Thesis Title Purification and Characterization of Highly Immunogenic Protein Antigens from *Penicillium marneffei*

Author Ms. Walla Poolsri

M.S. Microbiology

Examining Committee:

Assoc. Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Parimondh Khanjanasthiti	Member
Assoc. Prof. Dr. Nopporn Sittisombut	Member
Assoc. Prof. Dr. Khuanchai Supparatpinyo	Member

ABSTRACT

Penicillium marneffei is a dimorphic pathogenic fungus that can cause disseminated and progressive disease. The disease is one of the most common infections in AIDS patients in endemic area, which is Southeast Asia and China, especially in northern Thailand; in the latter it is the third common infection after tuberculosis and cryptococcosis. The exact route of infection in humans is not known, but it is assumed that infection is acquired by inhalation of the conidia. Previous studies using gel electrophoresis and immunoblot assays demonstrated the presence of humoral immune responses to this fungus in sera from 33 AIDS patients with culture-confirmed penicilliosis marneffei. Four major immunogenic proteins of 200, 88, 54 and 50 kDa were produced in large quantities from *P. marneffei* yeast-form during the deceleration and early stationary phases of growth. Immunoreactivity of these proteins was detected in 72.7, 93.9, 60.6 and 57.6% of patients, respectively. The bands of 88, 54 and 50 kDa gave strong reactions with half of serum samples. The present study has confirmed this work by using the same method. The culture filtrate protein antigens were prepared from the yeast phase of *P. marneffei* 391H and 302BM. Their antigenicity was tested by immunoblot assay with pooled sera of 10 AIDS patients infected with *P. marneffei.* It was found that the 88 and 50 kDa proteins were highly immunogenic and were secreted in large amounts into the culture filtrate of

P. marneffei (yeast-form). Both antigens were isolated and purified by using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. The 88 kDa protein was isolated as a single band in fractions 160-210 by using Prep-cell preparative gel electrophoresis. However, after these fractions were pooled and concentrated by using ultrafiltration and a centricon device, the sample was contaminated with some lower molecular mass proteins. The 50 kDa protein was isolated as a single band by using Mini-Protean II preparative gel electrophoresis following with Coomassie brilliant blue staining, band excision and electro-elution. Two-dimensional gel electrophoresis was used to determine whether these antigens were single or multiple proteins. The proteins were separated according to isoelectric points in the first dimension and according to molecular weight in the second dimension. The results revealed that the 88 and 50 kDa proteins had isoelectric point values of approximately $\leq$ 4.5 to 5.6 and $\leq$ 4.5 to 5.1, respectively; the data did not indicate whether they were single or multiple proteins. These separated proteins were then transferred onto nitrocellulose membrane to study their antigenicity and concanavalin A and wheat germ agglutinin binding properties. The results indicated that both antigens were glycoproteins. The 88 kDa antigen has higher affinity for concanavalin A than the 50 kDa antigen. They were characterized as mannoproteins. Both antigens did not bind wheat germ agglutinin.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนแอนติเจนที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ตอบสนองได้สูง จากเชื้อ เพนนิซิเลี่ยม มาเนฟฟิไอ

ชื่อผู้เขียน นางสาววัลลา พูลศรี

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์:

รศ.ดร. นงนุช	วณิตย์ธนาคม	ประธานกรรมการ
รศ.ดร. ปริมณฑ์	กาญจนัษฐิติ	กรรมการ
รศ.นพ. นพพร	สิทธิสมบัติ	กรรมการ
รศ.นพ. ขวัญชัย	ศุภรัตน์ภิญโญ	กรรมการ

