

CLONING AND EXPRESSION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MAJOR OUTER MEMBRANE PORIN PROTEIN F (OprF) AND SPECIFIC POLYCLONAL ANTIBODY PRODUCTION

BENJAPORN BHUSRI 5336394 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHANWIT TRIBUDDHARAT, M.D., Ph.D.,
CHERTSAK DHIRAPUTRA, M.D., M.Sc., SOMPORN SRIFUENGFUNG, Ph.D.,
IYARIT THAIPISUTTIKUL, M.D., Ph.D.

ABSTRACT

Carbapenems are effective antibiotics for the treatment of infections caused by multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa*. However, resistance to these antibiotics, such as imipenem, has increased steadily in recent years. The major mechanism of imipenem resistance in *P. aeruginosa* is a loss of OprD protein on the outer membrane that usually forms specific channels for uptake of basic amino acids and imipenem into the cells. From OprD-mediated resistance, an OprD detection technique was developed for imipenem susceptibility testing. Species confirmation of the pathogen should be considered as an internal control of the immunological test, since this resistance mechanism may be shared also by other pseudomonads. In this study, a major outer membrane porin protein F (OprF) is interesting in view of its species specificity for *P. aeruginosa*. The whole *oprF* gene of *P. aeruginosa* PA10 clinical strain was cloned into pET-28b plasmid and expressed for a (His)₆-tagged OprF fusion protein in *E. coli* BL21. The fusion protein in form of an insoluble inclusion body was purified by HisTrap HP column chromatography, confirmed its identity by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, and prepared for specific polyclonal antibody production in a New Zealand White rabbit. The anti-OprF polyclonal antibody was used to determine the specificity in Western blot analysis, and it showed a specific band of OprF protein from wild type *P. aeruginosa* and 6 clinical isolates. It showed no cross-reaction in other *Pseudomonas* species, such as *P. alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. mendocina*, *P. putida*, *P. stutzeri*, and *P. syringae*. There was no specific banding pattern in *E. coli* ATCC 25922 and BL21. These results suggested that OprF protein may be used in characterization of *P. aeruginosa* at the species level.

KEY WORDS: OprD / OprF / (HIS)₆-TAGGED OprF / MALDI-TOF

86 pages

การโคลนนิ่งและการสร้าง MAJOR OUTER MEMBRANE PORIN PROTEIN F (OprF) ของเชื้อ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* และการผลิต POLYCLONAL ANTIBODY ที่จำเพาะ
CLONING AND EXPRESSION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MAJOR OUTER MEMBRANE
PORIN PROTEIN F (OprF) AND SPECIFIC POLYCLONAL ANTIBODY PRODUCTION

เบญจพร ภูศรี 5336394 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, M.D., Ph.D., เชิดศักดิ์ ชีระบุตร, M.D., M.Sc., สมพร ศรีเฟื่องฟู, Ph.D., ไอยฤทธิ์ ไทยพิสุทธิกุล, M.D., Ph.D.

บทคัดย่อ

ยาในกลุ่ม carbapenem นับเป็นยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสำหรับการรักษาการติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่คือยาหลายขนาน แต่ในปัจจุบันพบว่าเชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้เช่น ยา imipenem เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยกลไกหลักที่เชื้อใช้ในการดื้อยา imipenem คือ การสูญหายของโปรตีน OprD บนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ซึ่งปกติมีหน้าที่ในการนำกรดอะมิโนที่เป็นเบสเข้าสู่เซลล์และยังเป็นช่องทางสำหรับนำเข้ายา imipenem จากความรู้เรื่องการดื้อยาจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน OprD ได้มีการนำเทคนิคการตรวจหาโปรตีน OprD มาใช้กับชุดตรวจหาความไวต่อยา imipenem ของเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งในอนาคตจะมีการพัฒนาต่อไป แต่การพิสูจน์ยืนยันเชื้อ *P. aeruginosa* นับเป็นเรื่องสำคัญในแง่ของการเป็น internal control ของชุดทดสอบ เนื่องจากกลไกการดื้อยานี้อาจพบได้ในเชื้อ pseudomonads อื่นๆ ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาโปรตีน OprF ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนใหญ่บนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *P. aeruginosa* ในแง่ของความจำเพาะ เพื่อบอกว่าเชื้อที่ทดสอบเป็นเชื้อ *P. aeruginosa* หรือไม่ การทดลองเริ่มจากการนำยีน *oprF* ของเชื้อ *P. aeruginosa* PA10 เข้า pET-28b expression vector และทำให้เกิดการสร้าง (His)₆-tagged OprF ใน *E. coli* BL21 โปรตีนนี้อยู่ในรูป inclusion body และถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี HisTrap HP หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์โปรตีนเพื่อยืนยันโดย MALDI-TOF mass spectrometry ก่อนจะนำไปเตรียมเพื่อทำการผลิต polyclonal antibody จากกระต่าย ซึ่งแอนติบอดีที่ได้จะมีความจำเพาะต่อโปรตีน OprF ในการวิเคราะห์หาความจำเพาะของโปรตีน OprF ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ใช้วิธีวิเคราะห์โดย Western blot ซึ่งผลการทดลองพบว่า โปรตีน OprF มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ไม่พบ cross-reaction กับเชื้อ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่น ได้แก่ *P. alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. mendocina*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. syringae* และไม่พบว่ามีผลจำเพาะต่อโปรตีนจาก *E. coli* BL21 และ *E. coli* ATCC 25922.