Thesis Title Production and Evaluation of Recombinant Antigens for Detection of Specific Antibodies Against *Penicillium marneffei* in AIDS Patients

Author Ms. Jutarat Praparattanapan

Degree Master of Science (Health Sciences)

Thesis Advisory Committee

	Prof. Dr. Thira Sirisanthana	Chairperson
	Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom	Member
	Dr. Amornrat Kanjanahaluethai	Member

ABSTRACT

Penicillium marneffei (P. marneffei) is a thermal dimorphic pathogenic fungus that grows as mold form at 25 °C and yeast-like form at 37 °C. It causes disseminated disease, penicilliosis marneffei in immunocompromised patients, especially among acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. Diagnosis of *P. marneffei* infection patients by fungal culture is rather time-consuming that would dalay the treatment. Some diagnostic tests such as immunodiffusion, indirect immunofluorescent antibody test, and latex agglutination test have been developed. However, the specificity of these tests is low. Although, an enzyme-linked immunosorbent assay has been developed by using a recombinant protein as an antigen, the rabbit anti-recombinant protein antibody could not react specifically with the protein antigens of *P. marneffei* Thai isolates. In this study, the unknown gene, *P6* cDNA and *P23* cDNA encoding putative 30-kDa heat shock protein of *P. marneffei* Thai isolate strain F4 were selected and used for generation of recombinant proteins. These two recombinant proteins were produced by using glutathione S-transferase (GST) fusion expression system in *Escherichia coli* and purified by affinity

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

chromatography. The purified recombinant proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot assays. SDS-PAGE analysis showed a high level expression of the recombinant proteins. The SDS-PAGE analysis of the GST-P6p showed the protein bands of 58, 34-32 kDa, and of 53-kDa for the GST-P23p. The Western blot assay of the GST-P6p fusion protein with antiserum from a rabbit immunized with *P. marneffei* cytoplasmic antigens and 2 out of 10 cases of AIDS patients infected with *P. marneffei* showed positive reactions (20%). The Western blot assay of the GST-P23p fusion protein with antisera from other 2 cases of AIDS patients infected with *P. marneffei* showed positive reactions (20%). Reactivities of antisera from the rabbit immunized with *Cryptococcus neoformans* or *Histoplasma capsulatum* to the GST-P6p or GST-P23p fusion protein showed negative results. Surprisingly, the GST-P23p fusion protein did not react with antisera from the rabbits immunized with *P. marneffei.* The results of this study revealed that the recombinant proteins which were expressed from two cDNA clones of *P. marneffei*, *P6* and *P23* could react to specific antibody in some serum samples derived from the AIDS patients infected with *P. marneffei.* The combining of these two recombinant antigens would increase the positive reactivity to be 40%. The recombinant proteins produced in this study may be used to develop the test for detection of *P. marneffei* infection. To increase the sensitivity of the test is to combine these two recombinant antigens with the other specific one. However, a large number of serum samples from *P. marneffei*-infected patients have to be tested and the specificity of both recombinant antigenic proteins requires extensive investigation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและการประเมินรีคอมบิแนนท์แอนติเจนสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อราเพนนิซิเลียมมาร์เนฟฟีไอในผู้ป่วยเอดส์

ผู้เขียน นางสาวจุฑารัตน์ ประภารัตนะพันธุ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สุขภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ.	ธีระ	ศิริสันธนะ	ประธานกรรมการ
ศ.ดร.	นงนุช	วณิตย์ธนาคม	กรรมการ
ดร.	อมรรัตน์	กาญจนหฤทัย	กรรมการ

บทคัดย่อ

เชื้อ *Penicillium marneffei* (*P. marneffei*) เป็นราก่อโรคมีสองรูปคือ รูปราสาย (mold-form) ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและรูปส่า (yeast-like form) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรค penicilliosis marneffei ชนิดแพร่กระจายในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะอย่างยิ่งมักพบในผู้ป่วยโรคเอดส์ การตรวจวินิจฉัยโรคอาศัยวิธีการทางห้องปฏิบัติการโดยการเพาะเลี้ยงแยกเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลานานทำให้การเริ่มการรักษาช้า มีการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคหลายวิธีเช่นวิธี immunodiffusion, latex agglutination test และ indirect immunofluorescent antibody test โดยใช้โปรตีนที่ผลิตจากตัวเชื้อเพื่อทดสอบหาแอนติบอดีในซีรั่มผู้ป่วยแต่วิธีการตรวจวินิจฉัยนี้ยังมีความจำเพาะต่ำ แม้ว่าวิธีการ enzyme-linked immunosorbent assay จะถูกพัฒนาขึ้นมาโดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อ *P. marneffei* แต่ anti-recombinant protein antibody ที่สร้างจากกระต่ายไม่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับโปรตีนจากตัวเชื้อ *P. marneffei* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนไทย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยใช้ cDNA ซึ่งสร้างมาจากเชื้อ *P. marneffei* F4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยไทยคือ *P6* cDNA ซึ่งเป็นยีนส์ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ และ *P23* cDNA ซึ่งเป็นยีนส์ที่กำหนดการสร้าง 30-kDa heat shock protein วิธีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใช้ระบบ Glutathione S-transferase (GST) fusion ซึ่งสามารถสร้างโปรตีนปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มากได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* รีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography และรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แยกได้ถูกนำไปประเมินคุณสมบัติโดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และวิธี Western blot ผลการทดสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระดับสูง น้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-P6p มีขนาด 58, 34-32 kDa ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-P23p มีขนาด 53-kDa การทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จะเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองตัวโดยวิธี Western blot พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-P6p สามารถทำปฏิกิริยาให้ผลบวกกับซีรั่มที่ได้จากกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. marneffei* และผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. marneffei* จำนวน 2 รายจากจำนวนผู้ป่วย 10 ราย (คิดเป็นร้อยละ 20) การทดสอบโดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-P23p สามารถทำปฏิกิริยาให้ผลบวกกับซีรั่มที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. marneffei* เพิ่มอีกจำนวน 2 ราย (คิดเป็นร้อยละ 20) ส่วนผลการทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-P6p และ GST-P23p โดยวีธี Western blot ในซีรั่มที่ได้จากกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Cryptococcus neoformans* หรือ *Histoplasma capsulatum* พบว่าให้ผลเป็นลบ ในขณะที่ผลการทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-P23p ในซีรั่มที่ได้จากกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. marneffei* พบว่าให้ผลเป็นลบ จากผลที่ได้แสดงว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตขึ้นมาน่าจะเกิดปฏิกิริยาได้กับแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรั่มของผู้ป่วยเอดส์บางรายที่ติดเชื้อ *P. marneffei* ถ้านำรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองชนิดที่ผลิตขึ้นมารวมกันน่าจะสามารถเพิ่มการเกิดผลบวกของปฏิกิริยาได้เป็นร้อยละ 40 การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคนี้สามารถทำได้โดยการนำไปใช้ร่วมกันและใช้ร่วมกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. marneffei* ที่สามารถผลิตขึ้นมาซึ่งสามารถเพิ่มความไวของการทดสอบให้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการทดสอบกับซีรั่มของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. marneffei* จำนวนมากขึ้นและศึกษาเพิ่มเติมถึงความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved