อ *P. aeruginosa* จากผิวหนังและหูของสุนัขสูงขึ้นจาก 7.5% ในปี 1992 เป็น 27.8% ในปี 1997 (Petersen, *et al.*, 2002)

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับระบบ multidrug efflux systems ใน *P. aeruginosa*

Lomovskaya *et al* (1999) ทำการตัด (deletion) ยีน multidrug efflux systems บนสายโครโมโซมของ *P. aeruginosa* ที่ดื้อยาหลายชนิด พบว่าทำให้เชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น

และยังเสนอว่าระบบเหล่านี้เป็นเป้าหมายใหม่ของการผลิตยาต่อต้านเชื้อ (Lomovskaya, et al., 1999)

Tejedor et al (2003) ศึกษากลไกในการดื้อยา fluoroquinolone ของ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสุนัขที่มีอาการ otitis externa พบว่า 9 ใน 10 ตัวอย่างตอบสนองต่อยาดีขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับ Phe-Arg- β -naphthylamide ซึ่งเป็น Efflux pump inhibitor (EPI) ชนิดหนึ่ง ซึ่งให้เห็นว่า multidrug efflux pumps มีส่วนร่วมในการดื้อยานี้

Beinlich et al (2001) รายงานการแสดงออกของ MexAB-OprM MexEF-OprN และ MexXY ในเชื้อที่แยกได้จากสัตว์ป่วยจำนวน 10 สายพันธุ์ ที่น่าสนใจคือ ระบบ MexAB-OprM แสดงออกพร้อมกับ MexEF-OprN และ MexXY โดยไม่พบ mutation ที่ regulatory gene ที่อาจเป็นสาเหตุของการแสดงออกของระบบเหล่านี้ บ่งบอกถึงความซับซ้อนของระบบใน clinical isolates (Beinlich, et al., 2001)

Okazi et al (1992) และ Jalal et al (2000) รายงานว่า การใช้ norfloxacin และ ciprofloxacin ในการรักษาการติดเชื้อในผู้ป่วย cystic fibrosis ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ส่งผลให้มีการแสดงออกของระบบและเกิดการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาใน *P. aeruginosa* (Jalal, et al., 2000; Okazaki and Hirai, 1992)

Hocquet et al (2006) พบว่า *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีการแสดงออกของระบบ MexXY-OprM และดื้อยา cefepime และ ceftazidime ซึ่งเป็น β -lactams ซึ่งไม่เคยมีรายงานว่าระบบนี้สามารถยับยั้งในกลุ่มนี้ได้มาก่อน ซึ่งคณะผู้วิจัยเดียวกันนี้พบการแสดงออกของระบบ MexXY ร่วมกับ MexAB-OprM ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วย (Llanes, et al., 2004)

การนำข้อมูลเกี่ยวกับระบบ MEX ไปใช้เพื่อการวิจัย

Chuanchuen et al (2001) ใช้ *P. aeruginosa* ที่มีการแสดงออกของระบบแต่ละชนิดในระดับสูง (overexpression) ในการศึกษาผลของการใช้ triclosan ซึ่งเป็นยาฆ่าเชื้อต่อการดื้อยาปฏิชีวนะ พบว่า เชื้อมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นและสามารถพัฒนาการดื้อต่อ triclosan ได้ โดยเชื้อที่มีการกลายพันธุ์นี้มีการแสดงออกของระบบ multidrug efflux systems ได้หลายระบบ ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วย ซึ่งการกลายพันธุ์นี้เป็นแบบเดียวกับที่มีสาเหตุมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะ (Chuanchuen, et al., 2001)

ในการวิจัยเพื่อผลิต EPI ซึ่งเป็นหนทางใหม่ในการรักษาการติดเชื้อ *p. aeruginosa* ดื้อยา (Lomovskaya, et al., 1999) Lomovskaya and Watkins (2001) ใช้ isogenic mutants ของ *P. aeruginosa* ที่มีการแสดงออกของระบบในการศึกษาเพื่อค้นหาสารสังเคราะห์ตัวใหม่ที่สามารถ

ยับยั้งการทำงานของระบบ รวมทั้งสารที่ไม่ถูกขับออกโดยระบบที่สามารถใช้ในการรักษาร่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อเพิ่มความสามารถในการออกฤทธิ์ของยา (Lomovskaya and Watkins, 2001) โดย Tegos et al (2002) ใช้ *P. aeruginosa* ที่มีการแสดงออกของระบบอย่างต่อเนื่อง (constitutive express) ในการทดสอบการใช้สารที่สกัดได้จากพืชร่วมกับยาปฏิชีวนะ (Tegos, et al., 2002)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย

การดำเนินการวิจัย มี 3 ระยะ ประกอบด้วย

ระยะที่ 1 การเตรียมแอนติเจนที่จำเพาะต่อโปรตีน OprM OprN และ OprJ

ระยะที่ 2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน OprM OprN และ OprJ ในกระต่าย

ระยะที่ 3 การทดสอบคุณภาพของ polyclonal antisera

ระยะที่ 1 การเตรียมแอนติเจนที่จำเพาะต่อโปรตีน **OprM OprN และ OprJ**

การวิจัยโดยสังเขป การเตรียมแอนติเจนเริ่มด้วยการสกัดโปรตีนบริสุทธิ์ OprM-His₆ OprN-His₆ และ OprJ-His₆ แต่เนื่องจากข้อจำกัดของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ (ดูการอภิปรายผล) จึงเตรียมเปปไทด์สังเคราะห์ที่จำเพาะต่อโปรตีนทั้ง 3 เพื่อใช้เป็นแอนติเจนแทน

1.1. การเตรียมโปรตีนสกัด OprM-His₆ OprN-His₆ และ OprJ-His₆

แบคทีเรีย พลาสมีดและการเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียและพลาสมีดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงในตารางที่ 2 *P. aeruginosa* PAO1 ใช้ในการเตรียม DNA ต้นแบบสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน *oprM*, *oprJ* และ *oprN* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) *Escherichia coli* HPS1 เป็น cloning host ในการสร้างพลาสมีด pJS004, pJS005 และ pJS006 *E. coli* BL21(DE3) เป็น expression host สำหรับโปรตีนจากพลาสมีดทั้ง 3 โดยทั่วไปเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-bertani (LB) (Difco, MI, U.S.A.) ที่ 37°C ยกเว้น ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหรือสภาวะที่แตกต่างออกไปจะระบุไว้โดยเฉพาะ ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับ *E. coli* คือ ampicillin (Sigma, MO, U.S.A.) 100 µg/ml, spectinomycin (Sigma) 150 µg/ml gentamycin 15 µg/ml และ kanamycin (Sigma) 35 µg/ml ส่วนความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับ *P. aeruginosa* คือ carbenicillin (Gemini Bio-Products, CA, U.S.A.) 150-500 µg/ml gentamycin 30-50 µg/ml และ spectinomycin (Sigma) 300 µg/ml

ตารางที่ 2 แบบที่เรียและพลาสมิดที่ใช้ในการวิจัย

Strains	Relevant genotype or phenotype	แหล่งที่มา
<i>Pseudomonas</i>		
PAO1	Wild type expressing MexAB-OprM	(Ziha-Zafiri, et al., 1999)
OCR1	$\Delta mexR$ null mutant derivative of PAO1	(Koehler, et al., 1997)
PAO200	$\Delta(mexAB-oprM)$ null mutant derivative of PAO1	(Chuanchuen, et al., 2001)
PA0200-2	$nfxB mexC^+ D^+ -oprJ^+$ spontaneous derivative of PAO200	(Chuanchuen, et al., 2001)
PAO238	$\Delta(mexCD-oprJ)$ null mutant derivative of PAO200-2	(Chuanchuen, et al., 2001)
PA7H	$nfxC mexE^+ F^+ -oprJ^+$ spontaneous derivative of PAO1	(Koehler, et al., 1997)
PA7H1A	$\Delta(mexAB-oprM) nfxC mexE^+ F^+ -oprJ^+$ null mutant derivative of PAO7H	(Chuanchuen, et al., 2001)
PA0255	$\Delta(mexEF-oprN)$ null mutant derivative of PAO7H1A	(Chuanchuen, et al., 2001)
PA3579	$\Delta mexZ$ null mutant derivative of PAO1	(Westbrock-Wadman, et al., 1999)
PAJ013	$\Delta(mexXY)::FRTGm'$ mutant derivative of PA3579	การศึกษาคั้งนี้
PAJ014	$\Delta(mexXY):FRT$ mutant derivative of PA3579	การศึกษาคั้งนี้
<i>E. coli</i>		
HPS ₁	A cloning host ($F^- \Delta(lac-proAB)endA1gyrA96hsdR17supE44relA$ $1recA1thirif^R ZZX::mini-Tn_5(lac_4)$)	(Schweizer, 1994)
BL21(DE3)	Protein expression host strain ($F^- ompT hsdS(r_B^- m_B^-) dcm gal\Delta (srl-recA)306::Tn10$ (DE3)	Novagen

ตารางที่ 2 แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

Strains	Relevant genotype or phenotype	แหล่งที่มา
Plasmid		
pET-21b	Ap ^r ; a recombinant-protein cloning and expression vector carrying T7-Tag and an optional C-terminal His-Tag	Novagen
pTZ57R/T	Ap ^r ; a cloning vector for PCR products	Fermentas
pJS001	Ap ^r ; pTZ57R/T with 1,452-bp DNA fragment containing <i>oprM</i>	การศึกษาครั้งนี้
pJS002	Ap ^r ; pTZ57R/T with 1,410-bp DNA fragment containing <i>oprN</i>	การศึกษาครั้งนี้
pJS003	Ap ^r ; pTZ57R/T with 1,324-bp DNA fragment containing <i>oprJ</i>	การศึกษาครั้งนี้
pJS004	Ap ^r ; pET21-b with 1,454 bp <i>NdeI-NotI oprM</i> from pJS001	การศึกษาครั้งนี้
pJS005	Ap ^r ; pET21-b with 1,412 bp <i>NdeI-NotI oprN</i> from pJS002	การศึกษาครั้งนี้
pJS006	Ap ^r ; pET21-b with 1,436-bp <i>NdeI-NotI oprJ</i> from pJS003	การศึกษาครั้งนี้

DNA, Primers และสารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่

เตรียม Chromosomal DNA โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป ISOQUICK Nucleic acid extraction kit (ORCA, WA) และ QiAmp kit (Qiagen, CA, U.S.A.) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต เตรียมพลาสมิดได้โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAprep[®] Mini-spin kit (Qiagen) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ลำดับเบสของ primers สำหรับทำ PCR แสดงในตารางที่ 3 การสกัด PCR products จาก gel และการทำให้บริสุทธิ์ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป PCR purification protocol (Qiagen) เอนไซม์สำหรับตัดสาย DNA (Restriction enzymes) ทั้งหมดซื้อจาก Fermentas (Hanover, MD, USA).

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของ Primers ที่ใช้ในการวิจัย

ยีน	Primers	ลำดับเบส (5' -3')*	แหล่งที่มา
<i>oprM</i>	<i>oprM</i> -NdeI*	CAATc <u>ATATGAAACGGTCCTTCCTTTCCC</u>	การศึกษารังนี้
	<i>oprM</i> -NotI*	CGATg <u>cgGCCgcGGGATCTTCCTTC</u>	
<i>oprJ</i>	<i>oprJ</i> -NdeI*	GAACc <u>AtATGCGCAAACCTGCTTTTCGGC</u>	การศึกษารังนี้
	<i>oprJ</i> -NotI*	CGCTg <u>cgggcCgcGCCGCCTCGATGTA</u>	
<i>oprN</i>	<i>oprN</i> -NdeI*	TGCA <u>catATGATTCACGCGCAGTCGATC</u>	การศึกษารังนี้
	<i>oprN</i> -NotI*	<u>GGCGgccGcTTGCCAGCCACCGC</u>	
<i>gentamycin</i>	Gm-up	TGGAGCAGCAACGATGTTAC	(Schweizer, et al., 1996)
<i>cassesste</i>	Gm-down	TGTTAGGTGGCGGTACTIONTGG	
<i>mexXY</i>	<i>mexXYKO</i> -up	GAGCAGATCGATCCGATCTACGTGAA	การศึกษารังนี้
	<i>mexXYKO</i> -down	CAGGGCGAGGAACACGATCAACAC	

*Primers มี mismatches (ตัวพิมพ์เล็ก) ซึ่งเป็นการสร้าง restriction sites ใหม่ (ขีดเส้นใต้)

การเตรียม competent cells และการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ (transformation)

สำหรับการนำพลาสมิดปกติ (intact plasmid) เข้าสู่เซลล์ เตรียม competent cells ของ *E. coli* HPS1 และ BL21(DE3) ตามวิธีของ Chuanchuen และคณะ (Chuanchuen, et al., 2002) ดังนี้ เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 4 ml ที่ 37°C เป็นเวลา 1 คืน ในตู้บเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaking incubator) ที่ความเร็ว 250 rpm ขั้นตอนต่อจากนี้ ยกเว้นการปั่นเหวี่ยงให้ทำบนน้ำแข็ง เก็บตะกอนเซลล์จาก culture ปริมาตร 1 มล. ใน eppendorf tube ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 30 sec ล้างเซลล์ด้วยการเติม 1 mM MgCl₂ ที่เย็นปริมาตร 1 มล. และปั่นเหวี่ยงเช่นเดิม จากนั้นละลายเซลล์ใน TG Salt ที่เย็นปริมาตร 1 มล. และแช่ไว้ในน้ำแข็งนาน 10 min ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 30 sec เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ สุดท้ายละลายเซลล์ใน TG Salt 200 µl และเก็บไว้บนน้ำแข็งจนกว่าจะใช้ ในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ให้ใช้ competent cells 100 µl โดยใส่ลงในหลอดทดลองแก้วที่แช่ไว้ในน้ำแข็ง เติมพลาสมิด 3-5 µl และแช่ในน้ำแข็งต่ออีก 15 min จากนั้นนำส่วนผสมไปทำ heat-shock โดยแช่ใน waterbath หรือ heatblock ที่ 42°C นาน 2 min เติม LB 500 µl ทันที และนำไปบ่มที่ 37°C ใน shaking incubator นาน 1 h หลังจากนั้นคัดเลือก transformants บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งที่มียาปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมและอบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 20-24 h

ส่วนการนำ ligation mixture เข้าสู่เซลล์ ทำการเตรียม competent cells ของ *E. coli* HPS1 ตามวิธีของ Inoue และคณะ (Inoue, et al., 1990) และการนำ ligation mixture เข้าสู่เซลล์ตามวิธีของ Sambrook และ Russell (Sambrook and Russell, 2001) ดังนี้ เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว 4 มล. ที่ 37°C เป็นเวลา 1 คืน ในตู้บเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm จากนั้นเจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว 40-100 มล. และเลี้ยงต่อที่ 37°C เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตถึง log phase ($A_{600nm} \sim 0.5$) ใช้เวลาประมาณ 4 h ทุกขั้นตอนต่อจากนี้ให้ทำบนน้ำแข็ง ทำการแช่เซลล์ในน้ำแข็งนาน 10 min และปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ 4°C ความเร็ว 5,000xg นาน 10 min ละลายตะกอนเซลล์ใน 0.1 M MgCl₂ ที่เย็นปริมาตร 20 มล. และแช่ในน้ำแข็งนาน 15 min ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ 4°C ความเร็ว 5,000xg นาน 10 min จากนั้นละลายตะกอนเซลล์อีกครั้งใน TG salt ที่เย็นปริมาตร 20 มล. และแช่เซลล์ในน้ำแข็งนาน 30 min ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ 4°C ความเร็ว 5,000 x g นาน 10 min ละลายตะกอนเซลล์ใน TG salt ที่เย็นปริมาตร 1 มล. แช่เซลล์ในน้ำแข็งและเก็บที่ 4°C นาน 1 คืน จากนั้นแบ่ง competent cells ลงใน eppendorf tubes หลอดละ 200 µl และเก็บที่ -70°C จนกว่าจะใช้ ในการนำ ligation mixture เข้าสู่เซลล์ให้ใช้ competent cells 200 µl มาทำให้ละลายบนน้ำแข็งและใส่ลงในหลอดทดลองแก้วที่แช่ไว้ในน้ำแข็ง เติม ligation mixture ปริมาตรสูงสุด 20 µl และแช่ใน

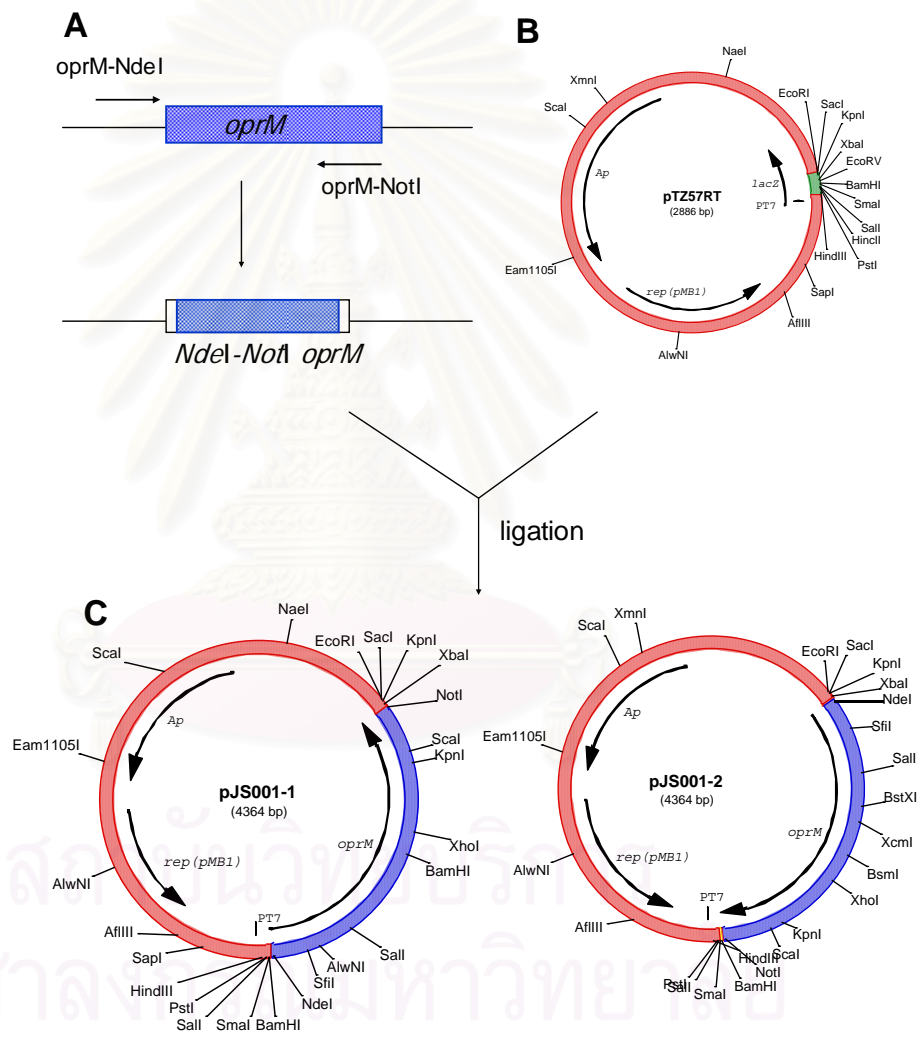
น้ำแข็งต่ออีก 30 min จากนั้นนำส่วนผสมไปอุ่นใน waterbath หรือ heatblock ที่ 42°C นาน 2 min เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 มล. ทันทีก และนำไปบ่มที่ 37°C ใน shaking incubator นาน 1 h หลังจากนั้นคัดเลือก transformants บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมและอบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 20-24 h

การสร้างพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ OprM, OprJ และ OprN

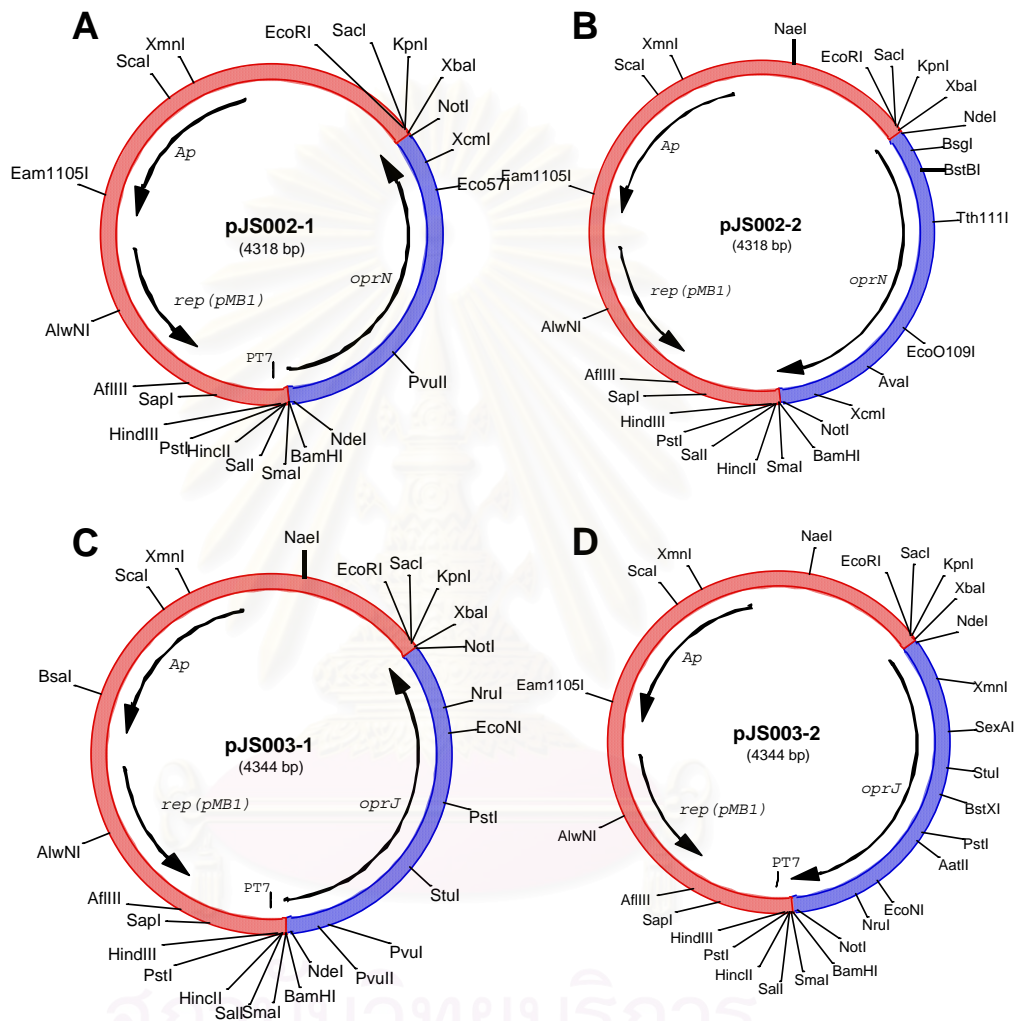
ทำการเพิ่มจำนวนยีน *oprM*, *oprJ* และ *oprN* ด้วยเทคนิค PCR จาก genomic DNA ของ *P. aeruginosa* PAO1MV โดยใช้ primers ที่สังเคราะห์โดยบริษัท integrated DNA Technologies, Inc (Carlsville, CA) ดังแสดงในตารางที่ ยีนทั้ง 3 ถูก clone ลงในพลาสมิด pET21-b (Novagen, WS, USA.) ให้แต่ละยีนเชื่อม (fuse) กับ 6XHisidine tag ที่ปลาย 3' เพื่อให้สามารถสร้างโปรตีน OprM-His₆, OprN-His₆ และ OprJ-His₆ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ในการสร้างพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ OprM ทำการเพิ่มจำนวนยีน *oprM* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ *oprM*-NdeI primer ซึ่งจับที่ปลาย 5' ของยีน *oprM* พร้อมทั้งแทรก restriction site ของเอนไซม์ NdeI และ *oprM*-NotI ซึ่งจับที่ปลาย 3' ของยีน *oprM* พร้อมทั้งแทรก restriction site ของเอนไซม์ NotI ปฏิกริยา PCR มีปริมาตรรวม 50 µl ประกอบด้วย DNA ต้นแบบ 0.5 µg, DMSO 5% (v/v), primer แต่ละตัว 30 µM, deoxynucleotides (dNTPs) 0.2 mM, MgCl₂ 1.5 mM และ เอนไซม์ Taq polymerase 5 units (Invitrogen) ในปฏิกริยาลูกโซ่ DNA ต้นแบบถูกแยกเป็นสายเดี่ยว (predenaturation) ที่ 95°C นาน 5 min จากนั้นปฏิกริยาดำเนินต่อที่ 95°C นาน 45 sec 77°C นาน 45 sec และ 72°C นาน 10 min จำนวน 30 cycles โดยเก็บ PCR products ที่ 8°C จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป จากนั้นนำไป clone ลงใน pTZ57R/T vector (InsT/Aclone™ kit, Fermentas) พลาสมิดที่ได้คือ pJS001 (ภาพที่ 3) จากนั้นตัดชิ้นส่วน DNA ที่มี *oprM* จาก pJS001 ด้วยเอนไซม์ NdeI และ NotI ซึ่งมีขนาด 1452-bp และนำไป clone ลงใน pET21b ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันได้พลาสมิด pJS004 ทำการยืนยันความแม่นยำโดยตัดด้วยเอนไซม์ NdeI และ NotI พร้อมกันและการหาลำดับเบส ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยโปรแกรม the SeqEd (Applied Biosystems, CA, USA.) (ภาพที่ 5) ในการสร้างพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ OprN (pJS005) และ OprJ (pJS006) ทำด้วยวิธีและขั้นตอนเดียวกัน โดยเพิ่มจำนวนยีน *oprN* ด้วย *oprN*-NdeI และ *oprN*-NotI primers และ clone ลงใน pTZ57R/T ได้พลาสมิด pJS002 จากนั้นตัดชิ้นส่วน DNA ขนาด 1,410-bp ที่มี *oprN* จาก pJS002 ด้วยเอนไซม์ NdeI และ NotI และนำไป clone ลงใน pET21b ได้พลาสมิด pJS005 ในทำนองเดียวกัน เพิ่มจำนวนยีน *oprJ* ด้วย *oprJ*-NdeI และ *oprJ*-NotI primers หลังจากที่ clone ลงใน pTZ57R/T ได้พลาสมิด pJS003 แล้ว

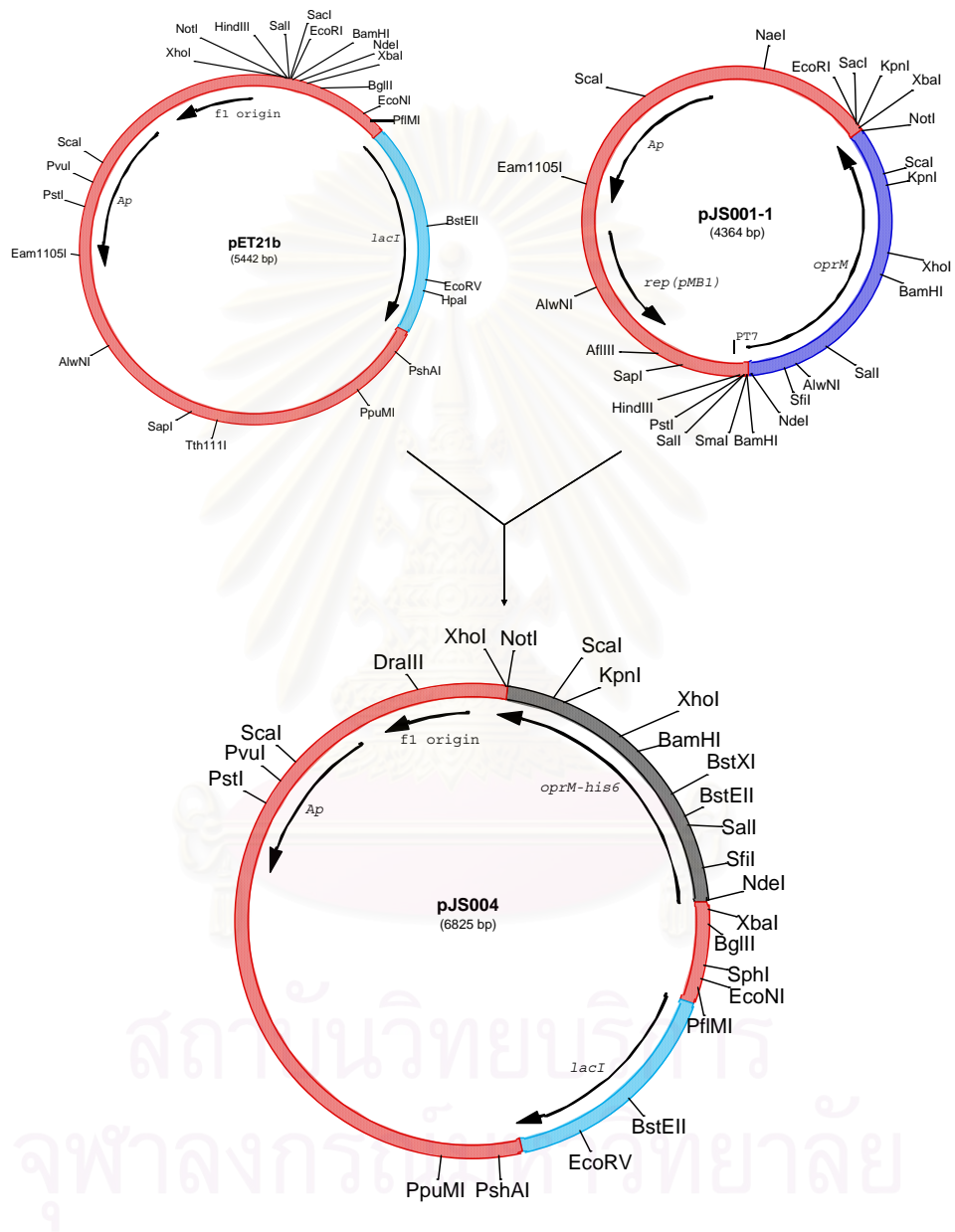
ตัดชิ้นส่วน DNA ขนาด 1,434-bp จาก pJS003 ด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *NotI* และนำไป clone ลงใน pET21b ได้พลาสมิด pJS006 (ภาพที่ 4 และ 6) สุดท้าย นำ pJS004, pJS005 และ pJS006 เข้าสู่ BL21(DE3) เพื่อใช้ในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนต่อไป



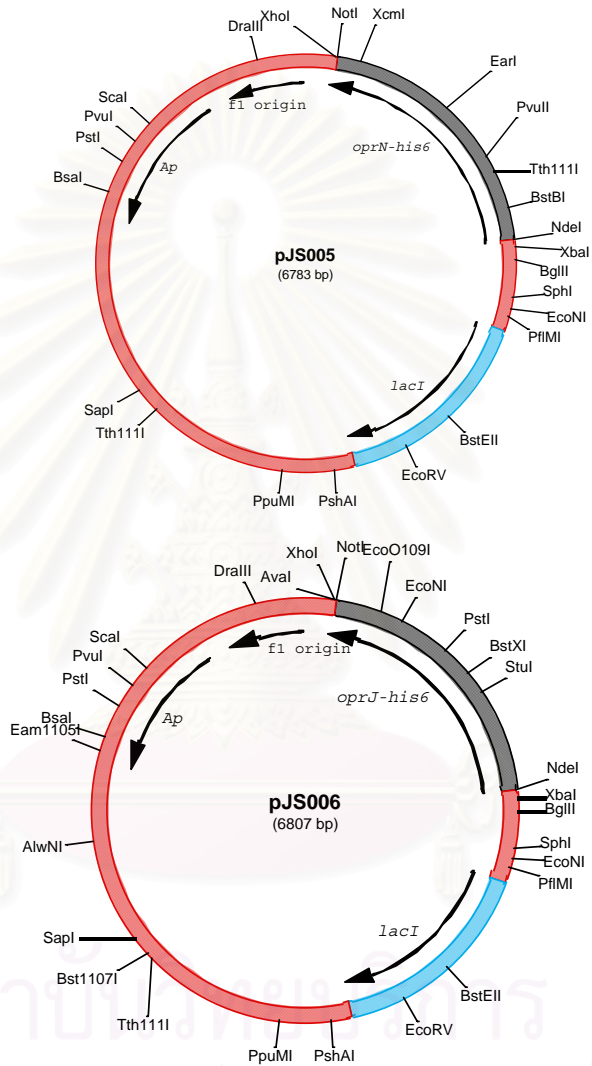
ภาพที่ 3 การสร้าง pJS001 **A** ยีน *oprM* ที่ amplify ด้วย *oprM-NdeI* และ *oprM-NotI* primers ถูก clone ลงใน **B** pTZ57R/T ได้ **C** (ซ้าย) pJS001-1 ที่มียีน *oprM* ในทิศทางเดียวกับ T7 promoter และ **C** (ขวา) pJS001-2 ที่มียีน *oprM* ในทิศทางตรงกันข้ามกับ T7 promoter



ภาพที่ 4 Genetic map ของ pJS002 และ pJS003 **A** และ **B** คือ pJS002-1 และ pJS002-2 ซึ่งเป็น pTZ57R/T ที่มียีน *oprN* ในทิศทางเดียวกันและตรงกันข้ามกับ T7 promoter ตามลำดับ **C** และ **D** คือ pJS003-1 และ pJS003-2 ซึ่งเป็น pTZ57R/T ที่มียีน *oprJ* ในทิศทางเดียวกันและตรงกันข้ามกับ T7 promoter ตามลำดับ



ภาพที่ 5 การสร้าง pJS004 ยีน *oprM* ถูกตัดจาก pJS001-1 ด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *NotI* และ cloned ลงใน pET21-b ที่ย้อยด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน



ภาพที่ 6 Genetic map ของ pJS005 และ pJS006

การเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน

เลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pJS004, pJS005 และ pJS006 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลวที่มี ampicillin 100 µg/ml (LB_{Ap100}) ปริมาตร 4 ml ที่ 37°C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB_{Ap100} ปริมาตร 1 L และเลี้ยงเชื้อที่ 37°C ประมาณ 1-2 h เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตจนได้ $A_{600nm} \sim 0.1-0.3$ จากนั้นเติม isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้ได้ความเข้มข้น 1 mM ทำการเลี้ยงเชื้อต่อที่ 37°C นาน 6 h หรือที่ 30°C นาน 1 คืน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ของแบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็ว 5,000 x g นาน 10 min และเก็บตะกอนเซลล์ที่ -70°C นาน 24 h เพื่อใช้สำหรับการเตรียมโปรตีนผนังหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ชั้นนอก

การเตรียมโปรตีนผนังหุ้มเซลล์

นำตะกอนเซลล์จาก -70°C มาทำให้ละลายบนน้ำแข็งและละลายใน 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง (sonic oscillation) จำนวน 6 รอบ โดยในแต่ละรอบให้สัมผัสคลื่นความถี่สูง 20 sec และพัก 50 sec เก็บตะกอนเมมเบรนโปรตีน (membrane protein) ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็ว 105,000 x g นาน 1 h และละลายตะกอนอีกครั้งใน Putts buffer ที่ดัดแปลงมาจาก Husain และคณะ (Husain, et al., 2004) เติม Phenylmethylsulphonyl-fluoride (PMSF, Sigma) ให้ได้ความเข้มข้น 1 mM จากนั้นนำส่วนผสมไปผ่านคลื่นความถี่สูงอีก 2 รอบและ rock ที่ 30°C นาน 30 min ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่แตกออกที่ 4°C ความเร็ว 10,000 - 15,000Xg นาน 20 min เก็บของเหลวใสซึ่งมีโปรตีนผนังหุ้มเซลล์ละลายอยู่ที่อุณหภูมิ -70°C.

การสกัดโปรตีนผนังเซลล์ชั้นนอก OprM-His₆, OprN-His₆ และ OprJ-His₆

ละลายตะกอนเซลล์จาก -70°C บนน้ำแข็งและล้างด้วย 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 2 ครั้ง ก่อนที่จะทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง เก็บตะกอนเมมเบรนโปรตีนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็ว 105,000 x g นาน 1 h และละลายตะกอนใน GuMACA0 นำส่วนผสมไปผ่านคลื่นความถี่สูงอีก 2 รอบและ rock ที่ 30°C นาน 30 min ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็ว 10,000-15,000Xg นาน 20 min เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ละลาย จากนั้นสกัด OprM-His₆, OprN-His₆ และ OprJ-His₆ ด้วยวิธี Methy-Chelating Affinity Chromatography (MCAC) โดยใช้ Ni²⁺-NTA agarose (Qiagen) ปริมาตร 3 ml ใน column (Qiagen) ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ GuMCAC10 ปริมาตร 50 ml ตามด้วย GuMCAC20 ปริมาตร 50 ml และ GuMCAC50 ปริมาตร 50 ml จากนั้นทำการเปลี่ยน

สารละลายบัฟเฟอร์โดยล้างด้วย 8UrMACAO และ 8UrMCAC50 อย่างละ 50 ml ในขั้นสุดท้ายใช้ 8UrMCAC500 5 ml และเก็บสารละลายส่วนที่มีโปรตีน ทำ Protein dialysis ที่ 4°C ใน dialysis buffer ปริมาตร 1,500 ml จำนวน 2 ครั้ง ทำการตรวจสอบโปรตีนด้วย 0.1% sodium dodecyl sulfate - 10% polyacrylamide gel electrophoresis (pH 9.2) (0.1% SDS-10% PAGE gel) จากนั้น เก็บโปรตีนสกัดที่ -70°C. ตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนสกัดด้วยชุดทดสอบ Bradford assay (Biorad) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนด้วยชุดทดสอบ the Bradford assay จาก Biorad (CA, U.S.A.) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต โดยใช้ Bovine serum albumin (Sigma) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

1.2. การเตรียมเปปไทด์สังเคราะห์ที่จำเพาะต่อ OprM, OprN และ OprJ

เปปไทด์สังเคราะห์ที่ได้รับการออกแบบและผลิตโดยบริษัท Affinity Bioreagents, (Golden, CO, USA) โดยกำหนดให้แต่ละสายประกอบด้วย 15-18 กรดอะมิโน เปปไทด์สังเคราะห์เชื่อม (cross-linked) กับ Keyhole limpet hemocyanin (KLH) ด้วย glutaraldehyde เพื่อเพิ่มความเป็น immunogenicity

ระยะที่ 2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน OprM OprN และ OprJ ในกระต่าย

การวิจัยโดยสังเขป ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่ายด้วยเปปไทด์สังเคราะห์

การผลิต polyclonal antibody ต่อ OprM, OprN และ OprJ

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White น้ำหนัก 2000-2500 กรัม (สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา กรุงเทพฯ) กระต่ายจะพักในกรงเลี้ยงที่ห้องสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นเวลา 15 วัน ก่อนเริ่มการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเก็บเลือดตามระยะเวลาที่แสดงในตารางที่ 4 โดยโปรแกรมการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ยุติลง เนื่องจากมีรายงานการติดเชื้อของสัตว์ทดลองในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองใกล้เคียง

โปรตีนแต่ละตัวใช้เปปไทด์สังเคราะห์ 2 สาย และฉีด (co-injection) เข้ากระต่าย 2 ตัว กระต่ายที่ได้รับเปปไทด์สังเคราะห์ของ OprM เรียกว่า กระต่าย M1 และ M2 ส่วนกระต่ายที่

ได้รับเปปไทด์สังเคราะห์ของ OprN และ OprJ เรียกว่า กระจาย N1, N2, J1 และ J2 ตามลำดับ โดยกระจายแต่ละตัวได้รับเปปไทด์สังเคราะห์ 2 สายรวม 100 μg ทำให้เป็นอิมัลชันใน TiterMax GoldTM adjuvant (Sigma) ซึ่งเป็น water-in-oil immunoadjuvant ประกอบด้วย Block copolymer CRL-8941 Microparticulate silica เคลือบด้วย CRL-8941 Sorbitan Monooleate 80 และ Squalene โดยใช้ในอัตราส่วน 50:50 ปริมาตรรวม 100 μl และฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลัง ในการเก็บเลือดเพื่อการทดสอบ เจาะเลือดจาก lateral ear vein ไม่เกิน 1% ของน้ำหนักตัว สำหรับการเก็บเลือดครั้งสุดท้าย ทำให้สลบด้วย sodium pentobarbitone 30 mg/kg ทาง central ear artery และเก็บเลือดจากหัวใจ ตามด้วย sodium pentobarbitone เกินขนาด เลือดที่เก็บได้จะปล่อยให้แข็งตัวที่อุณหภูมิปกติ 4 h และเก็บที่ 4°C ประมาณ 12 h จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเม็ดเลือดแดงที่ความเร็ว 4,000 rpm นาน 3-5 min และเก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -20°C

ในการฉีดกระตุ้นภูมิและเจาะเลือดใช้แอลกอฮอล์และน้ำในการทำความสะอาดเท่านั้น ไม่ใช้สารช่วยขยายหลอดเลือดใดๆที่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังกระจาย ทำลายซากโดยการเผา กำจัดที่หน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 กำหนดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเก็บซีรัม

วันที่	กิจกรรม
0	เก็บเลือด 5 ml และฉีดกระตุ้นภูมิ
20	เก็บเลือด 10 ml
40	เก็บเลือด 10 ml
60	เก็บเลือด 20 ml
80	เก็บเลือดครั้งสุดท้าย

ระยะที่ 3 การทดสอบคุณภาพของ polyclonal antisera

การวิจัยโดยสังเขป ทำการทดสอบคุณภาพและประสิทธิภาพของ polyclonal antibody ที่ผลิตได้ โดย antibody แต่ละชนิดใช้ *P. aeruginosa* ที่ overexpress และ isogenic mutants ที่ไม่มีการแสดงออกของระบบ MEX นั้นๆ ในการทดสอบ สำหรับ MexX ได้สร้าง mutants ที่ไม่มีการแสดงออกของระบบ เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมลบ

การทำ Western blot analysis

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลวจนถึง log phase ($A_{540nm} \sim 0.5-1.0$) วัดค่า A_{540nm} และเก็บตะกอนเซลล์จากเชื้อปริมาตร 1 ml โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 1 min จากนั้นปรับความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายบัฟเฟอร์ 2× sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยปริมาตรสารละลายบัฟเฟอร์ 2× SDS-PAGE (ml) เป็นผลคูณระหว่าง 0.08 กับค่า A_{540nm} ได้โปรตีนประมาณ 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ทำลายผนังเซลล์ด้วยการต้มในน้ำเดือด 5 min และแยกโปรตีนทั้งหมด (whole cell protein) ประมาณ 75 μg บน 0.1% SDS-10% PAGE gel จากนั้น transfer ไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF (blots) และแช่แผ่น blots ใน 10% skim milk PBST นาน 1 h หรือจนถึง 24 h จากนั้นให้สัมผัส 1st antibody ซึ่งเป็น polyclonal antibodies ในซีรัมที่เก็บได้จากวันต่างๆ และเจือจางใน PBST ในอัตราส่วนต่างๆ ดังนี้ 1:10000 1:1000 1:400 1:200 และ 1:100 โดยให้สัมผัสนาน 1-2 h แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ทำการตรวจหาสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนกับ 1st antibody (hybridized antibody) ด้วย 2nd antibody ซึ่งเป็น anti-rabbit antibody ที่เชื่อมกับเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) และทดสอบปฏิกิริยาของ HRP ด้วย 4-chloro-naphthol และ 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (CN/DAB substrate kit, Pierce, IL U.S.A.) หรือ 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) (TMB1 Component HRP membrane substrateTM, BioFxx Laboratories, MD, U.S.A.) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

สำหรับ anti-OprM Anti-OprN Anti-OprJ และ Anti-MexX ใช้ทดสอบการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิดที่เกี่ยวข้องในตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบดังแสดงในตารางที่ 5 ส่วนการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (Cross reactivity) ของ antibody ทั้ง 3 ระหว่างโปรตีน OprM OprN และ OprJ ทำโดยใช้ anti-OprM Anti-OprN และ Anti-OprJ แต่ละชนิดในการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนใน OCR1 PAO200-2 และ PAO7H โดยใช้โปรตีนที่เตรียมจาก null mutant PAO200 และ PAO255

ตารางที่ 5 การแสดงออกของระบบ MEX ในเชื้อควบคุม

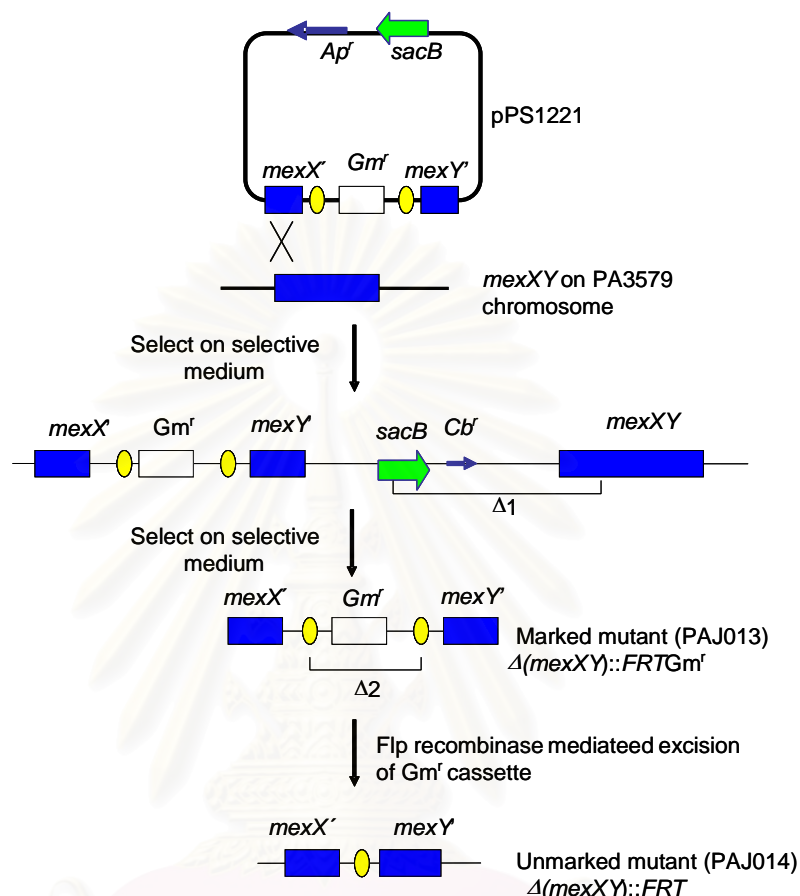
แบคทีเรีย	การแสดงออกของระบบ MEX*	Antibody ที่ใช้ทดสอบ	หน้าที่ในการทดสอบ
OCR1	MexA ⁺ B ⁺ -OprM ⁺	OprM	ตัวควบคุมบวก
PAO200	none	OprM, OprJ, OprN	ตัวควบคุมลบ
PAO200-2	MexC ⁺ D ⁺ -OprJ ⁺	OprJ	ตัวควบคุมบวก
PAO238	none	OprM, OprJ, OprN	ตัวควบคุมลบ
PA07H	MexAB-OprM MexE ⁺ F ⁺ -OprN ⁺	OprN	ตัวควบคุมบวก
PA07H1A	MexE ⁺ F ⁺ -OprN ⁺	OprN	ตัวควบคุมบวก
PAO255	none	OprN	ตัวควบคุมลบ
PA3579	MexAB-OprM MexX ⁺ Y ⁺	MexX	ตัวควบคุมบวก
PAJ014	MexAB-OprM	MexX	ตัวควบคุมลบ

*ระบบเฉพาะระบบ MEX ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยครั้งนี้เท่านั้น PAO1, PAO200, PAO200-2, PAO238, PAO7H, PAO7H1A, และ PAO255 เป็น WT ของ MexX ที่มีการแสดงออกแบบ inducible ในระดับต่ำ สำหรับ PA3579 การแสดงออกของ MexX เนื่องมาจากจึงเป็นแบบ overexpression

* การแสดงออกของระบบเป็นแบบ overexpression ส่วนระบบที่ไม่มีเครื่องหมายนี้ มีการแสดงออกแบบต่ำๆอย่างตลอดเวลา

การสร้าง PAJ (PA3579 Δ mexXY::FRT) ด้วยเทคนิค Gene replacement

ทำการตัดยีน *mexX* ใน PA3579 ตามวิธีของ Schweizer ในปี 1998 (Schweizer, 1998) (ภาพที่ 7) ดังนี้ นำพลาสมิด pPS1221 จาก Sm10lacIq เข้าสู่ PA3579 ด้วยเทคนิค Biparental mating คัดเลือก transconjugants บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Vogel-Bonner minimum medium (VBMM) ที่มีทั้งน้ำตาลซูโครส 5 % (VBMM5%Suc) และ gentamycin 50 μ g/ml (VBMMGm₅₀) ทำการทดสอบยืนยันรูปแบบปรากฏ (phenotype) อีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ VBMM5%Suc หรือ carbenicillin 200 μ g/ml (VBMMCb₂₀₀) หรือ VBMMGm₅₀ เพื่อให้ได้โคลนที่เจริญเติบโตได้ใน gentamycin (Gm^r) และน้ำตาลซูโครส (Suc^r) แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน carbenicillin (Cb^s) ซึ่งเป็น marked mutant เรียกชื่อว่า PAJ013 จากนั้นทำการตัด gentamycin-resistance cassette ออกด้วยเทคนิค Flp-recombinase excision โดยนำพลาสมิด pFLP₂ จาก Sm10 เข้าสู่ marked mutant ด้วย Biparental mating คัดเลือก transconjugants บนอาหารเลี้ยงเชื้อ VBMMCb₂₀₀ และทดสอบหาโคลนที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน VBMMGm₅₀ (Gm^s) แต่สามารถเจริญเติบโตได้ใน



