



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสังเคราะห์ยีนและโปรตีนจำเพาะที่แสดงออกใน vitelline cells
ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการพัฒนา
วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี immunodiagnosis

โดย อาตุลย์ มีพูล

1 มีนาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสังเคราะห์ยีนและโปรตีนจำเพาะที่แสดงออกใน vitelline cells ของ
พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวิธีการตรวจ
วินิจฉัยโรคด้วยวิธี immunodiagnosis

โดย อาตุลย์ มีพูล
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้คงไม่สามารถดำเนินการได้ถ้าไม่มี สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยในครั้งนี้ ในโอกาสนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคณะกรรมการบริหารองค์กรดังกล่าวที่ให้ความไว้วางใจ และสนับสนุนทุนให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสมำวิจัยในโครงการนี้

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. ประเสริฐ โศภน ที่ปรึกษาโครงการวิจัยนี้ อย่างสูง ที่ได้ให้โอกาสและคำแนะนำที่ดีในการทำวิจัยฉบับนี้ด้วยความอดทน ตลอดจนเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าได้ต่อสู้กับอุปสรรคที่เกิดขึ้นในขณะที่ทำการวิจัยฉบับนี้

ขอขอบพระคุณครูบาอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่าง ๆ จนทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินการวิจัยลุล่วงลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณผู้บริหารคณะวิทยาศาสตร์ และผู้บริหารมหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนการทำวิจัยนี้โดยการอนุญาตให้ใช้เครื่องมือในการทำวิจัย ตลอดจนสาธิตอุปกรณ์ต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มโครงการฯ จนกระทั่งสิ้นสุดโครงการฯ

ถ้างานวิจัยนี้ทำให้เกิดผลดีต่อบุคคลหรือองค์กรใด ข้าพเจ้าขอยกความดีนั้นให้กับ บิดา มารดา และญาติมิตรของข้าพเจ้า ตลอดจนศิษย์ของข้าพเจ้าที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลง

รหัสโครงการ : MRG4780145

ชื่อโครงการ: การสังเคราะห์ยีนและโปรตีนจำเพาะที่แสดงออกใน vitelline cells ของพยาธิใบไม้
ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี
immunodiagnosis

ชื่อนักวิจัย : อาดุลย์ มีพูล

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

Email address: ardool@buu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2547 – 30 มิถุนายน 2549

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษายีนที่มีการแสดงออกใน vitelline cells ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ซึ่งเป็นพยาธิที่ก่อให้เกิดปัญหากับอุตสาหกรรมสัตว์เลี้ยงของประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยการตรวจหายีนจาก cDNA library พบว่าสามารถค้นพบยีนใหม่จำนวน 5 ยีน คือ vitelline protein BI (VPBI), tegumental antigen protein (VgFg16), protein kinase / endoribonuclease like protein (VgFg28), carboxyltransferase like protein (VgFg29), tetraspanin like protein (VgFg37) ในการศึกษานี้ได้ทำการเลือกยีนที่ได้มาทำการสังเคราะห์โปรตีน แล้วนำไปผลิตและศึกษาคุณสมบัติโพลีโคลนอล แอนติบอดี จำนวน 3 ยีน ดังนี้

VPBI ที่สังเคราะห์ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 31.5 kDa และ แอนติบอดี ที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับ 31 kDa native protein ที่สกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี acid urea extraction ได้ และเมื่อนำไปย้อมกับเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยพบว่าสามารถย้อมที่ vitelline cell ที่อยู่ภายใน vitelline follicle และย้อมติด eggshell ทั้งที่อยู่ภายใน uterus และที่ปล่อยออกมานอกตัวพยาธิ

VgFg 16 ที่สังเคราะห์ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 15 kDa และแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับ native protein ที่สกัดจาก tegument และ whole body พยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยได้ และเมื่อนำไปย้อมกับเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยพบว่าสามารถย้อมติดเฉพาะที่ syncytial layer และ tegumental cell layer ของ tegument

VgFg 28 ที่สังเคราะห์ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 25 kDa และแอนติบอดี ที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับ native protein ที่สกัดจาก whole body ได้ แต่เมื่อนำไปย้อมกับเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยพบว่าให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ย้อมด้วยเซรัมของหนูก่อนการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสังเคราะห์

จากการศึกษาสามารถผลิตโปรตีนสังเคราะห์ และโพลีโคลนอล แอนติบอดี ที่ต้านต่อโปรตีนสังเคราะห์ที่มีความจำเพาะต่อ native protein ที่อาจใช้ในการศึกษาต่อยอดในการผลิตชุดตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีนป้องกันพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในอนาคตได้

คำหลัก : vitelline gland, *Fasciola gigantica*, recombinant protein

Project Code: MRG4780145

Project Title: Cloning, identification, and expression of specific genes expressed in the vitelline cells of *Fasciola gigantica* that have immunodiagnosis potential

Investigator: Ardool Meepool

Faculty of A Health Science, Burapha University, Chonburi, Thailand

Email Address: ardool@buu.ac.th

Project Period: 1st July 2004 – 30th June 2506

This study aims to clone vitelline specific genes of liver fluke *Fasciola gigantica*, which is caused economical problem of the veterinary industrial of Thailand and the South-east Asian Region. There are 6 genes have been identified from cDNA library screening: including vitelline protein BI (VPBI), tegumental antigen protein (VgFg16), protein kinase / endoribonulcease like protein (VgFg28), carboxyltransferase like protein (VgFg29), tetraspanin like protein (VgFg37) and cathepsin L protease. Three cDNA clones are selected for recombinant protein and immunological studies.

The 31.5 kDa recombinant VPBI has been expressed and purified. The polyclonal antibody against this recombinant protein could react with 31 kDa native protein extracted from whole body of the adult parasite by acid urea extraction. Further more, this polyclonal antibody reacts with the vitelline cells within vitelline follicles and also the eggshell of the eggs within the uterus as well as the secreted eggs.

The 15 kDa recombinant VgFg16 protein has been expressed and purified. The polyclonal antibody against this recombinant protein could react with native protein extracted from tegument and whole body of adult *F. gigantica*. In addition this polyclonal antibody could react with the syncytial and tegumental cell layers of the adult tegument.

The 25 kDa recombinant VgFg28 protein has been expressed and purified. The polyclonal antibody against this recombinant protein could react with native protein extracted from whole body of adult *F. gigantica*. In another way, the immunoperoxidase staining using this polyclonal antibody shows no any difference from those of using the preimmunized serum.

This study have been expressed and purified recombinant proteins and produced polyclonal antibodies against recombinant proteins that are the materials for vaccines and immunodiganosis development in the further studies.

Keywords: vitelline gland, *Fasciola gigantica*, recombinant protein

บทนำ

Fasciolosis หรือ โรคพยาธิใบไม้ตับ เป็นโรคทางปรสิตที่เป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพของคนและสัตว์เลี้ยงซึ่งเกิดจากพยาธิ *Fasciola* sp. ซึ่งพบระบาดอยู่ 2 ชนิดคือ *F. hepatica* และ *F. gigantica* โดยพยาธิ *F. hepatica* ระบาดในประเทศที่อยู่ในเขตอบอุ่น ส่วนพยาธิ *F. gigantica* ระบาดในประเทศแถบเส้นศูนย์สูตร โดยส่วนใหญ่ *F. gigantica* ระบาดในสัตว์เศรษฐกิจจำพวกโค กระบือ แพะ และแกะ สร้างความเสียหายให้แก่เศรษฐกิจของโลกประมาณ 2,000 ล้านดอลลาร์ต่อปี (Dalton, 1999) ในประเทศไทยพบการระบาดของพยาธิชนิดนี้ทุกภาคโดยเฉพาะอย่างยิ่งทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือและทำให้สูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมสัตว์เลี้ยงของประเทศอย่างมาก จากการสำรวจในปี 2544 พบว่า โค กระบือ มีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ 11.8 และอัตราการติดเชื้ออาจสูงถึงร้อยละ 85 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (วิฑูรย์ และคณะ 2544) พยาธิชนิดนี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายของคนหรือสัตว์โดยการกินตัวอ่อนระยะ metacercaria ที่เกาะอยู่ตามพืชผักจากแหล่งน้ำที่มีการระบาด ตัวอ่อนพยาธิออกจากซิสต์ในลำไส้เล็กส่วนต้นแล้วจะไชทะลุลำไส้เข้าช่องท้องเข้าสู่ตับโดยไม่ไปทางกระแสเลือด สารขับถ่ายของพยาธิที่มีน้ำหนักประมาณ 26–27 kDa มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ cystein proteinase ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยแอนติบอดีชนิด IgG ของโฮสต์บริเวณ hinge region ทำให้ IgG แยกเป็นส่วน Fab และ Fc ซึ่งเป็นผลให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ antibody mediated cytotoxic reaction ไม่สามารถทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ (Berasain et al., 2000) นอกจากนี้พยาธิชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงส่วน ประกอบของ glycocalyx บนผิวของพยาธิ เป็นผลทำให้คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนบนผิวพยาธิเปลี่ยนแปลง ทำให้พยาธิหลบหลีกการจับของแอนติเจนได้ (Smither, 1982) และก่อให้เกิดอาการและพยาธิสภาพต่างๆ ดังนี้

1. ระยะเฉียบพลัน (acute or invasive phase) เป็นช่วงที่พยาธิตัวอ่อนไชทะลุผนังลำไส้เข้าช่องท้อง ไชผ่านเยื่อหุ้มตับเข้าสู่ตับและไปยังท่อน้ำดี เกิด granuloma และพบ Charcot-Leyden crystals ของ eosinophil บริเวณที่เกิดพยาธิสภาพ อาการเกิดจากการไชทำลายเนื้อตับและเยื่อช่องท้อง อาการทางคลินิกพบมีไข้ต่ำ ปวดท้อง ท้องอืด คลื่นไส้ ท้องร่วง ลมพิษ ตับและม้ามโต มีน้ำในช่องท้อง (ascites) โลหิตจาง และดีซ่าน (jaundice) (วันชัย และคณะ 2544)

2. ระยะแฝง (latent phase) ระยะนี้เริ่มตั้งแต่พยาธิโตเต็มที่และวางไข่ พยาธิจะหยุดไชไปยังอวัยวะต่าง ๆ และมาอยู่ที่ท่อน้ำดี ระยะนี้กินเวลาเป็นเดือนหรือเป็นปี โดยผู้ติดเชื้อไม่มีอาการปรากฏ แต่พบไข่พยาธิจากการตรวจอุจจาระ ตรวจพบเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil ในเลือดสูง พยาธิสภาพของตับดีขึ้นมีการสร้างเนื้อตับขึ้นมาใหม่ (วันชัย และคณะ 2544)

3. ระยะท่อน้ำดีอุดตัน (obstructive phase) เป็นระยะเรื้อรังเมื่อตัวเต็มวัยพยาธิอยู่นานจะเกิดอาการท่อน้ำดีอักเสบและถุงน้ำดีอักเสบ เมื่อรวมกับตัวพยาธิแล้วอาจเกิดท่อน้ำดีอุดตัน ผู้ป่วยมีอาการปวดเสียดใต้ชายโครงขวา ปวดบริเวณลิ้นปี่ ท้องอืดเมื่อกินอาหารที่มีไขมัน และเกิด

ดีซ่าน การทำงานของตับผิดปกติ มีเอนไซม์ของเซลล์ตับคือ aminotransferase และ alkaline phosphatase รวมทั้งสาร bilirubin ในเลือดสูง (วันชัย และคณะ 2544)

นอกจากนี้พยาธิตัวอ่อนอาจไชลงไปอยู่นอกตับ เรียกว่า ectopic fascioliasis ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณที่มีพยาธิสภาพถูกทำลาย พร้อมกับมีการอักเสบและพังผืดของอวัยวะที่พยาธิตัวอ่อนไชเข้าไป มีรายงานพบที่กระเพาะอาหาร ตับอ่อน ปอด สมอง ใต้ผิวหนัง หัวใจ ม้าม กล้ามเนื้อ ลูกตา และ epididymis (ประยงค์ ระดมยศ, 2541)

จากอาการและพยาธิสภาพดังกล่าวสามารถส่งผลให้สัตว์ที่ติดเชื้อมีผลผลิตเนื้อและนมลดลง และเกิดปัญหาการขาดประสิทธิภาพในการใช้แรงงาน ตลอดจนเพิ่มอัตราการตายของสัตว์เลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ที่มีอายุน้อย ประเมินการว่าโรคพยาธิใบไม้ตับของสัตว์สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรปีละหลายร้อยล้านบาท (ไพบุลย์ สิทธิถาวร, 2544)

ถึงแม้ว่าคนจะไม่ใช้โฮสต์ตามธรรมชาติของพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้ แต่มีรายงานการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* sp. ในคนอยู่เสมอ ประเมินการว่าจำนวนคนที่ติดเชื้อนี้ 2.4–17 ล้านคนทั่วโลก สำหรับประเทศไทย มีรายงานว่ามีคนติดเชื้อพยาธิชนิดนี้แล้วไม่น้อยกว่า 25 ราย และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น (วันชัย และคณะ 2544) เนื่องจากการขยายตัวของเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา ในปัจจุบันการควบคุมโรคพยาธิยังคงใช้วิธีดั้งเดิม คือ การให้ยาฆ่าพยาธิในสัตว์ที่ติดเชื้อ แต่หลังจากการรักษาไม่นาน สัตว์ก็จะกลับมาติดเชื้อใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (Sukhapesna *et al.*, 1994) ดังนั้น การควบคุมโรคให้ได้ผลจึงจะต้องทำโดยการให้ยารักษาสัตว์อย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่องเป็นระยะ ๆ ทุก 3–6 เดือน วิธีนี้เป็นวิธีที่ต้องใช้งบประมาณสูง ส่งผลกระทบทั้งในส่วนของเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และรัