รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2559

การศึกษาการแสดงออกของยีนระดับ mRNA ของพยาธิ *Fasciola gigantica* เพื่อพัฒนายา วัคซีนและชุดตรวจ

Transcriptome analysis of *Fasciola gigantica* for drug, vaccine and diagnosis development of fasciolosis

ดร.นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ

มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2561

รหัสโครงการ 2559A10862007

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2559

โครงการการศึกษาการแสดงออกของยีนระดับ mRNA ของพยาธิ

Fasciola gigantica เพื่อพัฒนายา วัคซีนและชุดตรวจ

ดร.นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ

มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดย

สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา

และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission

บทคัดย่อ

งานวิจันครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกระดับยีน mRNA ในตัวอ่อนระยะแรก (Newly excysted juvenile-NEJ) ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* มีวิธีดำเนินการโดย 3 ขั้นตอน คือ 1) การสกัด RNAจากพยาธิใบไม้ตับระยะ NEJ ด้วยชุดสกัด mRNA 2) ทำ cDNA libraly ด้วย TruSeq RNA kit 3) อ่านลำดับเบสด้วย Illumina HiSeq 2000 4) ทำการวิเคราะห์ลำดับยีน ผลการวิจัย พบว่า *F. gigantica* ในระยะตัวอ่อน มีการแสดงออกของยีนมากกว่า 31,000 ยีน

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้ตับ, การแสดงออกระดับยีน, ตัวอ่อนระยะแรก

บทนำ

Fasciola gigantica เป็นพยาธิที่พบทั่วไปในโค กระบือ แกะ และคนในประเทศไทย และประเทศเขตร้อนอื่น ๆ ทั่วโลก เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านเกษตรอุตสาหกรรมการสัตว์เลี้ยงของประเทศในอัตราสูง จากการสำรวจพบว่าโค กระบือมีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ 11.8% และในบางบริเวณของประเทศไทยอาจมีอัตราการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 85 ดังนั้นพยาธิใบไม้ตับจึงเป็นพยาธิที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม การเลี้ยงโค กระบือ แพะ และแกะ เนื่องจากทำให้ผลผลิตเนื้อ นม และการใช้แรงงานลดลงอย่างมาก มีการประมาณว่าโรคพยาธิชนิดนี้สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรปีละประมาณ 300 ล้านบาท (Sukhapesna et al., 1990 : Sirihakim and Pholpark, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในประเทศไทย มีคนติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* มีแนวโน้มจะมากขึ้นเนื่องจากมีการขยายตัวของการเลี้ยงสัตว์ในประเทศ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 10 ปีที่แล้วมา

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* และ *F. hepatica* ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำ ซึ่งการเก็บอุจาระสัตว์นั้นทำได้ยากและเสียเวลามากในการตรวจ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้เนื่องจากจะตรวจพบไข่ก็ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์ ทำให้ไข่ของพยาธินั้นปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งทำให้วงจรการระบาดยังคงมีอยู่

ในประเทศไทยจะมีรายงายการติดพยาธิ *F. gigantica* ในคนน้อยนั้น ไม่สามารถแปรผลได้ว่าประไทยไม่มีการระบาดของของโรค Fasciolosis เป็นเพราะคนส่วนใหญ่ของประเทศไม่ได้รับการตรวจทางการแพทย์ เนื่องจากพฤติกรรมของคนไทยนั้นถ้าอาการของโรคไม่รุนแรงมากก็จะไม่ไปตรวจรักษา ซึ่งถ้าติดเชื้อ *F. gigantica* น้อยก็จะไม่แสดงอาการของโรคมากนัก ในทางตรงกันข้ามคนไทยนิยมบริโภคผักสด และผักบางชนิดนั้นปลูกในน้ำ เช่น ผักกะเฉด ผักบุ้งไทย เป็นต้น รวมถึงการนำน้ำธรรมชาติจากหนองบึงมาลดน้ำผักที่ปลูก ดังนั้นคนไทยจึงตกอยู่ในภาวะเสี่ยงเป็นโรค Fasciolosis จากพฤติกรรมการบริโภคโดยไม่รู้ตัว และอีกประการที่สนับสนุนได้ว่า *F. gigantica* มีการติดในคนได้มากเช่นกันดังมีรายงานการติดเชื้อ *F. gigantica* ในกลุ่มประเทศตะวันออกกลาง และแอฟริกาเหนือ ส่วนการติดเชื้อ *F. hepatica* มีรายงานการติดทั้งคนและสัตว์เช่นกัน ในช่วงระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยได้ออกเก็บตัวอย่างพยาธิจากโรงฆ่าสัตว์ เช่น เชียงใหม่

ปทุมธานี เพรชบุรี นครราชสีมา แม่ฮองสอน ยังพบวัวและควายติดเชื้อ *F. gigantica* อยู่ หรือสัตว์บางตัวไม่มีตัวพยาธิให้เห็นแต่กลับมีรอยโรค fasciolosis ให้เห็นอยู่ แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันการแพร่ระบาดของโรค fasciolosis ในประเทศไทยนั้นไม่ได้ลดลงเลย น่าจะเพิ่มขึ้นมากเสียอีก ภาวะโรคร้อนยิ่งเป็นตัวเร่งของวงจรชีวิตของ *Fasciola spp.* ให้เร็วและเพิ่มขึ้นด้วย ในสถานะการปัจจุบันมีการนำวัวจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่า บังคลาเทศ เข้ามา ซึ่งวัวในแถบนั้นมีการติดเชื้อ *Fasciola spp.* อยู่มาก และในอนาคตมีโอกาศมากที่เชื้อ *F. hepatica* จะมาแพร่ระบาดในประเทศไทยด้วย จึงยิ่งทำให้สถานการแพร่ระบาดไม่อาจหายไปได้เลย ดังมีรายงานหอยในแหล่งน้ำสาธารณะมีการติดเชื้อ *F. gigantica*

พันธุกรรมของ *F. gigantica* และ *F. hepatica* นั้นมีความคล้ายกัน 95-100 % แต่ระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกันและไม่เท่ากันแม้จะมีข้อมูลที่เผยแพร่การทำ transcriptome ในพยาธิ *F. hepatica* จึงไม่สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการพัฒนายา วัควีน และชุดตรวจเพื่อรักษา *F. gigantica* ได้ ในทางเดียวกันการแสดงออกของยีนในแต่ระยะของพยาธิไม่ไม่เหมือนกันและไม่เท่ากันจึงทำให้การคิดค้นยาตัวใหม่ๆและวัคซีนไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ในปัจจุบันมีรายงานการดื้อยาที่ใช้อยู่ ดังนั้นเราควรศึกษาค้นคว้าหายาตัวใหม่ๆ เพื่อเป็นยาสำรองในอนาคต แต่เรายังขาดข้อมูลพื้นฐาน คือ การแสดงออกของยีนในแต่ระยะของพยาธิที่เปลี่ยนแปลงไป และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะแสดงให้เห็นว่าพยาธิใช้วิธีใดในการป้องกันตัวเองจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสล์