ภาพที่ 7 การตัด *mexXY* บนโครโมโซม PA3579 ด้วยเทคนิค gene replacement pPS1221 ซึ่งเป็น suicide plasmid pEX18AP ที่มี *mexXY* ที่ถูกตัดออกและแทรกด้วย *Gm^r* cassette ถูกนำเข้าสู่ PA3579 ด้วยเทคนิค biparental จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่พลาสมิด integrate เข้าสู่โครโมโซม โดย Marked mutants (PAJ013) เป็นโคโลนีที่มี $\Delta 1$ เกิดขึ้นเองและเป็น *Cb^rGm^rSuc^r* จากนั้นตัด *Gm^r* cassette ออกเพื่อให้ได้ unmarked mutant (PAJ014) ด้วย FLP-recombinase excision ($\Delta 2$) ที่เป็น *Cb^rGm^rSuc^r* Δ หมายถึง การตัดยีนที่เกิดจาก homologous recombination

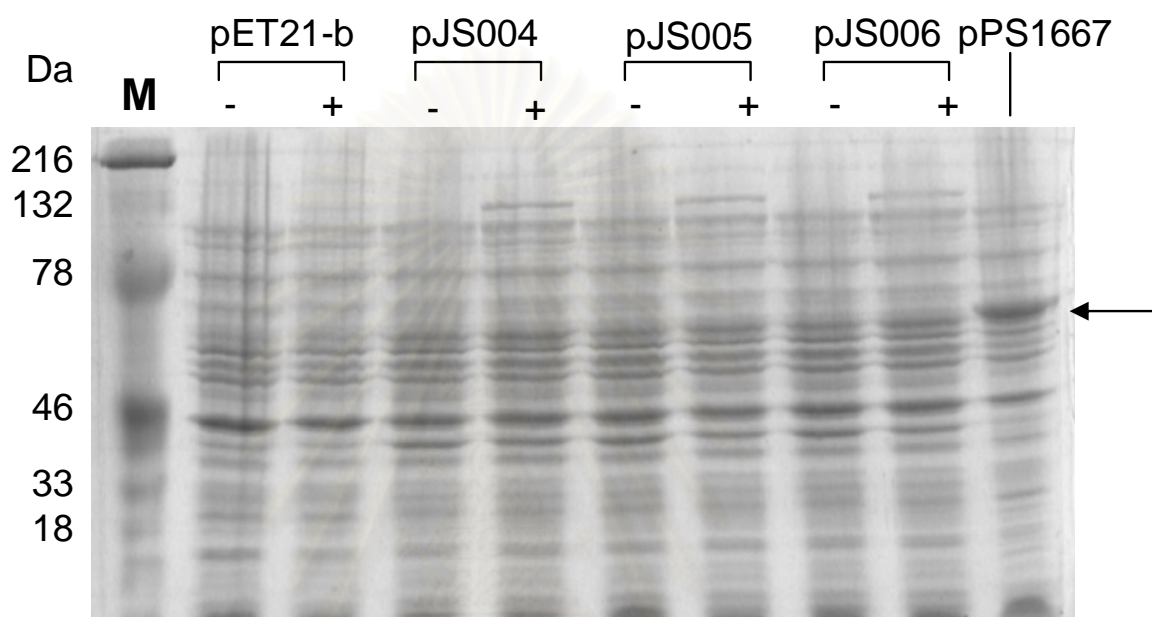
VBMMCb₂₀₀ (*Cb^r*) จากนั้นทำการกำจัด pFLP₂ โดยการเลี้ยงเชื้อบน VBMM5%*Suc* คัดเลือกให้ได้โคโลนีที่ *Gm^rCb^rSuc^r* โคโลนีที่ได้นี้เป็น unmarked mutant เรียกว่า PAJ014 ทำการยืนยันความถูกต้องของการตัดยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ *mexXYKO-up/mexXYKO-down* primers และ *Gm-up/down* primers

ผลการวิจัย

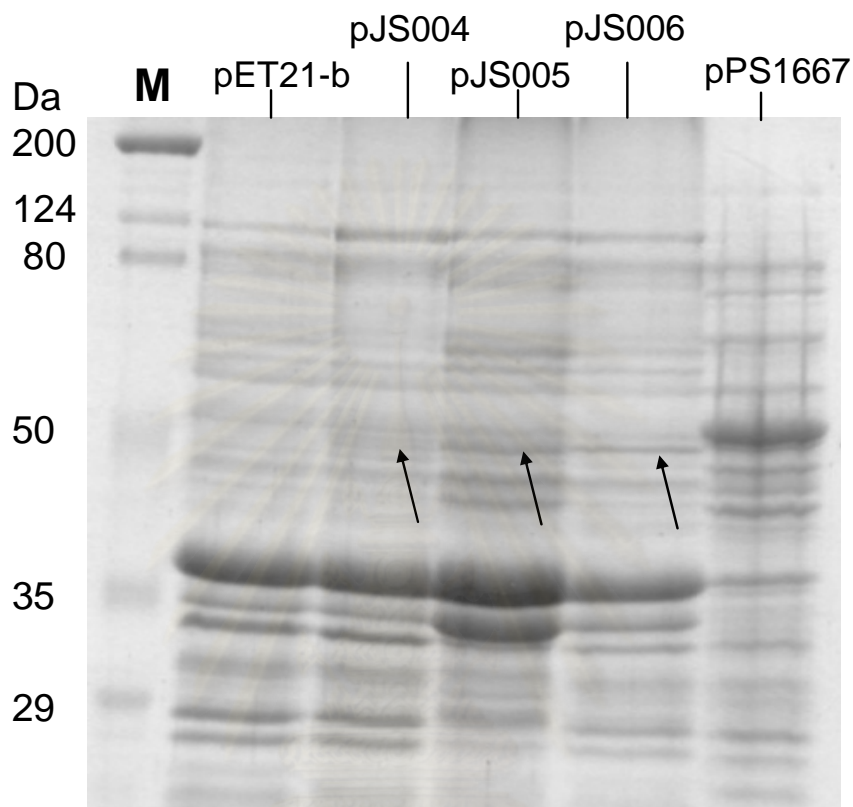
ระยะที่ 1 การเตรียมแอนติเจน

การสกัดโปรตีนบริสุทธิ์ OprM-His₆ OprN-His₆ และ OprJ-His₆

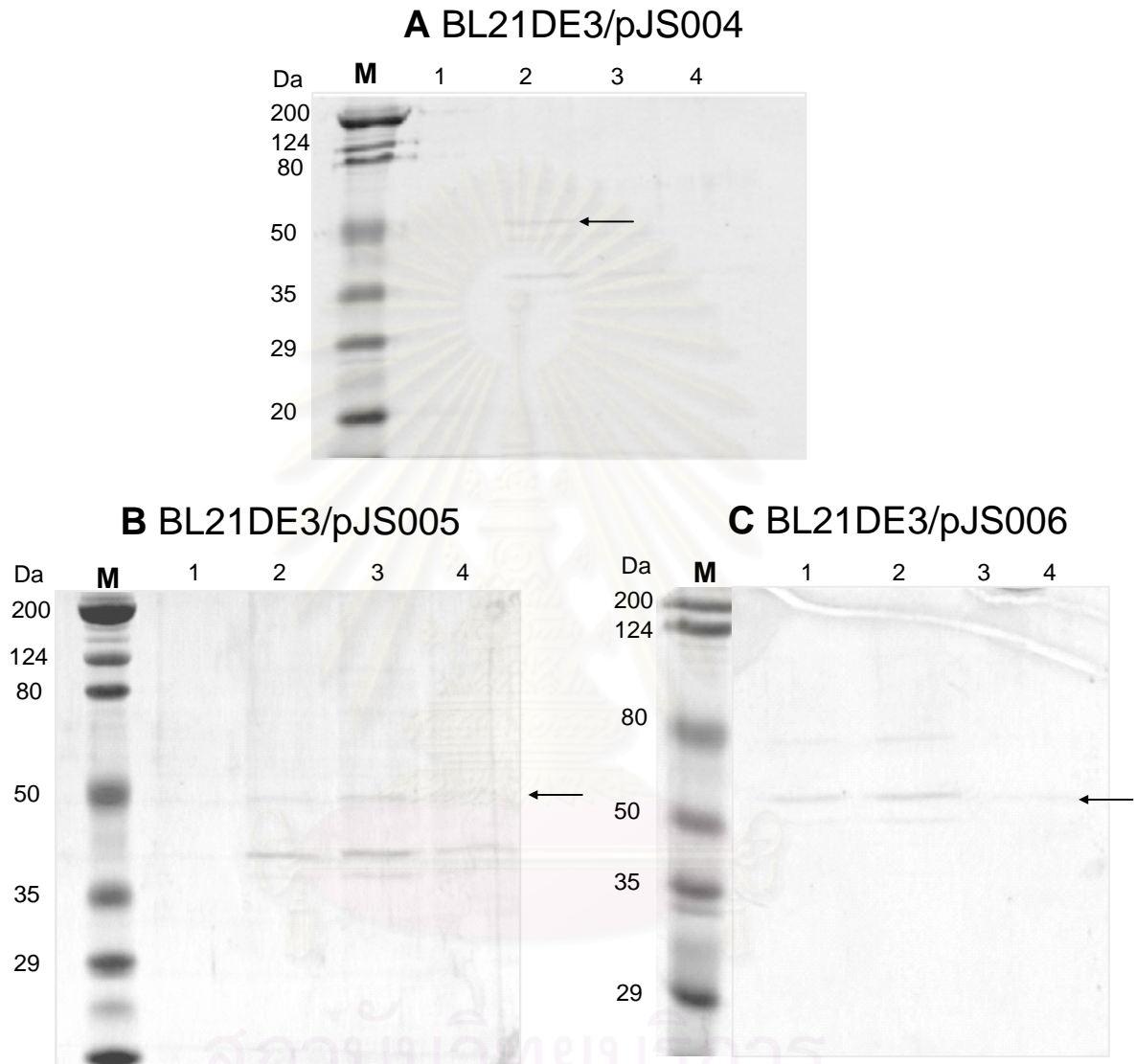
ยีน *oprM*, *oprN* และ *oprJ* จาก PAO1 ซึ่งเป็น WT ได้ถูก clone ลงใน pTZ57R/T ก่อน เพื่อให้สามารถตัดด้วย restriction enzymes ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากนั้นจึง clone ลงใน pET21-b ในทิศทางที่ fuse กับ 6X histidine tag ที่ปลาย 3' ทำให้ได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน Histidine 6 ตัวด้าน carboxy -terminal ซึ่งช่วยให้สามารถสกัดโปรตีนบริสุทธิ์ได้ด้วย Ni²⁺ - NTA affinity column การแสดงออกของยีนเป้าหมายควบคุมด้วย T7 RNA polymerase promoter ที่ปลาย 5' โดยเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 3 ด้วย 1 mM IPTG ใน *E. coli* BL21(DE3) ซึ่งเป็น expression host ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วย *lacUV5* promoter และ T7 RNA polymerase gene บนโครโมโซมอีกที่ เมื่อแยก whole cell protein บน 0.1% SDS-10% PAGE gel OprM-His₆ มีน้ำหนักโมเลกุล monomer ประมาณ 54 Kda ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักของ OprM ที่มี 485 กรดอะมิโน (54.3 Kda) เช่นเดียวกับ OprN-His₆ และ OprJ-His₆ มีน้ำหนักโมเลกุล monomer 52.8 และ 53.7 Kda ตามลำดับ (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักของ OprN และ OprJ ที่มี 472 และ 479 กรดอะมิโน ตามลำดับ จากการสกัด 6X histidine tagged protein จากโปรตีนผนังเซลล์ชั้นนอก (ภาพที่ 9) และโปรตีนผนังหุ้มเซลล์ด้วย MCAC ได้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสอดคล้องกับโปรตีนทั้ง 3 (ภาพที่ 10) แต่มีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นๆที่มีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีนเป้าหมายและปริมาณของโปรตีนที่ได้ไม่มาก โดยจากการสกัด OprM-His₆ จาก overnight culture ปริมาตร 2 l ได้โปรตีนทั้งหมดหลังจากทำ dialysis ประมาณ 5 µg ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่ายต้องการโปรตีนประมาณ 1 mg สำหรับ Freund's adjuvant หรือ 100 µg สำหรับ TiterMax adjuvant ซึ่งเป็นไปได้ยากในเชิงปฏิบัติเพื่อเตรียมแอนติเจนด้วยวิธีนี้ ดังนั้นจึงใช้เปปไทด์สังเคราะห์เป็นแอนติเจนแทน เนื่องจากปริมาณของ OprN-His₆ และ OprJ-His₆ บน 0.1% SDS-10% PAGE gel ไม่แตกต่างจาก OprM-His₆ จึงไม่ได้ตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้ง 2



ภาพที่ 8 Whole cell protein ของ BL21DE3/pJS004, pJS005 และ pJS006 ทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OprM-His₆, OprN-His₆ และ OprJ-His₆ เตรียม Whole cell protein และแยกโปรตีนบน 0.1%SDS-10%PAGE โดยพบ bands ขนาด ~53 Mda ใน Whole cell protein จาก BL21DE3/pJS004, pJS005 และ pJS006 ทั้งใน induced และ uninduced state แต่ไม่พบใน BL21DE3/pET21-b ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ OpmH-His₆ จาก pPS1667 (~54 Mda) ที่เป็น induction control Lane 1, molecular mass marker; lane 2, uninduced pET21b vector; lane 3 induced pET21b vector; lane 4, uninduced OprM-His₆; Lane 5, induced OprM-His₆; lane 6, uninduced OprN-His₆; Lane 7, induced OprN-His₆; lane; lane7, uninduced OprJ-His₆; Lane 8, induced OprJ-His₆ และ lane 9, induced OpmH-His₆; ลูกศรแสดง histidine tagged protein



ภาพที่ 9 Cell envelope ของ BL21DE3/pJS004, pJS005 และ pJS006 ทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OprM-His₆, OprN-His₆ และ OprJ-His₆ เตรียม Cell envelope และแยกโปรตีนบน 0.1%SDS-10%PAGE พบ bands ขนาด ~53 Mda ใน BL21DE3/pJS004, pJS005 และ pJS006 แต่ไม่พบใน BL21DE3/pET21-b ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ OpmH-His₆ จาก pPS1667 (~54 Mda) ที่เป็น induction control ภาพแสดงเฉพาะโปรตีนในสภาวะที่มีการเหนี่ยวนำ Lane 1, molecular mass marker; lane 2, pET21b vector; lane 3 OprM-His₆; lane 4, OprN-His₆; Lane 5, OprJ-His₆ และ lane 6, OpmH-His₆; ลูกศรแสดง histidine tagged protein



ภาพที่ 10 โปรตีนสกัด OprM-His₆, OprN-His₆ และ OprJ-His₆ ทำการเห็นย่นำการสร้างโปรตีน OprM-His₆, OprN-His₆ และ OprJ-His₆ ใน BL21(DE3) และสกัดให้บริสุทธิ์ด้วย Ni²⁺-NTA column โดยพบ bands ขนาด ~50 kDa (A, lane 2; B, lane 2 และ 3; C, lane 1 และ 2) ซึ่งเป็นขนาดของ polyhistidine tagged protein และมี non-specific protein ด้วย Lane 1, molecular mass marker; lane 2-4, fractions ของโปรตีนสกัด ลูกระจุยตำแหน่งของ OprM-His₆, OprN-His₆, และ OprJ-His₆

การเตรียมเปปไทด์สังเคราะห์ที่จำเพาะต่อ OprM, OprN และ OprJ

จากการออกแบบเปปไทด์สังเคราะห์ด้วย พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่มีความเป็น antigenicity ที่ดีดังแสดงในภาพที่ 11 โดยบริษัท Affinity Bioreagents เสนอลำดับกรดอะมิโนที่มีความเป็น immunogenicity สูงสุด 3 ลำดับแรก และผู้วิจัยสุ่มเลือกสายกรดอะมิโนจำนวน 2 สายต่อโปรตีนแต่ละตัวดังแสดงในตารางที่ 6

OprM MKRSFLSLAVAAVLSGCSLIPDYQRPEAPVAAAYPQQQAYGQNTGAAVPAADIGWRE
FFRDPQLQQLIGVALENNRDLRVAALNVEAFRAQYRIQRADLFPRIGVDGSGSTRQRLPGD
LSTTGSPAISSQYGVTLGTTAWELDLFGRLRSLRDQALEQYLATEQAQRSAQTTLVASVAT
AYLTLKADQAQLTKDTLGTYSKFDLQRSYDVGVSALDLRQAQTAVEGARATLAQ
YTRLVAQDQNALVLLGSGIPANLPQGLGLDQTLTEVPAGLPSDLLQRRPDILEAEHQ
MAANASIGAARAAFFPSISLTANAGTMSRQLSGLFDAGSGSWLFQPSINLPIFTAGSLRAS
LDYAKIQKDINVAQYEKAIQTAFQEVADGLAARGTFTEQLQAQRDLVKASDEYYQLADKR
YRTGVDNYLTLDDAQRSLFTAQQQLITDRLNQLTSEVNLKALGGGWNQQTVTQQQTAK
KEDPQA

