A GREEN FLUORESCENT PROTEIN MICROPLATE ASSAY (GFPMA) FOR SCREENING OF ANTIMYCOBACTERIAL COMPOUNDS

CHARTCHAI CHANGSEN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

(MICROBIOLOGY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2004

ISBN 974-04-4272-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การตรวจกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยวิธี GFP MICROPLATE ASSAY (A GREEN FLUORESCENT PROTEIN MICROPLATE ASSAY, GFPMA, FOR SCREENING OF ANTIMYCOBACTERIAL COMPOUNDS)

ชาติชาย แจ้งเสน 4037875 SCMI/D

ปร.ด. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : น.พ. ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์, M.D. , วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D. , Scott G. Franzblau, Ph.D. , มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D. , สารดี วาฤทธิ์, Ph.D.

บทคัดย่อ

โปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) เป็นโมเลกุลตัวรายงานชนิดหนึ่งที่ช่วยในการศึกษาการมีชีวิตอยู่ของเซลล์และการทดสอบอื่นๆที่ใช้การเรืองแสงของเซลล์เป็นหลัก เนื่องจาก GFP มีคุณสมบัติในการเรืองแสงอัตโนมัติโดยไม่ต้องจำเป็นต้องเติมสารตั้งต้นใดๆ ซึ่งถือว่าเป็นข้อได้เปรียบกว่าวิธีทดสอบที่ใช้ตัวรายงานชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดที่สำคัญของการใช้ GFP เป็นตัวรายงานในการทดสอบแบบ *in vitro* หรือการทดสอบการเรืองแสงของเซลล์เป็นหลัก คือโมเลกุลทางชีวภาพบางชนิดสามารถเรืองแสงได้ตามธรรมชาติ (auto-fluorescence) ซึ่งมีผลทำให้ความไวของการตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ของ GFP ลดลง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบสร้างดีเอ็นเอพาหะใหม่ที่มีชื่อว่า pFPCA1 ซึ่งการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์ GFP ถูกควบคุมโดยดีเอ็นเอของยีน acetamidase ที่ได้จากเชื้อ *M. smegmatis* สายพันธุ์ mc^2155 ที่ต่อมาได้นำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Ra และ *M. smegmatis* สายพันธุ์ mc^2155 เพื่อวิเคราะห์หาค่าฟลูออเรสเซนต์ การวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry พบว่าเชื้อ *M. smegmatis* ที่มี pFPCA1 ให้ค่าการเรืองแสงมากกว่าประมาณ 9 เท่า เมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่มี pFPV2 ซึ่งการแสดงออกของยีนที่สร้าง GFP ถูกควบคุมด้วยยีน *hsp60* ที่ได้มาจากเชื้อ *M. bovis* BCG เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี acetamide ในขณะที่ *M. tuberculosis* ที่มี pFPCA1 เรืองแสงมากกว่าสายพันธุ์เดียวกันที่มี pFPV2 ประมาณ 8 เท่า โดยไม่จำเป็นต้องเติม acetamide ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เมื่อใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนต์อื่นๆ เช่น microfluorometry และ epifluorescence microscopy ก็ให้ผลทดสอบที่สอดคล้องกัน นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าฟลูออเรสเซนต์จากเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ต่างๆ เช่น H37Ra, H37Rv และ Erdman ที่มี pFPCA1 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 7H12G (โดยพิจารณาจากค่าความสัมพันธ์แบบ Pearson's product-moment correlation coefficient; r) พบว่าค่าฟลูออเรสเซนต์ที่ได้มีความสอดคล้องอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญเติบโตของเชื้อในด้านการประยุกต์ใช้งาน GFP สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาการตรวจกรองสารยับยั้งเชื้อวัณโรค ซึ่งในช่วงแรกๆนั้นมักจะใช้เชื้อวัณโรคสายพันธุ์ที่มี pFPV2 ซึ่งมีการควบคุมการแสดงออกของยีนที่สร้าง GFP โดยดีเอ็นเอส่วนควบคุมของยีน *hsp60* ซึ่งพบว่ามีข้อจำกัดที่สำคัญคือค่าฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ต่ำเกินไป เนื่องจากมีสัดส่วนระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ต่อสัญญาณรบกวนน้อยมาก เพราะฉะนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์หลัก คือการทดสอบความสามารถในการสร้าง GFP ของดีเอ็นเอพาหะ pFPCA1 ที่มีดีเอ็นเอส่วนควบคุมเป็นของยีน acetamidase โดยการทดสอบวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ที่มี pFPCA1 ในถาดหลุม (GFP Microplate Assay or GFPMA) รวมถึงการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองของเชื้อดังกล่าวต่อยาต้านเชื้อจุลชีพ โดยเปรียบเทียบค่าฟลูออเรสเซนต์ที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ ผลการวิจัยพบว่าเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ต่างๆ (H37Rv, H37Ra และ Erdman) ที่มี pFPCA1 มีค่าฟลูออเรสเซนต์ในระดับที่สูงกว่าเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่มี pFPV2 ซึ่งพบว่าสัดส่วนสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ต่อสัญญาณรบกวนของเชื้อกลุ่มที่มี pFPCA1 มีค่าตั้งแต่ 20.6 ถึง 27.8 ในขณะที่เชื้อที่มี pFPV2 มีค่าตั้งแต่ 3.8 ถึง 4.5 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นของยาที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคได้ไม่น้อยกว่า 90% ($MIC_{90\%}$) ของยาต้านเชื้อจุลชีพ จำนวน 18 ชนิด พบว่าวิธี GFPMA ที่ใช้เชื้อวัณโรคที่มี pFPCA1 ให้ผลทดสอบที่ใกล้เคียงเช่นเดียวกับวิธีการทดสอบอ้างอิง Microplate Alamar Blue Assay (MABA) ซึ่งค่า MIC ที่ได้จากทั้งสองวิธีมีค่าสัมพันธ์ตั้งแต่ 89.6% ถึง 93.8% โดยไม่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ด้วยวิธี MABA พบว่าค่า MIC ที่ได้จากการใช้เชื้อวัณโรคสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ไม่มีดีเอ็นเอพาหะ pFPCA1 และเชื้อวัณโรคสายพันธุ์เดียวกันที่มี pFPCA1 ให้ค่าสัมพันธ์ตั้งแต่ 88.2% ถึง 97.1% ดังนั้นวิธี GFPMA ที่พัฒนาขึ้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงจัดได้ว่าเป็นวิธีวัดการเจริญเติบโตเชื้อด้วยฟลูออเรสเซนต์ในถาดหลุม ด้วยการใช้เชื้อวัณโรคสายพันธุ์ดัดแปลงที่มีความสามารถในการสร้าง GFP จนมีคุณสมบัติที่ดีเพียงพอที่จะนำไปใช้จริงในห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับการตรวจกรองสารต่อต้านเชื้อวัณโรค เนื่องจากเป็นวิธีทดสอบที่สะดวก รวดเร็ว ราคาถูก ทั้งยังมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจกรองสารตัวอย่างจำนวนมากในเวลาเดียวกัน

293 หน้า ISBN 974-04-4272-2

A GREEN FLUORESCENT PROTEIN MICROPLATE ASSAY (GFPMA) FOR SCREENING OF ANTIMYCOBACTERIAL COMPOUNDS.

CHARTCHAI CHANGSEN 4037875 SCMI/D

Ph.D. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS : PRASIT PALITTAPONGARNPIM, M.D., VITHAYA MEEVOOTISOM, Ph.D., SCOTT G. FRANZBLAU, Ph.D., MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D., SARADEE WARIT, Ph.D.

ABSTRACT

Green Fluorescent Protein (GFP) has become established as a convenient reporter for cell viability and other cell-based fluorescence assays, since its autofluorescence without addition of any substrates offers an advantage over other reporter assays. However, one of the limitations of using GFP as a reporter gene *in vitro* or in the cell-based fluorescence assay is the presence of naturally fluorescent molecules that can reduce the sensitivity of GFP detection. Plasmid pFPCA1, containing a red-shifted *gfp* gene driven by the acetamidase promoter (P*ace*) of *Mycobacterium smegmatis* mc^2155, was constructed and transformed into *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra and *M. smegmatis* mc^2155. By using flow cytometric analysis, GFP-mediated fluorescence of *M. smegmatis* containing pFPCA1 showed approximately 9-fold more fluorescence than the strain bearing pFPV2, containing the *gfp* gene and *hsp60* promoter upon cultivation in an acetamide-containing condition. While *M. tuberculosis* harboring the pFPCA1 fluoresced above 8-fold stronger than the strain bearing pFPV2, regardless of the presence of acetamide. Similar observations were also given by using microfluorometry and epifluorescence microscopy. After transformation of pFPCA1 into *M. tuberculosis* strains, it was shown that fluorescence curves of *M. tuberculosis* strains H37Rv, H37Ra, and Erdman harboring pFPCA1 correlated well to growth curves of corresponding strains as determined by a high Pearson's product-moment correlation coefficient between fluorescence and colony forming unit (cfu).

In terms of applications like high throughput antimicrobial drug screening, the green fluorescent protein (GFP) gene also offers many advantages. Previously, screening for antituberculosis compounds using GFP driven by the heat shock promoter (P*hsp60*), pFPV2, has been of limited utility due to the low signal to noise ratio. Therefore an improved promoter was evaluated for enhanced fluorescence during microplate-based culture and for response to 18 established antimicrobial agents using a Green Fluorescent Protein Microplate Assay (GFPMA).

M. tuberculosis strains H37Rv, H37Ra and Erdman containing pFPCA1 achieved higher levels of fluorescence than those carrying pFPV2 with signal:noise ratios of 20.6-27.8 and 3.8-4.5, respectively. The MICs of 18 established antimicrobial agents against all strains carrying pFPCA1 in the GFPMA were within 1 to 2 two-fold dilutions of those determined by either fluorometric or visual Microplate Alamar Blue Assay (MABA). Overall, good correlations between MIC results that determined by GFPMA and by MABA methods were observed (from 89.6% to 93.8%). No significant differences in MICs were observed between *M. tuberculosis* wild type and pFPCA1 transformants in MABA. Also, MIC results by MABA methods also revealed excellent correlation between wild type and *gfp* strains (from 88.2% to 97.1%). Thus, this optimized GFP microplate assay is sufficiently simple, robust and inexpensive to be utilized in routine high throughput screening for anti-tuberculosis compounds.

KEY WORDS : GREEN FLUORESCENT PROTEIN / TUBERCULOSIS / DRUG SCREENING / ACETAMIDASE PROMOTER

293 P. ISBN 974-04-4272-2