โรคพยาธิส่วนใหญ่ซึ่งรวมทั้งโรคพยาธิใบไม้ตับไม่มีทางที่จะกำจัดให้หมดสิ้นไปได้ เนื่องจากพยาธิชนิดนี้มีวงจรชีวิตที่แทรกซึมอยู่ในสภาพแวดล้อม โดยมีวงจรชีวิตส่วนหนึ่งที่พัฒนาเฉพาะในหอย lymneae ที่เป็นพาหะกลาง (intermediate host) ซึ่งมีกระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำต่าง ๆ และไม่อาจจะกำจัดให้หมดสิ้นไปได้ มาตรการที่จะช่วยให้สามารถควบคุมการติดเชื้อในประชากรของสัตว์ที่เป็นพาหะเฉพาะ (definitive hosts) ได้แก่ วัว ควาย แพะ แกะ ตลอดจนมนุษย์

ในปัจจุบันมีการศึกษาพัฒนายาและวัคซีนเพื่อป้องกันและรักษาโรค fasciolosis แต่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากพยาธิมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนและระดับการแสดงออกไม่เหมือนกันในแต่ระยะของตัวพยาธิเอง และยังไม่มีข้อมูลของการแสดงออกของยีนในทุกระยะพยาธิ จึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้วิจัยยาและวัคซีนให้ประสบความสำเร็จต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกของยีนระดับ mRNA ระยะ NEJ ของ *F. gigantica* เพื่อนำการแสดงออกของยีนมาวิเคราะห์เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจและวัคซีนสำหรับโรค fasciolosis และเป็นการหายีนใหม่ๆที่มีการแสดงออกเยอะมาทำการศึกษาต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ

นำเอาตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมจากไข่พยาธิไปติดเชื้อในหอย *Lymnaea ollula* ซึ่งนำมาจากประเทศญี่ปุ่นเพื่อให้ได้ตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียสำหรับการทดลองได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากหอย *L. ollula* เป็นพันธุ์ที่มีความทนต่อการติดเชื้อพยาธิกว่าหอย *Radix rubiginosa* ซึ่งเป็นพาหะกลางของพยาธิใบไม้ตับ โค กระบือ ตามธรรมชาติในประเทศไทย การเพาะเลี้ยงหอย *L. ollula* กระทำโดยนำหอยตัวเต็มวัยประมาณ 30 ตัว ใส่ในอ่างพลาสติกสีขาว ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 ซ.ม. สูงประมาณ 9 ซ.ม. ภายในอ่าง ใส่ดินเหนียวและก้อนหิน ทำเป็นทางลาดเพื่อให้หอยวางไข่ เติมน้ำให้ท่วมดินเหนียวและก้อนหินประมาณ 2 ซ.ม. ให้ออกซิเจนโดยใช้เครื่องพ่นอากาศลงไปในอ่างน้ำตลอดเวลาและให้แสงสว่างโดยใช้ไฟนีออนขนาด 40W เป็นเวลา 8 ซ.ม. ต่อวัน ให้อาหารคือผักกาดหอมและสาหร่ายเซลล์เดียว

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย L. ollula

(1) นำเอาไข่พยาธิที่ได้จากถุงน้ำดีของโคหรือกระบือที่ติดเชื้อพยาธิมาล้างน้ำดีออกด้วยน้ำที่ปราศจากคลอรีน จากนั้นรวมเอาไข่ที่ได้ใส่จานแก้ว (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 ซม. เติมน้ำให้ท่วมฝาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูการพัฒนาของไข่พยาธิทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope) พยาธิใช้เวลาประมาณ 14-16 วัน จึงจะเจริญเป็นระยะไมราซิเดียม และฟักออกมาจากไข่

(2) นำหอยที่โตเต็มที่ขนาดประมาณ 4-5 มม. แยกออกมาใส่ถ้วยพลาสติกซึ่งบรรจุน้ำปราศจากคลอรีน ดูดเอาตัวอ่อนพยาธิระยะไมราซิเดียม จำนวน 2 ตัว ใส่ลงไปในถ้วยที่ใส่หอยไว้แล้วใช้หลอดไฟขนาด 40W ส่องห่าง ๆ เพื่อช่วยกระตุ้นไมราซิเดียซึ่งไวต่อแสง ตั้งถ้วยทิ้งไว้ประมาณ 2 ชม. เพื่อให้ไมราซิเดียวไชเข้าไปในหอย หลังจากนั้นแยกเอาหอยออกมาเลี้ยงตามปกติ

การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ

จากการศึกษาพบว่า ตัวอ่อนพยาธิใช้เวลาในการเจริญในหอยประมาณ 6 สัปดาห์ จึงจะได้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) ซึ่งจะออกจากหอยมาว่ายอยู่ในน้ำ หลังการติดเชื้อได้สัปดาห์ที่ 5 จึงเริ่มตรวจดูหอยที่ติดเชื้อไว้ และแยกหอยที่ติดเชื้อออกมาเลี้ยงรวมกันในที่ซึ่งพรางแสง เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียออกมาจากหอย

การเก็บตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียดำเนินการดังต่อไปนี้

นำหอยที่ได้ติดเชื้อไว้แล้วแยกใส่ถ้วยพลาสติกใสที่มีน้ำปราศจากคลอรีนทำเช่นนี้ทุกวันเว้นวัน ใช้แผ่นพาลสติกบางใสขนาด 5x5 ซม. ใส่ลงในถ้วย ใช้โคมไฟขนาด 40W ส่องกระตุ้นให้เซอร์คาเรียออกจากหอย ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียที่ออกมาจากหอยจะว่ายอยู่ในน้ำระยะเวลาสั้น ๆ แล้วจึงเกาะกับแผ่นพลาสติก สลัดหางทิ้ง สร้างซิสต์ระยะเมตาเซอร์คาเรียขึ้นมา หลังจากนั้นประมาณ 2 ชม. แยกเอาหอยออกไปเลี้ยงตามเดิม นำเอาแผ่นพลาสติกออกมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บแผ่นพลาสติกที่มีเมตาเซอร์คาเรียไว้ในตู้เย็น ซึ่งเมตาเซอร์คาเรียจะมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 1 สัปดาห์

การเก็บพยาธิตัววันอ่อน (NEJ)

นำเมตาเซอร์คาเรียที่ได้มาทำการเลี้ยงในอาหาร RPMI โดยมีน้ำดีเป็นส่วนประกอบ โดยพยาธิระยะ NEJ จะเริ่มออกจากเปลือกหุ้มและมีการเคลื่อนที่ ใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง ทำการเก็บพยาธิตัวอ่อน โดยแยกเปลือกหุ้มเมตาเซอร์คาเรียออกจาตัวอย่างให้มากที่สุด ทำการล้างพยาธิตัวอ่อนด้วย 1XPBS ประมาณ 3-5 รอบเพื่อให้พยาธิตัวอ่อนสะอาดปราศจากการปนเปื้อน ทำการดู PBS ออกให้หมด จึงใส่น้ำยาเก็บรักษาสภาพนำตัวอย่างเก็บไว้ที่ -70°C

การแยกสกัด RNA

ทำการสกัด total RNA ของพยาธิระยะ NEJ วัยอ่อนโดยสารละลาย TRIzol (Invitrogen) วิธีการสกัด ทำตามวิธีที่แนะนำในหนังสือคู่มือสารละลาย RNA ที่ได้ต้องมีคุณภาพดีและไม่มี DNA ปน เปื้อน โดยจะทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ Transcriptome analysis