OprN MIHAQSIRSLASALGLFSLALSACTVGPDYRTPDTAAKIDATASKPYDRSRFESLW
WKQFDDPTLNQLVEQSLSGNRDLRVAFARLRAARALRDDVANDRFPVVTSRASADIG
KGQQPGVTEDRVNSERYDLGLDSAWELDLFGRIRRLQLESSDALSEAAEADLQQLQVS
LIAELVDAYGQLRGAQLREKIALSNLENQKESRQLTEQLRDAGVGAELDVLRADARLA
ATAASVPQLQAEARARHRIATLLGQRPEELTVDLSPRDLPAITKALPIGDPGELLRRR
PDIRAAERRLAASADVGVATADLFPVSLSGFLGFTAGRGSQIGSSAARAWSVGPSI
SWAAFDLGSVRARLRGAKADADAALASYEQVLLALEESANAFSDYGRKQERLVSLV
RQSEASRAAAQAAIRYREGTTDFLVLDAEREQLSAEDAQAQAEVELYRGIVAIYRSL
GGGWQPSA

OprJ MRKPAFGVSAALLIALTLGACSMAPTYERPAAPVADSWSGAAQQRGAAIDLDWKSF
IVDAELRRLVDMALDNNRSLRQTLLEIAARAQYRIQRADRVPLNAAATGNRQRQP
ADLSAGNRSEVASSYQVGLALPEYELDLFGRVKSLTDAALQQYLASEEAAARAIALV
AEVSAQYLSYDGLRRLALTRQTLVSREYSFALIDQRRAGAATALDYQEALGLVEQA
RAEQERNLRQKQAFNALVLLGSDAAQAI PRSPGQRPKLLQDIAPGTPSELIERRP
DILAAEHRLRARNADIGAARAAFFPRISLTGSFGTSSAEMSGLFDGGSRSWSFPLTL
PIFDGGRNRANLSAEARKDSAVAAEYGTIQTAFREVADALAASDTLRREKALRALA
NSSNEALKLAKARYESGVDNHLRYLDAQRSSFLNEIAFIDGSTQRQIALVDFRALGG
GWDEGRSLVHRGGRS

ภาพที่ 11 Potential antigenic peptides ของโปรตีน OprM, OprN และ OprJ โดยแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งสาย พร้อมกับลำดับกรดอะมิโนที่มีแนวโน้มเป็น antigenic peptides (ขีดเส้นใต้) และลำดับกรดอะมิโนที่เลือกเพื่อผลิตเป็นเปปไทด์สังเคราะห์และใช้ในการกระตุ้นภูมิในกระต่าย (กรอบสีเทา)

ตารางที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนและตำแหน่งเปปไทด์สังเคราะห์ที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิ

โปรตีน	ลำดับกรดอะมิโน	ตำแหน่งบนสายโปรตีน
OprM	AYPQQAYGQNTGAA	34-48
	QALEQYLATEQAQRS	155-169
OprN	WKQFDDPTLNQLVEQ	60-74
	RALRDDVANDRFPVV	93-107
OprJ	ATGNRQRQPADLSAG	106-120
	EHRLRARNADIGAAR	294-308

ระยะที่ 2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย

ปริมาณของซีรัมที่ได้ประมาณ 40-50% ของปริมาตรเลือดที่เก็บได้ในแต่ละครั้ง ส่วนใหญ่ซีรัมมี hemolysis เพียงเล็กน้อย ยกเว้น กระต่าย N2 ให้เลือดที่มีความหนืดและซีรัมที่มีสีแดงมากกว่าซีรัมจากกระต่ายตัวอื่นทุกครั้ง โดยตลอดระยะเวลาของการทดลอง กระต่ายทุกตัวมีสุขภาพแข็งแรงดี (จากการสังเกต) ไม่พบผื่นแดง ฝีมือง arthus reaction และ hypersensitivity พบสะเก็ดแผลเพียงเล็กน้อยตรงบริเวณที่ฉีดและหายไปก่อนการเก็บเจาะเลือดครั้งต่อไป

ระยะที่ 3 การทดสอบคุณภาพของ polyclonal antisera

การทดสอบการแสดงออกของ OprM, OprN และ OprJ ด้วย polyclonal antibodies

ทดสอบคุณภาพของ polyclonal antibodies ต่อโปรตีน OprM, OprN และ OprJ ด้วย Western blot analysis โดยใช้ซีรัมที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ พบว่า

OprM-hyperimmune serum จากกระต่าย M1 และ M2 ที่เก็บในวันที่ 60 และ 80 ให้ bands ขนาด ~54 Mda ซึ่งเป็นขนาดของ OprM ต่อโปรตีนทั้งหมด (whole cell protein) ที่เตรียมจาก OCR1 (ตัวควบคุมบวก) โดยไม่ให้เกิด bands ดังกล่าวต่อโปรตีนจาก PAO200 (ตัวควบคุมลบ) เมื่อใช้ในอัตราส่วน 1:400 โดยที่มี cross-reactivity กับโปรตีนตัวอื่นๆ แต่ไม่รบกวนความชัดเจนของ bands ของโปรตีนเป้าหมาย โดยในวันที่ 40 OprM-hyperimmune serum จากกระต่าย M1 เท่านั้นที่ให้ bands เป้าหมายแต่ไม่ชัดเจนและเมื่อลดการเจือจางเป็น 1:200 ให้ background มากจนไม่สามารถมองเห็น bands ของโปรตีนเป้าหมาย ในขณะที่เมื่อลดความเข้มข้นของ OprM-

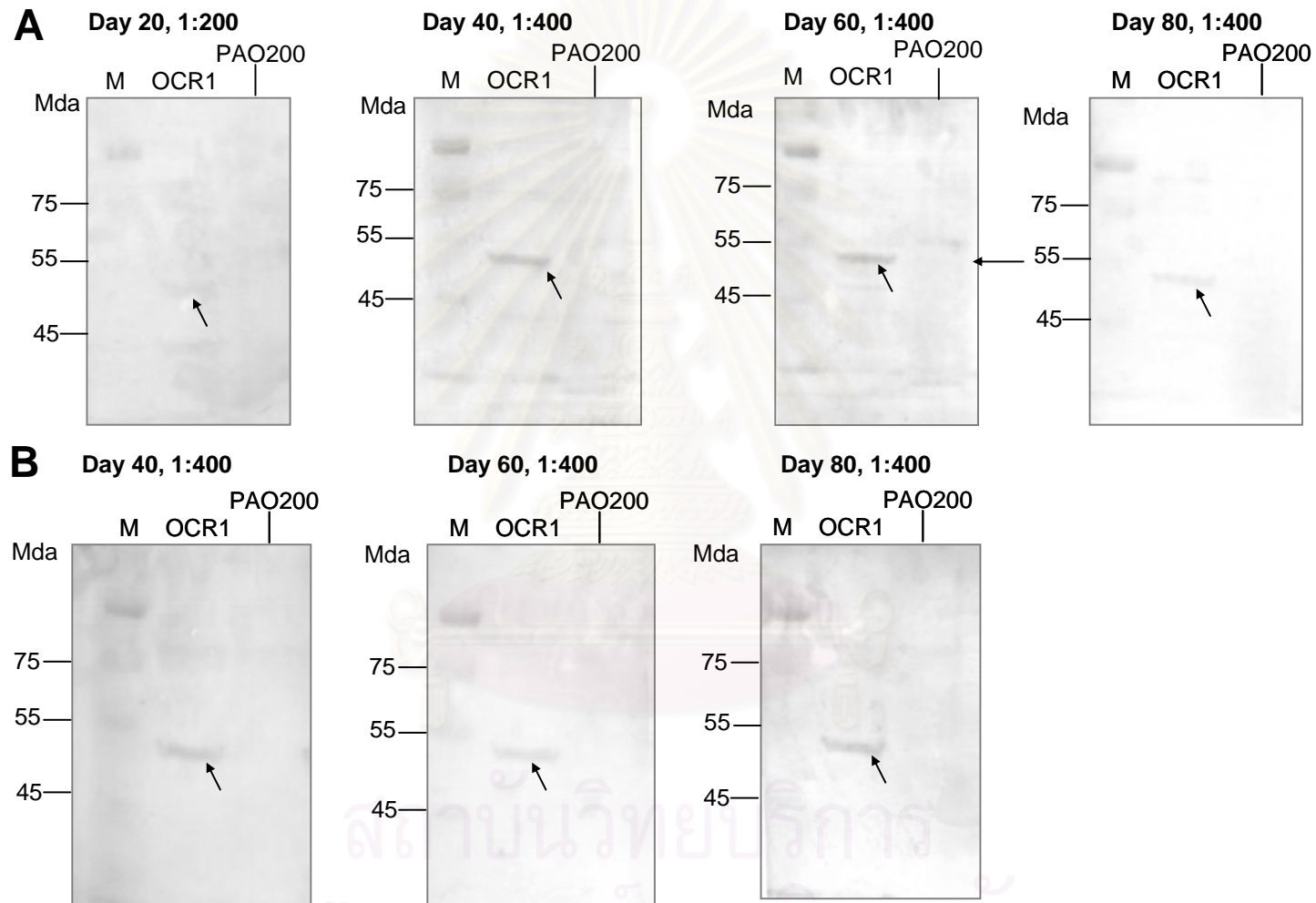
hyperimmune serum จากกระต่าย M1 และ M2 ในวันที่ 60 และ 80 จะไม่พบ bands ของโปรตีนเป้าหมาย แต่ background ลดลงมาก (ภาพที่ 12)

OprN-hyperimmune serum จากกระต่าย N2 ที่เก็บในวันที่ 60 และ 80 เมื่อใช้ในอัตราส่วน 1:400 ให้ bands ขนาดใกล้เคียงและต่ำกว่า 55 Mda จำนวน 3 bands เมื่อทดสอบกับ whole cell protein ที่เตรียมจาก PAO7H และ PAO7H1A (ตัวควบคุมบวก) และให้ bands ดังกล่าว จำนวน 2 bands ต่อ whole cell protein จาก PAO255 และ PA238 (ตัวควบคุมลบ) โดย bands ที่อยู่ตรงกลางพบเฉพาะใน whole cell protein ที่เตรียมจาก PAO7H และ PAO7H1A เท่านั้น จึงน่าจะเป็น OprN (~52 Mda) นอกจากนี้พบ strong cross-reactivity กับ unknown protein ใน PAO238 ที่มีขนาด ~35 Mda ส่วน OprN-hyperimmune serum จากกระต่าย N1 ในวันที่ 60 สามารถเห็น bands เป้าหมายใน whole cell protein ที่เตรียมจาก PAO7H และ PAO7H1A ได้เมื่อเจือจางที่อัตราส่วน 1:400 เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้น (1:200) พบว่าให้ background มากจนไม่สามารถมองเห็น bands ของโปรตีนเป้าหมาย ส่วน OprN-hyperimmune serum จากกระต่าย N1 ในวันที่ 80 ให้ bands เป้าหมายเมื่อใช้ในอัตราส่วน 1:400 โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้ background มากจนไม่สามารถมองเห็น bands ของโปรตีนเป้าหมายเช่นกัน (ภาพที่ 13)

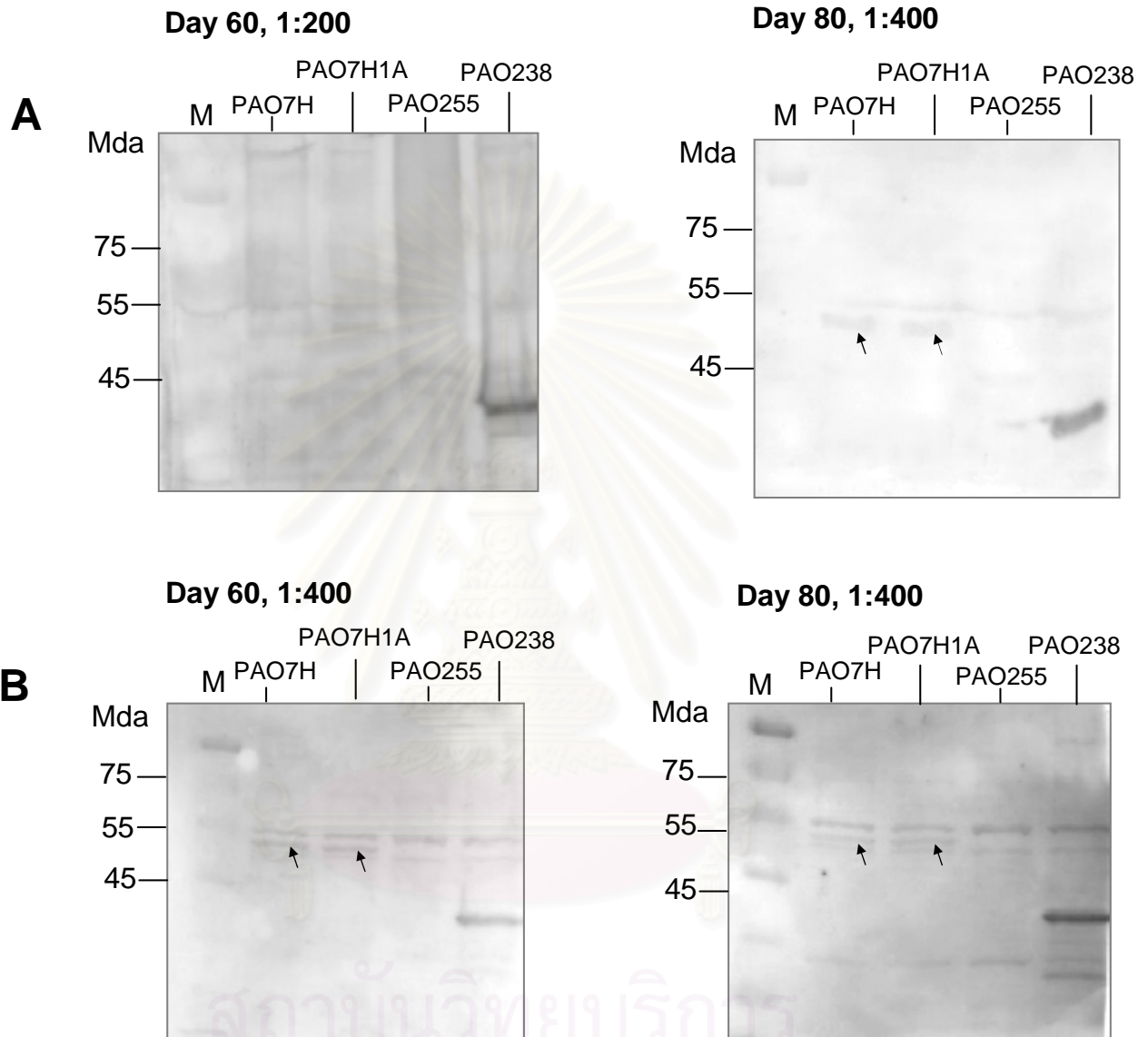
OprJ-hyperimmune serum จากกระต่าย J2 ที่เก็บในวันที่ 80 เท่านั้น ที่ให้ bands ขนาด ~53 Mda เมื่อทดสอบกับ whole cell protein ที่เตรียมจาก PAO200-2 (ตัวควบคุมบวก) และไม่ให้ bands ดังกล่าวต่อ whole cell protein จาก PAO200 (ตัวควบคุมลบ) โดยอัตราส่วนที่ใช้คือ 1:200 ซึ่งให้ background ค่อนข้างมากและมี cross-reactivity กับโปรตีนตัวอื่นๆ แต่ไม่รบกวน bands ของโปรตีนเป้าหมาย เพราะมีขนาดที่แตกต่างกันชัดเจน เมื่อใช้อัตราส่วน 1:400 ไม่สามารถมองเห็น bands ของโปรตีนเป้าหมาย และเมื่อใช้ในอัตราส่วน 1:100 ให้ background ที่เข้มมาก (ภาพที่ 14)

การทดสอบ cross reactivity ระหว่าง OprM OprN และ OprJ polyclonal antisera

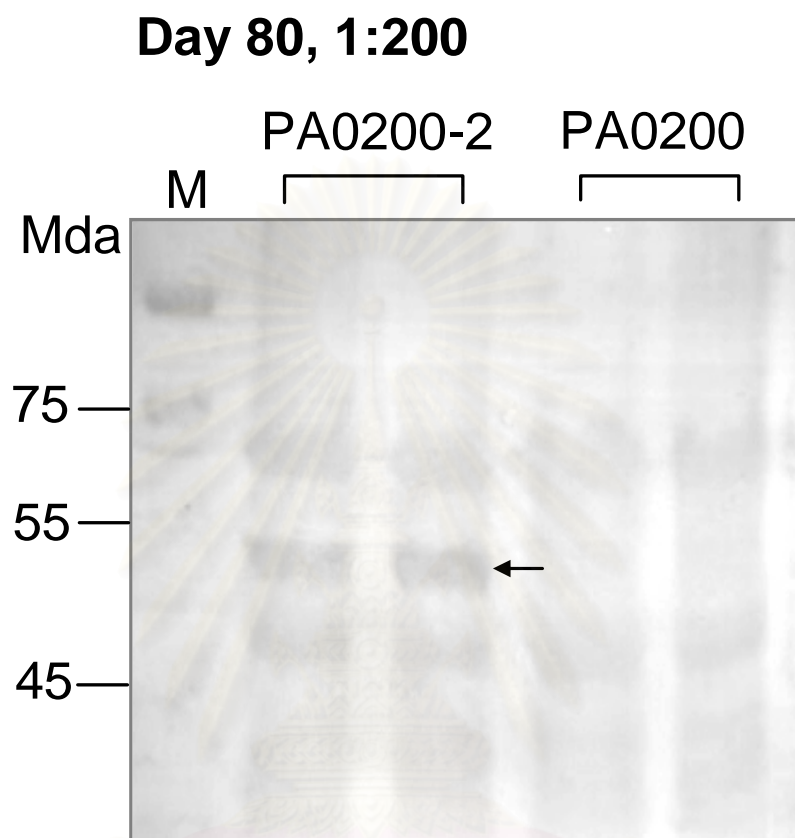
เมื่อเตรียม whole cell protein จาก OCR1 PAO200-2 และ PAO7H บนแผ่น blot เดียวกันและทดสอบด้วย OprM OprN และ OprJ polyclonal antisera พบว่า OprM polyclonal antisera ให้ band ที่มีขนาด ~ 54 Mda เฉพาะต่อโปรตีนที่เตรียมจาก OCR1 เท่านั้น ในทำนอง



ภาพที่ 12 การใช้ OprM polyclonal antisera เพื่อตรวจการแสดงออกของ OprM โดยทำ Western blot analysis ด้วยการแยก Whole cell protein ที่เตรียมจาก *P. aeruginosa* บน 0.1%SDS-10%PAGE และ electroblot ไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ทำการตรวจ OprM ด้วย OprM polyclonal antisera จาก **A** กระจาย M1 และ **B** กระจาย M2 ที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ ภาพแสดงเฉพาะวันและอัตราส่วนของซีรัมที่ให้ bands ของ OprM: ลูกศรชี้ตำแหน่งของ OprM: OCR1, มีการแสดงออกของ OprM แบบ overexpression; PAO200, ไม่มีการแสดงออกของ OprM

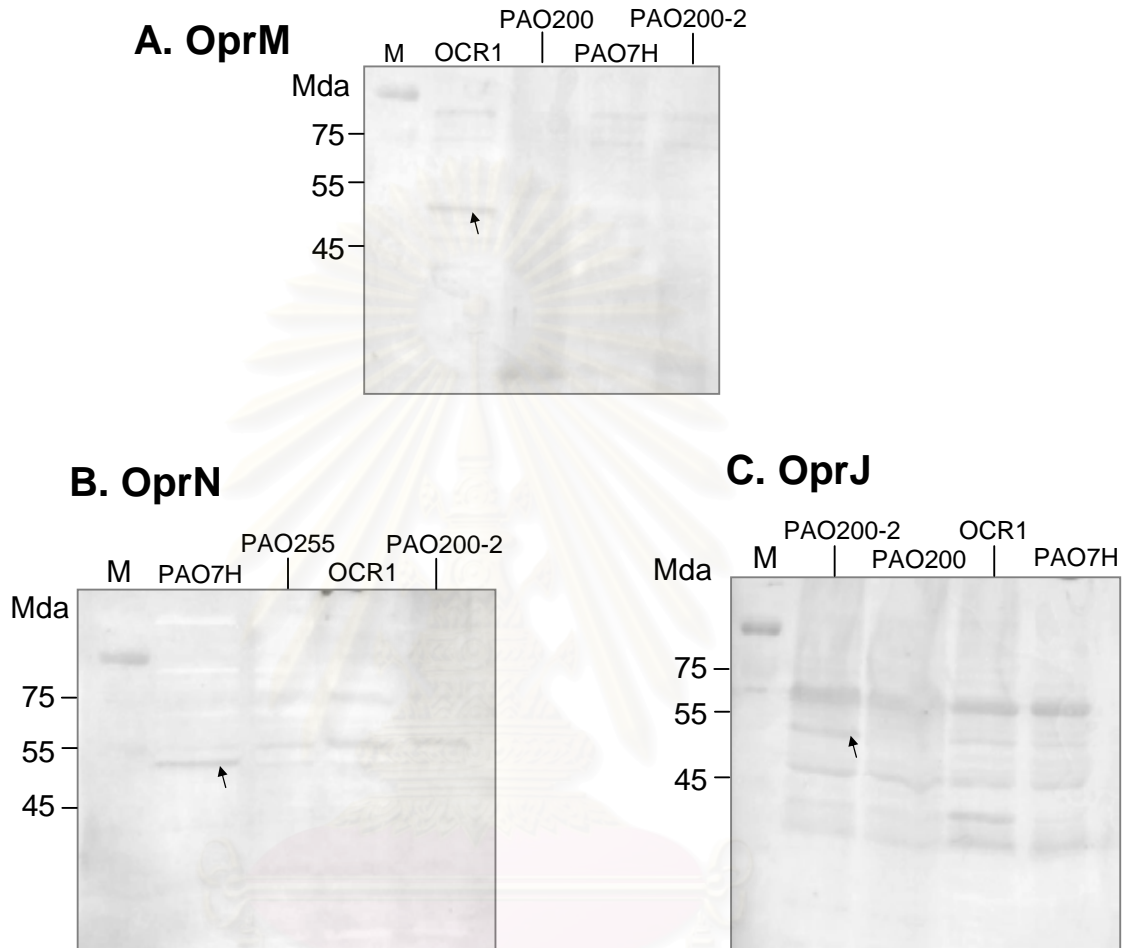


ภาพที่ 13 การใช้ OprN polyclonal antisera เพื่อตรวจการแสดงออกของ OprN โดยทำ Western blot analysis ด้วยการแยก Whole cell protein ที่เตรียมจาก *P. aeruginosa* บน 0.1%SDS-10%PAGE และ electroblot ไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ทำการตรวจ OprN ด้วย OprN polyclonal antisera จาก **A** กระจ่าย N1 และ **B** กระจ่าย N2 ที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ ภาพแสดงเฉพาะวันและอัตราส่วนของซีรัมที่ให้ bands ของ OprN: ลูกศรชี้ตำแหน่งของ OprN; PAO7H, มีการแสดงออกของ OprN แบบ overexpression; PAO7H1A, มีการแสดงออกของ OprN แบบ overexpression; PAO255, ไม่มีการแสดงออกของ OprN; PAO238, ไม่มีการแสดงออกของ OprN

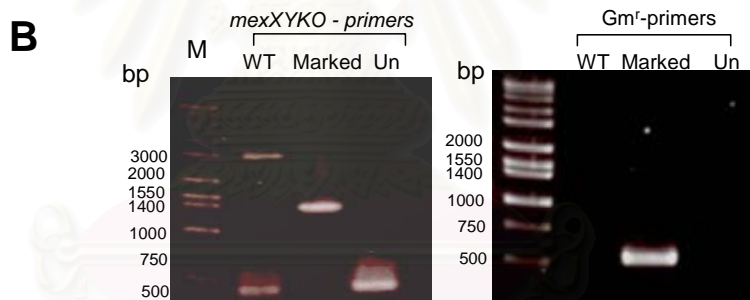
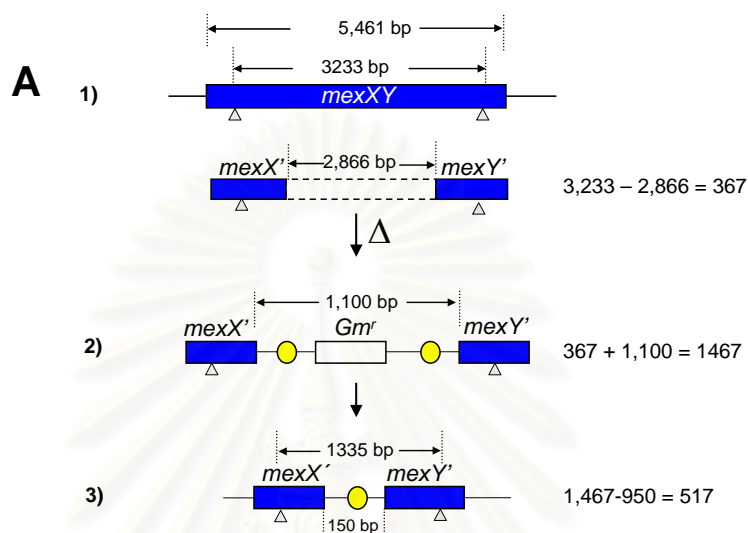


ภาพที่ 14 การใช้ OprJ polyclonal antisera เพื่อตรวจการแสดงออกของ OprJ โดยทำ Western blot analysis ด้วยการแยก Whole cell protein ที่เตรียมจาก *P. aeruginosa* บน 0.1%SDS-10%PAGE และ electroblot ไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ทำการตรวจ OprJ ด้วย OprJ polyclonal antisera ที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ โดย antisera จากวันที่ 80 ใช้ในอัตราส่วน 1:200 เท่านั้นที่ให้ bands: ลูกศรชี้ตำแหน่งของ OprM; PA0200-2, มีการแสดงออกของ OprJ แบบ overexpression; PA0200, ไม่มีการแสดงออกของ OprJ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 15 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ polyclonal antisera ด้วย Western blot analysis โดยแยก Whole cell protein ที่เตรียมจาก *P. aeruginosa* ที่ overexpress โปรตีน OprM, OprN และ OprJ และ null mutants บน 0.1%SDS-10%PAGE และ electroblot ไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ตรวจสอบการแสดงออกของ OMP โดยใช้ **A** OprM hyperimmune serum **B** OprN hyperimmune serum และ **C** OprJ hyperimmune serum ที่ อัตราส่วน 1:400: ลูกศรแสดงตำแหน่งของ OMP, M; Molecular weight marker



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงขนาดของ *mexXY* ระหว่างการทำ gene knockout ที่ยืนยันได้ด้วยเทคนิค PCR 1) *mexXY* มีขนาด 5,461 bp และ *mexXYKO*-up/down primers (Δ) จะ amplify ได้ PCR products ขนาด 3,233 bp เมื่อถูกตัดออก 2,866 bp จะเหลือ 367 bp 2) ส่วนที่ถูกตัดจะถูกแทนด้วย *Gm^r* cassette ขนาด 1,100 bp ได้ marked mutant ที่ให้ขนาด PCR products 1,467 bp 3) เมื่อ *Gm^r* cassette ถูกตัดออกจะมีส่วนเหลือ 150 bp ได้ unmarked mutant ที่ให้ขนาด PCR products 517 bp

B แสดงขนาดของ PCR products ที่ amplify ด้วย *mexXYKO*-up/down primers (ซ้าย) และ *Gm^r*-up/down primers (ขวา) ซึ่งเฉพาะ marked mutant เท่านั้นที่ให้ PCR products คำย่อ: WT = wild type, Un = unmarked mutant, Marked = marked mutant, M = Molecular weight marker, *Gm^r* = gentamycin resistance cassette

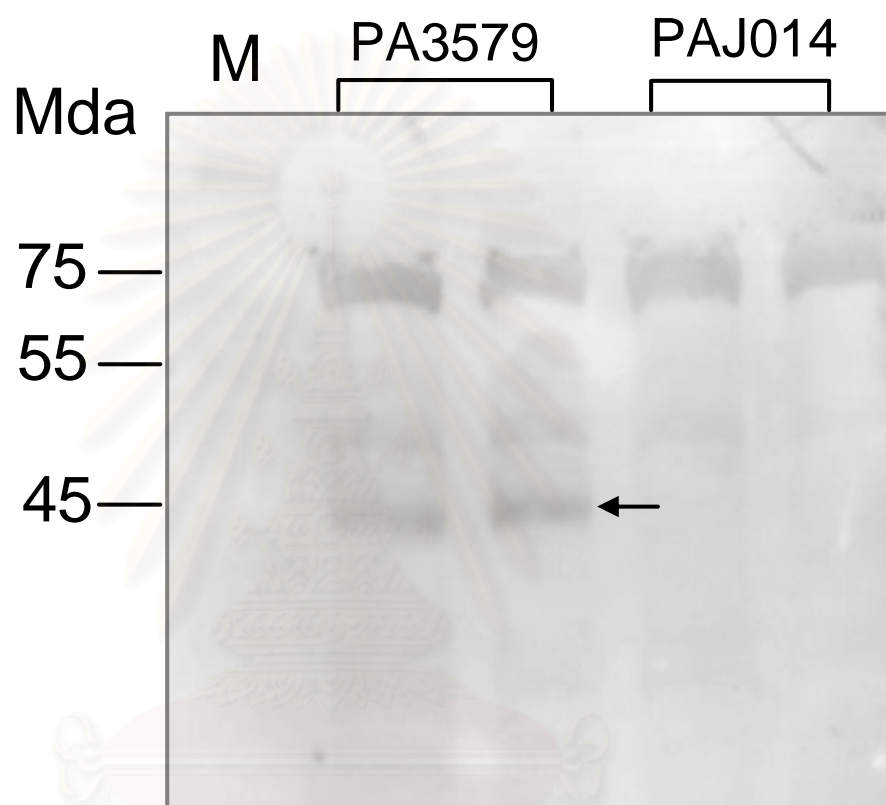
เดียวกัน OprN polyclonal antisera ให้ band เฉพาะต่อโปรตีนที่เตรียมจาก PAO7H เท่านั้น โดยไม่พบ cross reactivity ระหว่าง antibody ทั้ง 2 ส่วน OprJ polyclonal antisera ให้ bands ~53 Mda ต่อโปรตีนที่เตรียมจาก PAO200-2, PAO7H และ OCR1 แต่ไม่ให้ bands ดังกล่าวต่อโปรตีนที่เตรียมจาก PAO200 จึงอาจเป็น cross reactivity ก็ได้ (ภาพที่ 15)

การสร้าง PAJ014

PAJ014 ได้จากการตัด (delete) ยีน *mexXY* บนโครโมโซมของ PA3579 ด้วยเทคนิค Gene replacement และมี genotype เป็น $\Delta mexXY::FRT$ สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการเตรียมโปรตีนควบคุมลบ (MexX⁻) สำหรับการทดสอบการแสดงออกของ MexX ด้วย Anti-MexX โดย phenotype ของ PAJ014 คือ Gm^r Cb^r Suc^r จากการยืนยัน genotype ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ *mexXY*-KO up/down primers พบว่า *mexXY* ใน PA3579 ซึ่งเป็น WT มีขนาด 3,233 bp เมื่อถูกตัดออกและแทนที่ด้วย Gm^r-cassette (PAJ013) มีขนาด 1,467 bp และเมื่อตัด Gm^r-cassette (PAJ014) จะเหลือ 517 bp เมื่อยืนยันด้วย Gm-up/down primers เฉพาะ PAJ013 ซึ่งเป็น marked mutant เท่านั้นที่ให้ PCR products ขนาด ~500 bp แสดงว่า ยีน *mexXY* บนโครโมโซม PA3579 ได้ถูกตัดและ PAJ014 เป็น unmarked mutant ที่ไม่มี antibiotic resistance marker หลงเหลืออยู่ (ภาพที่ 17)

การทดสอบการแสดงออกของ MexX ด้วย MexX polyclonal antisera

สำหรับ MexX polyclonal antibody เมื่อใช้ในการทำ Western blot analysis ได้รับการแนะนำให้ใช้ที่อัตราส่วน 1:10,000 ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ Anti-MexX ในการตรวจการแสดงออกของ MexX ใน PA3579 ซึ่งมี overexpression ของ MexX เนื่องจากการกลายพันธุ์ของ *mexZ* ซึ่งเป็น repressor เป็นตัวควบคุมบวก และ PAJ014 ที่ไม่มีการแสดงออกของ MexXY เป็นตัวควบคุมลบ พบว่า ในสถานะที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ต้องใช้ Anti-MexX ในอัตราส่วน 1:1000 เพื่อให้สามารถเห็น bands ของ MexX ที่มีขนาด ~45 Mda ชัดเจนในโปรตีนที่เตรียมจาก PA3579 โดยไม่พบ bands ของ MexX ในโปรตีนที่เตรียมจาก PAJ014



ภาพที่17 การใช้ MexX polyclonal antisera เพื่อตรวจการแสดงออกของ MexX โดยทำ Western blot analysis ด้วยการแยก Whole cell protein ที่เตรียมจาก *P. aeruginosa* บน 0.1%SDS-10%PAGE และ electroblot ไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ทำการตรวจ MexX ด้วย MeX polyclonal antisera ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1,000: ลูกศรชี้ตำแหน่งของ MexX; PA3579, มีการแสดงออกของ MexX แบบ overexpression; PAJ014, ไม่มีการแสดงออกของ MexX

การอภิปรายผล

P. aeruginosa ตื้อยาหลายชนิดพร้อมกันโดยพันธุกรรมและสามารถพัฒนาการตื้อยาได้อีก ในระหว่างการรักษา ทำให้การรักษาการติดเชื้อนี้ด้วยยาปฏิชีวนะไม่มีประสิทธิภาพและล้มเหลวได้ โดยสาเหตุสำคัญมาจากการใช้สารต้านจุลชีพอย่างไม่ถูกต้อง รวมถึงการใช้เกินความจำเป็นและการใช้ข้อผิดพลาดวิธี ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เชื้อตื้อยาตัวใหม่ รวมทั้งการคัดเลือกและเพิ่มจำนวน เชื้อที่ตื้อยาอยู่แล้ว ในปัจจุบัน เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า กลไกสำคัญของการตื้อยาในเชื้อนี้ คือ ระบบ MEX ที่สามารถขับออกยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด โดยที่ยาเหล่านี้ไม่มีความสัมพันธ์ทางโครงสร้าง (Schweizer, 2003) ซึ่งเมื่อทำการ knockout ยีนระบบ MEX สามารถทำให้ *P. aeruginosa* ตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะได้อีก ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับระบบ MEX กัน อย่างกว้างขวาง โดยมุ่งไปที่กลไกการทำงานและการพัฒนาสารที่ออกฤทธิ์เป็น EPI เพื่อที่จะ นำมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะและสามารถทำให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะกลับมามีประสิทธิภาพอีกครั้ง ประเทศไทยมีสมุนไพรหลายชนิด บางชนิดสามารถใช้ได้ในคนและสัตว์ จึงมีความเป็นไปได้ที่ สารจากสมุนไพรเหล่านี้จะออกฤทธิ์เป็น EPI ดังนั้นการศึกษาระบบ MEX ใน *P. aeruginosa* ที่แยก ได้ในประเทศไทย โดยเฉพาะระบบที่มีความสำคัญทางคลินิกจะเป็นพื้นฐานสำหรับการวิจัยแนวลึก และเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการรักษาในอนาคต

การศึกษาการแสดงออกของระบบ MEX มีหลายวิธี วิธีที่ยืนยันการทำงานของระบบชัดเจน ที่สุดวิธีหนึ่ง คือ การตรวจการสร้างโปรตีน โดยที่ใช้ง่ายคือ การตรวจหาการแสดงออกของ OMP ด้วย Western blot analysis เพราะให้ผลที่เชื่อถือได้ มีความไวค่อนข้างสูง ทำได้ง่ายและเหมาะสมสำหรับตัวอย่างเชื้อจำนวนมาก โดยทั่วไป Western blot analysis มีความไวค่อนข้างสูงและมีข้อจำกัดน้อยเมื่อเทียบกับ immunodetection assay อื่นๆ (Harlow and Lane, 1988) โดย ประสิทธิภาพจะขึ้นกับคุณภาพของ antibody เป็นสำคัญ ซึ่งในการตรวจหาการแสดงออกของ OMP ต้องมีการพัฒนา antibody ที่จำเพาะต่อ OMP เหล่านี้ขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ โดย anti-OprM, anti-OprN และ anti-OprJ ใช้ในการตรวจการแสดงออกของ MexAB-OprM MexCD-OpJ และ MexEF-OprN ตามลำดับ การทดสอบการแสดงออกของยีน *omp* ซึ่งเป็นยีนตัวสุดท้ายบน operon และเป็นทางออกจากเซลล์ของยาปฏิชีวนะจะสามารถบอกได้ว่ามีการ transcription ที่มีจุดตั้งต้น จาก Promoter ที่ปลาย 5' ของยีนตัวแรกไปตลอดทั้ง operon นั้น (Schweizer, 2003) อย่างไรก็ตาม การผลิต antibody ต่อยีนอื่นๆบน efflux operon ก็ทำได้เช่นกันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษา ที่ผ่านมามีการผลิต antiserum ต่อยีน IMP และ MFP เช่น MexC และ MexD

(Gotoh, et al., 1998) MexA (Srikumar, et al., 1998) MexF (Aires, et al., 2002) ซึ่งในการผลิต antibody ต่อยีนอื่น ๆ บน efflux operon จะใช้เบปไตต์สังเคราะห์เป็นแอนติเจนเพราะการสกัดโปรตีนเหล่านี้ให้บริสุทธิ์จริงๆทำได้ยาก ในห้องปฏิบัติการของ Dr. Keith Poole (University of Calgary, Canada) ได้สกัดโปรตีนบริสุทธิ์ OprM-His₆ และใช้ในการผลิต hyperimmune serum ในกระต่าย ซึ่งได้ผลดีในช่วงแรก ต่อมาประสบปัญหาในการแยกโปรตีนบริสุทธิ์ได้น้อยลงและไม่สามารถกระตุ้นภูมิในกระต่ายได้ อาจมีสาเหตุมาจากความไม่คงตัวของ clone ที่มาจาก *P. aeruginosa* ที่อยู่ใน expression host ที่เป็น *E. coli* (Personnel communication)

การทำ Western blot analysis เป็นการตรวจการแสดงออกของโปรตีนที่เป็น denatured เพราะโปรตีนถูก break และแยกเป็น monomers ซึ่งโปรตีนสกัดสามารถใช้ในการผลิต antibody ได้ทั้งต่อ native และ denatured protein ขึ้นกับสภาวะของโปรตีน (conformation) ที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิ นอกจากการใช้ประโยชน์เป็นแอนติเจนแล้ว สามารถใช้โปรตีนสกัดในงานอื่นๆได้อีก เช่น การศึกษา function ของโปรตีนและการทำงานของระบบ MEX การทำ gel shift เป็นต้น ปัญหาสำคัญจากการใช้โปรตีนสกัดเป็น antigen คือ ความบริสุทธิ์ ซึ่งโปรตีนสกัดที่จะใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิจะต้องไม่มี bands ของโปรตีนปนเปื้อนที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เมื่อ run โปรตีนสกัด 10-20 μ g บน SDS-PAGE Gel และย้อมด้วย Coomassie blue (Harlow and Lane, 1988) ซึ่งโปรตีนสกัดที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้มี bands ของโปรตีนปนเปื้อนที่มองเห็นได้ชัดเจนและมีขนาดใหญ่กว่าโปรตีนเป้าหมาย (ภาพที่ 10) รวมทั้งปริมาณที่ได้ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิ ดังนั้นจึงใช้เบปไตต์สังเคราะห์เป็นแอนติเจนแทน ซึ่งเบปไตต์สังเคราะห์จะให้ antibody ที่มีความจำเพาะและ titer สูงกว่า ถ้าได้รับการออกแบบอย่างถูกต้อง โดย antibody ที่ได้จะ recognize เฉพาะ denatured protein และอาจไม่สามารถใช้กับ native protein ได้เลย จึงเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ใน Western blot analysis (Harlow and Lane, 1988) ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ co-injection เบปไตต์สังเคราะห์ 2 สายต่อโปรตีน 1 ชนิด เพื่อเพิ่มความเป็น immunogenicity โดยใช้ TiterMax GoldTM adjuvant ที่มีข้อดีคือ ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษ (hypersensitivity granulomatous response) ในสัตว์เพราะไม่มีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีน mineral oil polysaccharides และสารที่มาจากจุลชีพ รวมทั้งให้ antibody titer สูงโดยไม่ต้องกระตุ้นภูมิซ้ำ (booster) เพราะพื้นผิวของ copolymers สามารถจับ antigen ได้จำนวนมาก ซึ่งจะช่วยให้ antigen กระจายตัวได้ดีขึ้นและกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้มากขึ้น แต่ข้อเสียที่พบ คือ อาจทำให้เกิด arthus reaction ได้ง่าย ซึ่งแก้ไขได้โดยการแบ่งฉีดกระตุ้นภูมิหลายๆตำแหน่ง ถึงแม้ว่าการใช้เบปไตต์สังเคราะห์จะเป็นทางเลือกที่ดี แต่มีข้อจำกัดมากในการนำเบปไตต์สังเคราะห์ที่เหลืออยู่ไปใช้ประโยชน์อื่นๆ เมื่อ

เทียบกับโปรตีนสกัด สำหรับการทดลองครั้งนี้ ได้พยายามวัด titer ของ hyperimmuneserum ด้วย Enzyme Immunoabsorbance Assay (ELISA) แต่ผลที่ได้ไม่แน่นอน และไม่สามารถทดสอบซ้ำ ซึ่งพบว่าเนื่องมาจากเครื่อง ELISA reader ชำรุด จึงได้ทำการทดสอบคุณภาพของ hyperimmuneserum ด้วย Western blot analysis โดยใช้ antibody เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งเป็นเป้าหมายของการวิจัยอยู่แล้ว โดยพบว่า กระต่ายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเปปไทด์สังเคราะห์ที่จำเพาะต่อ OprM, OprN และ OprJ ไม่สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อ OprJ ที่ใช้เวลาถึง 80 วันจึงได้ hyperimmune serum ที่สามารถตรวจการแสดงออกของ OprJ ได้และให้ blots ที่มี background สูง อาจเป็นผลมาจาก hemolysis และมีเม็ดเลือดแดงปนอยู่ซึ่งมีปริมาณค่อนข้างมาก จากการศึกษาที่ผ่านมาการฉีดกระตุ้นภูมิโดยใช้ adjuvants ที่เป็น copolymers จะให้ antibody titer ที่ค่อนข้างสูง (Maeda, et al., 2002; Schwarzkopf and Thiele, 1996; Su, et al., 2006) แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่า hyperimmuneserum ที่ได้จากกระต่าย M1 และ M2 ในวันที่ 20, 40 และ 80 ไม่เพิ่มขึ้น ซึ่งทราบได้จากการที่อัตราส่วนในการเจือจางของ hyperimmuneserum ที่ใช้ยังเท่าเดิม (1:200 และ 1:400) เช่นเดียวกับในกระต่าย N1 และ N2 ซึ่งสาเหตุที่เป็นไปได้มีหลายประการ ได้แก่ การตอบสนองของกระต่ายเอง ประสิทธิภาพของการฉีดกระตุ้น การเตรียม emulsion สำหรับการฉีดกระตุ้น คุณภาพของเปปไทด์สังเคราะห์ เป็นต้น นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลอย่างยิ่ง คือ ความไวของ signal detection ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ chemogen ที่เป็น substrates ของเอ็นไซม์ horseradish peroxidase ทั้งนี้เพราะรวดเร็ว โดยสามารถเห็นตะกอนสีได้บนแผ่น blots ภายในระยะเวลาสั้น (ไม่เกิน 10 นาที) สะดวก ราคาไม่สูง ไม่ต้องการวัสดุสิ้นเปลืองและเครื่องมือราคาแพง เช่น แผ่นฟิล์ม X-ray และเครื่องล้างแผ่นฟิล์ม เป็นต้น แต่ตะกอนสีไม่คงทนและความไวในการตรวจไม่สูงนัก โดยเมื่อรอกจนเห็น bands ของโปรตีนเป้าหมายก็จะได้สีของ background ที่เข้มไปด้วย ทำให้ภาพโดยรวมของ blots ไม่ชัดเจน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง TMB และ 4-CN DAB พบว่า 4-CN DAB มีความไวมากกว่าและสีของ background ที่จางกว่า แต่ก็ยังมีผลต่อความคมชัดของ bands เป้าหมาย นอกจากนี้ ตะกอนสีเทาเข้มของ 4-CN DAB จะคงอยู่ได้ในเวลาที่สั้น (ไม่เกิน 15 นาที) ในการทดสอบการแสดงออกของ MexXY ตรวจการแสดงออกของ MexX เนื่องจากระบบนี้ไม่มี OMP ซึ่ง MexX Polyclonal antisera ที่ได้รับการอนุเคราะห์มานี้ผลิตจากการกระตุ้นภูมิในกระต่ายด้วยเปปไทด์สังเคราะห์เช่นกัน (Masuda, et al., 2000) ในการศึกษาครั้งนี้ต้องใช้ความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่แนะนำโดยผู้ผลิตถึง 10 เท่า ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก signal detection ที่ใช้ในครั้งนี้ยังไม่มีความไวเท่าที่ควรเช่นกัน

ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของ polyclonal antibody คือ การจับไม่จำเพาะกับโปรตีนอื่นๆ (non-specific binding) และการเกิด cross reactivity กับโปรตีนที่มีความใกล้เคียงกัน ดังนั้น การทดสอบการแสดงผลของ OMP ด้วย Western blot analysis ต้องมีตัวควบคุมที่ดีและ ที่ได้รับการยอมรับคือ โปรตีนที่เตรียมได้จาก *P. aeruginosa* ที่มี overexpression ของ OMP เป็นตัวควบคุมบวก และโปรตีนที่เตรียมได้จาก null mutants ซึ่งเป็น isogenic strain ของ *P. aeruginosa* นั้นๆ ที่ยีน *omp* ได้ถูก knockout เป็นตัวควบคุมลบ ซึ่งการใช้ null mutants เป็นการรับรองได้ว่าจะไม่มีการแสดงออกของยีน OMP ได้อีก การใช้ *P. aeruginosa* ที่มีหรือไม่มีแสดงออกของ OMP เนื่องจาก spontaneous mutation นั้นอาจมีปัญหากจากการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์หรือ reverse mutation ที่เกิดขึ้นได้ในระหว่างการทดลองภายหลัง ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการทดสอบกับตัวควบคุมบวกและลบที่เป็น isogenic strains ของกันและกัน คือ OCR1 กับ PAO200 PAO200-2 กับ PAO200 และ PAO7H กับ PAO255 สำหรับ OprM OprJ และ OprN ตามลำดับ รวมทั้งได้สร้าง PAJ014 ($\Delta mexXY::FRT$) ซึ่งเป็น isogenic strain ของ PA3579 ที่ยีน *mexXY* ทั้งระบบถูกตัดออกสามารถใช้เป็นตัวควบคุมลบที่มีประสิทธิภาพ เพราะไม่พบการแสดงออกของ MexX เลย วิธี gene replacement ที่ใช้ในการสร้าง PAJ014 นั้นเป็นเทคนิคที่ใช้กันแพร่หลายใน *P. aeruginosa* เพราะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง โดย null mutants ที่ได้จะไม่มี resistance markers หลงเหลืออยู่จึงใช้กันมากในการศึกษากลไกการดื้อยาในเชื้อชนิดนี้

OprM OprN และ OprJ เป็นโปรตีนในวงศ์ตระกูล the OprM family ซึ่งมีโปรตีนสมาชิกทั้งหมด 18 ชนิด มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน (~50-55 Mda) และเป็น OMP ในวงศ์ตระกูลเดียวที่เกี่ยวข้องกับระบบ MEX โดยเฉพาะ OprM ที่มีการศึกษาโครงสร้างผลึก (crystal structure) และพบว่าคล้ายกับ TolC ใน *E. coli* ที่เป็น a channel-forming protein (Koronakis, et al., 2000) ซึ่ง conserved sequence ที่พบ OMP ในวงศ์ตระกูลนี้ คือ LGGGW, E-DLFGR และ P-Y--P (Li and Poole, 2001) ในการวิจัยครั้งนี้ลำดับกรดอะมิโนที่ใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์ไม่ได้อยู่ใน conserved sequence จากผลการวิจัยพบว่า Anti-OprM ไม่เกิด cross reactivity กับ OprN และ OprJ แต่มีการจับแบบไม่จำเพาะกับโปรตีนอื่นๆ (non-specific bindings) สำหรับ Anti-OprN ไม่ให้ cross reactivity ต่อ OprM และ OprJ แต่ให้ bands ที่เป็น non-specific bindings ที่ชัดเจนและมีขนาดแตกต่างกันไม่มากทั้งใน PAO7H และ PAO255 ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถบอกได้ว่า non-specific bands นั้นเกิดจากโปรตีนชนิดใด สามารถแก้ไขปัญหานี้ได้ด้วยการใช้ตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบที่เป็น isogenic strains โดยระบุตำแหน่งของ OprN ในตัวควบคุมบวกและยีนอื่น

ความถูกต้องด้วยการไม่ปรากฏของโปรตีนชนิดนี้ในตัวควบคุมลบ อย่างไรก็ตาม non specific bindings ไม่รบกวนการอ่านผลการทดสอบหรือทำให้ไม่สามารถอ่านผลการทดสอบได้

