



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัคซีนและชุดตรวจในกลุ่มแอนไซม์ย่อยสลาย

โปรตีนสำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ opisthorchiasis

viverrini ในหนูทดลอง

Developments of the vaccines and diagnosis

using protease enzymes for opisthorchiasis

viverrini in mice model

ผศ.ดร.พรอนันต์ เกื้อไข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๒๓๔๗๒
สัญญาเลขที่ ๑๗/๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัคซีนและชุดตรวจในกลุ่มแอนไซม์ย่อยสลาย
โปรตีนสำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ *opisthorchiasis*
viverrini ในหนูทดลอง

Developments of the vaccines and diagnosis
using protease enzymes for *opisthorchiasis*
viverrini in mice model

ผศ.ดร.พรอนันต์ เกื้อไข

สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๖๒

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปี
งบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 17/2562

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University
through National Research Council of Thailand (Grant no. 17/2562).

บทคัดย่อ

พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* และ *Opisthorchis viverrini* มีการระบาดมากในภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยพยาธิใบไม้ตับทั้ง 2 ชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินน้ำดีและตับ สามารถพบได้ทั้งในสัตว์และมนุษย์ เช่น กุ้งน้ำจืดอีกเสบ นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีอีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปฏิกิริยาข้ามของซีรัมกระต่ายที่ติดเชื้อ *F. gigantica* กับ *O. viverrini* ด้วยวิธี ELISA พบว่ามีค่า OD = 0.805 วิธี Western blotting พบการแสดงออกของโปรตีนขนาด 72-95 kDa และ Immunohistochemistry staining พบว่า antibody ของกระต่ายที่ติดเชื้อ *F. gigantica* มีการย้อมติดบริเวณเยื่อบุทางเดินอาหาร ไช้ และอวัยวะของ *O. viverrini* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเกิด cross reaction ระหว่าง antibody ของกระต่ายที่ติดเชื้อ *F. gigantica* ต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* นอกจากนี้พบว่า แอนติบอดีต่อ FgES สามารถทำปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันกับเนื้อเยื่อของ *O. viverrini* อย่างจำเพาะที่บริเวณ gut, eggs, ovum และ uterus ของพยาธิซึ่งสามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า โปรตีน excretory secretory จาก *F. Gigantica* นอกจากนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน SOD ในพยาธิ *O. viverrini* ระยะตัวเต็มวัย ด้วยแอนติบอดีต่อ *Fasciola gigantica* cytosolic SOD (FgSOD) โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blotting และ Immunohistochemistry พบว่า มีค่า O.D. เท่ากับ 0.733 และแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17.5 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของโปรตีน SOD นอกจากนี้มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อพยาธิที่บริเวณอวัยวะ และอวัยวะ จึงสรุปได้ว่าแอนติบอดีต่อ FgSOD สามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน SOD ในพยาธิ *O. viverrini* จากการศึกษาพบว่ามีโอกาสพัฒนาเป็นวัคซีนหรือชุดตรวจโรคเพื่อใช้ในการวินิจฉัยได้ในอนาคต และจากการสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของ OvCatF และ OvLAP ด้วยวิธี PCR พบว่ายีน OvCatF และ OvLAP มีความใกล้เคียงกับพยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis* หลังจากนั้นได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนในแบคทีเรีย (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) พบว่าจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE รีคอมบิแนนท์โปรตีน OvCatF และ OvLAP มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 และ 61 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และได้นำโปรตีนที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA affinity และในงานวิจัยนี้จะนำไปศึกษาคุณลักษณะและพัฒนาเป็นวัคซีนและการวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ต่อไป

Abstract

Liver fluke *Fasciola gigantica* and *Opisthorchis viverrini* are one of the most common parasitic infections in the northeast region of Thailand. Both types of liver fluke cause diseases in the biliary tract and liver in both animals and humans. There are also relationship with bile duct cancer (colangiocarcinoma). There are currently no vaccine used to prevent liver fluke infections. Therefore, the objective of this research is to study the cross reaction of serum rabbits infected with *F. gigantica* and *O. viverrini* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method; OD = 0.805. Western blotting method showed 72-95 kDa protein expression. Immunohistochemistry staining found that the antibodies of rabbits infected with *F. gigantica* were stained on the lining of the digestive tract, eggs and testes of *O. viverrini*. Therefore, it was concluded that this result showed a cross reaction between the antibodies of rabbits infected *F. gigantica* and *O. viverrini*. In addition, it was found that antibodies against FgES were able to interact with the specific tissues of *O. viverrini* at the gut, eggs, ovum and uterus of the parasite. The expression of SOD protein in adult *O. viverrini* with antibodies against *F. gigantica* cytosolic SOD (FgSOD) by ELISA, western blotting and immunohistochemistry were found to have an OD value of 0.733 and the antibodies were specific to proteins with a molecular weight of approximately 17.5 kDa which corresponds to the size of the SOD protein. Therefore, it can be concluded that antibodies against rFgSOD can interact with the SOD protein in *O. viverrini*. From this study, it is possible to develop a vaccine or diagnostic kit for opisthorchiasis and fasciolosis diagnosis. On the other hand, OvCatF and OvLAP were cloned and characterized by using PCR, the OvCatF and OvLAP genes are similar to the liver fluke *Clonorchis sinensis*. After that, the protein (rOvCatF and rOvLAP) were expressed in bacteria (*Escherichia coli*) BL21 (DE3), found that after analysis by using SDS-PAGE, recombinant proteins OvCatF and OvLAP have molecular weight of 35 and 61 kDa, respectively. rOvLAP and rOvCatF were purified by Ni-NTA affinity, the results showed purified rOvCatF and rOvLAP at 35 and 61 kDa, respectively. In this research, rOvCatF and rOvLAP will be characterized for vaccines and diagnosis development for *O. viverrini* infection.

Keywords : *Opisthorchis viverrini*, cathepsinF, *Fasciola gigantica*, leucine aminopeptidase, cross reaction

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทนำ	1
เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	3
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
เนื้อเรื่อง	5
รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัย	14
สรุปผลการวิจัย	45
อภิปรายและวิจารณ์	46
ผลผลิต	47
รายงานการเงิน	48
บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก	51

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ <i>O. viverrini</i>	2
รูปที่ 2 ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA	11
รูปที่ 3 แสดงชุดตรวจแบบ ICS	12
รูปที่ 4 ผลการทำ colony PCR ของยีน OvCatF	14
รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ของ OvCatF กับ CatF ในสิ่งมีชีวิตอื่น	20
รูปที่ 6 แสดง time course expression ของโปรตีน rOvCatF	21
รูปที่ 7 แสดง determination of target protein solubility ของโปรตีน rFOvCatF	22
รูปที่ 8 แสดง SDS-PAGE ของ elute fraction จากการทำให้โปรตีน rOvCatF ให้บริสุทธิ์	23
รูปที่ 9 แสดง SDS-PAGE ของ elute fraction จากการทำให้โปรตีน rOvCatF ให้บริสุทธิ์	24
รูปที่ 10 แสดง SDS-PAGE ของ โปรตีน rOvCatF ที่บริสุทธิ์	25
รูปที่ 11 ผลการทำ colony PCR ของยีน OvLAP	26
รูปที่ 12 แสดงความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน LAP	33
รูปที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ของ OvLAP กับ LAP ในสิ่งมีชีวิตอื่น	34
รูปที่ 14 แสดง time course expression ของโปรตีน rOvLAP	35
รูปที่ 15 แสดง SDS-PAGE ของ โปรตีน rOvLAP ที่บริสุทธิ์	36
รูปที่ 16 แสดงผล cross-reaction ของ anti- FgSOD กับ โปรตีน SOD	37
รูปที่ 17 แสดงการแสดงออกของโปรตีน SOD ในพยาธิระยะตัวเต็มวัย	38
รูปที่ 18 แสดงการแสดงออกของโปรตีน <i>O. viverrini</i> ด้วยวิธี ELISA	39
รูปที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีน ES โดยวิธี western blot	40
รูปที่ 20 แสดงการแสดงออกของโปรตีน ES ในเนื้อเยื่อพยาธิ <i>O. Viverrini</i> บริเวณ bladder	41
รูปที่ 21 แสดงการแสดงออกของโปรตีน ES ในเนื้อเยื่อพยาธิ <i>O. Viverrini</i> บริเวณ gut	41
รูปที่ 22 แสดงการแสดงออกของโปรตีน ES ในเนื้อเยื่อพยาธิ <i>O. viverrini</i> ที่บริเวณ eggs	42
รูปที่ 23 การแสดงออกของ Rabbit infected resum (IRS) ด้วยวิธี ELISA	42
รูปที่ 24 แสดงการวิเคราะห์ western blotting ของโปรตีน IRS ที่ทำปฏิกิริยากับ <i>O. viverrini</i>	43
รูปที่ 25 แสดงบริเวณการเกิด cross reaction ของ IRS ในตัวเต็มวัยของ <i>O. viverrini</i>	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

CatF	Cathepsin F
SOD	Superoxide dismutase
LAP	Leucine aminopeptidase
Ov	<i>Opisthoechis voverrini</i>
r	recombinant
Fg	<i>Fasciola gigantica</i>
IRS	Rabbit infected serum
AD	Adult
ES	Excretion-secretion
TA	Tegumental antigen
cDNA	Complementary DNA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
AP	alkaline phosphatase
NBT/BCIP	nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indodyl phosphate
PoAb	Polyclonal antibody
MoAb	Monoclonal antibody
WB	Whole body
Ig	Immunoglobulin
SAP	saposin-like protein
CatB	Cathepsin B
CatL	Cathepsin L

บทนำ (Introduction)

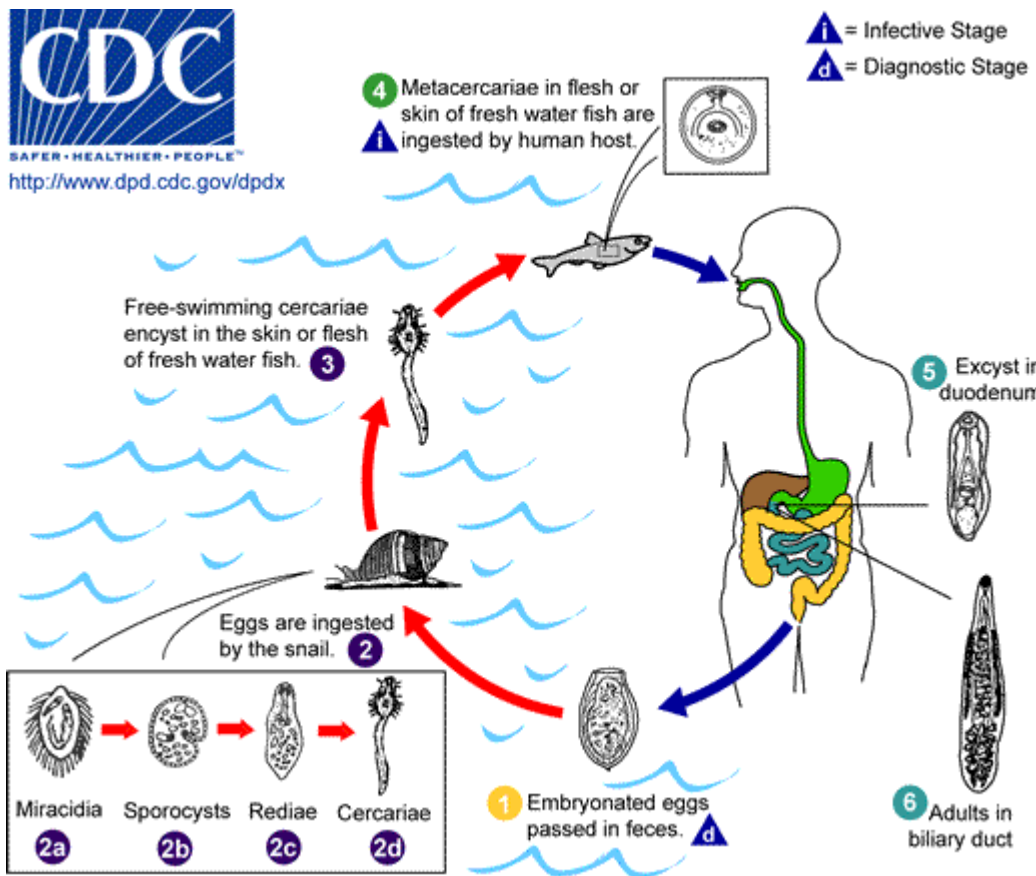
เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

พยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) มีรูปร่างแบนคล้ายใบไม้ ในประเทศไทยพบมากทั้งทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โรคพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มีสาเหตุเกิดจากการรับประทานอาหารประเภทปลาน้ำจืดประเภทปรังคิบ หรือสุกๆ ดิบ ๆ ที่มีตัวอ่อนระยะติดต่อ (เมตตาเซอร์คาเรีย) ของพยาธิปนเปื้อน เช่น ปลาจี่ ก้อยปลา ปลาส้ม ฯลฯ เมื่อคน แมว หรือสุนัข ซึ่งเป็นแหล่งรังโรคถ่ายอุจจาระปนเปื้อนแหล่งน้ำ จะทำให้เกิดการแพร่ระบาด โดยมีหอย (intermediate host ชนิดที่ 1) และปลาน้ำจืด (intermediate host ชนิดที่ 2) เป็นตัวช่วยให้พยาธิเจริญต่อไป พยาธิสภาพส่วนใหญ่เกิดจากการที่พยาธิตัวแก่ใช้ sucker ดูดเกาะผนังของท่อน้ำดี การกินเลือด พยาธิสภาพของการติดเชื้อ *O. viverrini* มักจะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผนังของท่อน้ำดีมากขึ้น เยื่อบุผิวของท่อน้ำดีจะหนาขึ้นกว่าปกติ ทำให้ท่อน้ำดีตีบลง บางครั้งท่อน้ำดีอาจเกิดการอุดตัน เนื่องจากพยาธิที่เบียดเสียดกันจำนวนมากๆ ในท่อน้ำดี โดยเฉพาะปลายท่อเกิดการโป่งพอง (การอุดตันทำให้ น้ำดีคั่ง (Evans et al., 1971; Sripa and Kaewkew, 2002; Sripa et al., 2003) เมื่อมีพยาธิตัวแก่จำนวนมาก และติดเชื้อเป็นเวลานาน พยาธิสภาพจะมากขึ้น ความเสียหายของท่อน้ำดีนอกจากเกิดจากตัวปรสิต ยังเป็นผลจากปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย การอักเสบอย่างเรื้อรัง รวมกับจำนวนปรสิตที่มาก หรือเบียดเสียดกัน ย่อมทำให้ท่อน้ำดีถูกอุดตันมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณขั้วตับ (portal area) ทำให้ท่อน้ำดีคั่งค้างอยู่ภายในตับ ท่อน้ำดีบริเวณเหนือจุดอุดตันขึ้นไป จะโป่งพองเป็นถุงน้ำเล็กๆ อยู่ทั่วไป นอกจากนี้ยังพบมีการอักเสบรอบๆ ท่อน้ำดีมากขึ้น การอักเสบลุกลามไปยังเซลล์ของตับ พบเซลล์พวก eosinophil และ mononuclear cell เมื่อเป็นนานๆ จะมี fibrous tissue เพิ่มมากขึ้น เป็นสาเหตุทำให้เกิดตับแข็ง (cirrhosis) ได้พยาธิสภาพจะรุนแรงมากขึ้นเมื่อมีปัจจัยเสริม หรือ โรคแทรกซ้อน เช่น ต่อมสุราเรื้อรัง โรคตับอักเสบจากเชื้อไวรัส และการรับสารก่อมะเร็งในชีวิตประจำวัน ในที่สุดเกิดตับแข็ง และ เกิดมะเร็งของท่อทางเดินน้ำดี (Cholangiocarcinoma) ร่วมด้วย (Watanapa and Watanapa, 2002; Bunyaratavej, 1981; Koopirochana, 1978)

จากการสำรวจอัตราความชุกโรคพยาธิใบไม้ตับของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2500 2524 2534 2539 2544 2552 และ 2557 พบว่าอัตราความชุกมีแนวโน้มลดลงจากร้อยละ 62.9, 54.7, 41.7, 35.0, 22.5, 18.1, 8.9 ตามลำดับ แต่ก็ยังเกินเป้าหมายที่กำหนด (ฐิติมา และคณะ, 2011) จากการสำรวจความชุกโรคพยาธิใบไม้ตับในประเทศไทย ปี 2557 พบว่า มีจังหวัดที่มีความชุกสูงกว่าร้อยละ 10 จำนวน 12 จังหวัด ในภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ตะวันออก ได้แก่ นครพนม (ร้อยละ 23.2) บุรีรัมย์ (ร้อยละ 17.6) ร้อยเอ็ด (ร้อยละ 15.5) น่าน (ร้อยละ 14.9) ศรีสะเกษ (ร้อยละ 14.3) สุรินทร์ (ร้อยละ 14.3) มหาสารคาม (ร้อยละ 13.1) สระแก้ว (ร้อยละ 12.7) มุกดาหาร (ร้อยละ 11.9) กาฬสินธุ์ (ร้อยละ 11.5) เชียงใหม่ (ร้อยละ 10.8) ลำปาง (ร้อยละ 10.5) ตามลำดับ (Thaewongjiew et al., 2014)

เมื่อมนุษย์หรือสัตว์กินตัวอ่อนระยะติดต่อคือระยะเมตตาเซอร์คาเรียเข้าไป ผนังหุ้มตัวอ่อนระยะนี้จะถูกทำลายโดยน้ำย่อยทำให้ตัวอ่อนระยะ newly excysted juvenile (NEJ) ออกจากซิสต์บริเวณลำไส้เล็กของโฮสต์ NEJ จะไชผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าไปในช่องท้องภายในลำตัวของโฮสต์ และเคลื่อนไปสู่ตับแล้วเจริญเป็น

พยาธิตัวอ่อนซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อของตับ ทำให้เนื้อเยื่อตับถูกทำลายเกิด haemorrhage และ fibrosis ในเนื้อตับ เมื่อพยาธิเจริญเป็นตัวเต็มวัยก็จะเดินทางไปอาศัยในท่อน้ำดีโดยใช้อวัยวะยึดเกาะ (oral และ ventral suckers) เกาะผนังของท่อน้ำดี เนื่องจากมีความต้องการอาหารในปริมาณสูง พยาธิจะทำลายเนื้อเยื่อ และเซลล์ของโฮสต์บริเวณที่พยาธิอาศัยอยู่ จากการเคลื่อนที่ไปมา พยาธิใช้ oral sucker กัดหรือฉีกเนื้อเยื่อ และเม็ดเลือดเพื่อดูดกิน ในขณะที่หนามบริเวณผนังลำตัวจะครูดและทำลายเนื้อเยื่อของโฮสต์ ในขณะที่พยาธิเคลื่อนที่ไปมา เอ็นไซม์และสารที่พยาธิหลั่งออกมาโดยเฉพาะกลุ่ม proteases และ lytic proteins จะช่วยทำลายและย่อยสลายเนื้อเยื่อและเซลล์ของโฮสต์มากยิ่งขึ้น เอ็นไซม์กลุ่ม endoproteases ในกลุ่ม cathepsin L (CatL) ,cathepsin B (CatB) และกลุ่ม exopeptidases ในสกุล leucine aminopeptidase (LAP) เป็นเอนไซม์หลักที่พยาธิหลั่งออกมาในสารคัดหลั่ง (excretion-secretion (ES) material) และพบว่ามีการอยู่ในพยาธิตั้งแต่ระยะ NEJ จนกระทั่งระยะตัวเต็มวัย โดยอาจมี isotype ที่ปรับเปลี่ยนไปเช่น CathB3 ถูกสร้างและปล่อยโดย NEJ ในช่วงที่ไชเข้าเนื้อเยื่อของโฮสต์ ส่วน CatB2 พบในขั้นตัวอ่อน และ CatB1 เป็นเอนไซม์หลักในตัวเต็มวัย เอ็นไซม์ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายตัวที่ tegumental cells และ caecal epithelial cell ในตัวพยาธิ นอกจากนี้พยาธิจะขับ lytic protein ที่ช่วยทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก ได้แก่ สารพวก saposin-like protein (SAP) ซึ่งจะจับกับไขมันบนผนังเซลล์ทำให้เกิดรูและทำให้เซลล์ของโฮสต์แตกออกเพื่อเป็นอาหารพยาธิต่อไป



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ *Opisthorchis viverrini*

ได้มีการศึกษาคุณสมบัติบางประการของยีน cathepsin F, cathepsin B (Sripa et al., 2010, 2011) ซึ่งโปรตีนของพยาธิในกลุ่มพยาธิใบไม้ตับมีความใกล้เคียงกัน โปรตีนทั้งสองตัวนี้มีน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างคล้ายกับโปรตีน cathepsin F, cathepsin B ในพยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ เช่น *F. gigantiga*, *F. hepatica*, *Opisthorchis felineus* (Chantree et al., 2013; Sathadawit et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตาม โปรตีนในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนชนิดอื่น เช่น leucine aminopeptidase, saposin-like protein, cathepsin L ยังไม่มีการศึกษาคุณลักษณะ และยังไม่มีการศึกษาโปรตีนเป้าหมายที่จะใช้ในการพัฒนาไปเป็นวัคซีน และการวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) มีรูปร่างแบนคล้ายใบไม้ ในประเทศไทยพบมากทั้งทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โรคพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* มีสาเหตุเกิดจากการรับประทานอาหารประเภทน้ำจืดปรุงดิบ หรือสุกๆ ที่มีตัวอ่อนของพยาธิปนเปื้อน เช่น ปลาร้า ก้อยปลา ปลาหมกไฟ ฯลฯ เมื่อคนแมว หรือสุนัข ซึ่งเป็นแหล่งรังโรคถ่ายอุจจาระปนเปื้อนแหล่งน้ำ จะทำให้เกิดการแพร่ระบาด โดยมีหอยและปลาน้ำจืด เป็นตัวช่วยให้พยาธินี้เจริญต่อไป พยาธิสภาพส่วนใหญ่เกิดจากการที่พยาธิตัวแก่ใช้ sucker ดูดเกาะผนังของท่อน้ำดี และการเคลื่อนที่ในระยะแรกๆ ทำให้เกิดระคายเคือง ปฏิกิริยาการอักเสบที่เกิดขึ้นในท่อน้ำดี ทำให้มีความรุนแรงมากขึ้น อย่างไรก็ตามความรุนแรงของพยาธิสภาพขึ้นอยู่กับจำนวนตัวหรือปริมาณการติดเชื้อ และยังขึ้นกับระยะเวลาที่มีเชื้อในตับ ถ้ามีพยาธิอยู่เป็นเวลานาน เช่นเกินกว่า 1 ปีขึ้นไปก็มักมีพยาธิสภาพมาก การมีโรคอื่นแทรกซ้อนอยู่ด้วย เช่น ทุโภชนาการเนื่องจากขาดอาหารโปรตีน ตับอักเสบจากเชื้อไวรัส โรคเนื้องอกในตับ รวมทั้งการที่ร่างกายได้รับสารก่อมะเร็ง มักทำให้พยาธิสภาพเกิดรุนแรงมากขึ้น (Bunyaratavej, 1981) โดยธรรมชาติผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมักติดเชื้อแบบเรื้อรัง นอกจากนี้ชาวบ้านยังมีการติดเชื้อซ้ำ ทำให้จำนวนเชื้อสะสมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จึงก่อให้เกิดการอักเสบของเซลล์บุผนังท่อน้ำดี เกิด hyperplasia (Koompirochana, 1978)

พยาธิสภาพของการติดเชื้อ *Opisthorchis viverrini* มักจะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผนังของท่อน้ำดีมากขึ้น เยื่อบุผิวของท่อน้ำดีจะหนาขึ้นกว่าปกติ ทำให้ท่อน้ำดีตีบลง บางครั้งท่อน้ำดีอาจเกิดการอุดตันเนื่องจากพยาธิที่เบียดเสียดกันจำนวนมากๆ ในท่อน้ำดี โดยเฉพาะปลายท่อ เกิดการโป่งพอง (การอุดตันทำให้น้ำดีคั่ง (Evans et al., 1971 ; Sripa and Kaewkew, 2002 ; Sripa et al., 2003) เมื่อมีพยาธิตัวแก่จำนวนมาก และติดเชื้อเป็นเวลานานพยาธิสภาพจะมากขึ้น ความเสียหายของท่อน้ำดีนอกจากเกิดจากตัวปรสิต ยังเป็นผลจากปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย การอักเสบอย่างเรื้อรัง ร่วมกับจำนวนปรสิตที่มาก ย่อมทำให้ท่อน้ำดีถูกอุดตันมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณขั้วตับ (portal area) ทำให้ท่อน้ำดีคั่งค้างอยู่ภายในตับ ท่อน้ำดีบริเวณเหนือจุดอุดตันขึ้นไป จะโป่งพองเป็นถุงน้ำเล็กๆอยู่ทั่วไป นอกจากนี้ยังพบมีการอักเสบรอบๆ ท่อน้ำดีมากขึ้น การอักเสบลุกลามไปยังเซลล์ของตับ พบเซลล์พวกeosinophil และ mononuclear cell เมื่อเป็นนานๆ จะมี fibrous tissue เพิ่มมากขึ้น เป็นสาเหตุทำให้เกิดตับแข็ง(cirrhosis) ได้พยาธิสภาพจะรุนแรงมากขึ้นเมื่อมีปัจจัยเสริม หรือ โรคแทรกซ้อน เช่น ตับสุราเรื้อรัง โรคตับอักเสบจากเชื้อไวรัส และ การรับสารก่อมะเร็งใน

ชีวิตประจำวัน ในที่สุดเกิดตับแข็ง และ เกิดมะเร็งของท่อทางเดินน้ำดี(Cholangiocarcinoma) ร่วมกับ (Watanapa and Watanapa, 2002) อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งที่พบบ่อยในประเทศไทย พบว่าในเพศชาย มีอัตราการเกิดโรคมะเร็งตับและท่อน้ำดีมากเป็นอันดับหนึ่ง (40.3 ต่อประชากรแสนคน) ส่วนเพศหญิงพบว่ามีอัตราการเกิดโรคมะเร็งตับและท่อน้ำดีเป็นอันดับสาม (16.6 ต่อประชากรแสนคน) (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์, 2014)

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้เนื่องจากจะตรวจพบไข่ก็ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์ จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามพัฒนาวิธีตรวจการติดเชื้อพยาธิโดยใช้เทคนิค immunoassay เพื่อให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ อย่างไรก็ตามจนถึงบัดนี้ก็ยังไม่สามารถใช้วิธี immunoassay ทดแทนวิธีตรวจไข่ในอุจจาระได้ เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ไม่ค่อยมีความจำเพาะและวิธีตรวจยังมีความไว (Sensitivity) ไม่สูงพอ อีกทั้งยังไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเสาะหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะสูงและหลังออกจากพยาธิในปริมาณมากพอ สำหรับโรคพยาธิชนิดนี้เพื่อนำมาผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีแล้วนำไปพัฒนาชุดตรวจสอบการติดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมีความจำเพาะและความไวสูง ตลอดจนมีราคาพอ สมควร และนำไปใช้ได้สะดวก ในปัจจุบันยังมีการศึกษาการสร้างและพัฒนาวัคซีนและชุดตรวจต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* น้อย แต่โรคพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้ยังไม่การระบาดในประเทศไทยและยังคงเป็นปัญหาของประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง คณะวิจัยจึงเห็นว่าควรมีการสร้างวัคซีนและชุดตรวจ เพื่อสามารถป้องกันและลดการนำไปสู่โรคมะเร็งท่อน้ำดี