นำ total RNA ไปทำ Transcriptome analysis ด้วยเครื่อง และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม การแสดงออกระดับยีน mRNA ในตัวอ่อนระยะแรก (Newly excysted juvenile-NEJ) ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* มีวิธีดำเนินการโดย 3 ขั้นตอน คือ 1) การสกัด RNAจากพยาธิใบไม้ตับระยะ NEJ ด้วยชุดสกัด

mRNA 2) ทำ cDNA libraly ด้วย TruSeq RNA kit 3) อ่านลำดับเบสด้วย Illumina HiSeq 2000 4) ทำการวิเคราะห์ลำดับยีน โดยการเปลียบเทียบกับฐานข้อมูลของ *F. hepatica*

ผลการวิจัย

1. การผลิตเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิ *F. gigantica*

การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ

นำเอาตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมจากไข่พยาธิไปติดเชื้อในหอย *Lymnaea ollula* ซึ่งนำมาจากประเทศญี่ปุ่นเพื่อให้ได้ตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียสำหรับการทดลองได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากหอย *L. ollula* เป็นพันธุ์ที่มีความทนต่อการติดเชื้อพยาธิกว่าหอย *Radix rugiginosa* ซึ่งเป็นพาหะกลางของพยาธิใบไม้ตับ โค กระบือ ตามธรรมชาติในประเทศไทย การเพาะเลี้ยงหอย *L. ollula* กระทำโดยนำหอยตัวเต็มวัยประมาณ 30 ตัว ใส่ในอ่างพลาสติกสีขาว ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 ซ.ม. สูงประมาณ 9 ซ.ม. ภายในอ่าง ใส่ดินเหนียวและก้อนหิน ทำเป็นทางลาดเพื่อให้หอยวางไข่ เติมน้ำให้ท่วมดินเหนียวและก้อนหินประมาณ 2 ซ.ม. ให้ออกซิเจนโดยใช้เครื่องพ่นอากาศลงไปในอ่างน้ำตลอดเวลาและให้แสงสว่างโดยใช้ไฟนีออนขนาด 40W เป็นเวลา 8 ช.ม. ต่อวัน ให้อาหารคือผักกาดหอมและสาหร่ายเซลล์เดียว

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย *L. ollula*

(1) นำเอาไข่พยาธิที่ได้จากถุงน้ำดีของโคหรือกระบือที่ติดเชื้อพยาธิมาล้างน้ำดีออกด้วยน้ำที่ปราศจากคลอรีน จากนั้นรวมเอาไข่ที่ได้ใส่จานแก้ว (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 ซม. เติมน้ำให้ท่วมฝาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูการพัฒนาของไข่พยาธิทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope) พยาธิใช้เวลาประมาณ 14-16 วัน จึงจะเจริญเป็นระยะไมราซิเดียม และฟักออกมาจากไข่

(2) นำหอยที่โตเต็มที่ขนาดประมาณ 4-5 มม. แยกออกมาใส่ถ้วยพลาสติกซึ่งบรรจุน้ำปราศจากคลอรีน ดูดเอาตัวอ่อนพยาธิระยะไมราซิเดียม จำนวน 2 ตัว ใส่ลงไปในถ้วยที่ใส่หอยไว้แล้วใช้หลอดไฟขนาด 40W ส่องห่าง ๆ เพื่อช่วยกระตุ้นไมราซิเดียซึ่งไวต่อแสง ตั้งถ้วยทิ้งไว้ประมาณ 2 ชม. เพื่อให้ไมราซิเดียวไชเข้าไปในหอย หลังจากนั้นแยกเอาหอยออกมาเลี้ยงตามปกติ

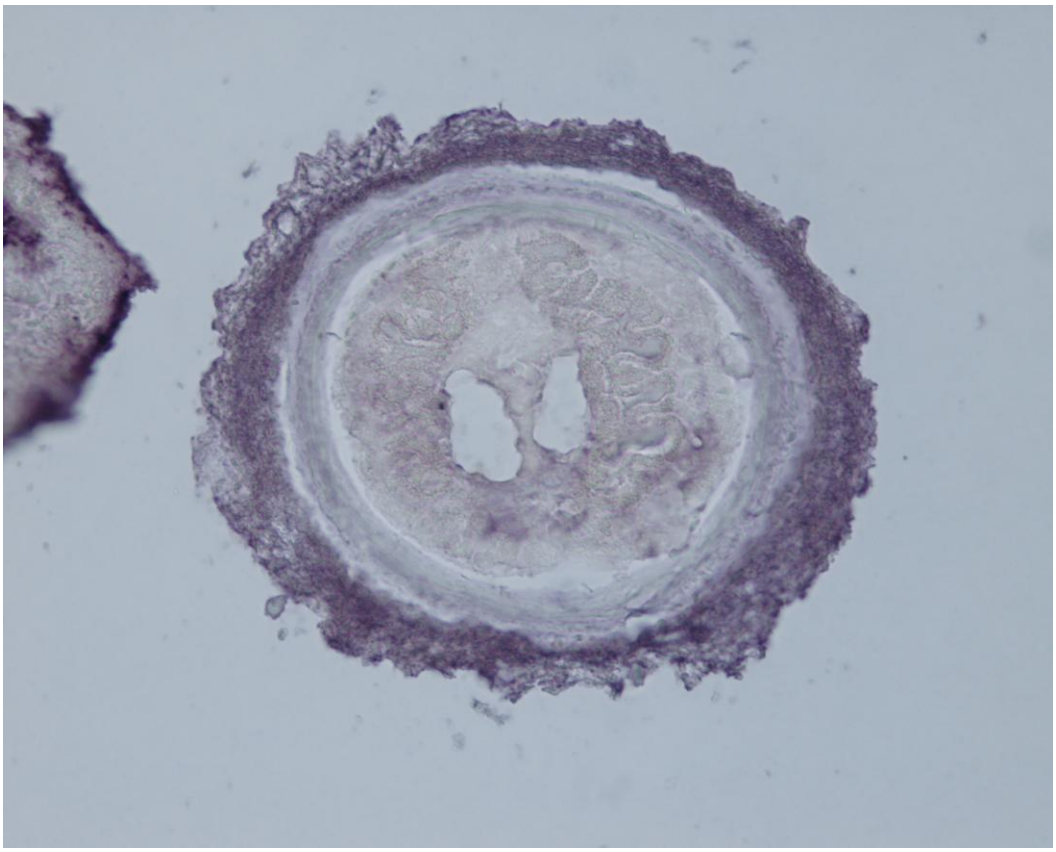
การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ ดังภาพที่ 1

จากการศึกษาพบว่า ตัวอ่อนพยาธิใช้เวลาในการเจริญในหอยประมาณ 6 สัปดาห์ จึงจะได้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) ซึ่งจะออกจากหอยมาว่ายอยู่ในน้ำ หลังการติดเชื้อได้สัปดาห์ที่ 5 จึงเริ่มตรวจดู

หอยที่ติดเชื้อไว้ และแยกหอยที่ติดเชื้อออกมาเลี้ยงรวมกันในที่ซึ่งพรางแสง เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียออกมาจากหอย

สำหรับการเก็บตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียดำเนินการดังต่อไปนี้

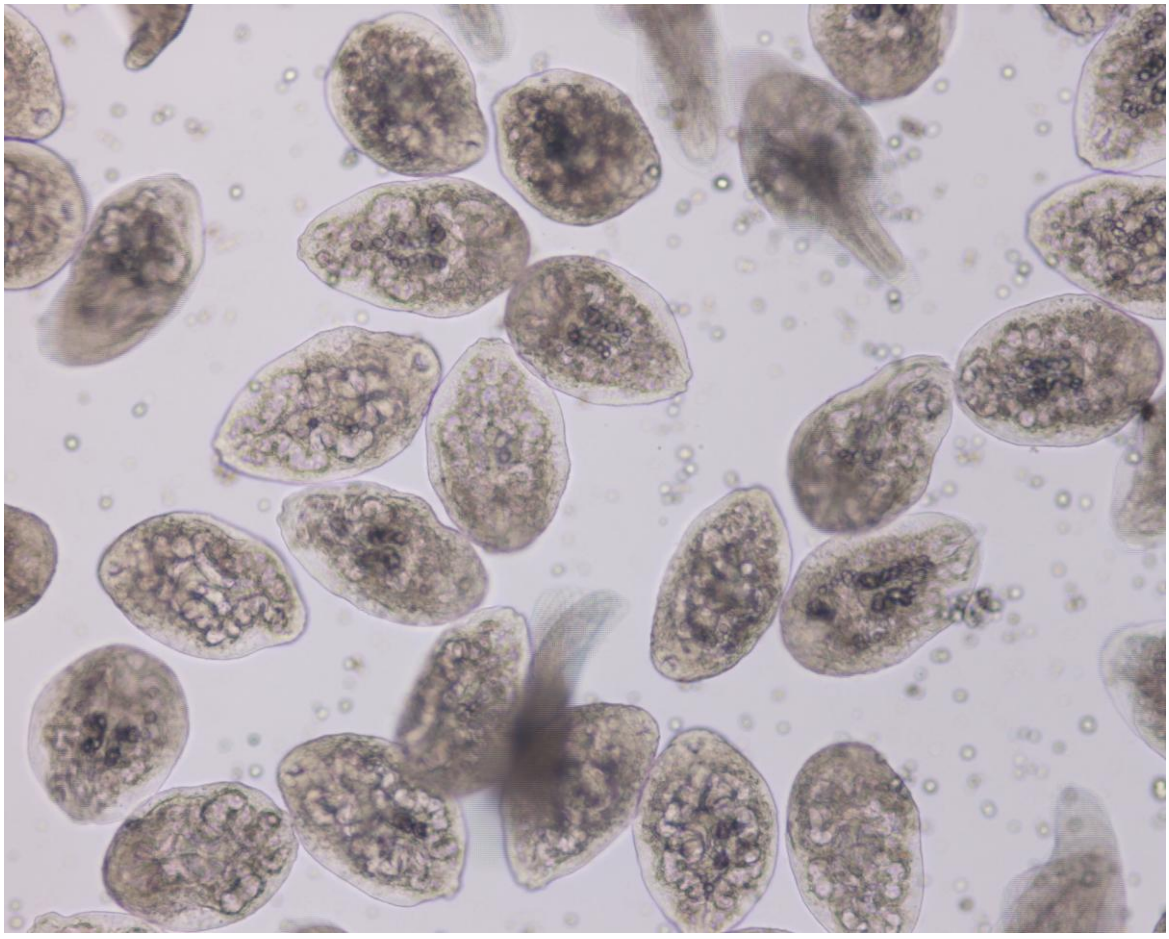
นำหอยที่ได้ติดเชื้อไว้แล้วแยกใส่ถ้วยพลาสติกใสที่มีน้ำปราศจากคลอรีนทำเช่นนี้ทุกวันเว้นวัน ใช้แผ่นพาลสติกบางใสขนาด 5x5 ซม. ใส่ลงในถ้วย ใช้โคมไฟขนาด 40W ส่องกระตุ้นให้เซอร์คาเรียออกจากหอย ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียที่ออกมาจากหอยจะว่ายอยู่ในน้ำระยะเวลาสั้น ๆ แล้วจึงเกาะกับแผ่นพลาสติก สลัดหางทิ้ง สร้างซิสต์ระยะเมตาเซอร์คาเรียขึ้นมาหลังจากนั้นประมาณ 2 ชม. แยกเอาหอยออกไปเลี้ยงตามเดิม นำเอาแผ่นพลาสติกออกมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บแผ่นพลาสติกที่มีเมตาเซอร์คาเรียไว้ในตู้เย็น 4°C ซึ่งเมตเซอร์คาเรียจะมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 6 เดือน ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 พยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย ของพยาธิ *F. gigantica*

การเก็บพยาธิวัยอ่อน

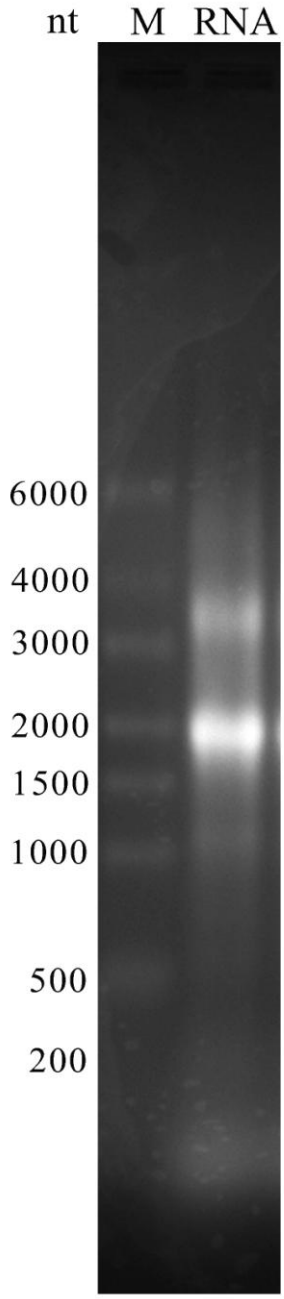
พยาธิระยะ NEJ จะเริ่มออกจากเปลือกหุ้มและมีการเคลื่อนที่ ใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง ทำการเก็บพยาธิตัวอ่อน โดยแยกเปลือกหุ้มเมตาเซอร์คาเรียออกจาตัวอย่างให้มากที่สุด ทำการล้างพยาธิตัวอ่อนด้วย 1XPBS ประมาณ 3-5 รอบเพื่อให้พยาธิตัวอ่อนสะอาดปราศจากการปนเปื้อน ทำการดู PBS ออกให้หมด จึงใส่น้ำยาเก็บรักษาสภาพ นำตัวอย่างเก็บไว้ที่ -70°C ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 วัยอ่อน (NEJ) ของพยาธิ *F. gigantica*

2. การสกัด RNA

ทำการสกัด total RNA ของพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียหรือวัยอ่อนโดยสารละลาย TRIzol (Invitrogen) วิธีการสกัด ทำตามวิธีที่แนะนำในหนังสือคู่มือสารละลาย RNA ที่ได้ต้องมีคุณภาพดีและไม่มี DNA ปน เปื้อน โดยจะทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสกัด RNA ดังภาพที่ 4

