## ABSTRACT

---

**Project Code:** TRG5680050

**Project Title:** Production of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Recombinant Protein from *Penicillium marneffei*, a Cell Surface Protein Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells

**Investigator:** Dr. Sophit Khanthawong

**E-mail Address:** sophitth@hotmail.com

**Project Period:** 2 years (June 3, 2013-June 2, 2015)

*Talaromyces* (*Penicillium*) *marneffei* is a thermal dimorphic fungus that can cause a fatal disseminated disease in human immunodeficiency virus-infected patients. The routes of infection and factors that affect the pathogenicity of this fungus remain unclear. The previous studies demonstrated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as an adherence factor in *T. marneffei* during early phase of infection and superoxide dismutase has been shown to contribute to the virulence of many human pathogenic fungi through its ability to neutralize toxic levels of reactive oxygen species generated by the host. In this study, recombinant GAPDH and Cu, Zn superoxide dismutase (Cu, Zn SOD) of *T. marneffei* were produced in a eukaryotic expression system, *Pichia pastoris*. The full-length *gpdA* and *sodA* gene of *T. marneffei* was amplified from cDNA clones using specific primers with restriction enzyme sequences. Then the amplified fragments of *gpdA* and *sodA* were cloned into pPICzA

and pPICzαB plasmid, respectively then transformed into TOP10 *E. coli* competent cells. The fusion plasmids were purified and linearized with *Mss*I restriction enzyme. They were subsequently transformed into *P. pastoris* X-33 competent yeast cells by electroporation and the positive clones were then checked with PCR and sequencing. The selected clone was cultured and induced for recombinant protein expression. After purification of rGAPDH, proteins of approximately 34 and 37 kDa were detected by Coomassie blue stained gel. Only 37-kDa rGAPDH was his-tag detected by using Western blot analysis. rGAPDH was purified by using Ni-NTA reducing condition to remove the protein contamination. The selected *sodA* positive clone was cultured and induced for recombinant protein expression. An apparent molecular mass of about 20 kDa secreted protein was detected for poly-histidine tag by Western blot with Ni-NTA. The Cu, Zn SOD was purified and an enzymatic activity was determined in non-denaturing gel. We have successfully cloned and produced GAPDH and Cu, Zn SOD recombinant protein of *T. marneffei* in a yeast expression system. These proteins will be further characterized for immunogenic properties and antioxidant properties of Cu, Zn SOD recombinant protein.

**Keywords;** *Talaromyces* (*Penicillium*) *marneffei*, *Pichia pastoris*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Cu, Zn superoxide dismutase, recombinant protein

# บทคัดย่อ

---

**รหัสโครงการ:** TRG5680050

**ชื่อโครงการ:** การสร้างโปรตีนลูกผสม Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase จากเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ โปรตีนส่วนนอกที่เชื้อใช้ในการเกาะติดกับองค์ประกอบนอกผิวเซลล์และยึดติดเซลล์

**ชื่อนักวิจัย:** ดร. โศภิศ คันธวงศ์

**E-mail Address:** sophitth@hotmail.com

**ระยะเวลาโครงการ:** 2 ปี (3 มิถุนายน 2556 ถึง 2 มิถุนายน 2558)

ทาลาโรไมซีส หรือชื่อเดิมเพนนิซีเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอเป็นเชื้อราสองรูปที่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ สำหรับการติดเชื้อและปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่า glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase หรือ GAPDH มีบทบาทในการเกาะติดของเชื้อในระยะแรกของการติดเชื้อ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ superoxide dismutase ซึ่งมีการศึกษาว่าเป็นปัจจัยหนึ่งในการก่อโรคในเชื้อก่อโรคหลายๆ ชนิด โดยหน้าจะทำหน้าที่ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเพื่อกำจัดเชื้อ ในการศึกษานี้ ได้ทำการผลิตโปรตีนลูกผสม 2 ชนิด คือ GAPDH และ Cu, Zn SOD จากเชื้อ *T. marneffei* ในระบบของยีสต์ *Pichia pastors* การทดลองเริ่มจากใช้ยีน *gpdA* และ *soda* ของเชื้อ *T. marneffei* จาก cDNA clones โดยใช้ primers ที่ติดปลายทั้งสองของมีลำดับของเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นจะทำการโคลนยีนที่ได้เข้าสู่ vector pPICZA และ pPICZαB ตามลำดับและนำเข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 หลังจากนั้นทำการแยกพลาสมิดแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mss*I เพื่อให้เป็นเส้นตรงก่อนจะนำเข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X-33 โดยวิธี electroporation จากนั้นคัดเลือกโคลนที่ต้องการและตรวจสอบโดยวิธี PCR และการหาลำดับเบส เมื่อได้โคลนที่ต้องการแล้วก็จะมีการกระตุ้นการสร้างโปรตีนโดยเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมและทำการสกัดแยกเอาโปรตีนที่สนใจออกมา เมื่อทำการตรวจสอบ พบว่าโปรตีนลูกผสม GAPDH ที่แยกได้มีขนาด 34 และ 37 kDa แต่พบว่าจะมีเฉพาะโปรตีนขนาด 37 kDa เท่านั้นที่มี his-tag ซึ่งตรวจสอบโดยวิธี Western blot จึงได้ทำการแยกโปรตีนลูกผสมออกจากโปรตีนอื่นเพื่อให้ได้โปรตีนที่สุทธิ์ สำหรับโปรตีนลูกผสม SOD พบว่ามีขนาดประมาณ 20 kDa

และเมื่อทำการแยกให้บริสุทธิ์และตรวจสอบพบว่ามีคุณสมบัติของเอนไซม์ SOD ใน non-denaturing gel ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้สร้างโปรตีนลูกผสม GAPDH และ Cu, Zn SOD ของเชื้อทาลาโรไมซีส มาร์เนฟฟิไอ ในระบบของยีสต์ ซึ่งการศึกษาต่อไปคือการศึกษาถึงคุณสมบัติของโปรตีนที่ผลิตได้นี้ในด้านการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระของ Cu, Zn SOD

**คำหลัก** : ทาลาโรไมซีส (เพนนิซีเลี่ยม) มาร์เนฟฟิไอ, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Cu, Zn superoxide dismutase, โปรตีนลูกผสม