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาคุณลักษณะ และการแสดงออกของยีน cathepsin B/L/F/D, saposin (SAP) และ leucine aminopeptidase (LAP)
2. พัฒนาวัคซีนที่สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิ โดยใช้ recombinant protein vaccines จาก cathepsin B/L/F/D, saposin (SAP) และ leucine aminopeptidase (LAP)
3. พัฒนาริธีตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิ โดยใช้วิธี sandwich ELISA และ immuno-chromatography โดยใช้แอนติเจนจากเอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีน เช่น cathepsin, saposin (SAP) และ leucine aminopeptidase (LAP) กับโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) ต่อแอนติเจนเหล่านี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ในวาร

คาดว่าจะสามารถตีพิมพ์บทความวิชาการในวารสารนานาชาติที่มี impact factor ค่อนข้างดี (Q1 หรือ Q2) ได้ไม่น้อยกว่า 1 บทความ

หน่วยงานที่สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สถาบันผลิตสัตว์และสุขภาพสัตว์
2. สถาบันบำรุงพันธุ์และวิเคราะห์โรคสัตว์ กรมปศุสัตว์
3. ฟาร์มปศุสัตว์
4. เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์รายย่อย

เนื้อเรื่อง (Main body)

รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

การสกัดโปรตีนจากพยาธิ *O. viverrini*

นำพยาธิ *O. viverrini* ระยะ adult มาใส่ lysis buffer และบดให้ละเอียดเพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C 30 นาที จะเห็นการแยกชั้นของ cell debris และ cell supernatant แล้วนำส่วนที่เป็น cell supernatant ที่มีโปรตีนของพยาธิเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

ศึกษาปริมาณการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อ *O. viverrini* ด้วยวิธี ELISA

นำโปรตีนจากพยาธิ *O. viverrini* ในระยะ adult ที่ละลายใน coating buffer ที่ความเข้มข้น (1:2000) ใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มข้ามคืนทิ้งไว้ที่ 4 องศา จากนั้นล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง แล้ว block non-specific binding ด้วย 4% skim milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยด primary antibody protein ทั้งหมด 12 ตัว ได้แก่ Cathepsin L1H, Leucine aminopeptidase (LAP), Saposin-like protein-2 (SAP-2), Cathepsin B3, Fatty acid binding proteins (FABP), Excretory-secretory (ES), IRS, Superoxide dismutase (SOD), Thioredoxin peroxidase (Trp), TGX, Thioredoxin (Trx) และ Peroxiredoxins (Prx) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง และเติม TMB substrate แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1N HCL (N คือ Normal) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย microplate reader (ELISA reader) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ศึกษาปริมาณการเกิดปฏิกิริยาข้ามของ แอนติบอดีต่อ FgES FgSOD และ rabbit infected serum กับ *O. viverrini* ด้วยวิธี western blot

นำโปรตีนที่สกัดได้จากพยาธิ มาเจือจางโดยผสมกับ loading dye และ PBS ให้มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร จากนั้น ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที และนำมา ใส่ลงในแผ่นเจล SDS-PAGE โดยใส่ Running buffer ให้ท่วมเจล เริ่มรันเจลโดยโหนดโปรตีนหลุมละ 5 ไมโครลิตร ใช้ไฟ 20 มิลลิแอมป์ต่อแผ่น จากนั้นจะ Transfer Protein จากเจลไปยัง Nitrocellulose membrane (0.45 μ m) และ นำ membrane มาย้อมด้วยสี Ponceau S ก่อนตากให้แห้ง นำแผ่น membrane ที่มี Protein นำมาตัดให้ ขนาดพอเหมาะ นำมาล้างด้วย 0.1% PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นแช่ skim milk เป็นเวลา 60 นาที ต่อมานำไปบ่มใน rabbit anti-Excretory secretory rabbit anti-FgSOD และ rabbit infected serum (1:2000) เป็นเวลา 60 นาที และนำมาล้างด้วย 0.1% PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที หยอด Secondary antibody goat Anti-rabbit (1:2000) เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วย 0.1% PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นจะบ่มใน AP buffer เป็นเวลา 5 นาที และหยอด substrate NBT/BCIP ที่เจือจางใน AP buffer ลงบน membrane บ่มในที่มืดเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วย RO

ศึกษาปริมาณการเกิดปฏิกิริยาข้ามของ แอนติบอดีต่อ FgES FgSOD และ rabbit infected serum กับ *O. viverrini* ด้วยวิธี Immunohistochemistry

หลังจากได้รับเนื้อเยื่อพยาธิ *O. viverrini* ใน paraffin block นำมาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้ ได้แผ่นเนื้อเยื่อที่มีความหนา 5 ไมครอน แล้วนำแผ่นเนื้อเยื่อลอยใน water bath โดยนำแผ่นสไลด์ซ้อน เนื้อเยื่อขึ้น และตากบน Slides Warmer จากนั้นละลาย paraffin ออกจากเนื้อเยื่อ (Deparaffinization) ด้วย xylene และทำการนำน้ำกลับเข้าสู่เนื้อเยื่อ (Rehydration) ด้วย absolute, 95%, 90%, 80%, 70% ethanol และน้ำกลั่น ตามลำดับ หลังจาก De-paraffin และ Rehydration แล้ว นำเนื้อเยื่อแช่ RO 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แช่เนื้อเยื่อลงใน Citrate buffer, pH 6.0 3 ครั้ง พร้อมกับนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง microwave ให้เดือด นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาแช่ในสาร 3% H₂O₂ ใน methanol เป็นเวลา 30 นาทีโดย บ่มในที่มืด แล้วนำไปผ่านน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS 3 นาที ต่อมารวกลมรอบเนื้อเยื่อด้วยปากกา PAP pen และหยอด 10% BSA ใน PBS ลงบนเนื้อเยื่อเป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วย PBS นาน 3 นาที หยอด rabbit anti-Excretory secretory rabbit anti-FgSOD และ rabbit infected serum (1:2000) บนเนื้อเยื่อ บ่มในที่มืดทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย 0.1% PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที หยอด Secondary antibody goat Anti-rabbit (1:2000) นาน 60 นาที ล้างด้วย 0.1% PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นล้างด้วย RO นาน 5 นาที หยอด DAB Substrate kit ลงบนเนื้อเยื่อ บ่ม ในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที ล้างด้วย RO จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ dehydration ด้วย 70%, 80%, 90%, 95%, absolute ethanol และ xylene ตามลำดับ mounting ด้วย 90% glycerol และนำไปถ่ายรูปด้วยกล้อง Olympus ที่กำลังขยาย 40, 400 และ 1000 เท่า

การสังเคราะห์ recombinant F. gigantea proteins

กระบวนการผลิต recombinant proteins ของจีนเป้าหมายจะกระทำโดยใช้ expression vector ของระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย (prokaryotic system) คือ pET-30b และ pET-21b หลังจากนั้นจึงนำ vector เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งคือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของจีนและสุดท้ายทำให้เซลล์แบคทีเรียสลายและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

การศึกษาหาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนด้วยเทคนิค X-ray crystallography

ในการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Protein Crystallography จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างผลึกโปรตีน (Protein Crystal) และนำไปยิงด้วยรังสีเอ็กซ์เพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนซึ่งมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การตกผลึกโปรตีน (Protein Crystallization)

โปรตีนที่สนใจจะนำมาตกผลึกต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified) โดยเทคนิคสุดท้ายเป็น size exclusion chromatography เพื่อตรวจสอบความ homogenous ของโปรตีน และโปรตีนถูกวิเคราะห์ด้วย SDS-gel electrophoresis โดยโปรตีนที่จะนำมาตกผลึกควรมีความบริสุทธิ์มากกว่า 90% และมีความเข้มข้นของโปรตีนอย่างน้อย 5 mg/ml ก่อนที่จะทำการ crystallization โปรตีนจะถูกปั่นที่ความเร็ว 13,000g 10 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนที่ตกตะกอนออกไป เทคนิคที่ใช้ในการทำ crystallization screening คือ sitting drop vapour diffusion method โดยใช้ reservoir จากชุด kit ของ Hampton โปรตีนหนึ่งตัวจะถูก screen หาสถานะที่เหมาะสมที่ทำให้ตกผลึกอย่างน้อย 200 สถานะ เมื่อได้ microcrystal จะถูกนำมาปรับสถานะเพิ่มเติม (Crystallization optimization) เพื่อให้ได้ผลึกที่มีขนาดใหญ่ มีคุณภาพและเหมาะสมต่อการนำไปกระเจิงแสง X-ray (X-ray diffraction)

สารที่จะนำมาเตรียมเพื่อใช้ในการหาสถานะที่เหมาะสมจะถูกเตรียมและกรองผ่าน membrane 0.22 μm หรือ 0.45 μm เทคนิคที่ใช้ในการทำ crystallization optimization คือ Hanging drop vapour diffusion โปรตีน 1 μl จะถูกผสมกับ reservoir บนแผ่น cover slip ที่เคลือบด้วยสาร Haptane กับ Xylene, reservoir ประกอบไปด้วยบัฟเฟอร์ และ precipitant ที่ได้จากการหาสถานะโดยการ screening

2. X-ray data collection and processing

เมื่อได้ protein crystal ที่มีขนาดใหญ่พอจะถูกนำมายิงด้วยรังสีเอ็กซ์ (X-ray) ที่ความยาวคลื่น 1 \AA โดยในขั้นตอนนี้ต้องใช้แสง synchrotron ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน beamline 7.2 เพื่อลดความเสียหายของผลึกโปรตีนจากถูกรังสีเอ็กซ์ภายใต้สถานะเย็นจัดจาก liquid nitrogen จะต้องใช้ Cryomounting method โดยผลึกโปรตีนจะถูกแช่ใน cryoprotectant ผสมกับ reservoir ชนิดเดียวกับที่ใช้ตกผลึก ต้องทดสอบหา cryoprotectant เหมาะสมโดยไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งในผลึกโปรตีนและเป็นสถานะ

ที่ผลึกโปรตีนกระเจิงแสงได้มากที่สุด cryoprotectant ที่นิยมใช้ ได้แก่ 20-30% glycerol, 10-30% MPD หรือ 20-40% PEG400 เป็นต้น

ข้อมูล X-ray diffraction pattern จะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม iMOSFLM เพื่อหา space group ของผลึกโปรตีนจากนั้นนำ data set มา scale และ merge โดยโปรแกรม SCALA ใน CCP4 program suite จำนวน molecules ที่ปรากฏใน unit cell จะถูกประมาณโดย Brian Matthews' method คำนวณหา Matthews coefficient or V_m

3. การวิเคราะห์หาโครงสร้าง (Structure analysis)

เมื่อได้ข้อมูลจาก X-ray diffraction pattern จะนำวิเคราะห์ electron density map โดยโปรตีนที่ลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีนอื่น ๆ มากจะถูกวิเคราะห์ phase ด้วย molecular replacement method โดยโปรแกรม Molrep ใน CCP4 program suite ส่วนโปรตีนตัวที่ไม่คล้ายกับโปรตีนตัวอื่น ๆ เลย จะเลือกใช้เทคนิค single-wavelength anomalous dispersion (SAD) โมเดลของโปรตีนจะถูกสร้างขึ้นตามแบบของ electron density map และ refinement โดยโปรแกรม Refmac5 ทูกรอบของการ refinement จะตรวจสอบแบบ manual โดยใช้โปรแกรม COOT และ final model จะเติมน้ำ และตรวจสอบความถูกต้องโดยค่า residual (R) และ bias free (Rfree) factors

รูปภาพโมเดลต่าง ๆ จะถูกสร้างโดยโปรแกรม Pymol และนำไปวิเคราะห์หาหน้าที่ตามแบบโครงสร้างต่อไป

4. Structure validation and PDB deposition

คุณภาพของโครงสร้างโปรตีนจะถูกวิเคราะห์โดย PROCHECK and Whatcheck ถ้า residue ไต Phi (ϕ), Psi (ψ) ไม่อยู่ในบริเวณที่เหมาะสมจะถูกแก้ไขให้ถูกต้องตาม geometric และ stereochemical ของโปรตีน จากนั้นคำนวณ Atomic coordinate และ structure factor amplitudes โดยใช้ ADIT Validation Server ที่ <http://deposit.pdb.org/validate> ก่อนที่จะ deposit ใน Protein Data Bank (PDB)

การทดสอบคุณสมบัติของวัคซีนรีคอมบิแนนท์โปรตีน recombinant protein vaccine

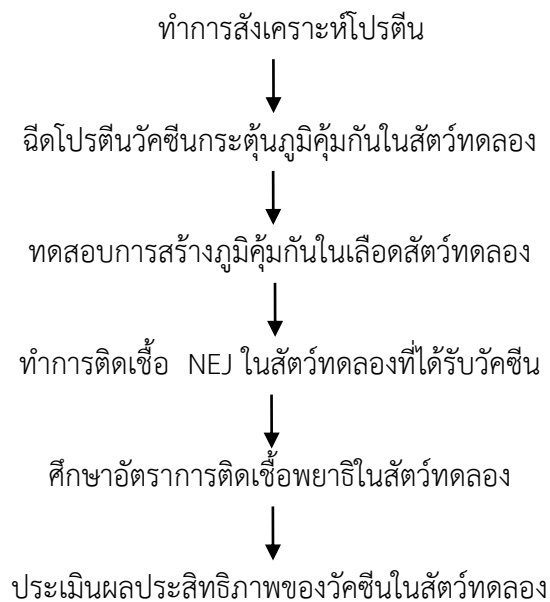
กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยทั้งในรูปของโปรตีนเดี่ยว (single vaccine) โปรตีนผสม (cocktail vaccine) และโปรตีนลูกผสม (hybrid protein vaccine) โดยผสมกับสาร adjuvants เช่น alum ในการศึกษาส่วนนี้ ผู้ทำการวิจัยจะทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองต่อ recombinant proteins เป้าหมาย (CatB, CatL, CatF, CatD SAP, LAP) โดยเลือกใช้ Alum เป็น adjuvant โดยทำการฉีดกระตุ้น 2 วิธีเพื่อเปรียบเทียบผล คือ ใต้ผิวหนัง โดยแบ่งหนุออกเป็น 3 กลุ่มทดลอง กลุ่มทดลองละ 10 ตัว ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ไม่มีการฉีดกระตุ้นใช้เป็นกลุ่มควบคุมที่ 1

กลุ่มที่ 2 ทำการฉีดกระตุ้นด้วยบัพเฟอร์ที่ไม่มีโปรตีนผสมเป็นกลุ่มควบคุมที่ 2

กลุ่มที่ 3 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย recombinant protein 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง

นำโปรตีนจำนวน 50 ไมโครกรัม ซึ่งละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Saline) ผสมกับ Alum Adjuvant ในปริมาณเท่า ๆ กัน และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันจนกระทั่งเหนียวขึ้นไม่แตกตัวกระจาย และจับตัวเป็นกลุ่มเมื่อหยดทดสอบลงในน้ำ จากนั้นฉีดเข้าช่องท้องหนูหรือใต้ผิวหนังโดยฉีดทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ ละครั้งห่างกัน 3 สัปดาห์ โดยผสมโปรตีนกับ Alum Adjuvant สำหรับการฉีดกระตุ้นในทุกครั้ง เมื่อครบ 2 สัปดาห์หลังจากฉีดครั้งที่ 3 จะเก็บเลือดจากหางหนูเพื่อทดสอบการสร้างภูมิคุ้มกันในหนู และจากนั้นจะทำการทดสอบการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ



แผนภูมิ แสดงแผนงานวิจัยด้านการพัฒนาโปรตีนวัคซีน เพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันการติดเชื้อพยาธิ

การพัฒนาและทดสอบวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ

การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb)

นำ recombinant proteins ฉีดเข้าช่องท้องของหนูทดลอง (intraperitoneal injection) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนในหนูทดลองสร้างและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในม้าม โดยการฉีดกระตุ้นจำนวน 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะฉีดห่างกัน 3 สัปดาห์ จากนั้นทำการฉีดเข้าเส้นเลือดบริเวณ หาง (tail vein) ก่อนทำการแยกเซลล์ม้าม 3 วัน เมื่อครบกำหนดทำการแยกเซลล์ม้ามที่ได้จากหนูที่มีการฉีดกระตุ้นเพื่อใช้สำหรับเชื่อมกับเซลล์ myeloma

นำเซลล์ myeloma และเซลล์ม้ามมาทำการเชื่อมต่อกันด้วย polyethyleneglycol (PEG) นำเซลล์ hybridoma ที่ได้หยอดลงใน 96 well plate แล้วนำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมปริมาณ CO₂ ที่ร้อยละ 5 และทำการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี limiting dilution

หลังจากนั้นจึงคัดเลือกโคลนด้วย enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และ enzyme linked immunoelectrotransfer blot (EITB) ทำการตรวจหา class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Immunopure Monoclonal Antibody Isotyping kit (HRP/ABTS) (PIERCE) ซึ่งใช้หลักการ sandwich ELISA

การตรวจคุณสมบัติของ MoAb ด้วยวิธี immunoblotting

เมื่อได้ MoAb แล้วเราจะนำ MoAb ไปตรวจการทำปฏิกิริยากับ recombinant proteins เป้าหมาย และโปรตีนธรรมชาติชนิดเดียวกันที่มีอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพยาธิ เช่น ภายในตัว (whole body proteins) โปรตีนจากชั้นผิว (tegument proteins-TA) และโปรตีนจากสารขับถ่ายและคัดหลั่งจากพยาธิ (excretory-secretory protein-ES)

การสกัดโปรตีนแอนติเจนจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิเพื่อนำมาทดสอบกับ MoAb

นำพยาธิตัวเต็มวัยที่เก็บได้จากตับหนูที่ติดเชื้อมาสกัดโปรตีนจากชั้นผิว (TA) ใน extracting buffer ซึ่งประกอบด้วย PBS pH 7.4 ที่มี 1% (v/v) nonidet P-40, 1% (w/v) sodium deoxycholate, และ 0.025% (w/v) phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) โดยแช่พยาธิเป็นเวลา 30 นาที นำชั้น TA ที่หลุดออกมาไป sonicate โดยใช้ ultrasonic disintegrator ที่ amplitude 10-14 micron นาน 1 นาที ทำ 5 รอบ นำ suspension มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 xg ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส นาน 15 นาที นำ supernate ที่ได้มาวัดความเข้มข้นของโปรตีน จากนั้นเก็บ supernate ที่มี TA แอนติเจน ไว้ที่ -20° เซลเซียส เพื่อนำมาทำการทดสอบต่อไป ส่วนลำตัวของพยาธิที่เหลือจะถูกสกัดต่อไป และ homogenized จนละเอียด แล้วปั่นเอา supernatant ที่มี whole body (WB) แอนติเจนเก็บไว้ใช้ต่อไป ส่วน excretory-secretory (ES) แอนติเจน ได้จากการ incubate พยาธิตัวเต็มวัยเป็น ๆ ที่เก็บมาจากตับหนูใน RPMI medium 2 ชั่วโมง แล้วเก็บ medium เพื่อนำไปปั่นตกตะกอน ส่วน supernatant คือ ES แอนติเจนที่จะเก็บไว้ใช้ต่อไป

การแยกโปรตีนโดยใช้ sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำ supernates ที่ได้ข้างต้น และ recombinant proteins มาทำการแยกโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE ด้วยวิธีของ Laemmli, 1970 โดยนำ supernate ที่มีปริมาณโปรตีน 25 µg มาแยกในส่วน SDS-polyacrylamide mini-slab gel ที่มี 10% acrylamide separating gel และ 3% acrylamide stacking gel ทำการ electrophoresis ใน running buffer ที่มี 25 mM Tris, 192 mM glycine และ 0.1% SDS, pH 8.3 โดยใช้ ที่ความต่างศักย์ 200 V ที่อุณหภูมิ 10-15° เซลเซียส

Western blotting

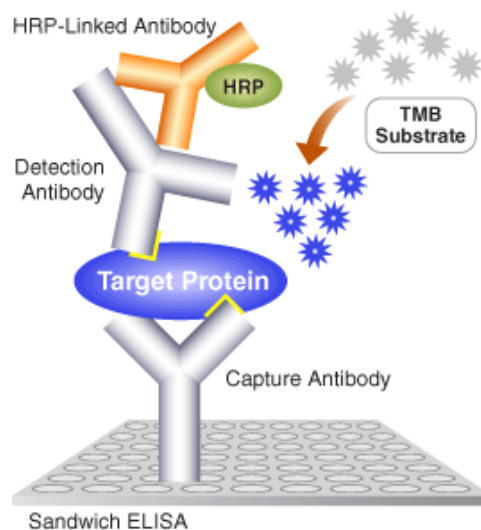
หลังจากทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้ว ทำการย้ายโปรตีนจาก gel สู่ PVDF membrane ใน transferring buffer ที่มี 40 mM Tris, pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 20% (v/v) methanol, และ 0.05% SDS ทำการย้ายโปรตีนโดยใช้ constant voltage ที่ 10 v, อุณหภูมิ 10-15° เซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (over-night) ใช้ Mini Trans-Blot^R transfertank

นำแผ่น PVDF membrane ที่ได้มา block ด้วย 3% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween-20 ใน PBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย PBST (ประกอบด้วย PBS pH 7.4 ที่มี 0.1% (v/v) Tween-20) นำแผ่น membrane ที่ถูก block แล้วมาทำการตรวจหาโปรตีนที่เป็นแอนติเจนเป้าหมาย โดยใช้ monoclonal antibodies ที่จำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย PBS-Tween นานครั้งละ 10 นาที ทำการตรวจปฏิกิริยาการจับระหว่าง antigen และ antibody ที่เกิดขึ้นโดยใช้ horseradish peroxidase – conjugated secondary antibody บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย PBS-Tween เติม peroxidase substrate solution ที่มี 1.3 mM diaminobenzidine (DAB), 0.02% (v/v) H₂O₂ ใน PBS pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่น membrane แช่ในน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง แล้วนำมาวิเคราะห์ผล ในการทำ SDS-PAGE ใช้ pre-stained protein markers เป็น molecular weight control

การนำ MoAb และ recombinant proteins ไปพัฒนาวิธีตรวจการติดเชื้อพยาธิ

การพัฒนาวิธีตรวจแบบ sandwich ELISA

เป็นวิธีที่มี sensitivity สูงใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจนจากพยาธิใบไม้ตับ *O.viverrini* ขึ้นตอน ในการตรวจหาแอนติเจนดังกล่าวแสดงโดยย่อ โดยแผนผังและภาพประกอบ ดังนี้



รูปที่ 2 ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA

เคลือบ ELISA plate ด้วย แอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนเป้าหมาย

↓
ใส่โมโนโคลนัลแอนติบอดี (capture antibody) ลงในหลุมของ ELISA plate

↓
ใส่ skim milk เพื่อ block non specific binding

↓
ใส่ซีรัมสัตว์ที่ติดเชื้อลงในหลุมของ ELISA plate

↓
ใส่โพลีโคลนัลแอนติบอดี ต่อแอนติเจนเป้าหมายที่เชื่อมกับ biotin (detection antibody)

↓
ใส่ streptavidin-HRP ลงในหลุมของ ELISA plate

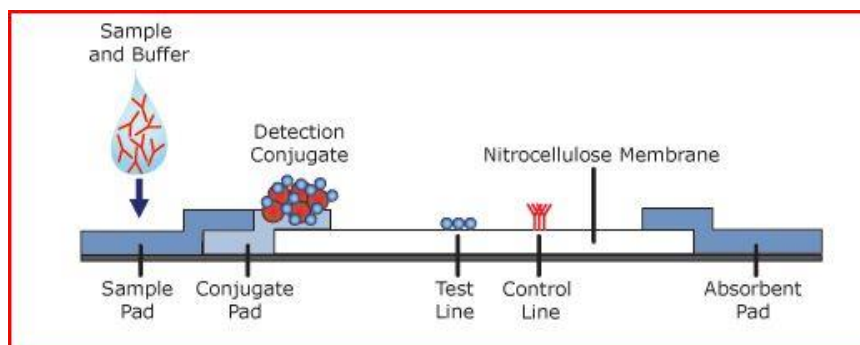
↓
ใส่ TMB substrate ลงในหลุมของ ELISA plate

↓
หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N HCl แล้วอ่าน OD

แผนภูมิ ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA

การพัฒนาวิธีตรวจสอบ immuno-chromatography (Immunochromatographic strip (ICS) test)

ICS test ใช้หลักการของ immuno-chromatography เป็นการตรวจสอบชนิด rapid qualitative หรือ semi-quantitative ใช้สำหรับตรวจแอนติเจนเป้าหมาย ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่ เลือด และ ซีรัม เป็นต้น



รูปที่ 3 แสดงชุดตรวจแบบ ICS

ICS ประกอบด้วย ส่วนสำคัญ 4 ส่วน ได้แก่ sample pad, conjugate release pad, analytical membrane และ wicking (absorbent) pad (ดูภาพประกอบ)

1. Sample pad เป็นส่วนที่ใช้ใส่ตัวอย่างที่ต้องการตรวจ ตัวอย่างจะเคลื่อนที่โดย capillary action ไปยังส่วน conjugate release pad และ analytical membrane
2. Conjugate release pad เป็นส่วนที่ประกอบด้วย โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles ที่จำเพาะต่อแอนติเจนจากชั้นผิวพวยจารีที่น้ำหนักมวลโมเลกุล 28.5 กิโลดาลตัน (หรือแอนติเจนเป้าหมายอื่น)
3. Analytical lines เป็นส่วนที่ประกอบด้วย โพลีโคลนัลแอนติบอดี ต่อแอนติเจนซึ่งเป็นบริเวณทดสอบ (capture line) และ แอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles ซึ่งเป็นบริเวณควบคุม (control line)
4. Wicking (absorbent) pad เป็นส่วนที่ใช้ในการควบคุมการเคลื่อนตัวของแอนติเจน ในตัวอย่าง ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

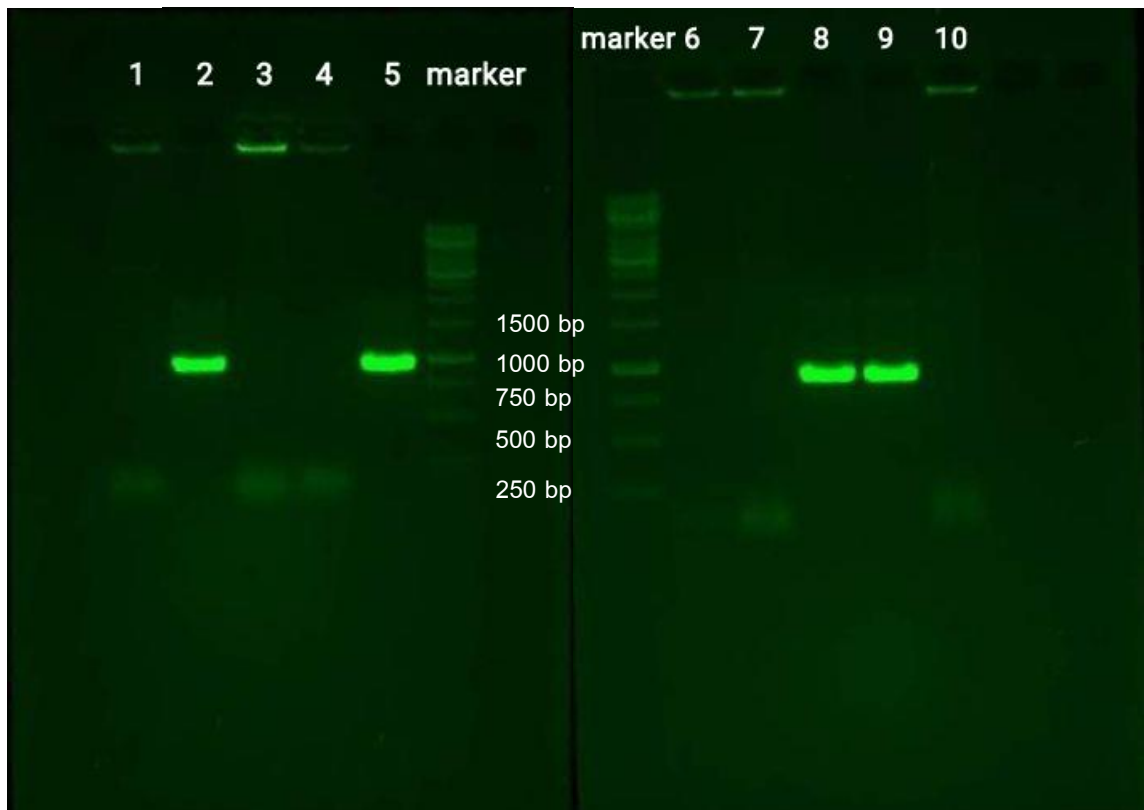
การแปลผลการทดสอบของ ICS test

เมื่อหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ เช่น เลือด ในบริเวณ sample pad ตัวอย่างดังกล่าว จะเคลื่อนตัวโดย capillary action ในกรณีที่มีแอนติเจนปนอยู่จะเกิดแถบสีขึ้น 2 แถบซึ่งมาจากแอนติเจนที่จับตัวกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles เป็น antibody-antigen complex เคลื่อนตัวไปจับกับ โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดนี้ในบริเวณทดสอบ (capture line) และ มาจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles จับตัวกับแอนติบอดีต่อโมโนโคลนัล แอนติบอดีที่บริเวณควบคุม (control line) แต่ในกรณีที่ตัวอย่างไม่มีแอนติเจนปนอยู่ จะเกิดแถบสีขึ้นเพียงแถบเดียวจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles จับตัวกับแอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่บริเวณควบคุม (control line) จากข้อมูลที่ได้จะนำคู่ MoAb และ PoAb และแอนติเจนที่แสดงผลดีที่สุดไป พัฒนาเป็นวิธีตรวจสอบ ที่จะนำไปใช้ในภาคสนามต่อไป

ผลการวิจัย (Results)

การโคลนยีน Cathepsin F (OvCatF)

ทำการเชื่อมยีน OvCatF ของพยาธิตัวตืด *Orpisthorchis viverrini* เข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector (DNA ligation) แล้วนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของ *E.coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock transformation ต่อมานำเชื้อไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและนำไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในเชื้อ *E.coli* DH5 α โดยทำการเลือกเชื้อที่เพาะเลี้ยงมาโคโลนี 10 colonies เพื่อนำมาตรวจสอบหา ยีน CatF ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำไปรันเจล agarose 1% ได้ผลดังนี้



รูปที่ 4 ผลการทำ colony PCR clone ที่ 1-10

จากผลการทำ Colony PCR ข้างต้น พบว่าโคลนที่ 2, 5, 8 และ 9 เกิด band ขนาดประมาณ 1,000 bp เมื่อเทียบกับ DNA ladder จึงคาดว่าโคลนที่ 2, 5, 8 และ 9 น่าจะมียีน OvCat F อยู่ จึงนำดังกล่าวไปสกัดพลาสมิดและทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับเบสต่อไป

การสกัดพลาสมิดและการหาลำดับเบสของ clone ที่ 2, 5, 8 และ 9

นำโคลนที่ 2, 5, 8 และ 9 มาเลี้ยงใน LB broth ที่มียา ampicillin ผสมอยู่ ปุ่มที่ 37 °C เขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดแล้วส่งทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ถัดมาได้นำผลการทำ DNA sequencing มาแปลรหัสจากลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโน ได้ผลดังนี้

924 nucleotides Translation in forward direction

DNA: agaactaccccattcgagcctgatgatgcccgggcactatacgaggagttcaagctgaag
aa: R T T P F E P D D A R A L Y E E F K L K

DNA: tacaagaagacctattcaaatgatgatgatgagccttcgatttagaattttcaaagacaac
aa: Y K K T Y S N D D D E L R F R I F K D N

DNA: ttggagcgcgccaagagactgcaggcaatggaacaaggacagcggagtatggtgtaacg
aa: L E R A K R L Q A M E Q G T A E Y G V T

DNA: caattttccgacctgaccagtgaggagttcaagacgcggtatttgaggatgacgattgat
aa: Q F S D L T S E E F K T R Y L R M R F D

DNA: gagccgattgtcaatgaggatcccaccccacaagaagatgtgacgatggataacagcaat
aa: E P I V N E D P T P Q E D V T M D N S N

DNA: tttgattggcgagatcatggtgcagtcggaccagtattggaccaaggagattgtggttcg
aa: F D W R D H G A V G P V L D Q G D C G S

DNA: tgctgggcattttctgtgattgggaatgtcgagggtcagtggttccgtaagactggggat
aa: C W A F S V I G N V E G Q W F R K T G D

DNA: ctactaggtctcagtgaacagcaacttattgattgacgaccattccgatcagggatgtgat
aa: L L G L S E Q Q L I D C D H S D Q G C D

DNA: ggcggttatccccacagacttacagtgcaattgaagagatgggcggttgaggctccga
aa: G G Y P P Q T Y S A I E E M G G L E L R

DNA: tcggattaccggtacacaggaaaggacggaatatggttatatggaccaatcgaagttcgta
aa: S D Y P Y T G K D G I C Y M D Q S K F V

DNA: gcctatgtgaacggttcaactcgcttgccatggtgcaaaaagacacaggcgaatcattg
aa: A Y V N G S T R L P W C E K T Q A K S L

DNA: aaggaaatcgggtccacttttcttggttgatgcccgtattgctccaactgtacaaacga
aa: K E I G P L S S G L N A V L L Q L Y K R

DNA: ggaatcatgcggtcccagatggtgcaatccagctgaactgaaccacgctgttctcacagtc
aa: G I M R P R W C N P A E L N H A V L T V

DNA: ggctacggcatggagcatagaatgccttactggatagtgaaaaacagttggggcgaacgt
aa: G Y G M E H R M P Y W I V K N S W G K R

DNA: tttggagaaaagggtattttccgtatctaccgaggagatggaacttgcggaatcaaccgc
aa: F G E K G Y F R I Y R G D G T C G I N R

DNA: gcagttactacagccggttgtaaa
aa: A V T T A V V K

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน

ลำดับต่อมาทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลเพื่อตรวจสอบดูความเหมือนกันระหว่างโปรตีน OvCatF สังเคราะห์ขึ้นมากับโปรตีน CatF (GenBank: AAV69023.1) ในพยาธิ *Opisthorchis viverrini* ได้ผลดังนี้

Clone ที่ 2 (P1)

P1_T7	RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAIEYGV
CATF	RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAIEYGV
P1_SP6	RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAIEYGV
P1_T7	QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDPEIVNEDPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDGCS
CATF	QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDPEIVNEDPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDGCS
P1_SP6	QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDPEIVNEDPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDGCS
P1_T7	CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR
CATF	CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR
P1_SP6	CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR
P1_T7	SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKR
CATF	SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKR
P1_SP6	SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKR
P1_T7	G-IMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYWIWKNSWGKRFGEK-GYFRIYRGDGTTCGI
CATF	G-IMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYWIWKNSWGKRFGEK-GYFRIYRGDGTTCGI
P1_SP6	RNHASQKGAIQLN-TPPVSPVGYGLEQKMPYGESEKNLGANFLEKKGLFSLFPGKRELCE
P1_T7	NRAVTTAVVKNRIPAAAMAAGACDSS-----
CATF	NRAVTTAVVK-----
P1_SP6	NTPPF-PLFQKKISPPPPGGGGKVNIGPHFPQRGAP

Clone ที่ 5 (P2)

P2_T7	RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAIEYGV
P2_SP6	RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAIEYGV
CATF	RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAIEYGV
P2_T7	QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDPEIVNEDPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDGCS
P2_SP6	QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDPEIVNEDPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDGCS
CATF	QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDPEIVNEDPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDGCS
P2_T7	CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR
P2_SP6	CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR
CATF	CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR
P2_T7	SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQVKSLEIGPLSSGLNAVLLQLYKR
P2_SP6	SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQVKSLEIGPLSSGLNAVLLQLYKR
CATF	SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKR
P2_T7	GIMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYWIWKNSWGKRFGEKGYFRIYRGDGTTCGINR
P2_SP6	GIMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYWIWKNSWGKRFGEKGYFRIYRGDGTTCGINR
CATF	GIMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYWIWKNSWGKRFGEKGYFRIYRGDGTTCGINR
P2_T7	AVTTAVVKNH
P2_SP6	AVTTAVVKNH
CATF	AVTTAVVK-

Clone ที่ 8 (P3)

P3_SP6 RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAEYGV
CATF RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAEYGV
P3_T7 RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAEYGV

P3_SP6 QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDEPIVNEPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDCGS
CATF QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDEPIVNEPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDCGS
P3_T7 QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDEPIVNEPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDCGS

P3_SP6 CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR
CATF CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR
P3_T7 CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR

P3_SP6 SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKR
CATF SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKR
P3_T7 SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKR

P3_SP6 GIMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYIWVKNWSGKRFGEKGYFRIYRGDGTGGINR
CATF GIMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYIWVKNWSGKRFGEKGYFRIYRGDGTGGINR
P3_T7 GIMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYIWVKNWSGKRFGEKGYFRIYRGDGTGGINR

P3_SP6 AVTTAVVKNH--IRGRLQVDHMGELPTRDAC-----
CATF AVTTAVVK-----
P3_T7 AVTTAVVKNH--IRGRLQVDHMGELPTRWMHSLIL-CPPNSLA-SRSK

Clone ที่ 9 (P4)

P4_SP6 RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAEYGV
CATF RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAEYGV
P4_T7 RTTPFEPDDARALYEEFKLKYKKTYSNDDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAEYGV

P4_SP6 QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDEPIVNEPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDCGS
CATF QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDEPIVNEPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDCGS
P4_T7 QFSDLTSEEFKTRYLRMRFDEPIVNEPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDCGS

P4_SP6 CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR
CATF CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR
P4_T7 CWAFSVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQQLIDCDHSDQGCDGGYPPQTYSAIEEMGGLELR

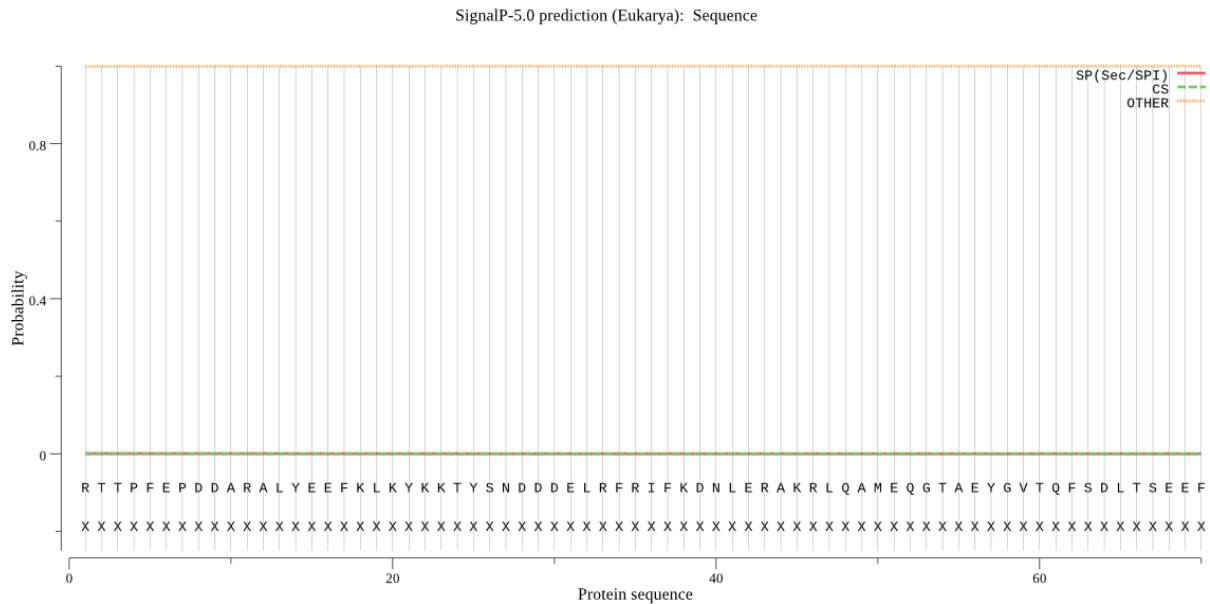
P4_SP6 SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKR
CATF SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKR
P4_T7 SDYPYTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKR

P4_SP6 GIMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYIWVKNWSGKRFGEKGYFRIYRGDGTGGINR
CATF GIMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYIWVKNWSGKRFGEKGYFRIYRGDGTGGINR
P4_T7 GIMRPRWCNPAELNHAFLTVGYGMEHRMPYIWVKNWSGKRFGEKGYFRIYRGDGTGGINR

P4_SP6 AVTTAVVKNH
CATF AVTTAVVK--
P4_T7 AVTTAVVKNH

จากผลการเปรียบเทียบทั้ง 4 โคลน พบว่าโคลนที่ 8 (P3) มีลำดับอะมิโนตรงกับโปรตีน CatF (GenBank: AAV69023.1) ทำให้โคลนที่ 8 มีความเหมาะสมสำหรับนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนถัดต่อไป

การตรวจสอบ Signal peptide



ทำการตรวจสอบ Signal peptide ผ่านเว็บไซต์ <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> จากการทำนาย Signal peptide ในโปรตีนสังเคราะห์ OvCatF พบว่าไม่มีส่วนใดของโปรตีนที่เป็น Signal peptide จึงเหมาะกับการสังเคราะห์โปรตีน OvCatF ในแบคทีเรีย

การเปรียบเทียบลำดับอะมิโนของ Cathepsin F ของ *Opisthorchis viverrini* กับ species อื่น

O. viverrini -----
C. sinensis -----
H. sapiens MAPWLQLLSLLGLLP--GAVAAPAQPRAASFQAWGPPPELLAPTRFALEMFNRRGRAAGT
B. taurus MAPWLQLLLLLGLLP--AAAPASSKPPAAGAQAWE LASPELREPARFALEMYNRRGRAAGT
M. musculus MALLLQLLWLLTLLSTVALSPVPAKPWADDEQAWNLSQELLAPARFALDMYNYGRAAGT

O. viverrini -----
C. sinensis -----
H. sapiens RAVLGLVRGRVRRAGQGSLSLEATLEEPPCNDPDMVCRLPVSKKTLCSFQVLDELGRHV
B. taurus RAALGAVRGRVRRAGRGSLSLKATLVEPPCNDPTVCQLPVSKKTLCSFEVLDELGKHM
M. musculus RAVLGAVRGRVRRAGQGSLSLEATLEEPPCNDPLVCPLPETKKTVLCSFEVLEELKEHL

O. viverrini -----RTTPF
C. sinensis -----MRFELCFLVALGFFGVLSNIIP
H. sapiens LLRKDCGPVDTKVPGAGEPKSAFTQGSAMISLSQNHDPNRNETFSSVISLLNEDPLSQD
B. taurus LLRRDCGPVDTKTT-----DDRNETFSSFLPLLNKDPLPQD
M. musculus LLRRDCSPVNAKVT-----EFRNATFSSFLPLLKDKDPLPQD

E R F N A Q

O. viverrini EPDDARALYEEFKLKYKKTYSN-DDDELRFRIFKDNLERAKRLQAMEQGTAEYGVTTQFSD
C. sinensis ESENAQLYEEFKLKYKKSYSN-DDDEYRFVFKDNLRLIKQFQNMERGTAKYGVTTQFSD
H. sapiens LPVKMASIFKNFVITYNRTYESKEEARWRLSVFVNNMVRQKIQALDRGTAQYGVTKFSD
B. taurus FSVKMASIFKDFVTTYNRTYDSQEEASWRMSVFANNMVRQKIQALDRGTARYGVTKFSD
M. musculus FSVKMAPLKFDFMTTYNRTYESREEAQWRLTVFARNMIRQKIQALDRGTAQYGITKFSD

O. viverini LTSEEFKTRYLRMRFDPEIVNEDPTPQEDVTMDNSNFDWRDHGAVGPVLDQGDGSCSWAF
C. sinensis LTAQEFKVRYLRSKFGGVPVDREPVVPIRMDVDDDNFDWRNHGAVGPVLDQGDGSCSWAF
H. sapiens LTEEEFRTIYLNLTLLRKEPGNKMKQAKSVGDLAPPEWDWRKGAVTKVVDQGMCGSCWAF
B. taurus LTEEEFRTIYLNPLLLKDAFGRNMRPAQPVTDVPPQWDWRNKGAVTNVKDQGMCGSCWAF
M. musculus LTEEEFHRTIYLNPLLLQKESGRKMSPAKSINDLAPPEWDWRKKGAVTEVKNQGMCGSCWAF

O. viverini SVIGNVEGQWFRKTGDLGLSEQQLLIDCDHSDQGDGGYPPQTYSAIEEMGGLELRSDYP
C. sinensis SAVGNIEGQWFRKTDNLLQLSEQQLLDCDEVDEGNGGTPQQAFKQILGMGGLQLSDYP
H. sapiens SVTGNVEGQWFLNQGTLTLLSLSEQELLDCKMDKACMGGLPSNAYSIAIKNLGGLETEDDYS
B. taurus SVTGNVEGQWFLKRGTLTLLSLSEQELLDCKTDKACLGGGLPSNAYSIAIRTLGGLETEDDYS
M. musculus SVTGNVEGQWFLNRGTLLSLSEQELLDCKVDKACLGGGLPSNAYAAIKNLGGLETEDDYG

O. viverini YTGKDGICYMDQSKFVAYVNGSTRLPWCEKTQAKSLKEIGPLSSGLNAVLLQLYKRGIMR
C. sinensis YEGREGQCRMVPSKVYVYINGSKILPEDEQIQAQMLKETGPLSSALNALFLQFYTEGILH
H. sapiens YQGHMQSCNFSAEKAKVYINDSVELSQNEQKLAAWLAKRGPISVAINAFGMQFYRHGISR
B. taurus YRGRLQTCFSAEKAKVYINDSVELSKNEQKLAAWLAKNGPVSIAINAFGMQFYRHGISH
M. musculus YQGHVQTCNFSAQMAKVYINDSVELSRNENKIAAWLAQKGPISVAINAFGMQFYRHGIAH

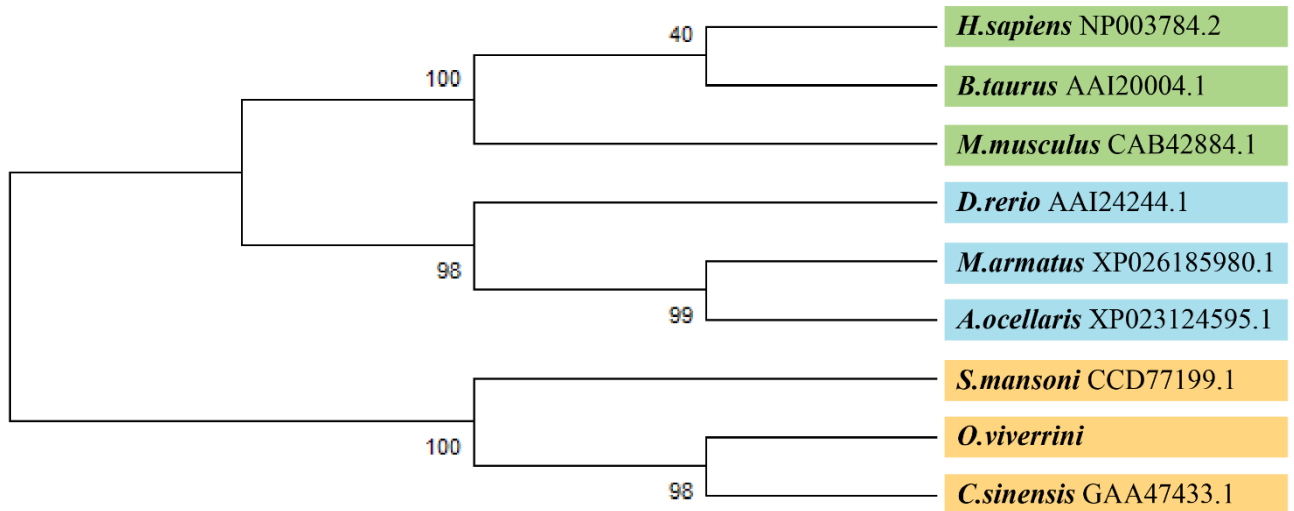
O. viverini --PRWCNPAELNHAVLTVGYGMEHRMPYWIVKNSWGKRFGEKGYFRIYRGDGTGGINRAV
C. sinensis PLPALCDAQSLNHAVLTVGYGKEGRLPYWTVKNSWSTMFGENGYFRIYRGDGTGGINTLV
H. sapiens PLRPLCSPWLIDHAVLLVGYGNRSVDFWAIKNSWGTDWGEGYGYLHRGSGACGVNTMA
B. taurus PLRPLCSPWLIDHAVLLVGYGNRSVDFWAIKNSWGTDWGEGYGYLHRGSGACGVNIMA
M. musculus PFRPLCSPWFIDHAVLLVGYGNRSNIPYWAIKNSWGSWGEEGYGYLHRGSGACGVNTMA

O. viverini TTAVVKNH
C. sinensis STSIIL--
H. sapiens SSAVVD--
B. taurus SSAVIN--
M. musculus SSAVNV--

▼ : Cysteine residues ★ : Active sites ■ : Enzyme domain

ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OvCatF กับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ชนิดอื่นอื่น โดยเปรียบเทียบกับ *C. sinensis* (GAA47433.1) ซึ่งพยาธิในกลุ่มเดียวกันกับพยาธิ *O. viverrini* และเปรียบกับโฮสต์ในธรรมชาติได้แก่ คน (NP_003784.2) หนู (CAB42884.1) และวัว (AAI20004.1) โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ตำแหน่งของ Active sites คือบริเวณ Cysteine Histidine และ Asparagine (สัญลักษณ์ดาว) พบส่วนของ Cysteine residues (สัญลักษณ์ลูกศรสีดำ) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteinase นอกจากนี้พบ Domain enzyme ของโปรตีน OvCatF และพบบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์ของกรดอะมิโนคือ ERFNAQ

การทำ Phylogenetic tree เพื่อดูความใกล้ชิดของโปรตีน Cathepsin F ในสิ่งมีชีวิต species ต่างๆ



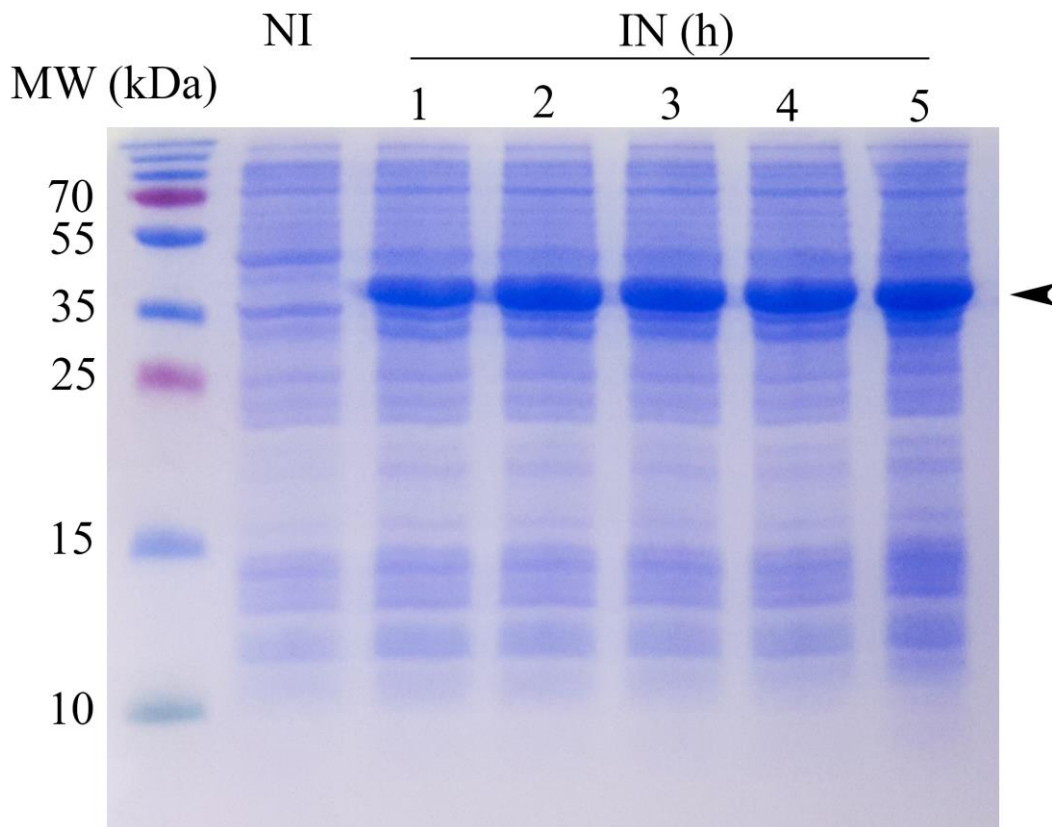
รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ของ OvCatF พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* กับ CatF ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

จากแผนภาพ Phylogenetic tree พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OvCatF ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความใกล้ชิดกับกลุ่มพยาธิ *S.mansoni* กับ *C.sinensis*

การแสดงออกของโปรตีน rOvCatF

Time Course

หลังจากใส่ IPTG เพื่อ induce ให้เกิดการ express ของโปรตีน แล้วเก็บเซลล์ทุกชั่วโมงเพื่อนำมาวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่า ในชั่วโมงที่ 0 ยังไม่เกิดการ expression ของโปรตีน โดยจากรูปจะเห็นว่าโปรตีนที่ต้องการจะเริ่ม expression ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 เป็นต้นไป เพิ่มขึ้นตามลำดับในชั่วโมงที่ 2 และ 3 ซึ่งมีการ expression ของโปรตีนมากที่สุด เมื่อเวลาผ่านไปชั่วโมงที่ 4 และ 5 จะเห็นว่า โปรตีนมีการ expression คงที่ (ภาพที่ 6)



รูปที่ 6 SDS-PAGE วิเคราะห์การถูก induce ของโปรตีน rOvCatF ที่เวลาต่างๆ กัน โดยใช้สีย้อม Coomassie blue

Lane M : Protein Maker

Lane NI : Non-induce

Lane H0 : หลังจากใส่ IPTG .ในชั่วโมงที่ 0

Lane H1 : หลังจากใส่ IPTG .ในชั่วโมงที่ 1

Lane H2 : หลังจากใส่ IPTG .ในชั่วโมงที่ 2

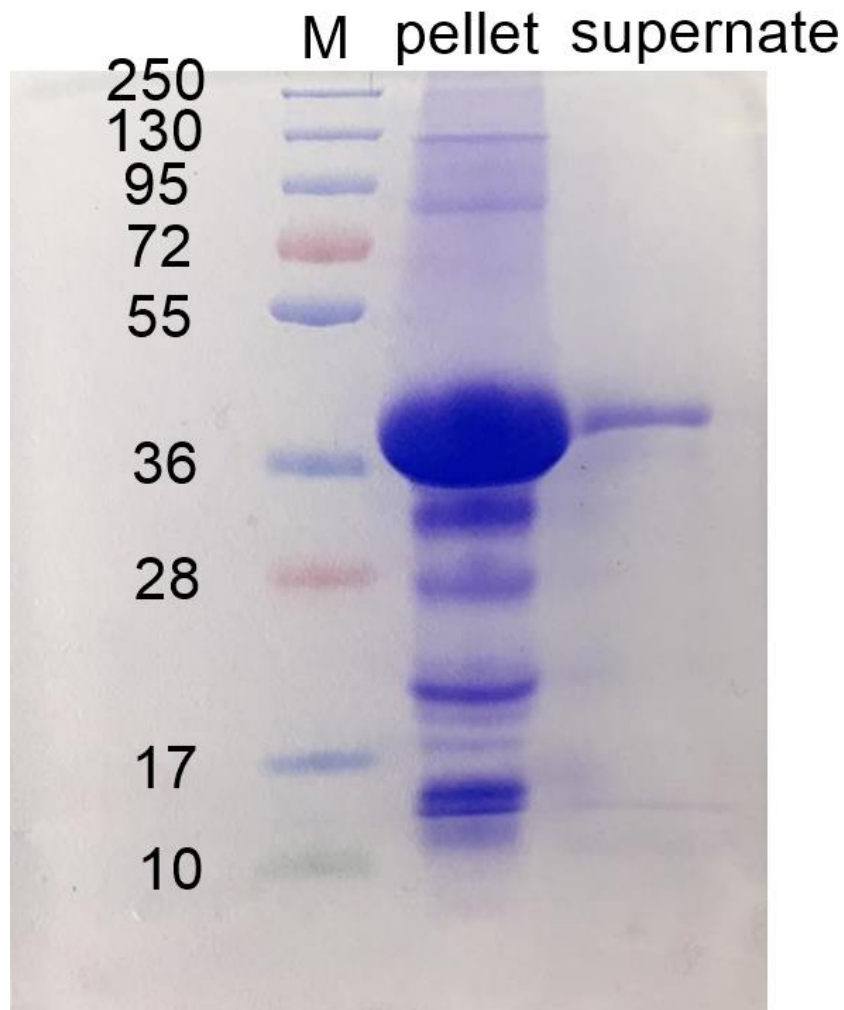
Lane H3 : หลังจากใส่ IPTG .ในชั่วโมงที่ 3

Lane H4 : หลังจากใส่ IPTG .ในชั่วโมงที่ 4

Lane H5 : หลังจากใส่ IPTG .ในชั่วโมงที่ 5

Determination of target protein solubility

เมื่อทำการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนแล้ว นำเซลล์ที่ถูก expression มาสกัดโปรตีนด้วย PBS แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารละลายและตะกอนเซลล์ จึงนำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สังเคราะห์ได้อยู่ใน pellet (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 SDS-PAGE วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน โดยใช้สีย้อม Coomassie blue

Lane M : Protein Maker

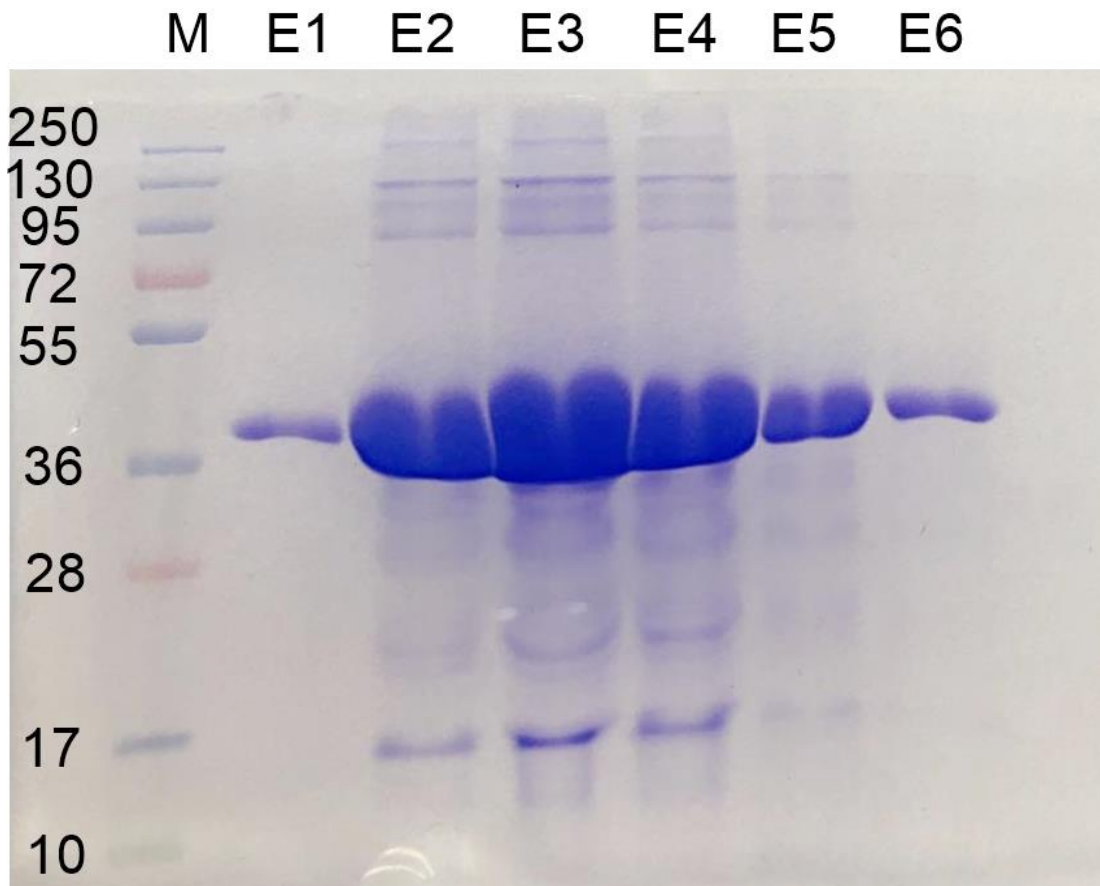
Lane pellet : การแสดงออกของโปรตีน rOvCatF ใน pellet

Lane supernate : การแสดงออกของโปรตีน rOvCatF ใน supernate

Purification

ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนนั้น ทำโดยการล้างโปรตีนที่ไม่ต้องการออกด้วยการใช้ Wash Buffer

Elution หลังจากล้างโปรตีนที่ไม่ต้องการออกจาก column แล้ว จึงใช้ Elution Buffer ล้างโปรตีนที่ต้องการ ออกมา โปรตีนจะเริ่มออกมาตั้งแต่ E1 ออกมามากที่สุดที่ E3 แล้วเริ่มน้อยลงที่ E4, E5, E6, E7, E8, E9 และ E10 ตามลำดับ (ภาพที่ 8 และ 9) เมื่อได้โปรตีนออกมาแล้วนำมาวิเคราะห์ต่อด้วย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่ได้เป็นโปรตีน rOvCatF เพียงชนิดเดียว ปราศจากโปรตีนอื่นๆ เจือปน (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 8 SDS-PAGE วิเคราะห์ purification ของ rOvCatF จากการ express ใน *E. coli* ภายใต้ Denature condition โดยใช้สี Coomassie blue ย้อม

Lane M : Protein Maker

Lane E1 : ล้าง Elution Buffer ครั้งที่ 1

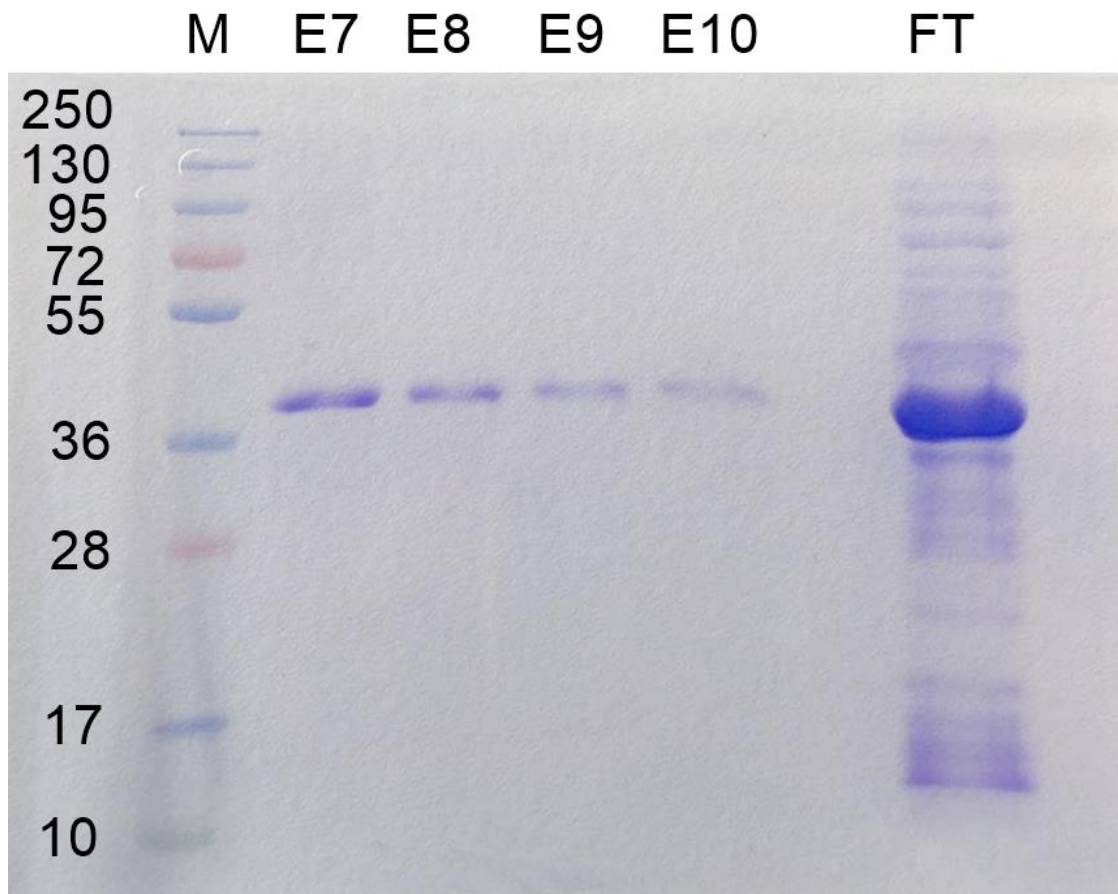
Lane E2 : ล้าง Elution Buffer ครั้งที่ 2

Lane E3 : ล้าง Elution Buffer ครั้งที่ 3

Lane E4 : ล้าง Elution Buffer ครั้งที่ 4

Lane E5 : ล้าง Elution Buffer ครั้งที่ 5

Lane E6 : ล้าง Elution Buffer ครั้งที่ 6



ภาพที่ 9 SDS-PAGE วิเคราะห์ purification ของ rOvCatF จากการ express ใน *E. coli* ภายใต้ Denature condition โดยใช้สี Coomassie blue ย้อม

Lane M : Protein Maker

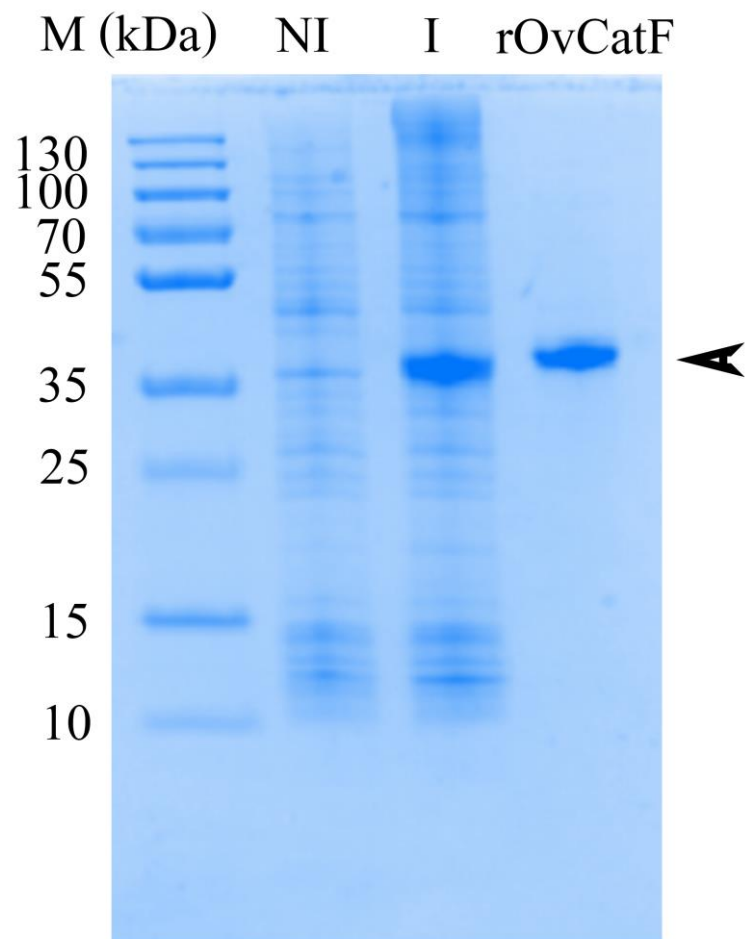
Lane E7 : ล้าง Elution Buffer ครั้งที่ 7

Lane E8 : ล้าง Elution Buffer ครั้งที่ 8

Lane E9 : ล้าง Elution Buffer ครั้งที่ 9

Lane E10 : ล้าง Elution Buffer ครั้งที่ 10

Lane FT : Flow-through



ภาพที่ 10 SDS-PAGE วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีน rOvCatF หลังจากใช้ Elution Buffer ล้างออกมาจาก column โดยใช้สี Coomassie blue ย้อม

Lane M : Protein Maker

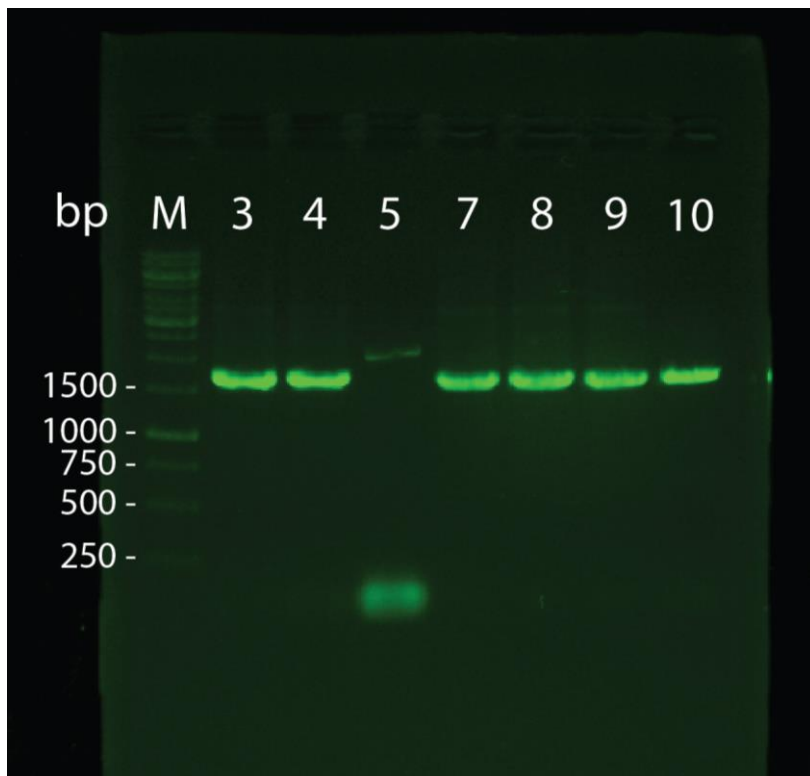
Lane NI : non induce with IPTG

Lane I : induce with IPTG

Lane rOvCatF : โปรตีน rOvCatF

การโคลนยีน Leucine aminopeptidase (OvLAP)

ทำการเชื่อมยีน OvLAP ของพยาธิใบไม้ตับ *Orpisthorchis viverini* เข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy vector (DNA ligation) แล้วนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของ *E.coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock transformation ต่อมานำเชื้อไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและนำไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในเชื้อ *E.coli* DH5 α โดยทำการเลือกเชื้อที่เพาะเลี้ยงมาโคโลนี 10 colonies เพื่อนำมาตรวจสอบหายีน LAP ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำไปรันเจล agarose 1% ได้ผลดังนี้



ภาพที่ 11

รูปที่ 11 ผลการทำ colony PCR clone ที่ 1-10

จากผลการทำ Colony PCR ข้างต้น พบว่าโคลนที่ 3, 4, 7, 8, 9 และ 10 เกิด band ขนาดประมาณ 1,500 bp เมื่อเทียบกับ DNA ladder จึงคาดว่าโคลนที่ 3, 4, 7, 8, 9 และ 10 น่าจะมียีน OvLAP อยู่ จึงนำโคลนดังกล่าวไปสกัดพลาสมิดและทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับเบสต่อไป

การสกัดพลาสมิดและการหาลำดับเบสของ clone ที่ 3, 4, 7, 8, 9 และ 10

นำโคลนที่ 3, 4, 7, 8, 9 และ 10 มาเลี้ยงใน LB broth ที่มียา ampicillin ผสมอยู่ บ่มที่ 37 °C เซย่าตลอด เวลา เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดแล้วส่งทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ถัดมาได้้นำผลการทำ DNA sequencing มาแปลรหัสจากลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโน ได้ผลดังนี้

DNA : ATGTCTGTGAGCCGTAGCGTCACTGGAGATTTCGGGGTGAACGCGCAAGAACAGGGCATT
aa : M S V S R S V T G D S G V N A Q E Q G I

DNA : TGTGCCATAACAGTACCCATCAATGTGTGTAATCAGTTGAACTCCAGCGATCACGACTGT
aa : C A I T V P I N V C N Q L N S S D H D C

DNA : CTTGTCTGGTTACCGATGACGTATCCATCTTACCGGCCGAATTCGAACTGATTTTCGCAG
aa : L V L V T D D V S I L P A E F E L I S Q

DNA : TGCCTATCGGCGCAAAATAGTATTGTGCCCGAGTTTCATTCTGGGGTTCATTTAATCTAC
aa : C L S A Q N S I V P E F H S G V H L I Y

DNA : TGCAGTCCTTACCTTCCAAAAGAATAGTTCTCTCGTTTACAGGTTTCGCTTGATCGTGAT
aa : C E S L P S K R I V L S F T G S L D R D

DNA : TATGATGACATTCGGCGCGTTTCTGAGGCTGCCCGCGATGGGATTTACATGCCTTGAAA
aa : Y D D I R R V S E A A R D G I S H A L K

DNA : ATCGGATCCATAAGGCCTTTATTGGCTTTGACACCTTTGAAAGCTCTGGAGAAAATACGG
aa : I G S I R P L L A L T P L K A L E K I R

DNA : GTCCTTCCCAGCTGGGCGAAGCCCGAGGCCTTGTGCCTATCCACTTTACTTGGTGCATTG
aa : V L P S W A K P E A L C L S T L L G A L

DNA : CATGCACTCTATGTTCCGCTGGAGGTGCGAGAATTCGCATTGAGGCCAGTCAAGTCTGAC
aa : H A L Y V P L E V R E F A L R P V K S D

DNA : TTACACAAGTCTGTCAAGCCATCCAAAGTGACTTCTCTCGGTTGGTTTCTGGCACGTAT
aa : L H K S V K P S K V T S L G W F P G T Y

DNA : ACAGTTGACCACACTCACCTGGTGCACATTGCCTGGTGTCTCGAGGAGGGCCGTCGCGTT
aa : T V D H T H L V H I A W C L E E G R R V

DNA : TGCCGTGACATAGGTGGATCTGATCCTGAACGCATGTGTGCTAGCCGCATTGTTGATTAC
aa : C R D I G G S D P E R M C A S R I V D Y

DNA : ATCAAGGCAGAGCTGAGTGATACTGGCGTTGTGGTTAAAACGGGTCCGGTGGATGCGACA
aa : I K A E L S D T G V V V K T G P V D A T

DNA : CTCTATCCTCTGGCTGCTGCTGTAGATCGAGGCAGCAATGAACGTCACCGAGGAGCCATA
aa : L Y P L A A A V D R G S N E R H R G A I

DNA : GTCCATCTGGAATATTCGGGACCATTAGCCGATGACCCAAATGGCTCAGAAGTTACCAAC

aa : V H L E Y S G P L A D D P N G S E V T N

DNA: TTATTCCTGATCGGCAAGGGGATTGTTTATGATACAGGTGGTTCTGATTTGAAAGTCGGA

aa : L F L I G K G I V Y D T G G S D L K V G

DNA: GGGATTATGGCCACAATGCACCGGGACAAGTGTGGAGCGGCTGCTGTTGTAGGATTTTTC

aa : G I M A T M H R D K C G A A A V V G F F

DNA: AAAACAGCCGCGTTGTTGAAGCCTGAGAACTAAGGCTTCACGGCAGCCTGGCAATTGTC

aa : K T A A L L K P E K L R L H G S L A I V

DNA: CGGAACAGTATCGGTTCGAATGCTTACGTCAGCGATGAAATTATAACTTCGCGCGCTGGA

aa : R N S I G S N A Y V S D E I I T S R A G

DNA: CTACGCGTACGCGTGAATAATACTGATGCTGAAGGTCGGATGGTCATGACGGATCTTCTA

aa : L R V R V N N T D A E G R M V M T D L L

DNA: TGTGAAGCAAAGGAACAGGCACTTCAGGTGGTCAACCCGCATCTCATGACATTTGCAACT

aa : C E A K E Q A L Q V V N P H L M T F A T

DNA: TTGACTGGGCATGTTGTATTGTCATACGGACCAAACCTACACGGGAATAGTAGCTAACGGC

aa : L T G H V V L S Y G P N Y T G I V A N G

DNA: CCTTCGCGCGTCATGGGAGCTGATCAGACCTTCCAAAGTTATGGCGAGCTGCTAGGGCAA

aa : P S R V M G A D Q T F Q S Y G E L L G E

DNA: ATGCACGAGATATCAACACTTCGTCGTGAAGACTTTGACGCCCATAAAGCCCAAGAGGAG

aa : M H E I S T L R R E D F D A H K A Q E E

DNA: TATGCAGACCTCATCAACGCGGCTCGTCCAGTTGGAGGAAAACGTGTTTCGGGGACATCAA

aa : Y A D L I N A A R P V G G K R V R G H Q

DNA: TCACCTGCTGCTTTTATGATAGTTGCATCTGGGTAGATTTCGCACATGACAAAACGCGGAG

aa : S P A A F M I V A S G L D S H M T N A E

DNA: AAACCGTTACCATACACGCACTTCGACATTGCTGGAAGTCAGGGTCCTTGTCCCGGTATA

aa : K P L P Y T H F D I A G S Q G P C P G I

DNA: CCCACCGCTGTGCCGTTGTTGACGTTAGCGTCACGATACCTGCTTCAGGGCTTCTGGGAG

aa : P T A V P L L T L A S R Y L L Q G F W E

DNA: GTGGTTTCCAAACTG

aa : V V S K L

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน

ลำดับต่อมาทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลเพื่อตรวจสอบความเหมือนกันระหว่างโปรตีน OvLAP สังเคราะห์ขึ้นมากับโปรตีน LAP (GenBank: KX187340.1) ในพยาธิ *Opisthorchis viverrini* ได้ผลดังนี้

```
OvLAP      MSVSRSVTGD SGVNAQEQGICAITVPIVNCNQLNSSDHDCLVLVTDDVSILPAEFELISQ
N5         MSVSRSVTGD SGVNAQEQGICAITVPIVNCNQLNSSDHDCLVLVTDDVSILPAEFELISQ
N4         MSVSRSVTGD SGVNAQEQGICAITVPIVNCNQLNSSDHDCLVLVTDDVSILPAEFELISQ
N6         MSVSRSVTGD SGVNAQEQGICAITVPIVNCNQLNSSDHDCLVLVTDDVSILPAEFELISQ
N2         MSVSRSVTGD SGVNAQEQGICAITVPIVNCNQLNSSDHDCLVLVTDDVSILPAEFELISQ
          *****:*****.******
```

```
OvLAP      CLSAQNSIVPEFHSGVHLYICESLPSKRIVLSFTGSLDRDYDDIRRVSEAARDGISHALK
N5         CLSAQNSIVPEFHSGVHLYICESLPSKRIVLSFTGSLDRDYDDIRRVSEAARDGISHALK
N4         CLSAQNSIVPEFHSGVHLYICESLPSKRIVLSFTGSLDRDYDDIRRVSEAARDGISHALK
N6         CLSAQNSIVPEFHSGVHLYICESLPSKRIVLSFTGSLDRDYDDIRRVSEAARDGISHALK
N2         CLSAQNSIVPEFHSGVHLYICESLPSKRIVLSFTGSLDRDYDDIRRVSEAARDGISHALK
          *****
```

```
OvLAP      IGSIRPLLALTPLKALEKIRVLP SWAKPEALCLSTLLGALHALYVPLEVREFALRPVKSD
N5         IGSIRPLLALTPLKALEKIRVLP SWAKPEALCLSTLLGALHALYVPLEVREFALRPVKSD
N4         IGSIRPLLALTPLKALEKIRVLP SWAKPEALCLSTLLGALHALYVPLEVRE LALRPVKSD
N6         IGSIRPLLALTPLKALEKIRVLP SWAKPEALCLSTLLGALHALYVPLEVRE LALRPVKSD
N2         IGSIRPLLALTPLKALEKIRVLP SWAKPEALCLSTLLGALHALYVPLEVRE LALRPVKSD
          ***:*****:*****
```

```
OvLAP      LHKSVKPSKVTSLGWFP GTYTV DHTHLVHIAWCLEEGRRVCRDIGGSDPERMCASRIVDY
N5         LHKSVKPSKVTSLGWFP GTYTV DHTHLVHIAWCLEEGRRVCRDIGGSDPERMCASRIVDY
N4         LHKSVKPSKVTSLGWFP GTYTV DHTHLVHIAWCLEEGRRVCRDIGGSDPERMCASRIVDY
N6         LHKSVKPSKVTSLGWFP GTYTV DHTHLVHIAWCLEEGRRVCRDIGGSDPERMCASRIVDY
N2         LHKSVKPSKVTSLGWFP GTYTV DHTHLVHIAWCLEEGRRVCRDIGGSDPERMCASRIVDY
          *****
```

```
OvLAP      IKAELSDTG VVVK TGPV EATLYPLAAAVDRGSNERHRGAI V HLEYSGLADDPNGSEVTN
N5         IKAELSDTG VVVK TGPV DATLYPLAAAVDRGSNERHRGAI V HLEYSGLADDPNGSEVTN
N4         IKAELSDTG VVVK TGPV DATLYPLAAAVDRGSNERHRGAI V HLEYSGLADDPNGSEVTN
N6         IKAELSDTG VVVK TGPV DATLYPLAAAVDRGSNERHRGAI V HLEYSGLADDPNGSEVTN
N2         IKAELSDTG VVVK TGPV DATLYPLAAAVDRGSNERHRGAI V HLEYSGLADDPNGSEVTN
          *****:*****
```

```
OvLAP      LFLIGKGI VYDTGGSDLK VGGIMATMHRDKCGAAAVVGF FKTAA LLKPEKLR LHGSLAIV
N5         LFLIGKGI VYDTGGSDLK VGGIMATMHRDKCGAAAVVGF FKTAA LLKPEKLR LHGSLAIV
N4         LFLIGKGI VYDTGGSD SKVGGIMATMHRDKCGAAAVVGF FKTAA LLKPEKLR LHGSLTIV
N6         LFLIGKGI VYDTGGSDLK VGGIMATMHRDKCGAAAVVGF FKTAA LLKPEKLR LHGSLAIV
N2         LFLIGKGI VYDTGGSDLK VGGIMATMHRDKCGAAAVVGF FKTAA LLKPEKLR LHGSLAIV
          ***** *****:*****
```

```
OvLAP      RNSIGSNAYVSDEIITSRAGLRVRVNNTDAEGRMVMTDLLCEAKEQALQV VNP HLMTFAT
N5         RNSIGSNAYVSDEIITSRAGLRVRVNNTDAEGRMVMTDLLCEAKEQALQV VNP HLMTFAT
N4         RNSIGSNAYVSDEIITSRAGLRVRVNNTDAEGRMVMTDLLCEAKEQALQV VNP HLMTFAT
N6         RNSIGSNAYVSDEIITSRAGLRVRVNNTDAEGRMVMTDLLCEAKEQALQV VNP HLMTFAT
N2         RNSIGSNAYVSDEIITSRAGLRVRVNNTDAEGRMVMTDLLCEAKEQALQV VNP HLMTFAT
          *****
```

```
OvLAP      LTGHVVLSYGP NYTGIVANGPSRVMGADQTFQSYGELLGEMHEI STLRRDFDAHKAQEE
N5         LTGHVVLSYGP NYTGIVANGPSRVMGADQTFQSYGELLGEMHEI STLRRDFDAHKAQEE
N4         LTGHVVLSYGP NYTGIVANGPSRVMGADQTFQSYGELLGEMHEI STLRRDFDAHKAQEE
N6         LTGHVVLSYGP NYTGIVANGPSRVMGADQTFQSYGELLGEMHEI STLRRDFDAHKAQEE
N2         LTGHVVLSYGP NYTGIVANGPSRVMGADQTFQSYGELLGEMHEI STLRRDFDAHKAQEE
          ***** * *****
```

```

OvLAP      YADLINAARPVGGKRVRGHQSPAAFMIVASGLDSHMTNAEKPLPYTHFDIAGSQGPCPGI
N5         YADLINAARPVGGKRVRGHQSPAAFMIVASGLDSHMTNAEKPLPYTHFDIAGSQGPCPGI
N4         YADLINAARPVGGKRVRGHQSPAAFMIVASGLDSHMTNAEKPLPYTHFDIAGSQGPCPGI
N6         YADLINAARPVGGKRVRGHQSPAAFMIVASGLDSHMTNAEKPLPYTHFDIAGSQGPCPGI
N2         YADLINAARPVGGKRVRGHQSPAAFMIVASGLDSHMTNAEKPLPYTHFDIAGSQGPCPGI
          *****

```

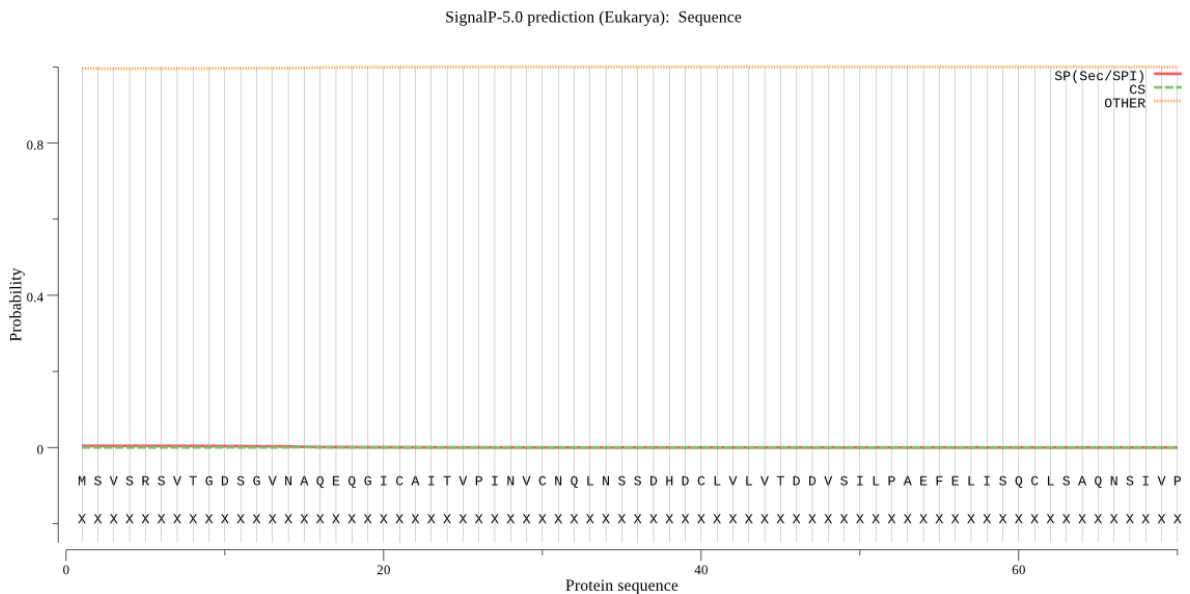
```

OvLAP      PTAVPLLTLASRYLLQGFWEVVS KL
N5         PTAVPLLTLASRYLLQGFWEVVS KL
N4         PTAVPLLTLASRYLLQGFWEVVS KL
N6         PTAVPLLTLASRYLLQGFWEVVS KL
N2         PTAVPLLTLASRYLLQGFWEVVS KL
          *****

```

จากผลการเปรียบเทียบทั้ง 4 โคลน พบว่าโคลนที่ 5 (N5) มีลำดับอะมิโนตรงกับโปรตีน LAP (GenBank: KX187340.1) ทำให้โคลนที่ 5 มีความเหมาะสมสำหรับนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนถัดต่อไป

การตรวจสอบ Signal peptide



ทำการตรวจสอบ Signal peptide ผ่านเว็บไซต์ <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> จากการทำนาย Signal peptide ในโปรตีนสังเคราะห์ OvLAP พบว่าไม่มีส่วนใดของโปรตีนที่เป็น Signal peptide จึงเหมาะกับการสังเคราะห์โปรตีน OvLAP ในแบคทีเรีย

การเปรียบเทียบลำดับอะมิโนของ Leucine aminopeptidase ของ *Opisthorchis viverrini* กับ species อื่น

```
OvLAP -----MSVSRSVTGDSGVNAQEQGICAITVPIIN
CsLAP_RJW68263 TPFACALRANGSRRTARTKPAREWAKASIFCFKPRSVTGDLGMNAQDQIGICAKTVPIIS
PwLAP_ABL96626.2 -----MEHLPTTAVT
FgLAP_ACS94976.1 -----MAALAV
FhLAP_AAV59016 -----MAALAV
SmLAP_XP_002574445.1 -----MSTSVVTPVF
SjLAP_AFN58250 -----MSLVTPAF
HsLAP_AAD17527 -----MFLLPLPAAGR VVVRR LAVVRS
MmLAP_AAK13495 -----MYLLPLPAAARVALRRLGVRGL
BtLAP_AAB28170 -----MPPPGSPWPSE RQPARTL
```

```
OvLAP VCNQLNSSDHDCLVLVTDVVSILPAEFELISQCLSAQNSIVPEFHSGVHLYICESLPS--
CsLAP_RJW68263 VCSQLNSSDHDCLVLVADVVSILPTEFELISQCLSAQNSIVSEFHSGIHVYICESLPS--
PwLAP_ABL96626.2 LSSDLSTAECDSVVLVLEDVNVLSNFSPISSTLNCWNKSFSKLNSGVHVIYCEELPS--
FgLAP_ACS94976.1 GVSDDLSDKRFDVVIIFINDDAEGCAKDAAVYEALKSFSKINPHLGSELSIVPPFAHPS--
FhLAP_AAV59016 GVSDDLSDKRFDVVIIFINDDAEGCAKDAAVYEALKSFSKINPNLGESELSIVPPFAHPS--
SmLAP_XP_002574445.1 PVSCLTDPSTDAVLLLNDDIEHLPRDLQLAYKPLKEFSEVNPKFSDEVSVIIPPEHPS--
SjLAP_AFN58250 PVFNLVDSAYDAVLLLNDDVEHLPNALQLALNALKEFSEVNPKFSDEVSIIPFPQHPS--
HsLAP_AAD17527 GSRSLSTADMTKGLVVLGIYSKEKEDDVPQFTSAGENFDKLLAGKRETLNISGPPLKAGK
MmLAP_AAK13495 WDRGLSTADMTKGLVVLGIYAKDKDDLPQFTSAGESFNKLVSGKLEMLNISGPPLKAGK
BtLAP_AAB28170 AG---GCSDMTKGLVVLGIYSKEKEEEDVPQFTSAGENFNKLVSGKLEILNISGPPLKAGK
```

```
OvLAP KRIVLSFTGSLDRDYDDIRRVSEAAARDGISHALKIGSIRPLLALTPLKALEKIRVLPWSWA
CsLAP_RJW68263 KRIVLSFTGSLDRDYDDIRRVSEAAARDGISHALKIGSIRPLLALPLKALEKIRILPWSWA
PwLAP_ABL96626.2 HTLVVVSFTGALDRDFDDIRRIDTASDKDGIQAQALKAGSTKPMALAPFKTASKLRCS--WT
FgLAP_ACS94976.1 GRLIYSPTGALNTDTADIRNVYDAACAGVKRALSMGCHAPLLYLGL---SLRSASFGFEWM
FhLAP_AAV59016 GRLIYSPTGALNTDTADIRNVYDAACAGVKRALSMGCHAPLLYLGL---SLRSASFGFEWM
SmLAP_XP_002574445.1 KRLI FSPTGR LNTDEADIRNVYDAAVNGMLKLLKIGCKSPLLCCG---SFI SAPKDFQWC
SjLAP_AFN58250 KRLI FSPTGQLNTDEADIRNVYDAAVNGMLKLLKIGCKSPLLCCG---S FVSAPKDAQVS
HsLAP_AAD17527 TRTFYGLHQDFPVS VVLVGLGKKAAGIDEQENWHEGKENIRA AAVAAGCRQIQDLELSSVEV
MmLAP_AAK13495 TRTFYGLHQDFPVS VVLVGLGKRSAGVDDQENWHEGKENIRA AAVAAGCRQIQDLELPSVEV
BtLAP_AAB28170 TRTFYGLHEDFPVS VVLVGLGKKTAGIDEQENWHEGKENIRA AAVAAGCRQIQDLEIPSVEV
```

```
OvLAP KPEALCLSTLLGALHALYVPLEVREFALRPVKSDLHKS VKPSKVTSLGWFFG-TYTVDHT
CsLAP_RJW68263 KPEALCLSTLLGALHALYVPLEVREFTLRPVKSDLHKS VKPSKVTSLGWFFG-TYTVDHA
PwLAP_ABL96626.2 DPKSLCLAALLSALHELYE PLEVREFSMLPRTAELTKSIKASKVDSLFWFSGSHYAVDHS
FgLAP_ACS94976.1 QRKHLNALLGAYHALYLPLEVREMRPTTGLKAQHLGKEDTKGSD-----E
FhLAP_AAV59016 QRKHLNALLGAYHALYLPLEVREMRPTTGLKAQHLGKEDTKGSD-----E
SmLAP_XP_002574445.1 ERNCLLLNAILGAYHVLYTPLEVREMLPNKFPKAI RFGVMEADNS-----
SjLAP_AFN58250 ERNCLLLNAILGAYHALYTPLEVREMLPEKFPKAI RFGVMEADNS-----
HsLAP_AAD17527 DPCGDAQAAAAGAVLGLYEYDDLKQKKKMAVSAKLYGSGDQ-----
MmLAP_AAK13495 DPCGDAQAAAAGAVLGLYEYDDLKQKKKMAVSAKLYGSGDL-----
BtLAP_AAB28170 DPCGDAQAAAAGAVLGLYEYDDLKQKRKVVVSAKLYGSEDDQ-----
```

```
OvLAP HLVHIAWCLEEGRRVCRDIGGSDPERMCASRIVDYIKAELS-DTG VVVTKGPVDATLYPL
CsLAP_RJW68263 HLVHIAWCLEEGRRVCRDIGGSDPERMCASRIVDYIKAELS-DTG VVVTEGPDVAILYPL
PwLAP_ABL96626.2 KLIHVAVCLEEGRRVCRDIGGSDPERMRASHIVDYLKA EFA-DSGVTFRSGPDALKYPL
FgLAP_ACS94976.1 LVLRLAMALEEGRWLARDIGGSDPERMAAPRIVDY LKTSLSGLKGITMSVEKVDIQKYPL
FhLAP_AAV59016 LVLRLAMALEEGRWLARDIGGSDPERMAAPRIVDY LKTSLSGLKGITMSVEKVDIQKYPL
SmLAP_XP_002574445.1 -LLNIANAIEEGRTLARDIGGSDPERMAAPKIAEY LQNALNGLKGVTVTVDKVDAKKYPL
SjLAP_AFN58250 -LLNIAKAIIEGRTLARDIGGSDPERMAAPKIAEY LKNALDGLTGTVITINKVDAKKYPL
HsLAP_AAD17527 EAWQKGVLFASGQNLARQLMETPANEMTPTRFAE IIEKNLKSASSKTEVHIRPKSWIEEQ
MmLAP_AAK13495 EAWQKGVLFASGQNLARHLMESPANEMTPTRFAE IIEKNLKSASSKTKVHIRPKSWIEEQ
BtLAP_AAB28170 EAWQKGVLFASGQNLARRLMETPANEMTPTKFAE IVEENLKSASIKTDFVIRPKSWIEEQ
```

```
OvLAP AAVVDRGS--NERHRGAI VHLEYSGLPLADDPNGSEVTNLF LIGKGIIVYDTGGSDLKVG RG
CsLAP_RJW68263 AAVVDRGS--NERHRGAI VHLEYSGLPLADDPNDSEVTNLF LIGKGIIVYDTGGSDLKVG-G
PwLAP_ABL96626.2 AAVVDRGS--NDSRRESI VHLEYSGLPLADDPNDSEVTNLF LIGKGIIVYDTGGSDLKVG-G
FgLAP_ACS94976.1 MAAVNRAASVVARHDGRV VHLKYEPNPTE----VDT TLYLIGKGIITYDTGGADIKAN-G
FhLAP_AAV59016 MAAVNRAASVVARHDGRV VHLKYEPNPTE----VDT TLYLIGKGIITYDTGGADIKAN-G
SmLAP_XP_002574445.1 MAAVNRAASVVRPHDGRV VHVVDYKPSNSKE----ID TSLFLVVGKGIITFD TGGADV KAG-G
SjLAP_AFN58250 MAAVNRAASVVRPHDGRV VHVHIDYKPSNSKE----ID TSLFLVVGKGIITFD TGGADV KAG-G
HsLAP_AAD17527 AMGSFLSVAKGSEPPVFL EIH YMGSPNAN-----EP PLV FVGKGIITFD SGGISIKAS-A
MmLAP_AAK13495 EMGSFLSVAKGSEPPVFL EIH YMGSPNAT-----EAP L V FVGKGIITFD SGGISIKAS-A
BtLAP_AAB28170 EMGSFLSVAKGSEPPVFL EIH YMGSPNAS-----EP PLV FVGKGIITFD SGGISIKAA-A
```

```
OvLAP IMATMHRDKCGAAAVVGF FKTAA LLKPEKLR LHGSLAIVRNSIGSNAYVSDEIITSRAGL
CsLAP_RJW68263 IMATMHRDKCGAAAVVGF FKTAA LLKPEKLR LHGSLAIVRNSIGSNAYVSDEIITSRAGL
PwLAP_ABL96626.2 IMATMHRDKCGAAAVG FFKTAA LLKPEKLR LHGSLAIVRNSIGSSAYVSDEIITSRAGI
```

FgLAP_ACS94976.1	VMAGMHRDKCGAAAAGLFTKLTGLQPPGLSVSAAALAFVRNSVSGADSYVADEILVARSGQ
FhLAP_AAV59016	VMAGMHRDKCGAAAAGLFTKLTGLQPPGLSVSAAALAFVRNSVSGADSYVADEILVARSGQ
SmLAP_XP_002574445.1	IMAGMHRDKCGAAAAGLMTKLTIGLLQPDGIVSAGLAFVRNSIGSESYVADEII IARSQ
SjLAP_AFN58250	IMAGMHRDKCGAAAAGLMTKLTIGLLQPTGLSVSAAALAFVRNSVGEESYVADEII IARSQ
HsLAP_AAD17527	NMDLMRADMGGAATICSAIVSAAKLNLP-INI IGLAPLPCENMPGKANKPGDVRANKG
MmLAP_AAK13495	NMDLMRADMGGAATICSAIVSAAKLNLP-INI IGLAPLPCENMPGKANKPGDVRANKG
BtLAP_AAB28170	NMDLMRADMGGAATICSAIVSAAKLDLP-INIVGLAPLPCENMPGKANKPGDVRANKG
OvLAP	* *: * ***: . . : . * . : : . : * . . : . : : : *
CsLAP_RJW68263	RVRVNTDAEGRMVMTDLLCEAKEQALQVVPNPHLMTFATLTGHVVLSYGPNTGIVANGP
PwLAP_ABL96626.2	RVRVNTDAEGRMVMTDLLCEAKEQALQVVPNPHLMTFATLTGHVVLSYGPNTGIVANGP
FgLAP_ACS94976.1	RIRVNTDAEGRMVMTDLLCEAKEKAINATNPFLFTIATLTGHVVVRAY-KHYTAVMDNGP
FhLAP_AAV59016	RIRVNTDAEGRMVMTDLLCEAKEKAINATNPFLFTIATLTGHVVVRAY-KHYTAVMDNGP
SmLAP_XP_002574445.1	RVRIGNTDAEGRMVMDLLCEAKEKALTKNPFLFTIATLTGHVIRAY-KHFTAVMDNGP
SjLAP_AFN58250	RVRIGNTDAEGGTVMADLLCEAKEKALTAKNPFLFTVATLTGHVIRAY-KNYTSGYG---
HsLAP_AAD17527	TIQVDNTDAEGRLLADALCYAHTFNP----KVLNAATLTGAMDVALGSGATGVFTNSS
MmLAP_AAK13495	TIQVDNTDAEGRLLADALCYAHTFNP----KVIINAATLTGAMDVALGSGATGVFTNSS
BtLAP_AAB28170	TIQVDNTDAEGRLLADALCYAHTFNP----KVIINAATLTGAMDIALGSGATGVFTNSS
OvLAP	:::***** : : * * * : : : * * * * : : * .
CsLAP_RJW68263	SRVMGADQTFQSYGELLGEMHEI STLRRDFDAHKAQEEYADLINAARPVGGKRVGRHQS
PwLAP_ABL96626.2	SRVMGADQTFQSYGELLGEMHEI STLRRDFDAHKAQEEYADLINSARPVGGKRVGRHQS
FgLAP_ACS94976.1	ARLLKMDHIFQSQSGELLGEMSEI STLRRDYEAHKAHEPYADLLNSARPVGGKRVGRHQS
FhLAP_AAV59016	ARIHRVSQSLQEAGDRISDMAEISTVRKEDYEFNRGKTEYEDILQCNNLPSATPRGHQI
SmLAP_XP_002574445.1	PRIHRSVQSLQEAGDRISDMAEISTVRKEDYEFNRGKTEYEDILQCNNLPSATPRGHQI
SjLAP_AFN58250	ARVKKVSYELQNSGDLISDAEISTIRKEDYAMNKAKSEYEDLLQCNNLASSATPRGHQM
HsLAP_AAD17527	-----
MmLAP_AAK13495	WLWNKLFEAS IETGDRVWRMPLFEHYTR-----QVVDQCQLADVNNIGKYRSAGACTAAAF
BtLAP_AAB28170	WLWNKLFEASVETGDRVWRMPLFEHYTR-----QVIDCQLADVNNLIGKYRSAGACTAAAF
OvLAP	WLWNKLFEAS IETGDRVWRMPLFEHYTR-----QVIDCQLADVNNIGKYRSAGACTAAAF
CsLAP_RJW68263	PAAFMIVASGLDSHMTNAEKPLPYTHFDIAGSQGPCPGIPTAVPLLTLASRYLLQGFWEV
PwLAP_ABL96626.2	PAAFMIVASGLDSHMTNAEKPLPYTHFDIAGSQGPCPGIPTAVPLLTLASRYLLQGFWEV
FgLAP_ACS94976.1	PAAFMIVASGLDSHMCNSEKPLPYTHFDIAGSQGTCPGIPTAAPLLTLASQYLLGDYWQE
FhLAP_AAV59016	PAAFMALASGLDKHGLGSAKPIPYTHVDVAGSAAEIHVLPPTAAPLLMFASRYVLPRLGFK
SmLAP_XP_002574445.1	PAAFMLASGLDKHGLGSAKPIPYTHVDVAGSATEIHVLPPTAAPLLMFASRYVLPRLGFK
SjLAP_AFN58250	PAAFVLVVASGLDKHGLDQVRIPIPYTHVDVAGSAGDINVTPTAAPLLMFARKYILPRLSFK
HsLAP_AAD17527	-----
MmLAP_AAK13495	LKEFVTHP-----KWAHLDIAGVMTNKDEVPYLRKGMTGRPTRTLIEFLLR
BtLAP_AAB28170	LREFVTHP-----KWAHLDIAGVMTNKDEIPYLRKGMGRPTRTLIEFLLR
OvLAP	LKEFVTHP-----KWAHLDIAGVMTNKDEVPYLRKGMAGRPTRTLIEFLFR
CsLAP_RJW68263	VSKLNH
PwLAP_ABL96626.2	VSKL--
FgLAP_ACS94976.1	LLKVRL
FhLAP_AAV59016	-----
SmLAP_XP_002574445.1	-----
SjLAP_AFN58250	-----
HsLAP_AAD17527	FSQDNA
MmLAP_AAK13495	FSKDSS
BtLAP_AAB28170	FSQDSA

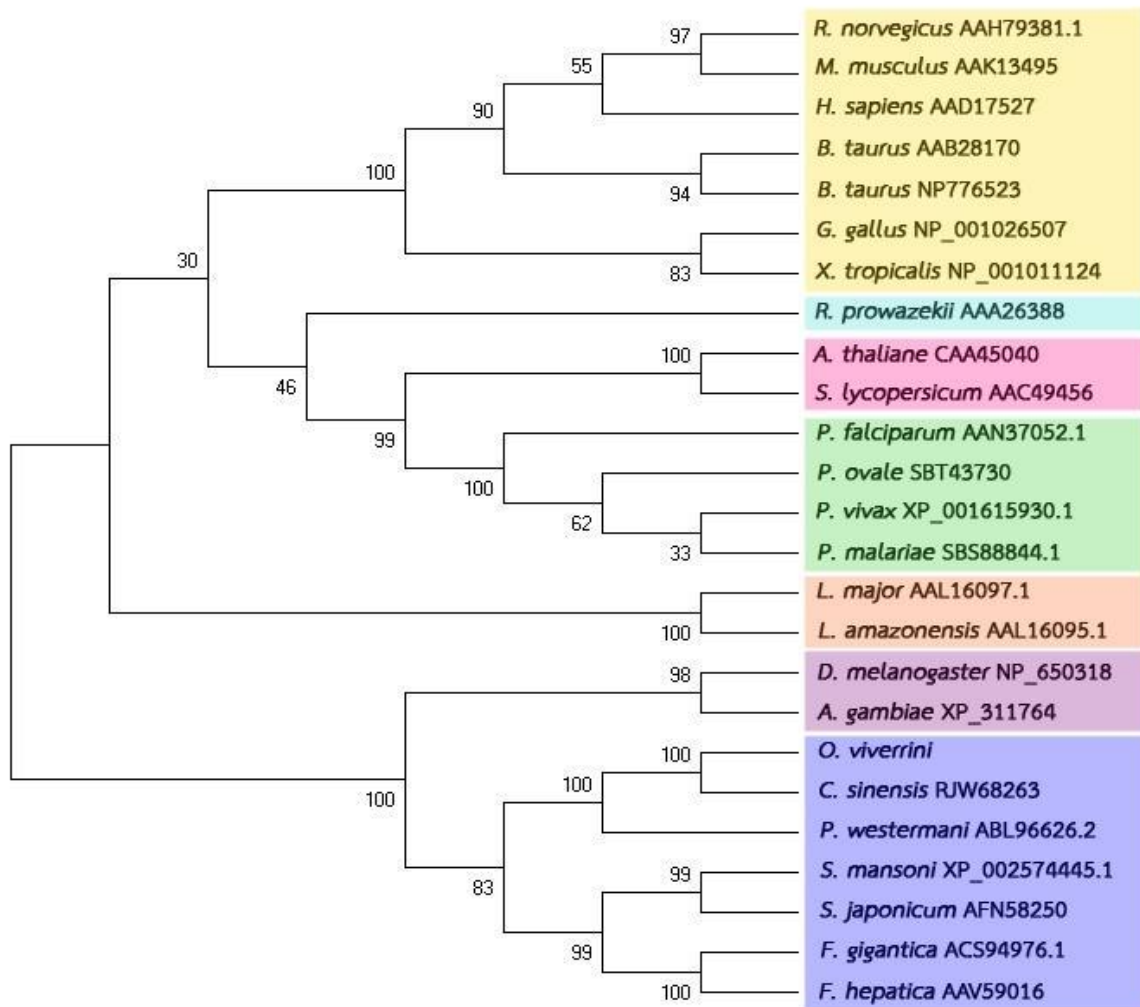
■ : catalytic site ■ : metal binding site

ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OvLAP กับสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ชนิดอื่นอื่น โดยเปรียบเทียบ กับ *C. sinensis* (CsLAP; RJW68263), *P. westermani* (PwLAP; ABL96626.2), *F. gigantica* (FgLAP; ACS94976.1), *F. hepatica* (FhLAP; AAV59016), *S. mansoni* (SmLAP; XP_002574445.1), *S. japonicum* (SjLAP; AFN58250), *H. sapiens* (HsLAP; AAD17527), *M. musculus* (MmLAP; AAK13495) และ *B. taurus* (BtLAP; AAB28170) โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ตำแหน่งของ catalytic site คือบริเวณ NTDAEGR L นอกจากนี้พบ metal binding site ของโปรตีน OvLAP คือบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์ของกรดอะมิโน VGKG

	<i>O. viverrini</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>P. westermani</i>	<i>S. japonicum</i>	<i>F. gigantica</i>	<i>F. hepatica</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>M. musculus</i>	<i>B. Taurus</i>	<i>H. sapiens</i>
<i>O. viverrini</i>	1									
<i>C. sinensis</i>	0.937	1								
<i>P. westermani</i>	0.659	0.672	1							
<i>S. japonicum</i>	0.417	0.412	0.659	1						
<i>F. gigantica</i>	0.415	0.413	0.363	0.633	1					
<i>F. hepatica</i>	0.413	0.411	0.361	0.631	0.987	1				
<i>S. mansoni</i>	0.411	0.413	0.419	0.869	0.660	0.656	1			
<i>M. musculus</i>	0.146	0.152	0.145	0.171	0.156	0.156	0.158	1		
<i>B. Taurus</i>	0.144	0.154	0.150	0.171	0.154	0.154	0.160	0.869	1	
<i>H. sapiens</i>	0.139	0.156	0.150	0.173	0.154	0.156	0.156	0.902	0.881	1

รูปที่ 12 ตารางแสดงความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน LAP

การศึกษาความใกล้ชิดของโปรตีน LAP จากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ด้วยแผนภูมิต้นไม้



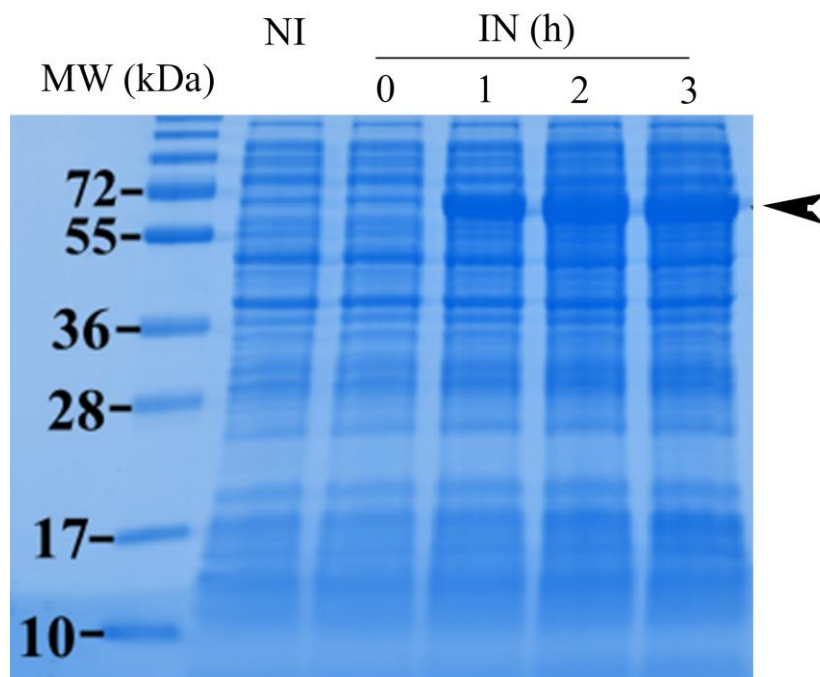
รูปที่ 13. แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ของโปรตีน LAP ระหว่าง *O. viverrini*, *R. norvegicus* (AAH79381.1), *M. musculus* (AAK13495), *H. sapiens* (AAD17527), *B. taurus* (AAB28170), *B. taurus* (NP776523), *X. tropicalis* (NP_001011124), *R. prowazekii* (AAA26388), *A. thaliane* (CAA45040), *S. lycopersicum* (AAC49456), *P. falciparum* (AAN37052.1), *P. ovale* (SBT43730), *P. vivax* (XP_001615930.1), *P. malariae* (SBS88844.1), *L. major* (AAL16097.1), *L. amazonensis* (AAL16095.1), *D. melanogaster* (NP_650318), *A. gambiae* (XP_311764), *C. sinensis* (RJW68263), *P. westermani* (ABL96626.2), *S. mansoni* (XP_002574445.1), *S. japonicum* (AFN58250), *F. gigantica* (ACS94976.1) และ *F. hepatica* (AAV59016) พบว่าโปรตีน LAP จากพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มีความใกล้ชิดกับพยาธิใบไม้ตับชนิด *C. sinensis*

จากแผนภาพ Phylogenetic tree พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OvLAP ที่สังเคราะห์ขึ้นมามีความใกล้เคียงกับกลุ่มพยาธิ *C.sinensis* กับ *P.westermani*

การแสดงออกของโปรตีน rOvLAP

Time Course

หลังจากใส่ IPTG เพื่อ induce ให้เกิดการ express ของโปรตีน แล้วเก็บเซลล์ทุกชั่วโมงเพื่อนำมาวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่า ในชั่วโมงที่ 0 ยังไม่เกิดการ expression ของโปรตีน โดยจากรูปจะเห็นว่าโปรตีนที่ต้องการจะเริ่ม expression ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 เป็นต้นไป เพิ่มขึ้นตามลำดับในชั่วโมงที่ 2 และ 3 ซึ่งมีการ expression ของโปรตีนมากที่สุด เมื่อเวลาผ่านไปชั่วโมงที่ 2 และ 3 จะเห็นว่า โปรตีนมีการ expression คงที่ (ภาพที่ 14)



รูปที่ 14 SDS-PAGE วิเคราะห์การถูก induce ของโปรตีน rOvLAP ที่เวลาต่างๆ กัน โดยใช้สีย้อม Coomassie blue

Lane M : Protein Maker

Lane NI : Non-induce

Lane H0 : หลังจากใส่ IPTG .ในชั่วโมงที่ 0

Lane H1 : หลังจากใส่ IPTG .ในชั่วโมงที่ 1

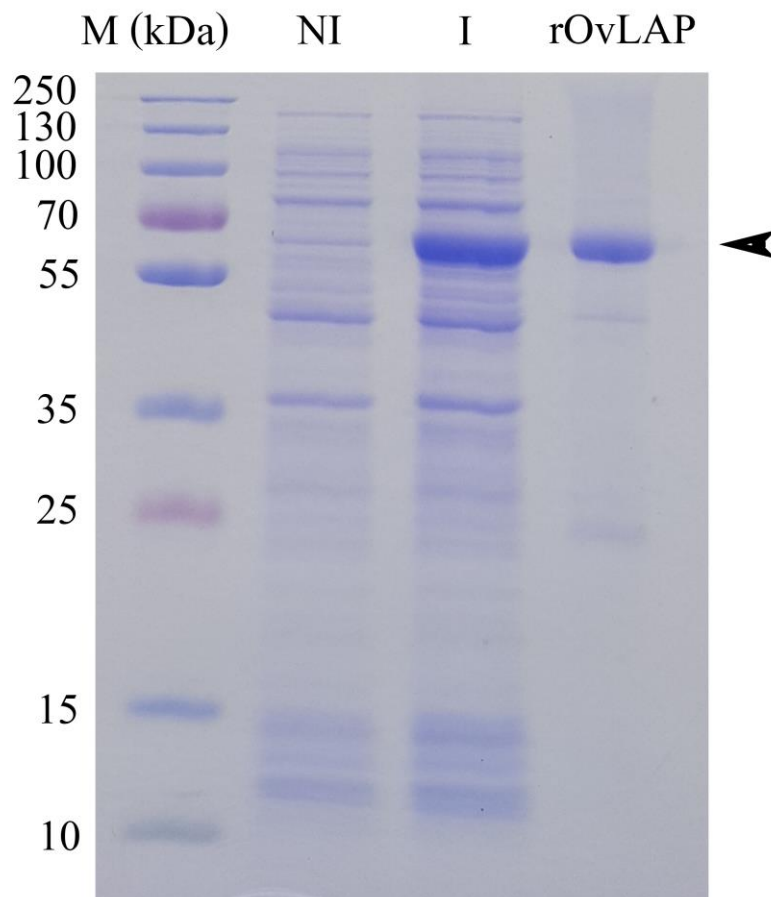
Lane H2 : หลังจากใส่ IPTG .ในชั่วโมงที่ 2

Lane H3 : หลังจากใส่ IPTG .ในชั่วโมงที่ 3

Purification

ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนนั้น ทำโดยการล้างโปรตีนที่ไม่ต้องการออกด้วยการใช้ Wash Buffer

Elution หลังจากล้างโปรตีนที่ไม่ต้องการออกจาก column แล้ว จึงใช้ Elution Buffer ล้างโปรตีนที่ต้องการ ออกมา โปรตีนจะเริ่มออกมาตั้งแต่ E1 ออกมามากที่สุดที่ E3 แล้วเริ่มน้อยลงที่ E4, E5, E6, E7, E8, E9 และ E10 ตามลำดับ เมื่อได้โปรตีนออกมาแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่ได้เป็นโปรตีน rOvCatF เพียงชนิดเดียว ปราศจากโปรตีนอื่นๆ เจือปน (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 SDS-PAGE วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีน rOvLAP หลังจากใช้ Elution Buffer ล้างออกมาจาก column โดยใช้สี Coomassie blue ย้อม

Lane M : Protein Maker

Lane NI : non induce with IPTG

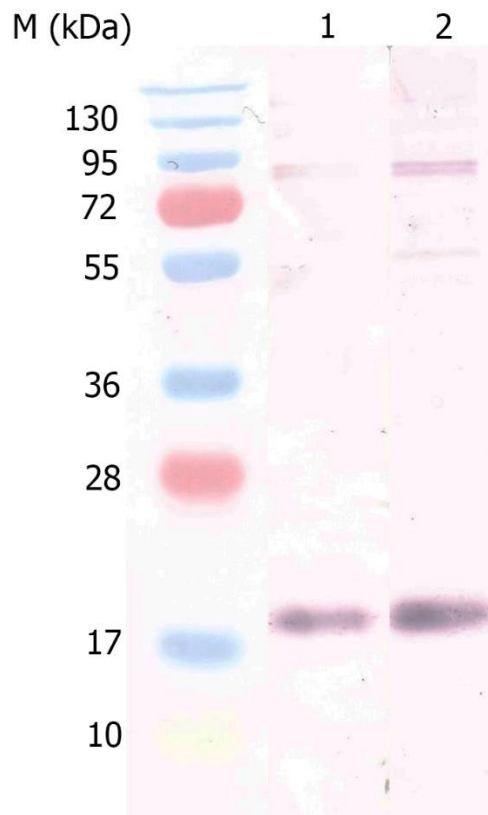
Lane I : induce with IPTG

Lane rOvLAP : โปรตีน rOvLAP

ปฏิกิริยาข้าม (cross reaction)

3.2 ผลการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนโดยวิธี Immunoblot

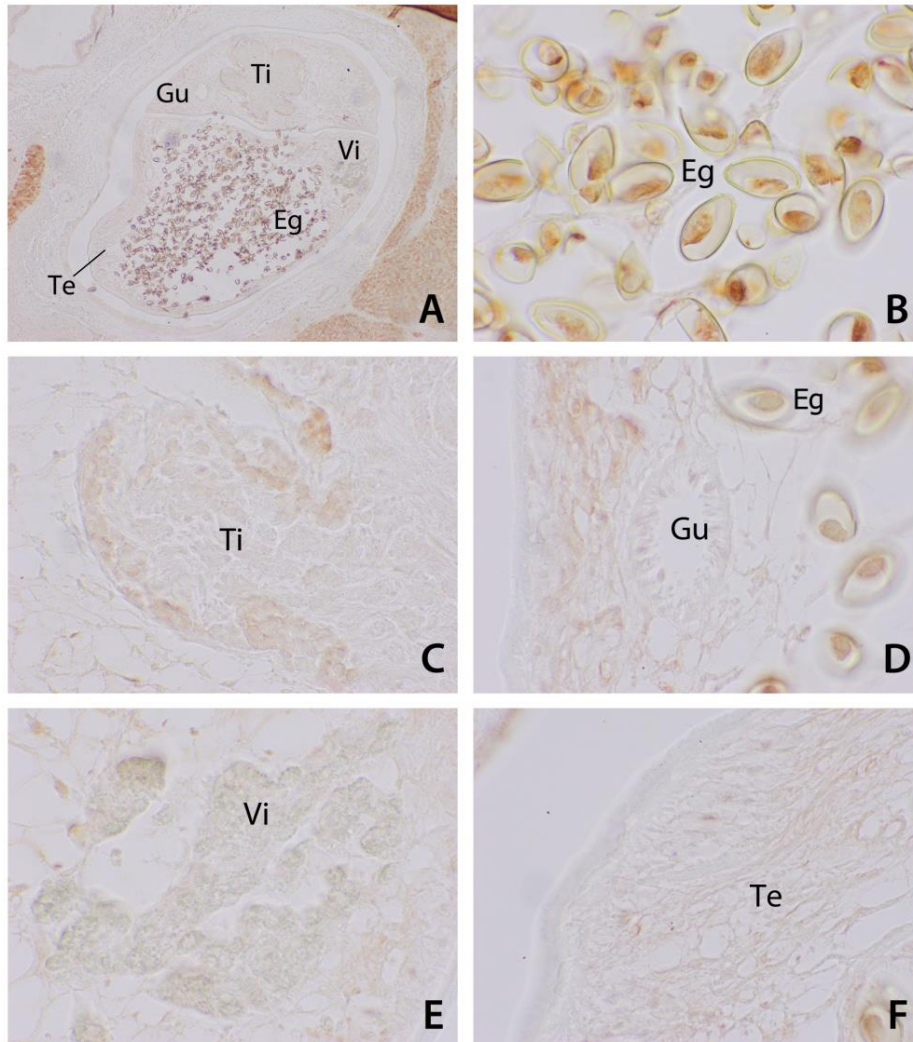
นำโปรตีน SOD ที่สกัดได้จากพยาธิตัวเต็มวัยมาวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE และ ทดสอบการทำปฏิกิริยากับ anti-FgSOD โดยวิธี immunoblotting พบว่า anti-FgSOD แสดงผลบวก (positive band) ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17.5 กิโลดาลตัน ดังรูป



รูปที่ 16 แสดงผล cross-reaction ของ anti-FgSOD กับ โปรตีน SOD ที่สกัดจากพยาธิ *O.viverrini* ระยะตัวเต็มวัย โดยวิธี immunoblot พบว่า lane1 และ lane 2 ปรากฏ positive band ที่น้ำหนักโมเลกุล 17.5 กิโลดาลตัน โดยมี marker band อยู่ทางซ้ายมือ

ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน SOD โดยวิธี Immunohistochemistry

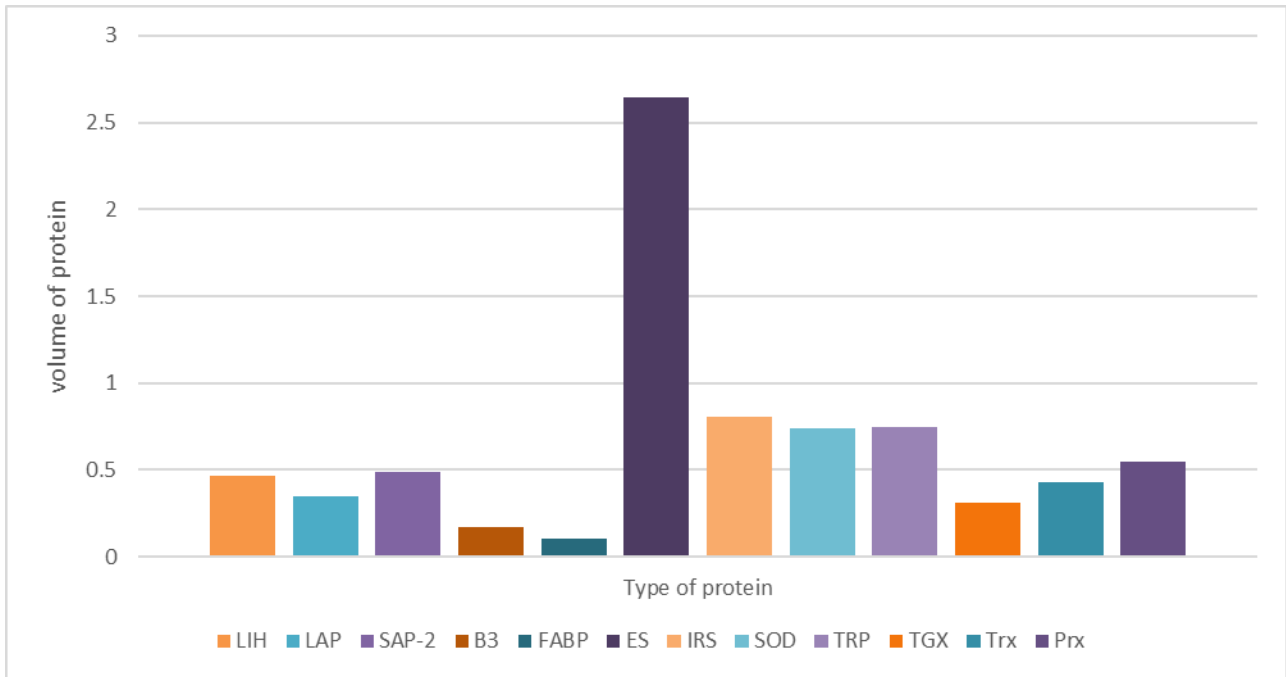
กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ FgSOD ในกระต่าย และนำไปทดลองการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนในเนื้อเยื่อพยาธิ *O. viverrini* ระยะ adult ด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าโปรตีน SOD มีการแสดงออกที่บริเวณไข่และอวัยวะ แต่ไม่มีการแสดงออกที่ตำแหน่งอื่นของพยาธิ ดังรูป



รูปที่ 17 แสดงการแสดงออกของโปรตีน SOD ในพยาธิระยะตัวเต็มวัย ย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry (A) พยาธิระยะตัวเต็มวัยแสดงผล positive ที่บริเวณไข่ (Eg) และอวัยวะ (Ti) (B-C) ภาพกำลังขยายสูงของพยาธิแสดงผล positive บริเวณไข่ (Eg) และอวัยวะ (Ti) (D-F) ภาพกำลังขยายสูงของพยาธิแสดงผล negative บริเวณทางเดินอาหาร (Gu) , vitelline gland (Vi) และ tegument (Te)

การแสดงผลของโปรตีนที่จำเพาะต่อ *O. viverrini* ด้วยวิธี ELISA

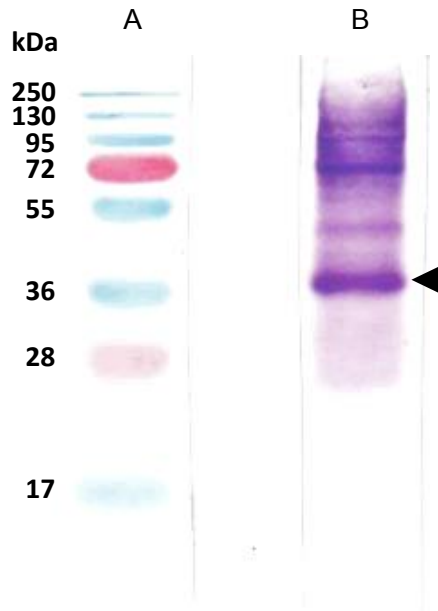
การศึกษาปริมาณการแสดงผลของโปรตีนที่จำเพาะต่อ *O. viverrini* ด้วยวิธี ELISA พบว่า มีความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนของพยาธิ *O. viverrini* ในระยะ adult ที่แตกต่างกัน โดยพบว่า rabbit Anti-Excretory secretory มีความจำเพาะต่อโปรตีนจากพยาธิ *O. viverrini* สูงที่สุด และ LIH, SOD, SAP-2 ตามลำดับ



รูปที่ 18 กราฟแสดงการแสดงผลของโปรตีน *O. viverrini* ด้วยวิธี ELISA

การแสดงผลของโปรตีน Excretory secretory ที่จำเพาะต่อ antibody ของโปรตีน Excretory secretory จาก *F. gigantica* ด้วยวิธี western blot

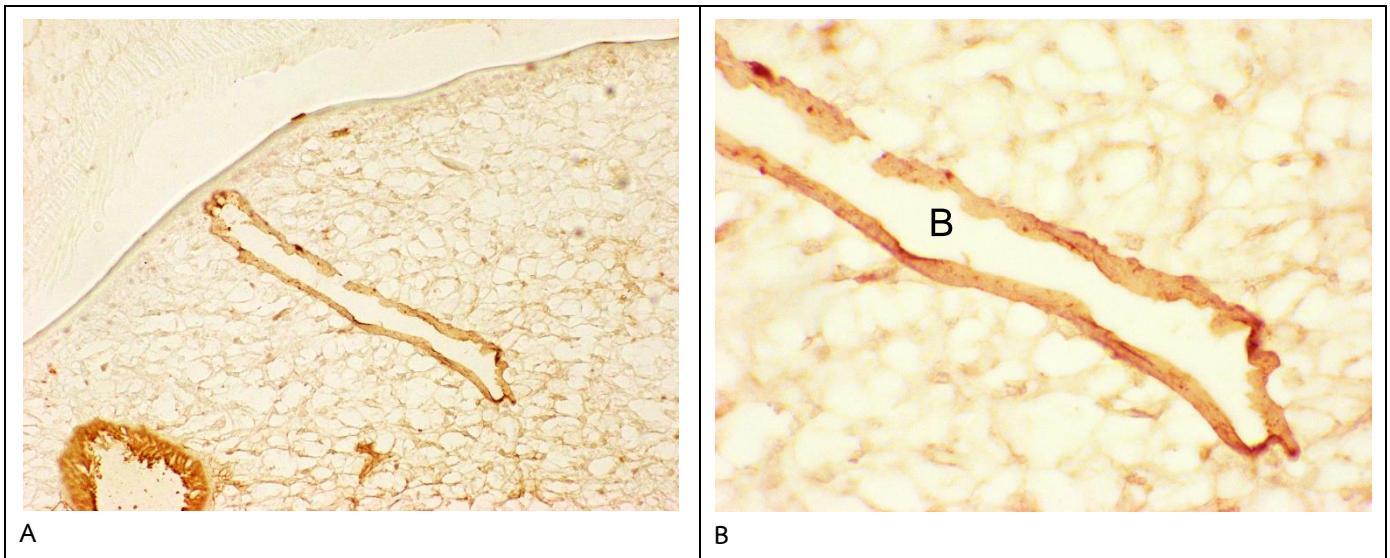
การศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน Excretory secretory ของ *F. gigantica* ต่อโปรตีน Excretory secretory จาก *O. viverrini* ที่ด้วยวิธี western analysis พบว่า มีการแสดงผลของโปรตีน Excretory secretory โดยจับกับโปรตีน ที่ขนาดประมาณ 25-250 kDa



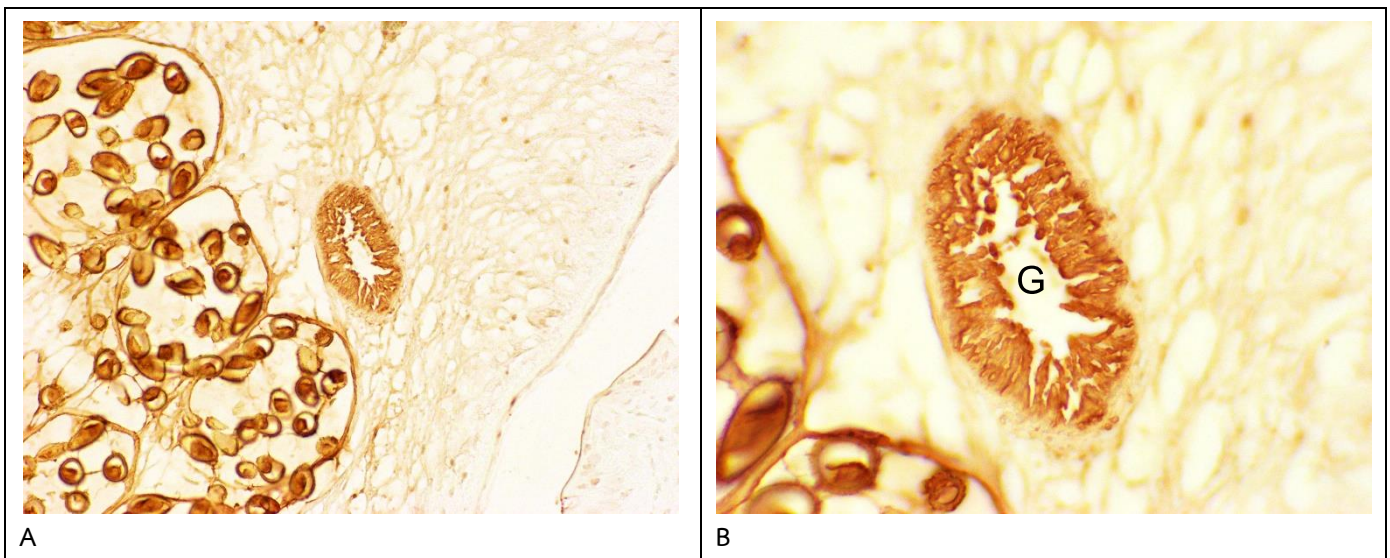
รูปที่ 19 แสดง marker protein (A) เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีน Excretory secretory โดยวิธี western blot (B)

การแสดงออกของโปรตีน Excretory secretory ที่จำเพาะต่อ antibody ของโปรตีน Excretory secretory จาก *F. gigantica* ในบริเวณ Bladder, Gut, Eggs, Ovum และ Uterus ในวิธี Immunohistochemistry

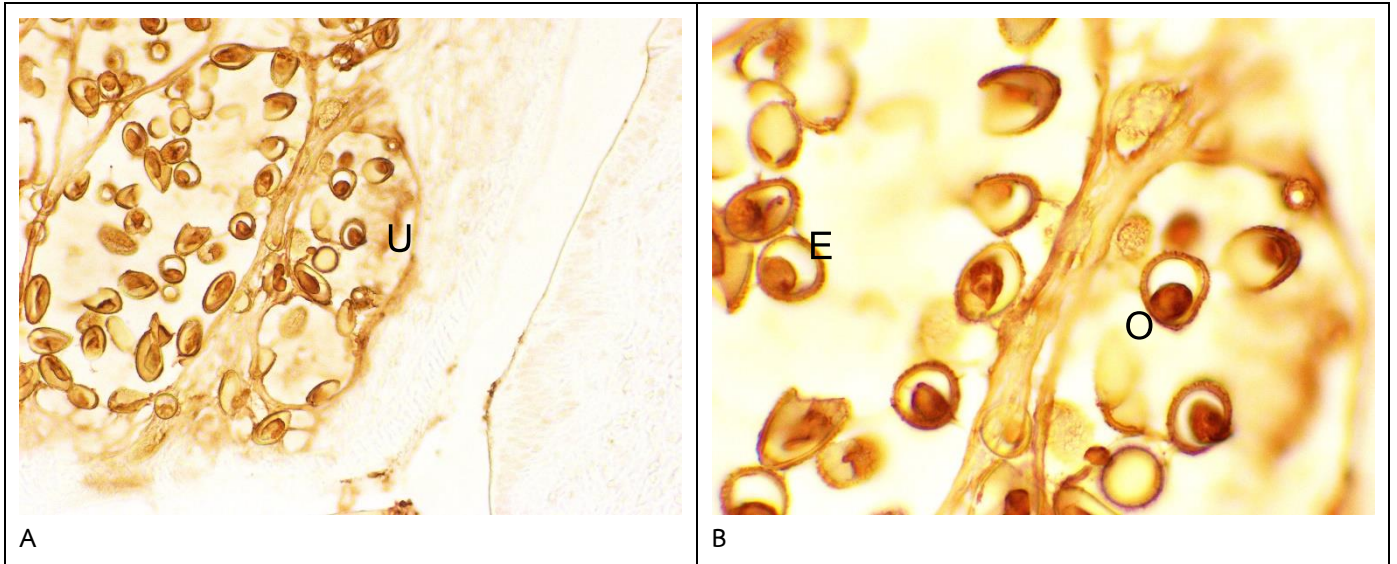
การศึกษาโปรตีน Excretory secretory จากพยาธิ *O. viverrini* ที่จำเพาะต่อ *F. gigantica* ด้วยวิธี Immunohistochemistry พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Excretory secretory ที่จำเพาะในบริเวณ Bladder, Gut, Eggs, Ovum และ Uterus



รูปที่ 20 แสดงแสดงออกของโปรตีน ES ในเนื้อเยื่อพยาธิ *O. viverrini* ที่บริเวณ B = Bladder ด้วยการย้อม Immunohistochemistry ที่กำลังขยาย 400 เท่า (A) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (B)



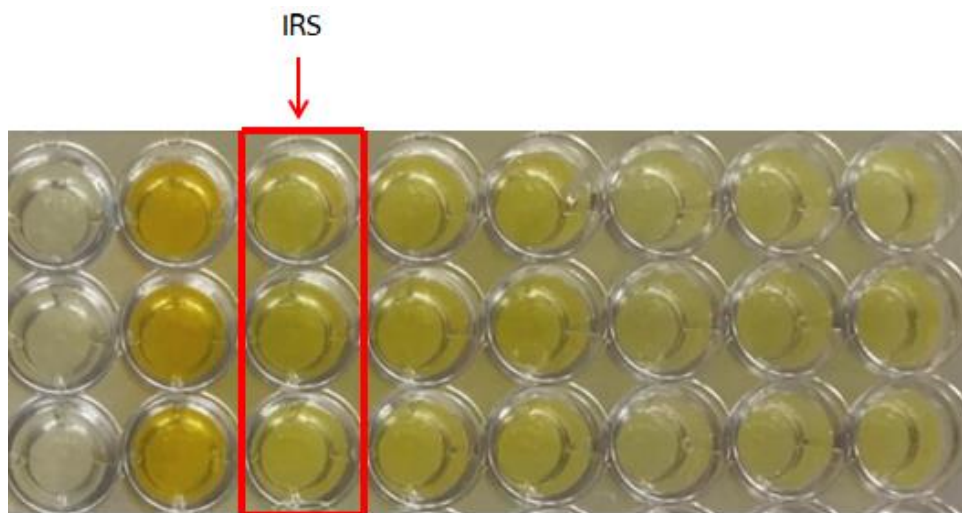
รูปที่ 21 แสดงแสดงออกของโปรตีน ES ในเนื้อเยื่อพยาธิ *O. viverrini* ที่บริเวณ G = Gut ด้วยการย้อม Immunohistochemistry ที่กำลังขยาย 400 เท่า (A) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (B)



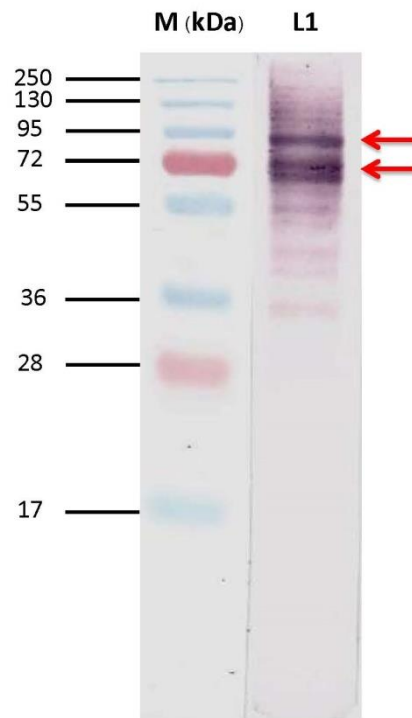
รูปที่ 22 แสดงแสดงออกของโปรตีน ES ในเนื้อเยื่อพยาธิ *O. viverrini* ที่บริเวณ E = Eggs, O = Ovum และ U = Uterus ด้วยการย้อม Immunohistochemistry ที่กำลังขยาย 400 เท่า (A) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (B)

ศึกษาการแสดงออกโปรตีน Rabbit infected resum (IRS) ใน *O. viverrini*

จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของ Rabbit infected resum (IRS) มีค่า OD = 0.805 (ภาพที่ 22) และจากการทำ western blotting พบว่าการแสดงออกของโปรตีน IRS ต่อ *O. viverrini* โดยแสดงผล positive band ที่ MW 72 - 95 kDa (ภาพที่ 23)



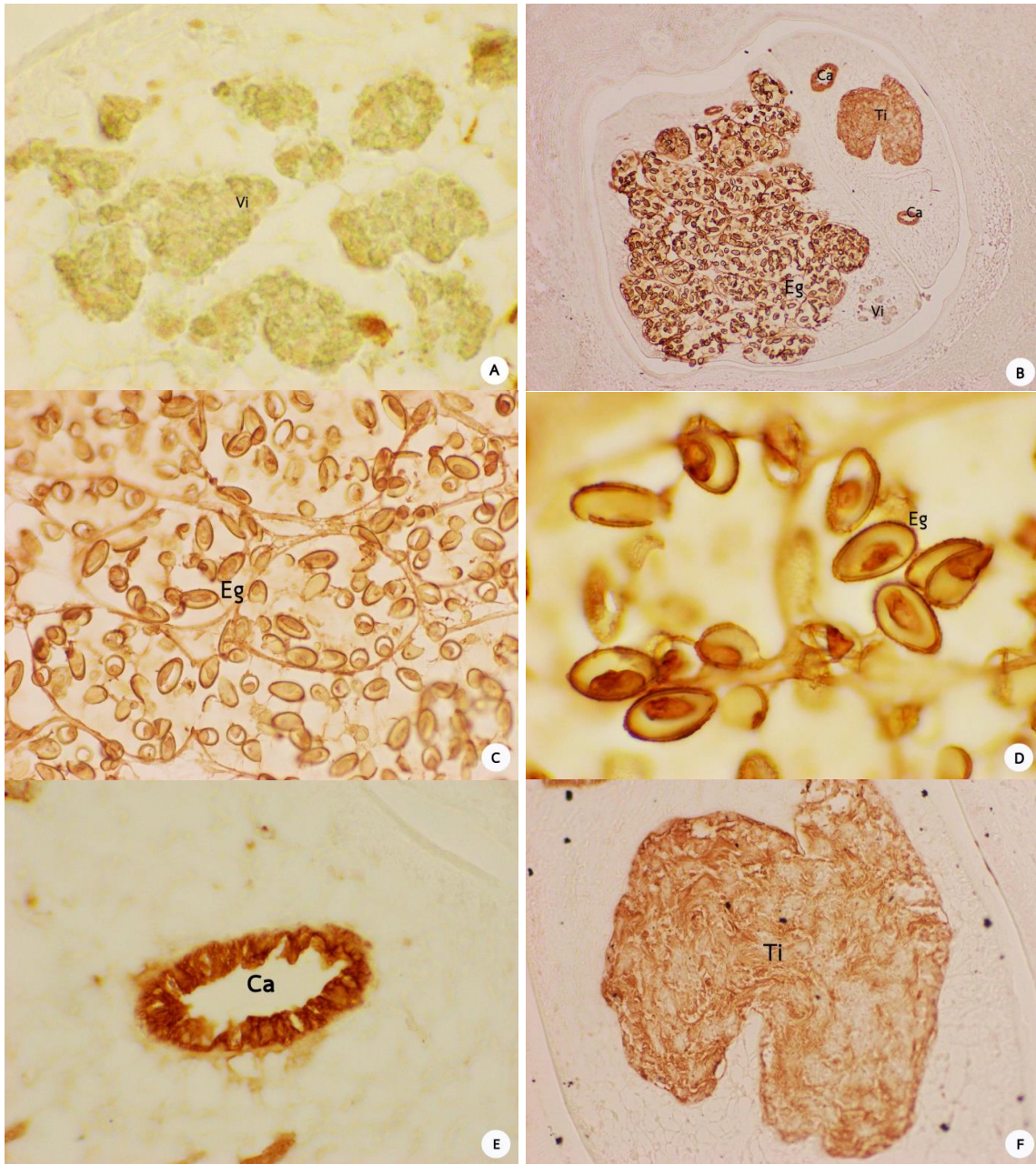
รูปที่ 23 การแสดงออกของ Rabbit infected resum (IRS) ด้วยวิธี ELISA มีค่า OD = 0.805



รูปที่ 24 แสดงการวิเคราะห์ western blotting ของโปรตีน IRS ที่ทำปฏิกิริยากับ *O. viverrini* พบว่าเกิด positive band ที่ MW 72-95 kDa เมื่อเทียบกับ MW marker ทางด้านซ้ายมือ

การศึกษา Cross reaction ของโปรตีน IRS ที่ระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ *O. Viverrini* ในเนื้อเยื่อตับ ด้วยวิธี Immunohistochemistry staining

จากการศึกษาตำแหน่งของโปรตีน IRS โดยใช้สไลด์ *O. Viverrini* ระยะตัวเต็มวัย ที่ลงโปรตีน IRS, Goat anti-rabbit antibody conjugated with HRP และ DAB แสดงให้เห็นตำแหน่งของโปรตีน IRS ซึ่งมีการแสดงออกบริเวณทางเดินอาหาร (Ca) อัณฑะ (Ti) และไข่ (Eg) ส่วนบริเวณ vitelline gland (Vi) ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน IRS จึงกำหนดเป็น negative control (รูปที่ 25)



รูปที่ 25 แสดงบริเวณการเกิด cross reaction ของ IRS ในตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ด้วยวิธี Immunohistochemistry staining

ภาพ A แสดง Vitelline gland (Vi) ที่ใช้เป็น Negative กำลังขยาย 40X

ภาพ B แสดง cross section ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในเนื้อเยื่อตับที่กำลังขยาย 40X

ภาพ C แสดง cross section ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในเนื้อเยื่อตับที่กำลังขยาย 40X

ภาพ D แสดง cross section ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในเนื้อเยื่อตับที่กำลังขยาย 100X

ภาพ E แสดง cross section ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในเนื้อเยื่อตับที่กำลังขยาย 100X

ภาพ F แสดง cross section ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในเนื้อเยื่อตับที่กำลังขยาย 40X

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการสังเคราะห์ยีนและรีคอมบิแนนท์โปรตีน cathepsinF (rOvCatF) และ leucine aminopeptidase (rOvLAP) ของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งสังเคราะห์ด้วยวิธีโคลนนิ่งด้วยพีซีอาร์ (PCR) จาก cDNA ของพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัย พบว่ายีน OvCatF และ OvLAP มีความใกล้เคียงกับพยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis* มากที่สุด หลังจากนั้นได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนในแบคทีเรีย (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) พบว่าจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE รีคอมบิแนนท์โปรตีน OvCatF และ OvLAP มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 และ 61 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

จากการแสดงออกของโปรตีน SOD ในพยาธิ *O. viverrini* ระยะตัวเต็มวัยด้วยแอนติบอดีต่อ *Fasciola gigantica* cytosolic SOD (FgSOD) โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าให้ผล positive ต่อโปรตีน whole body ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะตัวเต็มวัย โดยมีค่า OD เท่ากับ 0.733 จากนั้นทำ western blotting analysis พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17.5 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของโปรตีน SOD และเมื่อนำมาข้อมด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่ามีการแสดงออกที่บริเวณไข่และอัมชะ การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม excretory secretory antigens ในพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ซึ่งโปรตีนในกลุ่ม Excretory secretory เป็นโปรตีนที่พยาธิสร้างและคัดหลั่งเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีของกระต่ายต่อ excretory secretory ของ *F. gigantica* และ rabbit infected resum (IRS) สามารถจับกับโปรตีน excretory secretory ของ *O. viverrini* ได้อย่างจำเพาะ จากการศึกษาด้วยวิธี western blotting analysis และจากการศึกษาด้วยวิธี immunohistochemistry ซึ่งให้เห็นว่า มีการแสดงออกของโปรตีน excretory secretory ของ *O. viverrini* ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของ *F. gigantica* ในบริเวณเยื่อบุทางเดินอาหาร ไข่ และอัมชะ

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน IRS ซึ่งเป็นโปรตีนในกระต่ายที่ติดเชื้อ *F. gigantica* ผลจากการทดลองด้วยวิธี Western blotting พบ Positive band ที่ MW 72 - 95 kDa แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยา Antigen - Antibody complex ระหว่าง *O. viverrini* และโปรตีน IRS จากการศึกษาการเกิด Cross reaction ของโปรตีน IRS ที่ระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในเนื้อเยื่อตับ พบว่าแอนติบอดีของกระต่ายที่ติดเชื้อ *F. gigantica* มีการย้อมติดบริเวณเยื่อบุทางเดินอาหาร ไช้ และอวัยวะของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ระยะตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีของกระต่ายที่ติดเชื้อ *F. gigantica* สามารถจับกับแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ได้ ซึ่งโดยปกติแล้วปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนจะต้องจำเพาะต่อกัน จากผลการทดลองพบว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มี epitopes ที่คล้ายคลึงกันกับ epitopes ที่อยู่บนแอนติเจนของ *F. gigantica* จึงทำให้เกิด Cross reaction ระหว่างแอนติบอดีของ *F. gigantica* ต่อแอนติเจน *O. viverrini* ได้ จากการย้อมด้วยวิธี Immunohistochemistry staining พบว่าบริเวณที่ย้อมติดสีคือบริเวณที่เกิด Cross reaction ระหว่างแอนติบอดีของกระต่ายที่ติดเชื้อ *F. gigantica* ต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*

โรคพยาธิใบไม้ตับ Opisthorchiasis เกิดจากการติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* เป็นการรับประทานปลาน้ำจืดดิบที่มีการติดเชื้อในระยะติดต่อ metacercariae และโรคพยาธิใบไม้ตับ Fasciolosis เกิดจากการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* เป็นการรับประทานพืชน้ำที่ปนเปื้อนในระยะติดต่อ metacercariae เมื่อพยาธิเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์จะมีการผลิตสารและคัดหลั่งเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์ เรียกว่า Excretory-secretory (ES material) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาวัคซีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนสำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับจากการศึกษาการผลิตและลักษณะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับอ่อน *Eurytrema pancreaticum* โดยการนำ excretory secretory product ของพยาธิ *E. pancreaticum* ตัวเต็มวัยมาแยกแถบโปรตีนตามมวลโมเลกุลด้วย 12.5% SDS-PAGE จากนั้นนำไปจำนวนและคำนวณหาหน้าหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนเทียบกับ Standard marker จากการตรวจสอบของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี Western blotting จากการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ES-products ของพยาธิ *E. pancreaticum* ตัวเต็มวัยตรวจหาตำแหน่งที่พบ ES products ในเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยพบว่า เซลล์หรืออวัยวะที่ให้ตะกอนสีซึ่งเป็นผลบวกของปฏิกิริยาเข้มที่สุดคือ เซลล์ค้ำจุน (parenchymal cell) ท่อระบบขับถ่าย (excretory bladder) อวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive organs) เพศผู้ ได้แก่ อัณฑะ (testis) และ seminal vesicle และเพศเมีย ได้แก่ vitelline gland รังไข่ (ovary) มดลูก (uterus) Mehlis' gland และ seminal receptacle ในขณะที่ท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) และเนื้อเยื่อปกคลุมร่างกาย (tegument) พบตะกอนสีปานกลาง และไม่พบตะกอนสีที่เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (อาตุลย์ มีพูล และคณะ, 2550) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า rOvESP มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในเป็นแอนติเจนเพื่อการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ (opisthorchiasis) ด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (วิฑูรย์ ไวยนันท์ และคณะ, 2549) ในส่วนของที่ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ คือ เป็นการศึกษาจับกันอย่างจำเพาะของแอนติบอดีจาก *F. gigantica* กับโปรตีน Excretory secretory จาก *O. viverrini* ซึ่งต่างจากงานวิจัยดังที่กล่าวมาข้างต้น

จากการศึกษาด้วยวิธี ELISA พบว่าแอนติบอดีจากกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย FgSOD มีความจำเพาะต่อโปรตีนในพยาธิ *O.viverrini* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีสามารถจับกับ Epitope ของโปรตีนในพยาธิได้ พบว่าในการทดสอบโดย western blot ได้โปรตีนที่มีขนาด 17.5 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีน SOD (วิภาพร และคณะ, 2558) การแสดงออกของโปรตีน SOD ในพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะตัวเต็มวัย ในการทดสอบกับ rabbit anti-FgSOD โดยวิธี immunohistochemistry พบการแสดงออกของโปรตีน SOD ในบริเวณอวัยวะ และ อวัยวะตามลำดับ แต่ไม่มีการแสดงออกในตำแหน่งอื่น ซึ่งอวัยวะที่มีการแสดงออกดังกล่าวมีกระบวนการแบ่งตัวและเมตาบอลิซึมสูงซึ่งกระบวนการเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระจึงอาจเป็นสาเหตุให้มีการสร้าง Antioxidant enzyme สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่ามี การแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม Antioxidant enzyme ในพยาธิ เช่น พบการแสดงออกของ glutathione peroxidase (GPx) ที่ vitelline gland และอวัยวะ ใน *F.gigantica* (Changklungmoa N, et al. 2018) และพบการแสดงออกของ thioredoxin ที่ไข่ของพยาธิ *O.viverrini* (Suttiyapapa S, et al.2012) โดยเฉพาะ Superoxide dismutase enzyme ที่เป็นเอนไซม์ลำดับแรกในทำลายอนุมูลอิสระประเภท superoxide ที่มักเกิดในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า วิภาพร และคณะ (วิภาพร และคณะ, 2559) ได้ศึกษาคูณลักษณะและประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของโปรตีน SOD ใน *F.gigantica* และเมื่อทำการย้อมทาง immunohistochemistry มีการแสดงออกของโปรตีน SOD ทุกระยะการเจริญเติบโตของ *F.gigantica* โดยมีการแสดงออกของ SOD ที่ตำแหน่ง อวัยวะ, ออวูล, vitelline gland และรังไข่ และภายหลังผู้วิจัยได้ทดสอบการเป็นวัคซีนในหนูที่ทำให้ติดเชื้อพยาธิ พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantea* ได้มากถึงร้อยละ 45 อีกทั้ง anti- rFgSOD ยังสามารถเกิด cross-reaction กับพยาธิชนิดอื่น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน SOD ในพยาธิเหล่านี้มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่โปรตีน SOD นี้จะสามารถพัฒนาไปเป็นวัคซีนสำหรับ *F. gigantea* และ *O. viverrini*

สรุปและเสนอแนะ

ไม่มี

(5) ผลผลิต (Output)

(5.1) ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในและระดับชาติ และนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์

(5.2) การจดสิทธิบัตร

ไม่มี

(5.3) ผลงานเชิงพาณิชย์ (มรกรรนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

ไม่มี

(5.4) ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ไม่มี

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 3930100116xxx สัญญาเลขที่ 17/2562

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาวัคซีนและชุดตรวจในกลุ่มแอนโซมัยย่อยสลายโปรตีนสำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ
opisthorchiasis viverrini ในหนูทดลอง

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร. พรอนันต์ เกื้อไข

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2562

ระยะเวลาดำเนินการ.....1.....ปี.....3.....เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 469,400 บาท เมื่อวันที่ 30 เดือน ตุลาคม ปี 2561

งวดที่ 2 (40%) 375,520 บาท เมื่อวันที่ 23 เดือน กันยายน ปี 2562

งวดที่ 3 (10%) บาท เมื่อวันที่ - เดือน - ปี -

รวม 844,920

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	60,000	60,000	-
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	732,330	732,330	-
4. ค่าใช้สอย	462,000	462,000	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าธรรมเนียมอุดหนุน สถาบัน	93,880	93,880	-
รวม	938,800	938,800	-

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม (Bibliography)

- ฐิติมา วงศาโรจน์ และคณะ. การศึกษาสถานการณ์โรคหนอนพยาธิและโปรโตซัวในลำไส้ในประเทศไทย ปี 2552. The 96 years of opisthorchiasis: Past, Present and Future international congress of the liver flukes 7-8 March 2011, Pullman Raja Orchid Hotel, Konkhaen, Thailand.
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. Cancer in Thailand 2007-2009.
- Bunyaratavej P, Rajatapiti B, Dhitavat V, Kichanantha B, Tangchai W, Sukonthaman Y, Vongviriyatham S, Chinprahast K, Watanapat S, Dusitsin N. 1981. Comparison of vasectomy performed by medical students and surgeons in Thailand. Stud Fam Plann. 12(8-9):316-318.
- Chantree P, Phatsara M, Meemon K, Chaichanasak P, Changklungmoa N, Kueakhai P, Lorsuwannarat N, Sangpairoj K, Songkoomkrong S, Wanichanon C, Itagaki T, Sobhon P. 2013 Vaccine potential of recombinant cathepsin B against *Fasciola gigantica*. Experimental Parasitology 135:102-109.
- Evans H, Bourgeois CH, Comer DS, Keschamras N. 1971. Biliary tract changes in opisthorchiasis. Am J Trop Med Hyg. 20(5):667-671.
- Koompirochana C, Sonakul D, Chinda K, Stitnimakarn T. Hepatic carcinoma with opisthorchiasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 9(2):215-219.
- Sethadavit M, Meemon K, Jardim A, Spithill TW, Sobhon P. 2009. Identification, expression and immunolocalization of cathepsin B3, a stage-specific antigen expressed by juvenile *Fasciola gigantica*. Acta Trop. 112(2):164-173.
- Sripa J, Brindley PJ, Sripa B, Loukas A, Kaewkes S, Laha T. 2012. Evaluation of liver fluke recombinant cathepsin B-1 protease as a serodiagnostic antigen for human opisthorchiasis. Parasitol Int. 61, 191-195.
- Sripa J, Pinlaor P, Brindley PJ, Sripa B, Kaewkes S, Robinson MW, Young ND, Gasser RB, Loukas A, Laha T. 2011. RNA interference targeting cathepsin B of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. Parasitol Int. 60(3):283-288.
- Sripa J, Laha T, To J, Brindley PJ, Sripa B, Kaewkes S, Dalton JP, Robinson MW. 2010. Secreted cysteine proteases of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: regulation of cathepsin F activation by autocatalysis and trans-processing by cathepsin B. Cell Microbiol 12(6):781-795.
- Sripa B, Kaewkes S. 2002. Gall bladder and extrahepatic bile duct changes in *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters. Acta Trop. 83(1):29-36.

- Sripa B, Haswell-Elkins MR, Sinawat P. 2003. Histological analysis of gallbladder diseases in relation to opisthorchiasis in endemic areas of Thailand. *Acta Trop.* 88(3):239-246.
- Thaewnongiew K, Singthong S, Kutchamart S, Tangsawad S, Promthet S, Sailugkum S, Wongba N. 2014. Prevalence and risk factors for *Opisthorchos viverrini* infections in upper Northeast Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15(16), 6609-6612.
- Watanapa P, Watanapa WB. 2002 Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Br J Surg.* 89(8):962-970.

ภาคผนวก
(Appendix)

ผศ.ดร.พรอนันต์ เกื้อไข, Ph.D.

สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โทรศัพท์ : 03810-3169 โทรสาร : 03839-3497

e-mail : earn_patho@hotmail.com, pornanan@buu.ac.th

ผลงานวิจัย 5 ปีย้อนหลัง (2015-2019)

- 1) **Kueakhai P**, Chaithirayanon K, Chaiwichien A, Samrit T, Osotprasit S, Suksomboon P, Jaikua W, Sobhon P, Changklungmoa N. Monoclonal antibody against *Fasciola gigantica* glutathione peroxidase and their immunodiagnosis potential for fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, 2019;276,108979,1-7.
- 2) Changklungmoa, N., Chaithirayanon, K., Cheukamud, W., Chaiwichien, A., Osotprasit, S., Samrit, T., Sobhon, P., **Kueakhai, P.** (2018). Expression and characterization of glutathione peroxidase of the liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Parasitology Research*, 117:3487-3495.
- 3) Sangpairoj, K., Apisawetakan S., Changklungmoa, N., **Kueakhai, P.**, Chaichanasak, P., Sobhon, P., Chaithirayanon, K. (2018). Potential of recombinant 2-Cys peroxiredoxin protein as a vaccine for *Fasciola gigantica* infection. *Experimental Parasitology*, 194:16-23.
- 4) **Kueakhai P**, Changklungmoa N, Waseewiwat P, Thanasinpaiboon T, Cheukamud W, Chaichanasak P, Sobhon P. Characterization and vaccine potential of *Fasciola gigantica* saposin-like protein 1 (SAP-1). *Vet Parasitol* 2017; 233,115-122.
- 5) Changklungmoa N, Poinok N, Yencham C, Sobhon P, **Kueakhai P**. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. *Vet Parasitol* 2016; 226: 124-131.
- 6) Jaikua W, **Kueakhai P**, Chaithirayanon K, Tanomrat R, Wongwairot S, Riengrojpitak S, Sobhon P, Changklungmoa N. Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. *Acta Trop* 2016; 162:75-82.
- 7) **Kueakhai P**, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Jaikua W, Sobhon P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1 against *Fasciola gigantica* in mice. *Acta Trop* 2015; 150:71-78.
- 8) Changklungmoa N, **Kueakhai P**, Sangpairoj K, Chaichanasak P, Jaikua W, Riengrojpitak S, Sobhon P, Chaithirayanon K. Molecular cloning and characterization of *Fasciola gigantica* thioredoxin-glutathione reductase. *Parasitol Res* 2015;114: 2119–2127.
- 9) Sansri V, Meemon K, Changklungmoa N, **Kueakhai P**, Chantree P, Chaichanasak P, Lorsuwannarat N, Itagaki T, Sobhon P. Protection against *Fasciola gigantica* infection in

mice by vaccination with recombinant juvenile-specific cathepsin L. *Vaccine* 2015; 33(13): 1596-1601.