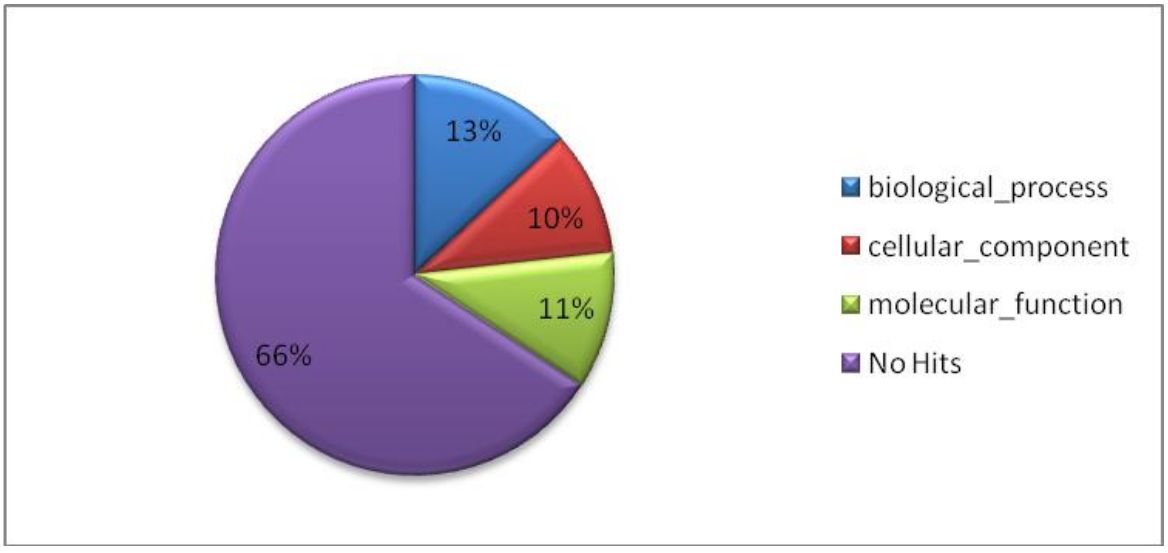


ภาพที่ 2 ผลของการสกัด RNA จากพยาธิ *F. gigantica*

3. ผลการแสดงออกของยีนระดับ mRNA จาพยาธิ F.gigantica

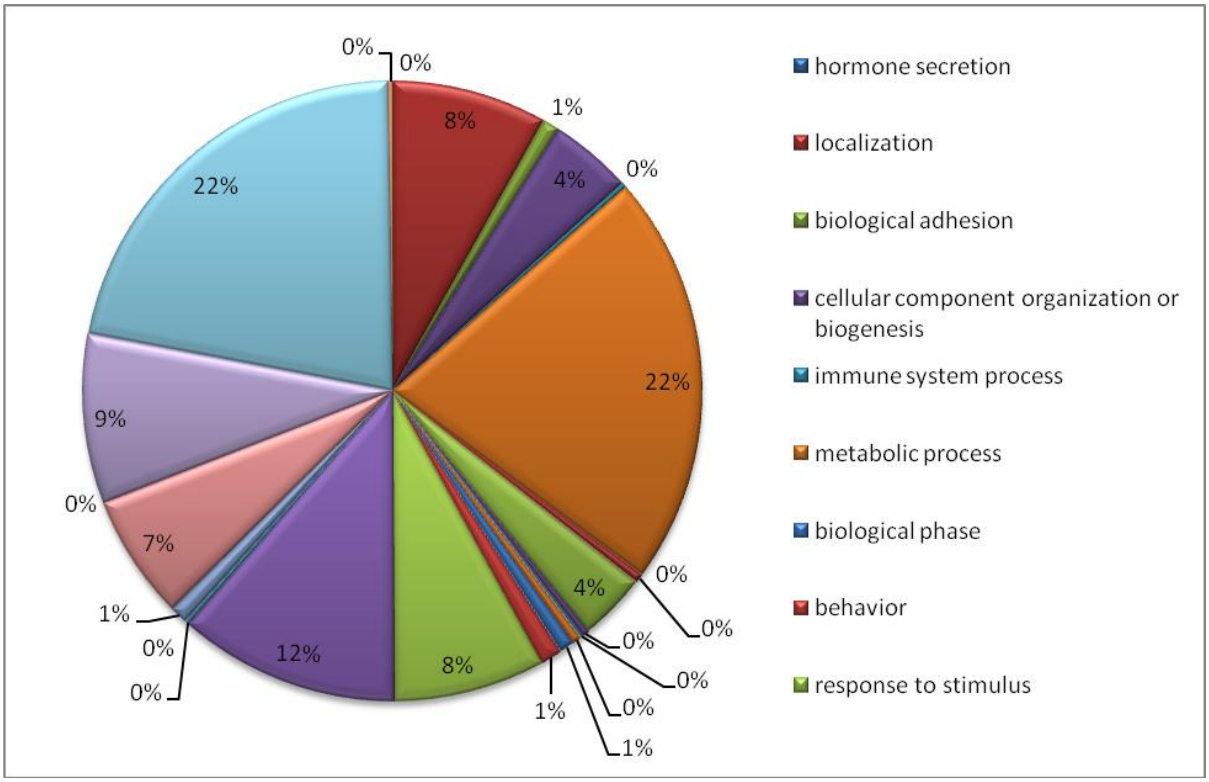
แสดงออกระดับยีน mRNA ในตัวอ่อนระยะแรก (Newly excysted juvenile-NEJ) ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* มีวิธีดำเนินการโดย 3 ขั้นตอน คือ 1) การสกัด RNAจากพยาธิใบไม้ตับระยะ NEJ ด้วยชุดสกัด mRNA 2) ทำ cDNA libraly ด้วย TruSeq RNA kit 3) อ่านลำดับเบสด้วย Illumina HiSeq 2000 4) ทำการวิเคราะห์ลำดับยีน ผลการวิจัย พบว่า Fasciola gigantica ในระยะตัวอ่อน มีการแสดงออกของยีนมากกว่า 31,000 ยีน สามารถระบุยีนได้ถึง 34% และไม่สามารถระบุได้ 66% ดังภาพที่ 3

ตารางที่ 1 GO analysis result:	
biological_process	6597.85
cellular_component	5102.12
molecular_function	5482.02
No Hits	33093.00