บทคัดย่อ

เชื้อ *Penicillium marneffei* เป็นราสองรูปก่อโรคติดเชื้อแบบแพร่กระจาย แหล่งระบาดของโรคอยู่บริเวณแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประเทศจีน โรคนี้พบมากในผู้ป่วยโรคเอดส์ โดยเฉพาะบริเวณภาคเหนือของประเทศไทยพบมากเป็นอันดับสามรองลงมาจาก วัณโรค และโรคติดเชื้อรา cryptococcosis การติดเชื้อในคนยังไม่ทราบแน่ชัดว่าติดได้โดยทางใดแต่คาดว่าอาจเกิดจากการสูดหายใจเอาสปอร์ของเชื้อเข้าไป มีการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยวิธี gel electrophoresis และ immunoblot assays แสดงให้เห็นว่าในซีรั่มผู้ป่วยโรคเอดส์ร่วมกับ penicilliosis marneffei จำนวน 33 ราย มีการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อแอนติเจนของเชื้อรานี้ โดยตรวจพบโปรตีนแอนติเจนที่สำคัญ 4 ขนาดคือ 200, 88, 54 และ 50 กิโลดัลตัน ซึ่งเชื้อรูปยีสต์สร้างเป็นจำนวนมากในช่วงอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดจนถึงระยะต้นของการเจริญคงที่ จำนวนที่พบคือ 72.7, 93.9, 60.6 และ 57.6% ตามลำดับ ซีรั่มผู้ป่วยประมาณครึ่งหนึ่งทำปฏิกิริยาได้แรงกับโปรตีนขนาด 88, 54 และ 50 กิโลดัลตัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจยืนยันผลการทดลองเดิมอีกครั้งด้วยวิธีเดียวกัน โดยเตรียมโปรตีนแอนติเจนจากเชื้อรารูปยีสต์ของ *P. marneffei* 2 isolates คือ 391H และ 302BM ทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนแอนติเจนกับแอนติบอดีในซีรั่มรวมของคนไข้โรคเอดส์ 10 รายซึ่งติดเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาเนฟฟิไอ ด้วยวิธี immunoblot โปรตีนแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยาได้แรงกับแอนติบอดีในซีรั่มผู้ป่วย และเชื้อสร้างได้จำนวนมากอยู่ที่ขนาด 88 และ 50 กิโลดัลตัน โปรตีนทั้งสองขนาดถูกแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วย

วิธี preparative polyacrylamide gel electrophoresis โปรตีน 88 กิโลดัลตันถูกแยกออกมาเป็นแถบเดียวในหลอดที่ 160-210 ด้วยวิธี Prep-cell preparative gel electrophoresis แต่หลังจากเทสารละลายรวมกัน และทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration และ centricon พบว่าโปรตีนที่ได้มีการปนเปื้อนด้วยโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็กบ้าง โปรตีน 50 กิโลดัลตันถูกแยกให้เป็นแถบเดียวด้วยวิธี Mini-Protean II preparative gel electrophoresis ร่วมกับการย้อมสี Coomassie brilliant blue ตัดเจล และไล่โปรตีนออกจากเจลด้วยกระแสไฟฟ้า โปรตีนทั้งสองขนาดถูกนำไปทดสอบว่าเป็นโปรตีนชนิดเดียวหรือประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ด้วยวิธี two-dimensional gel electrophoresis หลักการคือโปรตีนจะถูกแยกตามค่า isoelectric points ในขั้นตอนแรก และจะถูกแยกตามน้ำหนักโมเลกุลในขั้นตอนที่สอง ผลการทดลองพบว่า โปรตีนขนาด 88 และ 50 กิโลดัลตัน มีค่า isoelectric point อยู่ระหว่าง $\leq$ 4.5 ถึง 5.6 และ $\leq$ 4.5 ถึง 5.1 ตามลำดับ โดยที่ไม่สามารถระบุได้ว่าโปรตีนเหล่านี้เป็นชนิดเดียว หรือประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด จากนั้นโปรตีนเหล่านี้จะถูกถ่ายจากเจลไปบน nitrocellulose membrane เพื่อศึกษาคุณสมบัติ การทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรั่มผู้ป่วย คุณสมบัติการเป็นไกลโคโปรตีน คุณสมบัติการจับกับ concanavalin A และ wheat germ agglutinin ผลการทดลองพบว่าแอนติเจนทั้งสองขนาดเป็นไกลโคโปรตีน แอนติเจน 88 กิโลดัลตันจับกับ concanavalin A ได้แรงกว่าแอนติเจน 50 กิโลดัลตัน แอนติเจนทั้งสองจัดเป็น mannoproteins และไม่จับกับ wheat germ agglutinin.