- 10) **Kueakhai P**, Changklungmoa N, Chaithirayanon K, Phatsara M, Preyavichyapugdee N, Riengrojpitak S, Sangpairoj K, Chusongsang P, Sobhon P. Saposin-like protein 2 has an immunodiagnostic potential for detecting *Fasciolosis gigantea*. *Exp Parasitol* 2015; 151-152: 8-13.
- 11) Wongwairot S, **Kueakhai P**, Changklungmoa N, Jaikua W, Sansri V, Meemon K, Songkoomkrong S, Riengrojpitak S, Sobhon P. Monoclonal antibody against recombinant *Fasciola gigantea* cathepsin L1H could detect juvenile and adult cathepsin Ls of *Fasciola gigantea*. *Parasitol Res* 2015; 114(1):133-40.

ผศ.ดร. นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ, Ph.D.

สาขาวิชาพยาธิวิทยากายวิภาค คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โทรศัพท์ : 03810-3169 โทรสาร : 03839-3497

e-mail : narin_bio@hotmail.com

ผลงานวิจัย 5 ปีย้อนหลัง (2014-2019)

- 1) **Changklungmoa N**, Kueakhai P, Sangpairoj K, Chaichanasak P, Jaikua W, Riengrojpitak S, Sobhon P, Chaithirayanon K. Molecular cloning and characterization of *Fasciola gigantica* thioredoxin-glutathione reductase. Parasitol Res 2015;114: 2119–2127.
- 2) Sansri V, Meemon K, **Changklungmoa N**, Kueakhai P, Chantree P, Chaichanasak P, Lorsuwannarat N, Itagaki T, Sobhon P. Protection against *Fasciola gigantica* infection in mice by vaccination with recombinant juvenile-specific cathepsin L. Vaccine 2015; 33(13): 1596-1601.
- 3) Kueakhai P, **Changklungmoa N**, Chaithirayanon K, Phatsara M, Preyavichyapugdee N, Riengrojpitak S, Sangpairoj K, Chusongsang P, Sobhon P. Saposin-like protein 2 has an immunodiagnostic potential for detecting Fasciolosis gigantica. Exp Parasitol 2015; 151-152: 8-13.
- 4) Wongwairot S, Kueakhai P, **Changklungmoa N**, Jaikua W, Sansri V, Meemon K, Songkoomkrong S, Riengrojpitak S, Sobhon P. Monoclonal antibody against recombinant *Fasciola gigantica* cathepsin L1H could detect juvenile and adult cathepsin Ls of *Fasciola gigantica*. Parasitol Res 2015; 114(1):133-40.
- 5) Kueakhai P, **Changklungmoa N**, Chaichanasak P, Jaikua W, Sobhon P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1 against *Fasciola gigantica* in mice. Acta Trop 2015; 150:71-78.
- 6) Jaikua W, Kueakhai P, Chaithirayanon K, Tanomrat R, Wongwairot S, Riengrojpitak S, Sobhon P, **Changklungmoa N**. Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. Acta Trop 2016; 162:75-82.
- 7) **Changklungmoa N**, Poinok N, Yencham C, Sobhon P, Kueakhai P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. Vet Parasitol 2016; 226: 124-131.
- 8) Kueakhai P, **Changklungmoa N**, Waseewiwat P, Thanasinpaiboon T, Cheukamud W, Chaichanasak P, Sobhon P. Characterization and vaccine potential of *Fasciola gigantica* saposin-like protein 1 (SAP-1). Vet Parasitol 2017; 233,115-122.

- 9) Thongrod S, **Changklungmoa N**, Chansela P, Siangcham T, Kruangkum T, Suwansa-Ard S, Saetan J, Sroyraya M, Tinikul Y, Wanichanon C, Sobhon P. Characterization and tissue distribution of neuropeptide F in the eyestalk and brain of the male giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Cell and Tissue Research*. 2017; 367(2),181-195
- 10) **Changklungmoa N**, Chaithirayanon K, Cheukamud W, Chaiwichien A, Osotprasit S, Samrit T, Sobhon P, Kueakhai P. Expression and characterization of glutathione peroxidase of the liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Parasitology Research*. 2018; 117,3487-3495.
- 11) Sangpairoj K, Apisawetakan S, **Changklungmoa N**, Kueakhai P, Chaichanasak P, Sobhon P, Chaithirayanon K. Potential of recombinant 2-Cys peroxiredoxin protein as a vaccine for *Fasciola gigantica* infection. *Experimental Parasitology*, 2018; 194,16-23.
- 12) Sroyraya M, Songkoomkrong S, **Changklungmoa N**, Poljaroen J, Weerakiet S, Sophonsritsuk A, Wongkularb A, Lertvikool S, Tingthanatikul Y, Sobhon P. Differential expressions of estrogen and progesterone receptors in endometria and cyst walls of ovarian endometrioma from women with endometriosis and their responses to depo-medroxyprogesterone acetate treatment. *Mol Cell Probes*. 2018; 40,27-36.
- 13) Kueakhai P, Chaithirayanon K, Chaiwichien A, Samrit T, Osotprasit S, Suksomboon P, Jaikua W, Sobhon P, **Changklungmoa N**. Monoclonal antibody against *Fasciola gigantica* glutathione peroxidase and their immunodiagnosis potential for fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, 2019;276,108979,1-7.

ผศ.ดร. นฤวรรณ เสาวคนธ์, Ph.D

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง นครราชสีมา 3000

โทรศัพท์ 044-224623

โทรสาร 044-224633

e-mail : naruwan@sut.ac.th

ผลงานตีพิมพ์ 5 ปีย้อนหลัง (2015-2019)

- 1) Srimaroeng C, Ontawong A, **Saowakon N**, Vivithanaporn P, Pongchaidecha A, Amornlerdpison D, Soodvilai S, Chatsudthipong V. Antidiabetic and renoprotective effects of Cladophora glomerata Kützing extract in experimental type 2 diabetic rats: a potential nutraceutical product for diabetic nephropathy. J Diabetes Res. 2015;2015:320167. doi: 10.1155/2015/320167. Epub 2015 Mar 26.
- 2) **Saowakon N**, Ngersoungnern P, Watcharavitoon P, Ngersoungnern A, Kosanlavit R. Formaldehyde exposure in gross anatomy laboratory of Suranaree University of Technology: a comparison of area and personal sampling. Environ Sci Pollut Res Int. 2015 Dec;22(23):19002-12. doi: 10.1007/s11356-015-5078-2. Epub 2015 Aug 2.

ศ.ดร. ประเสริฐ โศภน, Ph.D

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

โทรศัพท์ : 02-201-5406 โทรสาร : 02-354-7168

e-mail : prasert.sob@mahidol.ac.th

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ 5 ปีย้อนหลัง (2015-2019)

- 1) Tinikul Y, Poljaroen J, Tinikul R, Anuracpreeda P, Chotwiwatthanakun C, Senin N, Poomtong T, Hanna PJ, **Sobhon P.** 2014. Effects of gonadotropin-releasing hormones and dopamine on ovarian maturation in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and their presence in the ovary during ovarian development. *Aquaculture*, 420-421:79-88.
- 2) Changklungmoa N, Kueakhai P, Apisawetakan S, Riengrojpitak S, **Sobhon P**, Chaithirayanon K. 2014. Identification and expression of *Fasciola gigantica* thioredoxin. *Parasitology Research*, 113:2335-1343.
- 3) Sangpairoj K, Changklungmoa N, Vanichviriyakit R, **Sobhon P**, Chaithirayanon K. 2014. Analysis of the expression and antioxidant activity of 2-Cys peroxiredoxin protein in *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology*, 140:24-32.
- 4) Lorsuwannarat N, Piedrafita D, Chantree P, Sansri V, Songkoomkrong S, Bantuchai S, Sangpairot K, Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Chansela P, **Sobhon P.** 2014. The in vitro anthelmintic effects of plumbagin on newly excysted and 4-weeks-old juvenile parasites of *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology*, 136:5-13.
- 5) Anuracpreeda P, Srirakam T, Pandonlan S, Changklungmoa N, Chotwiwatthanakun C, Tinikul Y, Poljaroen J, Meemon K, **Sobhon P.** 2014. Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant cathepsin L1 of *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica*, 139:1-9.
- 6) Nurai P, Primphon J, Seangcharoen T, Tinikul Y, Wanichanon C, **Sobhon P.** 2014. Immunohistochemical detection of GnRH-like peptides in the neural ganglia and testis of *Haliothis asinina*. *Microscopy Research Technique*, 77(2):110-119.
- 7) Kornthong N, Tinikul Y, Khornchatri K, Saeton J, Magerd S, Suwansa-Ard S, Kruangkum T, Hanna PJ, **Sobhon P.** 2014. Neuronal classification and distribution in the central nervous system of the female mud crab, *Scylla olivacea*. *Microscopy Research Technique*, 77(3):189-200.

- 8) Kornthong N, Cummins SF, Chotwiwatthanakun C, Khornchatri K, Engsusophon A, Hanna PJ, **Sobhon P**. 2014. Identification of genes associated with reproduction in the Mud Crab (*Scylla olivacea*) and their differential expression following serotonin stimulation. *PLoS One*, 9(12):e115867.
- 9) Tinikul Y, Poljaroen J, Tinikul R, Chotwiwatthanakun C, Anuracpreeda P, Hanna PJ, **Sobhon P**. 2015. Alterations in the levels and distribution of octopamine in the central nervous system and ovary of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its possible role in ovarian development. *General and Comparative Endocrinology*, 210:12-22.
- 10) Wongwairot S, Kueakhai P, Changklungmoa N, Jaikua W, Sansri V, Meemon K, Songkoomkrong S, Riengrojpitak S, **Sobhon P**. 2015. Monoclonal antibody against recombinant *Fasciola gigantica* cathepsin L1H could detect juvenile and adult cathepsin Ls of *Fasciola gigantica*. *Parasitology Research*, 114(1):133-140.
- 11) Anuracpreeda P, Phutong S, Ngamniyom A, Panyarachun B, **Sobhon P**. 2015. Surface topography and ultrastructural architecture of the tegument of adult *Carmyerius spatiosus* Brandes, 1898. *Acta Tropica*, 143:18-28.
- 12) Khornchatri K, Kornthong N, Saetan J, Tinikul Y, Chotwiwatthanakun C, Cummins SF, Hanna PJ, **Sobhon P**. 2015. Distribution of serotonin and dopamine in the central nervous system of the female mud crab, *Scylla olivacea* (Herbst). *Acta Histochemica*, 117(2):196-204.
- 13) Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaithirayanon K, Phatsara M, Preyavichyapugdee N, Riengrojpitak S, Sangpairoj K, Chusongsang P, **Sobhon P**. 2015. Saposin-like protein 2 has an immunodiagnostic potential for detecting *Fasciolosis gigantica*. *Experimental Parasitology*, 151-152:8-13.
- 14) Sansri V, Meemon K, Changklungmoa N, Kueakhai P, Chantree P, Chaichanasak P, Lorsuwannarat N, Itagaki T, **Sobhon P**. 2015. Protection against *Fasciola gigantica* infection in mice by vaccination with recombinant juvenile-specific cathepsin L. *Vaccine*, 33(13):1596-1601.
- 15) Siangcham T, Chansela P, Hayasaka T, Masaki N, Sroyraya M, Poljaroen J, Suwansa-ard S, Engsusophon A, Hanna PJ, **Sobhon P**, Setou M. 2015. Changes of phosphatidylcholine and fatty acids in germ cells during testicular maturation in three developmental male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* revealed by imaging mass spectrometry. *PLoS One*, 10(3):e0120412.

- 16) Changklungmoa N, Kueakhai P, Sangpairoj K, Chaichanasak P, Jaikua W, Riengrojpitak S, **Sobhon P**, Chaithirayanon K. 2015. Molecular cloning and characterization of *Fasciola gigantica* thioredoxin-glutathione reductase. *Parasitology Research*, 114(6):2119-2127.
- 17) Sumpownon C, Engsusophon A, Siangcham T, Sugiyama E, Soonklang N, Meeratana P, Wanichanon C, Hanna PJ, Setou M, **Sobhon P**. 2015. Variation of prostaglandin E₂ concentrations in ovaries and its effects on ovarian maturation and oocyte proliferation in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, S0016-6480(15)00131-138.
- 18) Suwansa-Ard S, Thongbuakaew T, Wang T, Zhao M, Elizur A, Hanna PJ, Sretarugsa P, Cummins SF, **Sobhon P**. 2015. In silico Neuropeptidome of Female *Macrobrachium rosenbergii* Based on Transcriptome and Peptide Mining of Eyestalk, Central Nervous System and Ovary. *PLoS One*, 10(5):e0123848.
- 19) Meemon K, **Sobhon P**. 2015. Juvenile-specific cathepsin proteases in *Fasciola* spp.: their characteristics and vaccine efficacies. *Parasitology Research*, 114(8):2807-2813.
- 20) Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Jaikua W, Itagaki T, **Sobhon P**. 2015. Vaccine potential of recombinant pro- and mature cathepsinL1 against fasciolosis *gigantica* in mice. *Acta Tropica*, 150:71-78.
- 21) Kruangkum T, Vanichviriyakit R, Chotwiwatthanakun C, Saetan J, Tinikul Y, Wanichanon C, Cummins SF, Hanna PJ, **Sobhon P**. 2015. Spermatophore affects the egg-spawning and egg-carrying behavior in the female giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Animal Reproduction Science*.161:129-137.
- 22) Nuurai P, Panasophonkul S, Tinikul Y, **Sobhon P**, Wanichanon R. 2016. Spermatogenesis in the rock oyster, *Saccostrea forskali* (Gmelin, 1791). *Tissue and Cell*, 48:43-48.
- 23) Sangfuang M, Chusongsang Y, Limpanont Y, Vanichviriyakit R, Chotwiwatthanakun C, **Sobhon P**, Preyavichyapugdee N. 2016. *Schistosoma mekongi* cathepsin B and its use in the development of an immunodiagnosis. *Acta Tropica*, 155:11-19.
- 24) Tinikul Y, Poljaroen J, Tinikul R, **Sobhon P**. 2016. Changes in the levels, expression, and possible roles of serotonin and dopamine during embryonic development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, 225:71-80.
- 25) Chaweeborisuit P, Suriyonplengsaeng C, Suphamungmee W, **Sobhon P**, Meemon K. 2016. Nematicidal effect of plumbagin on *Caenorhabditis elegans*: a model for testing a nematicidal drug. *Zeitschrift für Naturforschung C*, doi: 10.1515/znc-2015-0222.

- 26) Anuracpreeda P, Chawengkirttikul R, **Sobhon P**. 2016. Antigenic profile, isolation and characterization of whole body extract of *Paramphistomum gracile*. *Parasite Immunology*, 38(7):431-438.
- 27) Preyavichyapugdee N, Sangfuang M, Chaiyapum S, Sriburin S, Pootaeng-on Y, Chusongsang P, Jiraungkoorskul W, Preyavichyapugdee M, **Sobhon P**. 2016. Schistosomicidal activity of the crude extract of *Artocarpus lakoocha*. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 47(1):1-15.
- 28) Meemon K, **Sobhon P**. 2016. Development of Fasciola Vaccine in an Animal Model. *Methods in Molecular Biology*. 1404:123-133.
- 29) Anuracpreeda P, Chawengkirttikul R, **Sobhon P**. 2016. Surface histology, topography, and ultrastructure of the tegument of adult *Orthocoelium parvipapillatum* (Stiles & Goldberger, 1910). *Parasitology Research*, 115(7):2757-2769.
- 30) Senarai T, Saetan J, Tamtin M, Weerachayanukul W, **Sobhon P**, Sretarugsa P. 2016. Presence of gonadotropin-releasing hormone-like peptide in the central nervous system and reproductive organs of the male blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and its effect on spermatogenesis. *Cell Tissue Research*, 365(2):265-77.
- 31) Anuracpreeda P, Chankaew K, Puttarak P, Koedrith P, Chawengkirttikul R, Panyarachun B, Ngamniyom A, Chanchai S, **Sobhon P**. 2016. The anthelmintic effects of the ethanol extract of Terminalia catappa L. leaves against the ruminant gut parasite, *Fischoederius cobboldi*. *Parasitology*, 143(4):421-433.
- 32) Thongbuakaew T, Siangcham T, Suwansa-Ard S, Elizur A, Cummins SF, **Sobhon P**, Sretarugsa P. 2016. Steroids and genes related to steroid biosynthesis in the female giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Steroids*, 107:149-160.
- 33) Anuracpreeda P, Chawengkirttikul R, **Sobhon P**. 2016. Immunodiagnosis of *Fasciola gigantica* Infection Using Monoclonal Antibody-Based Sandwich ELISA and Immunochromatographic Assay for Detection of Circulating Cathepsin L1 Protease. *PLoS One*, 11(1):e0145650.
- 34) Anuracpreeda P, Chawengkirttikul R, **Sobhon P**. 2016. Immunodiagnostic monoclonal antibody-based sandwich ELISA of fasciolosis by detection of *Fasciola gigantica* circulating fatty acid binding protein. *Parasitology*, 17:1-13.
- 35) Jaikua W, Kueakhai P, Chaithirayanon K, Tanomrat R, Wongwairot S, Riengrojpitak S, **Sobhon P**, Changklungmoa N. 2016. Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica*, 162:75-82.

- 36) Sangpairoj K, Vivithanaporn P, Apisawetakan S, Chongthammakun S, **Sobhon P**, Chaithirayanon K. 2016. RUNX1 Regulates Migration, Invasion, and Angiogenesis via p38 MAPK Pathway in Human Glioblastoma. *Cell and Molecular Neurobiology*, doi: 10.1007/s10571-016-0456-y.
- 37) Changklungmoa N, Phoinok N, Yenchan C, **Sobhon P**, Kueakhai P. 2016. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. *Veterinary Parasitology*, 226:124-31.
- 38) Suwansa-Ard S, Zhao M, Thongbuakaew T, Chansela P, Ventura T, Cummins SF, **Sobhon P**. 2016. Gonadotropin-releasing hormone and adipokinetic hormone/corazonin-related peptide in the female prawn. *General and Comparative Endocrinology*, 236:70-82.
- 39) Anuracpreeda P, Watthanadirek A, Chawengkirttikul R, **Sobhon P**. 2017. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to 16 kDa antigen of *Paramphistomum gracile*. *Parasitology Research*, 116(1):167-175.
- 40) Thongrod S, Changklungmoa N, Chansela P, Siangcham T, Kruangkum T, Suwansa-Ard S, Saetan J, Sroyraya M, Tinikul Y, Wanichanon C, **Sobhon P**. 2017. Characterization and tissue distribution of neuropeptide F in the eyestalk and brain of the male giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Cell and Tissue Research*, 367(2):181-195.
- 41) Kueakhai P, Changklungmoa N, Waseewiwat P, Thanasinpaiboon T, Cheukamud W, Chaichanasak P, **Sobhon P**. 2017. Characterization and vaccine potential of *Fasciola gigantica* saposin-like protein 1 (SAP-1). *Veterinary Parasitology*, 233:115-122.
- 42) Kuanpradit C, Jaisin Y, Jungudomjaroen S, Akter Mitu S, Puttikamonkul S, **Sobhon P**, Cummins SF. 2017. Attenuation of UV-B exposure-induced inflammation by abalone hypobranchial gland and gill extracts. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(5):1083-1090.
- 43) Kankuan W, Wanichanon C, Titone R, Engsusophon A, Sumpownon C, Suphamungmee W, Morani F, Masini M, Novelli M, Isidoro C, **Sobhon P**. 2017. Starvation promotes autophagy-associated maturation of the ovary in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Frontiers Physiology*, doi.org/10.3389/fphys.2017.00300.
- 44) Poljaroen J, Tinikul Y, Tinikul R, Anurucpreeda P, **Sobhon P**. 2017. Leptin-like immunoreactivity in the central nervous system, digestive organs, and gonads of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Acta Histochemica*, doi: 10.1016/j.acthis.2017.06.001.

- 45) Saetan J, Senarai T, Thongbuakaew T, Kruangkum T, Chansela P, Khornchatri K, Tamtin M, **Sobhon P**, Sretarugsa P, 2017. The presence of abalone egg-laying hormone-like peptide in the central nervous system and ovary of the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and its effect on ovarian maturation. *Aquaculture*, 479:412-422.
- 46) Bose U, Kruangkum T, Wang T, Zhao M, Ventura T, Mitu SA, Hodson MP, Shaw PN, **Sobhon P**, Cummins SF, 2017. Biomolecular changes that occur in the antennal gland of the giant freshwater prawn (*Machrobrachium rosenbergii*). *PLoS One*, 12(6):e0177064.
- 47) Chalorak P, Jattujan P, Nobsathian S, Poomtong T, **Sobhon P**, Meemon K, 2018. *Holothuria scabra* extracts exhibit anti-Parkinson potential in *C. elegans*: A model for anti-Parkinson testing. *Nutr Neurosci*. 21(6):427-438.
- 48) Suwansa-Ard S, Chaiyamoong A, Talarovicova A, Tinikul R, Tinikul Y, Poomtong T, Elphick MR, Cummins SF, **Sobhon P**, 2018. Transcriptomic discovery and comparative analysis of neuropeptide precursors in sea cucumbers (Holothuroidea). *Peptides*. 99:231-240.
- 49) Chotiwatthanakun C, Santimanawong W, **Sobhon P**, Wongtripop S, Vanichviriyakit R, 2018. Inhibitory effect of a reproductive-related serpin on sperm trypsin-like activity implicates its role in sperm maturation of *Penaeus monodon*. *Mol Reprod Dev*. 85(3):205-214.
- 50) Chaiyamoong A, Tinikul R, Chaichotranunt S, Poomthong T, Suphamungmee W, **Sobhon P**, Tinikul Y, 2018. Distribution and dynamic expression of serotonin and dopamine in the nervous system and ovary of *Holothuria scabra* during ovarian maturation. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 204(4):391-407.
- 51) Saetan J, Kruangkum T, Phanthong P, Tipbunjong C, Udomuksorn W, **Sobhon P**, Sretarugsa P, 2018. Molecular cloning and distribution of oxytocin/vasopressin-like mRNA in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and its inhibitory effect on ovarian steroid release. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 218:46-55.
- 52) Soonthornsumrith B, Saetan J, Kruangkum T, Thongbuakaew T, Senarai T, Palasoon R, **Sobhon P**, Sretarugsa P, 2018. Three-dimensional organization of the brain and distribution of serotonin in the brain and ovary, and its effects on ovarian steroidogenesis in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invert Neurosci*. 18(2):5. doi: 10.1007/s10158-018-0209-3.
- 53) Poljaroen J, Tinikul R, Anuracpreeda P, **Sobhon P**, Tinikul Y, 2018. The expression and distribution of a leptin receptor in the central nervous system, digestive organs, and

- gonads of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Acta Histochem.* 120(4):373-384.
- 54) Jattujan P, Chalorak P, Siangcham T, Sangpairaj K, Nobsathian S, Poomtong T, **Sobhon P**, Meemon K, 2018. *Holothuria scabra* extracts possess anti-oxidant activity and promote stress resistance and lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol.* 110:158-171.
- 55) Thongrod S, Wanichanon C, Kankuan W, Siangcham T, Phadngam S, Morani F, Isidoro C, **Sobhon P**, 2018. Autophagy-Associated Shrinkage of the Hepatopancreas in Fasting Male *Macrobrachium rosenbergii* Is Rescued by Neuropeptide F. *Front Physiol.* 24:9:613.
- 56) Sroyraya M, Songkoomkrong S, Changklungmoa N, Poljaroen J, Weerakiet S, Sophonsritsuk A, Wongkularb A, Lertvikool S, Tingthanatikul Y, **Sobhon P**. 2018. Differential expressions of estrogen and progesterone receptors in endometria and cyst walls of ovarian endometrioma from women with endometriosis and their responses to depo-medroxyprogesterone acetate treatment. *Mol Cell Probes.* 40:27-36.
- 57) Changklungmoa N, Chaithirayanon K, Cheukamud W, Chaiwichien A, Osotprasit S, Samrit T, **Sobhon P**, Kueakhai P. 2018. Expression and characterization of glutathione peroxidase of the liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Parasitol Res.* 117(11):3487-3495.
- 58) Sangpairaj K, Apisawetakan S, Changklungmoa N, Kueakhai P, Chaichanasak P, **Sobhon P**, Chaithirayanon K. 2018. Potential of recombinant 2-Cys peroxiredoxin protein as a vaccine for *Fasciola gigantica* infection. *Exp Parasitol.* 194:16-23.
- 59) Duangprom S, Ampansri W, Suwansa-Ard S, Chotwiwatthanakun C, **Sobhon P**, Kornthong N. 2018. Identification and expression of prostaglandin E synthase (PGES) gene in the central nervous system and ovary during ovarian maturation of the female mud crab, *Scylla olivacea*. *Anim Reprod Sci.* 198:220-232.
- 60) Sroyraya M, Kaewphalug W, Anantachoke N, Poomtong T, **Sobhon P**, Srimongkol A, Suphamungmee W. 2018. Saponins enriched in the epidermal layer of *Holothuria leucospilota* body wall. *Microsc Res Tech.* 81(10):1182-1190.
- 61) Saetan J, Boonyoung P, Vongvatcharanon U, Kruangkum T, Khornchatri K, Thaweethamseewee P, **Sobhon P**, Sretarugsa P. 2018. Corrigendum to 'The presence of abalone egg-laying hormone-like peptide in the central nervous system and ovary of the Spotted Babylon, *Babylonia areolata*' [Acta histochemica 119 (2017) 701-707]. *Acta Histochem.* 120(8):859.

- 62) Khornchatri K, Saetan J, Thongbuakaew T, Senarai T, Kruangkum T, Kornthong N, Tinikul Y, **Sobhon** P. 2019. Distribution of abalone egg-laying hormone-like peptide in the central nervous system and reproductive tract of the male mud crab, *Scylla olivacea*. *Acta Histochem.* 121(2):143-150.
- 63) Malaiwong N, Chalorak P, Jattujan P, Manohong P, Niamnont N, Suphamungmee W, **Sobhon** P, Meemon K. 2019. Anti-Parkinson activity of bioactive substances extracted from *Holothuria leucospilota*. *Biomed Pharmacother.* 109:1967-1977.
- 64) Kruangkum T, Saetan J, Chotwiwatthanakun C, Vanichviriyakit R, Cummins SF, Wanichanon C, **Sobhon** P. 2019. Existence of an egg-laying hormone-like peptide in male reproductive system of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Acta Histochem.* 121(2):156-163.
- 65) Chumphoochai K, Chalorak P, Suphamungmee W, **Sobhon** P, Meemon K. 2019. Saponin-enriched extracts from body wall and Cuvierian tubule of *Holothuria leucospilota* reduce fat accumulation and suppress lipogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *J Sci Food Agric.* 99(8):4158-4166.
- 66) Thongrod S, Wanichanon C, **Sobhon** P. 2019. Distribution of neuropeptide F in the ventral nerve cord and its possible role on testicular development and germ cell proliferation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Cell Tissue Res.* 376(3):471-484.
- 67) Kornthong N, Duangprom S, Suwansa-Ard S, Saetan J, Phanaksri T, Songkoomkrong S, Kheowkae S, Pollawat J, **Sobhon** P. 2019. Molecular characterization of a vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) in the mud crab (*Scylla olivacea*) and temporal changes in abundances of VIH mRNA transcripts during ovarian maturation and following neurotransmitter administration. *Anim Reprod Sci.* 208:106122.