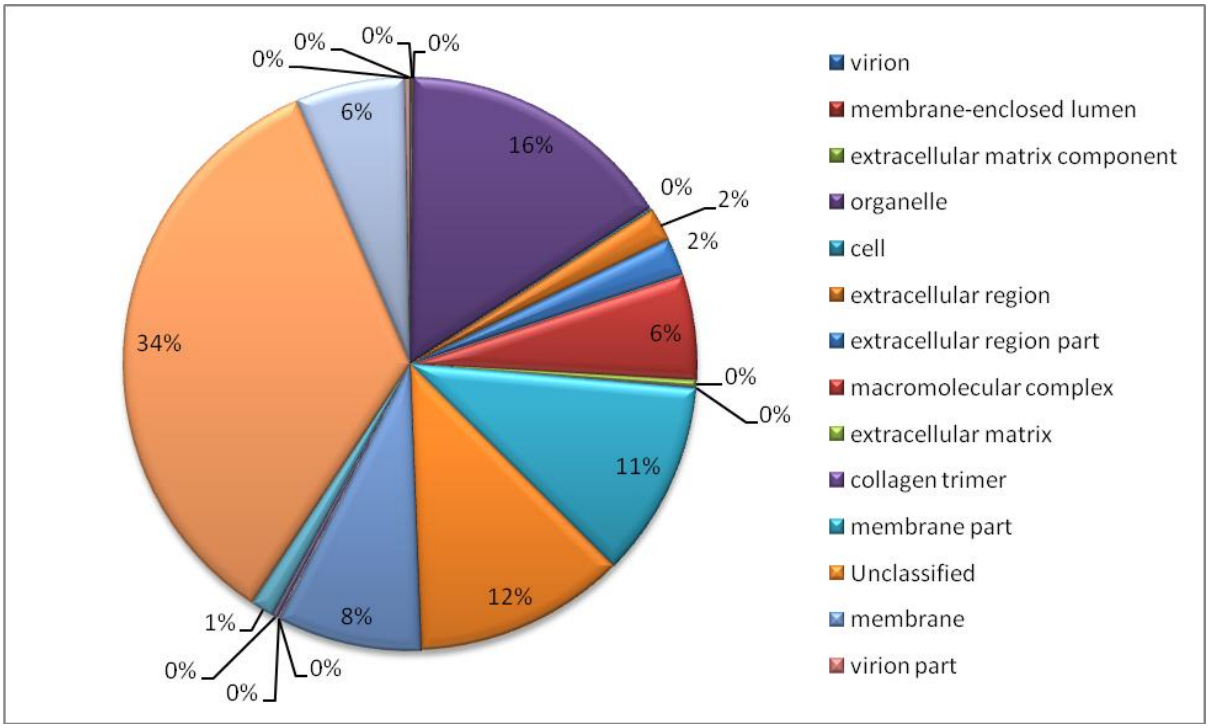
ภาพที่ 3 GO analysis result

ตารางที่ 2 biological_process:	
hormone secretion	0.08
localization	535.52
biological adhesion	57.60
cellular component organization or biogenesis	285.99
immune system process	16.27
metabolic process	1419.87
biological phase	2.41
behavior	29.62
response to stimulus	232.61
multi-organism process	25.68
rhythmic process	7.72
reproductive process	32.36
reproduction	50.48
multicellular organismal process	74.80
Unclassified	522.79
single-organism process	761.58
signaling	12.42
cell aggregation	1.32
locomotion	59.53
developmental process	429.74
cell killing	0.35
cellular process	585.47
biological regulation	1436.66
growth	16.87



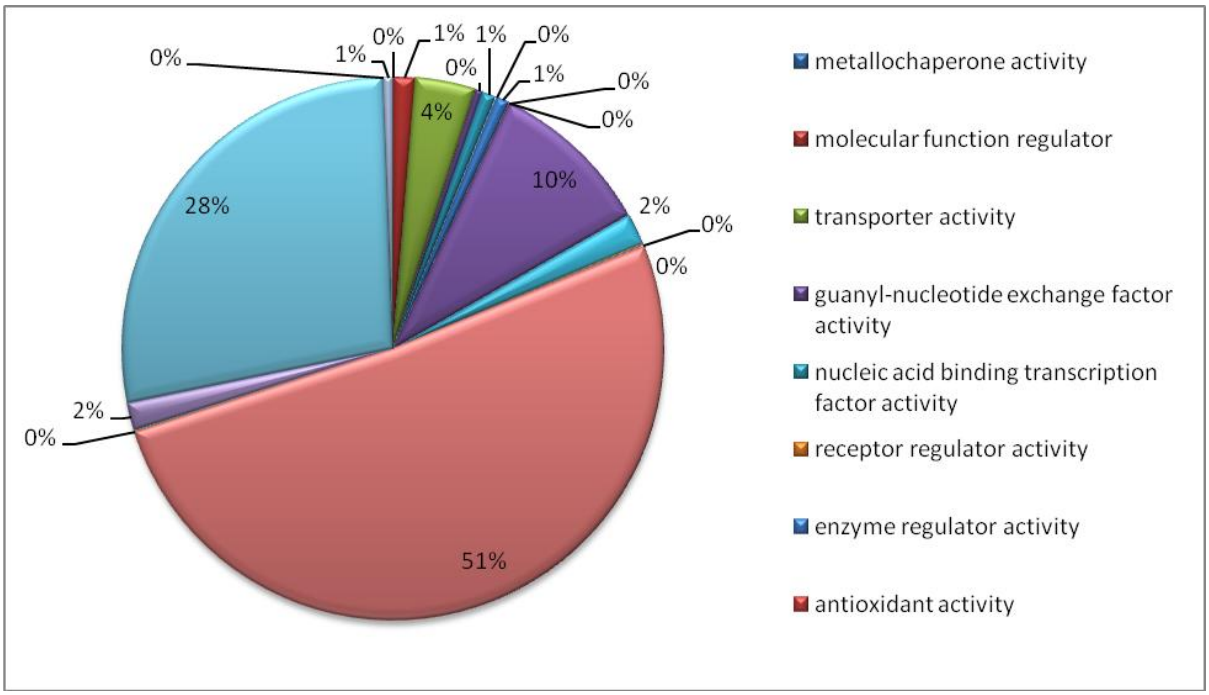
ภาพที่ 4 Biological process

ตารางที่ 3 cellular_component:	
virion	0.99
membrane-enclosed lumen	3.71
extracellular matrix component	5.29
organelle	799.17
cell	6.38
extracellular region	95.66
extracellular region part	107.09
macromolecular complex	300.98
extracellular matrix	20.79
collagen trimer	5.66
membrane part	565.22
Unclassified	608.40
membrane	417.56
virion part	2.49
nucleoid	1.12
synapse	18.24
cell junction	66.63
cell part	1746.52
organelle part	314.25
synapse part	15.87068911



ภาพที่ 5 cellular_component

ตารางที่ 4 molecular_function:	
metallochaperone activity	0.22
molecular function regulator	71.33
transporter activity	198.02
guanyl-nucleotide exchange factor activity	25.21
nucleic acid binding transcription factor activity	46.36
receptor regulator activity	0.39
enzyme regulator activity	43.82
antioxidant activity	3.92
protein tag	1.01
Unclassified	532.14
molecular transducer activity	103.48
electron carrier activity	6.23
channel regulator activity	1.89
binding	2806.15
translation regulator activity	2.97
structural molecule activity	92.45
catalytic activity	1514.59
chemoattractant activity	0.13
protein binding transcription factor activity	31.64



ภาพที่ 6 molecular_function

วิจารณ์

จากผลการทำ transcriptome ปรากฏผลมีการแสดงออกของยีนระดับ mRNA ที่สามารถทราบชนิดการแสดงออกได้ประมาณ 34% และไม่สามารถบ่งบอกชนิดของยีนได้มากถึง 66% ซึงจาการทำ transciptome ของพยาธิ *F. gigantica* ในครั้งนี้ใช้ข้อมูลในการเปลียบเทียบชนิดของยีนจากข้อมูลของ *F. hepatica* จึงเห็นว่ามียีนอีกจำนวนหนึงที่ไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้มากถึง 66% ซึงอาจเป็นอุปสรรคในการศึกษา จึงน่าจะมีการทำการหาลำดับยีนต่อไป แต่อย่างไรก็ดีเราได้ข้อมูลจากการทำการทดลองในครั้งนี้ ซึงเป็นข้อมูลพื้นฐานของการแสดงออกของยีนในพยาธิตัวอ่อน ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเลือกเป็นชีวโมเลกุลบ่งชี้ เพื่อใช้ในการพัฒนาชีวโมเลกุลบ่งชี้นี้เป็นชุดตรวจโรคต่อไป

จากผลการทดลองจะเห็นว่าเมื่อเปลียบเทียบกับรายงานงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษา transcriptome ในระยะตัวเต็มวัยของพยาธิ จะมีการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปแต่ละช่วยวัยของพยาธิเนื่องจากบริเวณหรือสิ่วแวดล้อมที่พยาธิอาศัยอยู่แต่ละช่วงวัยมีความแตกต่างกันจึงทำให้การแสดงออกของยีนนั้นมีความแตกต่างกันหรือสามารถเปลี่ยนไปตามสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่แต่ละช่วงวัย ในการทำ transcriptome ของพยาธิ *F. gigantica* ในระยะตัวอ่อน NEJ นี้นับว่าเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการที่จะเลือกแอนติเจนที่สำคัญต่อพยาธิในช่วงนั้นมาพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป เพื่อป้องกันการติดเชื้อในระยะแรกของการติดเชื้อได้ การวิจัยวัคซีนก่อนหน้านี้ไม่ได้ใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนของพยาธิ F. gigantica ในระยะตัวอ่อน NEJ ในภาพรวมมาทำการศึกษา จึงทำให้แอนติเจนบางตัวที่มีการแสดงออกมากและอาจมีวามสำคัญในการเคลื่อนที่ผ่านจากผนังสำใส้ไปยังตับไม่ได้ถูกศึกษาหรือพัฒนามาเป็นวัคซีนหรือไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ 100% งานวิจัยครั้งนี้จะเป็นภาพรวมและข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวัคซีนและชุดตรวจต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ลำดับยีน ผลการวิจัย พบว่า *F. gigantica* ในระยะตัวอ่อน มีการแสดงออกของยีนมากกว่า 31,000 ยีน ซึ่งสามารถระบุชนิดของยีนได้ 34% และไม่สามารถระบุชนิดของยีนได้ 66%

ผลผลิต

นำเสอนผลงานแบบโปรเตอร์ เมื่อวันที่ 2-4 มีนาคม 2560 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี จังหวัดอุดรธานี

จำนวน.....1.....เรื่อง

Abstract template (HERP Congress V)

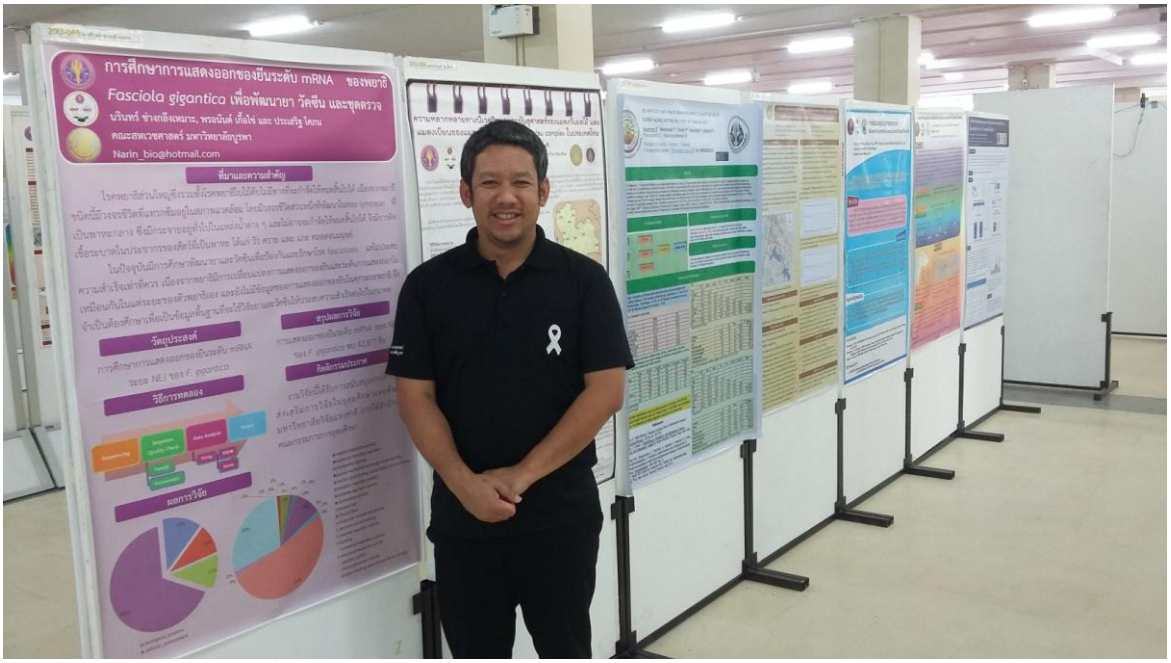
การศึกษาการแสดงออกของยีนระดับ mRNA ของพยาธิ Faciola gigantica ระยะตัวอ่อนระยะแรก เพื่อพัฒนายา วัคซีนและชุดตรวจ

นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ[1], พรอนันต์ เกื้อไข่[1]และ ประเสริฐ โศภน[1]