OprJ polyclonal antisera เท่านั้นที่ให้ bands ขนาดใกล้เคียงกันมาก (~53 Mda) ทั้งใน PAO200-2, OCR1 และ PAO7H แต่ไม่ให้ bands นี้ใน PAO200 ดังนั้น bands ดังกล่าวจึงอาจเป็น cross reactivity ต่อ OprM และ OprN หรือไม่มีก็ได้ ซึ่งก่อนหน้านี้ เป็นที่ทราบกันดีว่า การแสดงออกของระบบ *mexCD-OprJ* จะเกิดขึ้น เมื่อมีการกลายพันธุ์ที่ยับ repressor เท่านั้น แต่ก็มีรายงานว่า การแสดงออกของระบบนี้เป็นแบบ inducible โดยที่ตัวเหนี่ยวนำเป็นยาฆ่าเชื้อและสารสี (dye) บางชนิด (Morita, et al., 2001; Morita, et al., 2003) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า bands ที่เกิดจาก OprJ polyclonal antisera ใน OCR1 และ PAO7H เป็น induced OprJ ที่เกิดจากสารที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งสามารถยืนยันได้ด้วยการสร้าง $\Delta oprJ$ null mutant จาก OCR1 และ PAO7H แล้วทำการพิสูจน์อีกครั้งด้วย Western blot analysis และกำจัด cross reactivity ด้วย protein absorption ถ้าจำเป็น

เป้าหมายของงานวิจัยครั้งนี้คือ เพื่อให้ได้ polyclonal antibody ต่อโปรตีนในระบบ MEX ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ ได้แก่ OprM OprN OprJ และ MexX และให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้ polyclonal antibody ในการตรวจการแสดงออกของระบบด้วย Western blot analysis ซึ่งจากการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยสามารถผลิต Hyperimmuneserum ต่อ OprM OprN และ OprJ โดยที่ OprM และ OprN Hyperimmuneserum สามารถนำไปใช้ในการทำ Western blot analysis ได้ โดยต้องมีตัวควบคุมบวกและลบเพื่อยืนยันผลการทดลอง แต่ OprJ ให้ background สูงและอาจให้ cross reactivity กับ OprM และ OprN ซึ่งควรที่จะทำการศึกษาเพื่อพิสูจน์ข้อสงสัยนี้ต่อไป อย่างไรก็ตาม ควรมีการสกัดเฉพาะ antibody (IgG) จาก Hyperimmuneserum ที่ได้ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นและความจำเพาะของ antibody รวมทั้งสามารถสร้าง $\Delta(mexXY)$ null mutant ที่ใช้เป็นตัวควบคุมลบทำให้สามารถตรวจการแสดงออกของ MexXY ด้วย MexX polyclonal antibody ที่ได้รับความอนุเคราะห์มานั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ควรเพิ่มประสิทธิภาพของ signal detection โดยใช้วิธี detection ที่มีความไวในการตรวจมากกว่านี้ จะช่วยให้ได้ภาพที่มี bands ชัดเจนและมี background น้อยลง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการเริ่มต้นศึกษาระบบ multidrug efflux systems ที่มีความสำคัญต่อการดื้อยาหลายชนิดใน *P. aeruginosa* แยกได้ในประเทศไทย คณะผู้วิจัยจะนำ hyperimmuneserum ที่ผลิตได้ไปเพิ่มความบริสุทธิ์เพื่อให้ได้ specific polyclonal antibody ที่มีคุณภาพดียิ่งขึ้นและนำไปทดสอบการแสดงออกของระบบ multidrug efflux systems ใน clinical isolates โดยคณะผู้วิจัยวางแผนการศึกษาต่อเนื่องที่รวมถึงการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับการแสดงออกและการแพร่กระจายของระบบ multidrug efflux pumps ของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย อิทธิพลของการใช้ยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในฟาร์มคลินิกและโรงพยาบาลต่อการดื้อยาปฏิชีวนะที่มีสาเหตุเชื่อมโยงมาจากระบบ multidrug efflux systems การพัฒนาเทคนิคการตรวจการแสดงออกของระบบที่ให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ และต้นทุนไม่สูง เพื่อมาใช้ประกอบการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* โดยเฉพาะใน รายที่มีการติดเชื้ออย่างเรื้อรังและมีปัญหาการดื้อยาหลายชนิด ทั้งนี้การยืนยันได้ว่า การแสดงออกของระบบเป็นสาเหตุของการดื้อยาในผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วยแต่ละราย และสามารถบอกได้ว่าเป็นระบบใดจะส่งผลให้สามารถแนะนำให้ใช้ยาที่ไม่เป็น substrates ของระบบนั้น ที่สำคัญก็คือ การใช้ efflux pump inhibitors (EPI) ร่วมในการรักษา ซึ่งขณะนี้ได้มีการพัฒนาการผลิต EPI เพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น อาจมีการนำมาใช้ในวงการแพทย์และสัตวแพทย์ในอนาคตดังนั้นการพัฒนาเทคนิคการตรวจดังกล่าว เป็นการเตรียมความพร้อมเพื่อพัฒนาการรักษาโรคติดเชื้อของวงการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทย และจะนำไปสู่การศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้สารสกัดจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการทำงานของระบบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

โดยสรุป ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สามารถผลิต OprM และ OprN polyclonal antiresrum ได้ และสามารถนำไปใช้ตรวจการแสดงออกของโปรตีน OprM และ OprN พร้อมกับการใช้เชื้อควบคุมที่มีและไม่มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง โดย antibody ทั้ง 2 มีความจำเพาะในระดับที่ยอมรับได้ ส่วน OprJ polyclonal antiresrum ที่ผลิตได้สามารถตรวจการแสดงออกของ OprJ ในเชื้อควบคุม แต่ยังคงปรับปรุงคุณภาพ รวมถึงการพิสูจน์ความจำเพาะ ในภาพรวมของการศึกษาครั้งนี้พบว่า การสร้าง antibody ในกระต่ายเกิดขึ้นช้าและ titer ไม่สูงมาก รวมทั้งมี background บน blots จึงมีข้อเสนอแนะสำหรับการแก้ไขและงานวิจัยในอนาคต ดังนี้

1. ทำการสกัดหรือทำให้ antibody บริสุทธิ์ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ antibody รวมทั้งกำจัด non-specific protein และสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ที่ทำให้เกิด background วิธีในการ purification มีหลายวิธี ได้แก่ การใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Purification of IgG fractions การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate การแยก fractions ด้วย gel filtration chromatography เป็นต้น

2. ในการฉีดกระตุ้นภูมิครั้งต่อไป ควรเพิ่มจำนวนตำแหน่งของการฉีด เพื่อให้มีการสร้างภูมิต่อแอนติเจนมากขึ้น ถึงแม้ว่า การใช้ TiterMaxTM adjuvant ไม่จำเป็นต้องมีการฉีดกระตุ้นซ้ำ แต่การฉีดซ้ำด้วยแอนติเจนที่ไม่ผสมกับ adjuvant อาจช่วยเพิ่มปริมาณ antibody ได้ (คำแนะนำของผู้ผลิต)

3. ในการวิจัยครั้งนี้ สกัดโปรตีนบริสุทธิ์ OprM-His₆, OprN-His₆ และ OprJ-His₆ จาก Expression host ที่เป็น *E. coli* ในขณะที่โปรตีนทั้ง 3 มาจาก *P. aeruginosa* ดังนั้นอาจขาด factors บางตัวที่จำเป็นต่อการผลิตโปรตีนในปริมาณมาก อาจแก้ไขได้โดยการ express โปรตีนเหล่านี้ใน *P. aeruginosa* ซึ่งต้องมีการ clone origin of replication ลงใน pJS004, pJS005 และ pJS006 เพื่อให้พลาสมิดเหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนในเชื้อชนิดนี้ได้ แต่อาจได้โปรตีนสกัดที่มีการเจือปนของโปรตีนอื่นๆที่มาจาก *P. aeruginosa* เอง ซึ่งอาจเป็น strong immunogen และส่งผลให้ได้ polyclonal antibody ที่มีความจำเพาะลดลงด้วย

4. เพิ่มความไวของการทำ signal detection ได้ด้วยการใช้ Chemiluminescence ซึ่งมีความต้องการ antibody ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าการใช้ chemogens ช่วยให้ได้ภาพที่สะอาดมากขึ้น แต่มีความจำเป็นต้องใช้แผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์และอุปกรณ์ในการล้างฟิล์ม รวมทั้งเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- เกรียงศักดิ์ สายชนู และเกรียงศักดิ์ พูนสุข (2522) การศึกษาชุกโอมอนาส แอร์รูจิโนซ่า รายงานผลการวิจัยทุนสมเด็จพะมหิตลธิเบศร อุดลยเดชวกรรม พระบรมราชชนก สมศักดิ์ โสเลขา 2544 Antimicrobial resistant bacteria: Epidemiology, mechanism and clinical management. รายงานการสัมมนาวิชาการโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ หน้า 56-59
- วชิระชัย วารินไหล ศิราม สุวรรณวิภาช ชัยยศ อินตะวัน วรา พานิชเกรียงไกร อินทิตรา กระทบมทอง ชัยยศ ธารรัตน์ และวารี นิยมธรรม 2542 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาหยอดหูสองตำรับในการรักษาภาวะหูชั้นนอกอักเสบจากเชื้อแบคทีเรียในสุนัข โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
- โอพาร ตันวีรพงษ์ศิริ ชัยวัฒน์ บุญแก้ววรรณ ชาญชัย พัฒนพิชัย อินทิตรา กระทบมทอง อรรวรรณ นวิภาพ อภิสัทธี ปรการรภมานันท์ สุวิทย์ กัมทรทิพย์และวารี นิยมธรรม 2542 การศึกษาชนิดและความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคช่องหูส่วนนอกอักเสบในสุนัข โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
- Aires, J. R., Peche, J. C., Van Delden, C. and Kohler, T. (2002). Amino acid residues essential for function of the MexF efflux pump protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2169-2173.
- Beinlich, K. L., Chuanchuen, R. and Schweizer, H. P. (2001). Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **198**, 129-134.
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R. and Schweizer, H. P. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 428-432.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C. T. and Schweizer, H. P. (2002). Rapid benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *BioTechniques* **33**, 761-763.
- Cutler, K. L. (2003). Gangrenous mastitis in dairy herds. *Vet. Rec.* **153**, 758-9.

- Daly, M., Power, E., Bjorkroth, J., Sheehan, P., O'Connell, A., Colgan, M., Korkeala, H. and Fanning, S. (1999). Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2723-9.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Tsuda, M., Okamoto, K., Nomura, A., Wada, T., Nakahashi, m. and Nishino, T. (1998). Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in *DmexA-mexB-oprM* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1938-1943.
- Guerin-Faubleee, V., Carret, G. and Houffschmitt, P. (2003). In vitro activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. *Vet. Rec.* **152**, 466-71.
- Hammer, A. S., Pedersen, K., Andersen, T. H., Jorgensen, J. C. and Dietz, H. H. (2003). Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mink by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* **94**, 237-43.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibody: A laboratory manual*. Cold Spring Harber Laboratory publications.
- Husain, F., Humbard, M. and Misra, R. (2004). Interaction between the TolC and AcrA proteins of a multidrug efflux system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 8533-6.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **90**, 23-28.
- Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N. and Wretling, B. (2000). Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 710-712.
- Koehler, T., Michea-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L. K. and Pechere, J. C. (1997). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **23**, 345-354.
- Koronakis, V., Li, J., Koronakis, E. and Stauffer, K. (1997). Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol. Microbiol.* **23**, 617-626.

- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**, 914-9.
- Las Heras, A., Dominguez, L., Lopez, I. and Fernandez-Garayzabal, J. F. (1999). Outbreak of acute ovine mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Vet. Rec.* **145**, 111-2.
- Li, X.-Z. and Poole, K. (2001). Mutational analysis of the OprM outer membrane component of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 12-27.
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C. and Plesiat, P. (2004). Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1797-802.
- Lomovskaya, O., Lee, A., Hoshino, K., Ishida, H., Mistry, A., Warren, M. S., Boyer, E., Chamberland, S. and Lee, V. J. (1999). Use of a genetic approach to evaluate the consequence of inactivation of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1340-1346.
- Lomovskaya, O. and Watkins, W. (2001). Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 225-236.
- Maeda, K., Yamashiro, T., Minoura, T., Fujioka, T., Nasu, M. and Nishizono, A. (2002). Evaluation of therapeutic efficacy of adjuvant *Helicobacter pylori* whole cell sonicate in mice with chronic *H. pylori* infection. *Microbiol. Immunol.* **46**, 613-20.
- Martin Barrasa, J. L., Lupiola Gomez, P., Gonzalez Lama, Z. and Tejedor Junco, M. T. (2000). Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health* **47**, 191-6.
- Masuda, N., Sagagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. and Nishino, T. (2000). Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2242-2246.
- Mazel, D. and Davies, J. (1999). Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol. Life Sci.* **56**, 742-754.

- Moellering, R. C., Jr. (1998). Antibiotic resistance: lessons for the future. *Clin. Infect. Dis.*, **Suppl. 1**, S135-S140.
- Morita, Y., Komori, Y., Mima, T., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. (2001). Construction of a series of mutants lacking all of the four major *mex* operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 139-143.
- Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T., Mizushima, T., Gotoh, N., Nishino, T. and Tsuchiya, T. (2003). Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 991-4.
- Nakae, T. (1997). Multiantibiotic resistance caused by active drug extrusion in *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Microbiologia.* **13**, 273-84.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382-388.
- Normand, E. H., Gibson, N. R., Reid, S. W., Carmichael, S. and Taylor, D. J. (2000). Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. *Prev. Vet. Med.* **46**, 267-78.
- Okazaki, T. and Hirai, K. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa nfxB* gene, conferring resistance to new quinolones. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**, 197-202.
- Petersen, A. D., Walker, R. D., Bowman, M. M., Schott, H. C., 2nd and Rosser, E. J., Jr. (2002). Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **38**, 407-13.
- Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 255-264.

- Putman, M., Van Ween, H. W. and Konings, W. N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 672-693.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning*, Third edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schwarzkopf, C. and Thiele, B. (1996). Effectivity of Alternative Adjuvants in Comparison to Freund's Complete Adjuvant. *Altex* **13**, 22-25.
- Schweizer, H. P. (1994). A method for construction of bacterial hosts for *lac*-based cloning and expression vectors: a complementation and regulated expression. *BioTechniques* **17**, 452-456.
- Schweizer, H. P. (1998). Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 394-398.
- Schweizer, H. P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 1-7.
- Schweizer, H. P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet. Mol. Res.* **2**, 48-62.
- Schweizer, H. P., Klassen, T. R. and Hoang, T. (1996). Improved methods for gene analysis and expression in *Pseudomonas*. in Nakazawa, T., Furukawa, K., Haas, D. and Silver, S. (Eds), *Molecular biology of Pseudomonads*, American Society for Microbiology Press, pp. 229-237.
- Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N. and Poole, K. (1998). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 65-71.
- Su, Z., Segura, M. and Stevenson, M. M. (2006). Reduced protective efficacy of a blood-stage malaria vaccine by concurrent nematode infection. *Infect. Immun.* **74**, 2138-44.

- Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O. and Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3133-41.
- Westbrock-Wadman, S., Sherman, D. R., Hickey, M. J., Coulter, S. N., Zhu, Y. Q., Warrener, P., Nguyen, L. Y., Shawar, R. M., Folger, K. R. and Stover, C. K. (1999). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2975-2983.
- Ziha-Zafiri, I., Llanes, C., Koehler, T., Pechere, J.-C. and Plesiat, P. (1999). In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 287-291.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. Dialysis buffer ประกอบด้วย

50 mM Tris HCl, pH 7.5

10% glycerol

2. GuMCAC0 ประกอบด้วย

6 M GuHCl

50 mM Tris HCl pH 8.0

ถ้าเป็น GuMCAC10, GuMCAC20 และ GuMCAC50 มี imidazole ที่ความเข้มข้น 10mM imidazole, 20mM imidazole และ 50mM imidazole ตามลำดับ

3. Phosphate buffered saline (PBS) pH. 7.5 ประกอบด้วย

80 mM Disodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na_2HPO_4)

20 mM Sodium dihydrogen orthophosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

100 mM Sodium chloride (NaCl)

4. PBS -T ประกอบด้วย

80 mM Disodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na_2HPO_4)

20 mM Sodium dihydrogen orthophosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

100 mM Sodium chloride (NaCl)

0.1% Tween20

5. Putts buffer ประกอบด้วย

10 mM Tris HCL pH 7.5

1% sarcosyl

100 NaH_2PO_4

8M urea

1% Triton X-100

6. 2× sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ประกอบด้วย

0.125 M Tris-HCl, pH 6.8

4% SDS

20% glycerol

5% β -mercaptoethanol

7. TG Salt ประกอบด้วย

75 mM CaCl_2 6mM MgCl_2

15% glycerol

8. 8UrMACA0 ประกอบด้วย

8 M urea

50 mM Tris HCl, pH 8.0

โดย 8UrMCAC50 และ 8UrMCAC500 จะมี imidazole ที่ความเข้มข้น 50mM และ 500mM ตามลำดับ

9. Vogel-Bonner Minimum medium (VBMM, pH7.0) ประกอบด้วย

$\text{Na}_3\text{Citrate}$	10 mM
Citric acid	10mM
K_2HPO_4	57mM
NaNH_4PO_4	17 mM
MgSO_4	1 mM
CaCl_2	0.1 mM

