EXPRESSION OF LEPTOSPIRAL RECOMBINANT PROTEIN FOR SERODIAGNOSIS

PIYANART CHALAYON 4936025 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: THAREERAT KALAMBAHETI, Ph.D., PARON DEKUMYOY, Ph.D., AKANITT JITTMITTRAPHAP, M.Sc.

ABSTRACT

Currently, the diagnosis of leptospirosis is entirely dependent on laboratory assay. The microscopic agglutination test (MAT) is still the standard reference test, although it requires the maintenance of a leptospiral culture panel, which is not generally available in the routine diagnostic laboratory. Outer membrane lipoproteins are important antigens, based on their surface exposure and their accessibility to infection-related immune recognition. LipL32, LipL41, and Loa22 were selected for cloning and expression as antigen. PCR fragments derived from genes encoded LipL32, LipL41, and Loa22 were cloned into a pRSET-B vector having the six histidine fusion tag at the N-terminal, and expressed in the *E. coli* expression system. The recombinant proteins were purified via Nikle affinity column. The molecular weights of the purified rLipL32, rLipL41, and rLoa 22 proteins, were 35, 27, and 27 kDa, respectively. These three purified recombinant proteins were preliminarily reacted with MAT-positive sera in Western blot; only rLipL32 could react with leptospirosis sera, while rLipL41 and Loa22 could not. Mice were immunized with each recombinant protein, to induce antibody production. The mouse antiserum of each purified recombinant protein reacted with the whole-cell lysate of some selected leptospiral serovars at the expected molecular weight, determined in the available leptospiral genome. This implied the presence of a common epitope between natural and recombinant antigens. The recombinant proteins were investigated for their application in ELISA-based serodiagnosis, compared with the reference MAT assay, by detection of IgM and IgG in the sera of MAT-positive leptospirosis patients, in addition to MAT-negative suspected leptospirosis cases and a control group of normal individuals, patients with other febrile illnesses (e.g. scrub typhus, dengue fever, melioidosis). Recombinant LipL32 yielded the highest specificity (89%), compared with rLipL41 and rLoa22. It was able to differentiate MAT-positive cases from melioidosis patients, and a low percentage of positive cases were recognized in normal individuals. In suspected, MAT-negative leptospirosis cases, rLipL32 could detect serological positive, up to 43%.

KEY WORDS: LEPTOSPIROSIS/ RECOMBINANT OUTER MEMBRANE PROTEIN/ ELISA/ IgG/ IgM

147 pages

การผลิตโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค
EXPRESSION OF LEPTOSPIRAL RECOMBINANT PROTEIN FOR SERODIAGNOSIS

ปิยะนาถ ชลายน 4936025 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ธารีรัตน์ กะลัมพะเหติ, Ph.D. (Microbiology),
พารณ ดีคำย้อย Ph.D.(Tropical Medicine), อกนิษฐ์ จิตต์มิตรภาพ M.Sc.(Tropical Medicine)

บทคัดย่อ

กระบวนการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซีสต้องอาศัยวิธีการทางห้องปฏิบัติการ การตรวจโดยวิธี MAT เป็นวิธีมาตรฐาน แม้ว่าจะไม่สามารถตรวจได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากต้องเพาะเลี้ยงเชื้อ โปรตีนบนผิวเซลล์ของเชื้อเลปโตสไปโรซีสมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ดี จึงเป็นแอนติเจนที่สำคัญเนื่องจากมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ โปรตีน LipL32, LipL41 และ Loa22 เป็นแอนติเจนซึ่งถูกเลือกมาศึกษา และถูกโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pRSET-B รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้เพิ่มจำนวนในเชื้อ *E. coli* และทำให้บริสุทธ์โดยใช้ Nikle affinity column รีคอมบิแนนท์โปรตีน LipL32, LipL41 และ Loa 22 มีขนาด 35, 27 และ 27 kDa ตามลำดับ รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสามชนิดถูกนำมาทดลองเบื้องต้นโดยการทำปฏิกิริยากับซีรั่มที่มีผล MAT เป็นบวกโดยวิธี Western blot พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน LipL32 เท่านั้นที่มีปฏิกิริยา รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสามได้ถูกนำมาฉีดหนูเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ซีรั่มหนูที่ได้สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อเลปโตสไปราบางสายพันธุ์ ซึ่งทำให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสามชนิดมีคุณสมบัติเหมือนกับเชื้อเลปโตสไปรา รีคอมบิแนนท์โปรตีนถูกนำมาทดสอบในการตรวจหา IgM และ IgG ด้วยวิธี ELISA เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ MAT โดยใช้ซีรั่มคนไข้ที่มีผล MAT เป็นบวก ซีรั่มที่จากคนที่สงสัยว่าเป็นเลปโตสไปโลซีสแต่ผล MAT เป็นลบ ซีรั่มคนปกติ และซีรั่มของคนไข้กลุ่มโรค febrile illness เช่น Scrub typhus, ไข้เลือดออก และ Melioidosis รีคอมบิแนนท์โปรตีน LipL32 เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อโรคเลปโตสไปโรซีศสูงที่สุด คือ 89 เปอร์เซ็นต์และสามารถวินิจฉัยแยกโรคเลปโตสไปโรซีสจากโรค Melioidosis ในขณะที่มีเปอร์เซนต์ต่ำในกลุ่มซีรั่มคนปกติ ส่วนกลุ่มคนที่เป็นเลปโตสไปโลซีสแต่ผล MAT เป็นลบ รีคอมบิแนนท์โปรตีน LipL32 สามารถตรวจพบว่าเป็นโรคได้ถึง 43 เปอร์เซ็นต์

147 หน้า