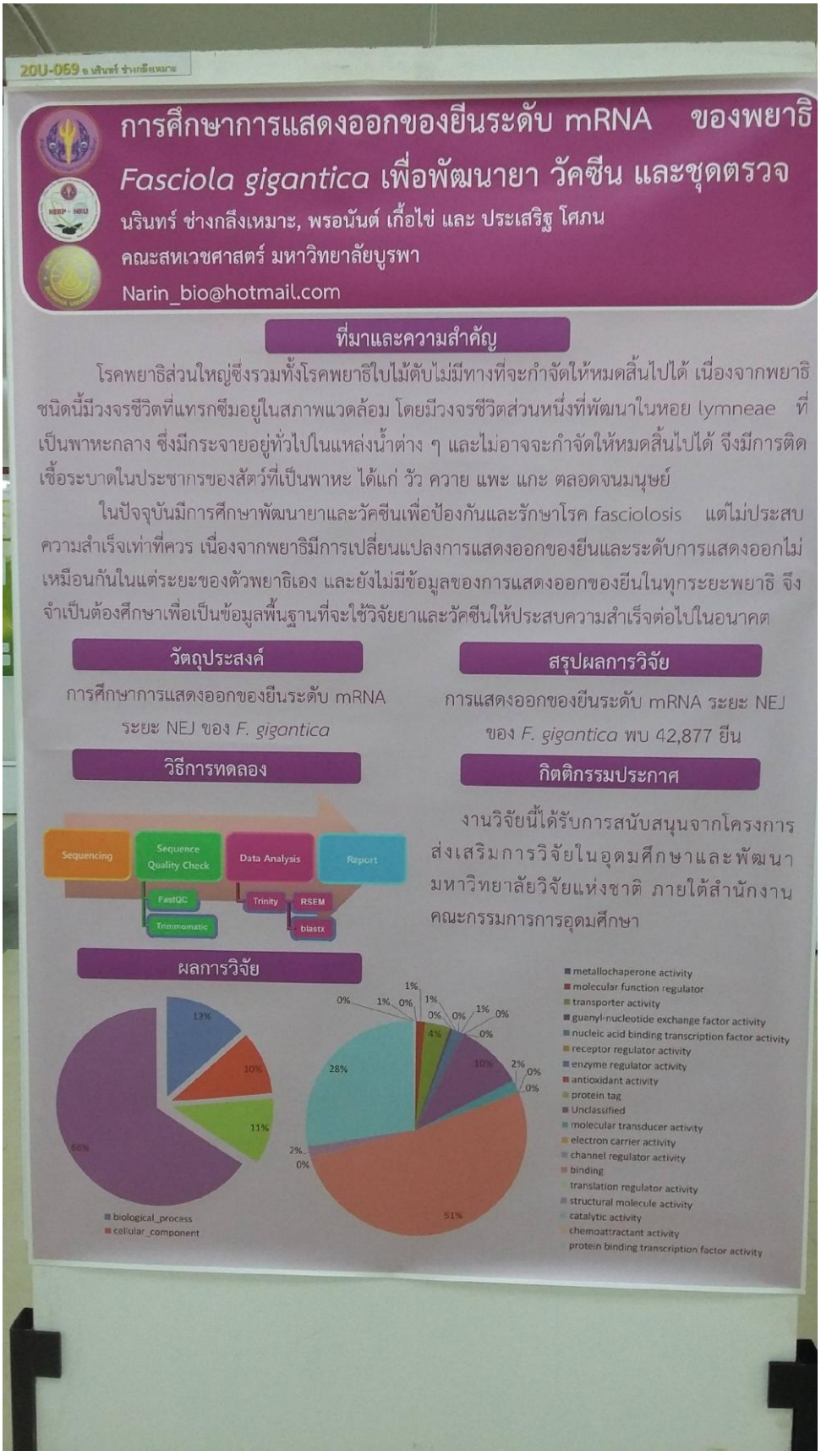
[1]คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

งานวิจันครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกระดับยีน mRNA ในตัวอ่อนระยะแรก (Newly excysted juvenile-NEJ) ของพยาธิใบไม้ตับ Fasciola gigantica มีวิธีดำเนินการโดย 3 ขั้นตอน คือ 1) การสกัด RNAจากพยาธิใบไม้ตับระยะ NEJ ด้วยชุดสกัด mRNA 2) ทำ cDNA libraly ด้วย TruSeq RNA kit 3) อ่านลำดับเบสด้วย Illumina HiSeq 2000 4) ทำการวิเคราะห์ลำดับยีน ผลการวิจัย พบว่า Fasciola gigantica ในระยะตัวอ่อน มีการแสดงออกของยีนมากกว่า 31,000 ยีน

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้ตับ, การแสดงออกระดับยีน, ตัวอ่อนระยะแรก



ภาพที่ 7 การนำเสนอผลงานวิจัยงาน HERP CONGRESS ครั้งที่ 5



ภาพที่ 8 โปสเตร์นำเสนอผลงานวิจัยงาน HERP CONGRESS ครั้งที่ 5

รายงานสรุปการเงิน ประจำปีงบประมาณ 2559
รหัสโครงการ (NRMS 13 หลัก) 2559A10862007
โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ชื่อมหาวิทยาลัย.....บูรพา.....
ชื่อโครงการ การศึกษาการแสดงออกของยีนระดับ mRNA ของพยาธิ *Fasciola gigantica* เพื่อพัฒนายา วัคซีนและชุดตรวจ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย (~~ศ. /รศ. /ผศ.~~ /ดร. /~~อ.~~) .....นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ.....

ระยะเวลาดำเนินการ จำนวน .....1.....ปี.....0.....เดือน

<u>รายจ่าย</u>

หมวด	งบประมาณรวมทั้งโครงการ (บาท)	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน) (บาท)
1. ค่าตอบแทน	30,000	30,000	0
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	210,000	210,000	0
4. ค่าใช้สอย	30,000	30,000	0
5. ค่าสาธารณูปโภค	30,000	30,000	0
รวม	300,000	300,000	0

<u>จำนวนงบประมาณที่ได้รับ</u>

- งวดที่ 1 จำนวน .....150,000.....บาท เมื่อ .....มกราคม 2560.....
- งวดที่ 2 จำนวน .....120,000.....บาท เมื่อ .....สิงหาคา 2560.....

รวม .....270,000.....บาท

.....
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

วันที่.....

.....
ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

วันที่.....

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ-นามสกุล นายนรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ

Mr. Narin Changklungmoa

ที่อยู่ปัจจุบัน คณะหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ตำแหน่ง อาจารย์

สถานที่ทำงาน คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผลงานทางวิชาการ

1. 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). Veterinary Parasitology. 2017; 233,115-122.
2. 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
3. **Changklungmoa N.**, Phoinok N., Yencham C., Sobhon..P, Kueakhai P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. Veterinary Parasitology. 2016; 226,124-131.
4. 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 Tropica 2016; 162,75-82.
5. Kueakhai P, **Changklungmoa N**, Chaichanasak P, Jaikua W, Itagaki T, Sobhon P. Vaccine poteintial of recombinant pro- and mature cathepsinL1 against fasciolosis gigantica in mice. Acta Tropica 2015; 150:71-78.

6. **Changklungmoa N.**, Kueakhai P., Chusongsang P.,Riengrojpitak S., Jaikua W., Sangpairoj K., Sobhon P., Chaithirayanon K. Molecular cloning and characterization of Fasciola gigantica thioredoxin-glutathione reductase. Experimental Parasitology. 2015; 114(6):2119-27.
7. 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; 24;33(13):1596-601.
8. 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*. Experimental Parasitology. 2015; 151-152:8-13.
9. 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*. Parasitology Research. 2015; 114(1):133-40.
10. Anuracpreeda P., Srirakam T., Pandonlan S., **Changklungmoa N**., Chotwiwatthanakun C., Tinikul Y., Poljaroen J., Meemon K., Sobhon P. Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant cathepsin L1 of *Fasciola gigantica*. Acta Tropica. 2015; 136:1-9.
11. **Changklungmoa N.**, Kueakhai P., Riengrojpitak S., Sobhon P., Chaithirayanon K. Identification and expression of *Fasciola gigantica* thioredoxin. Parasitology Research. 2014; 113(6):2335-43.
12. Sangpairoj K., **Changklungmoa N.**, Vanichviriyakit R., Sobhon P., Chaithirayanon K. Analysis of the expression and antioxidant activity of 2-Cys peroxiredoxin protein in *Fasciola gigantica.* Experimental Parasitology. 2014; 140:24-32.

13. Lorsuwannarat N., Piedrafita D., Chantree P., Sansri V., Songkoomkrong S., Bantuchai S., Sangpairot K., Kueakhai P., **Changklungmoa N.**, Chaichanasak P., Chansela P., Sobhon P. The in vitro anthelmintic effects of plumbagin on newly excysted and 4-weeks-old juvenile parasites of *Fasciola gigantica*. Experimental Parasitology. 2014; 136:5-13.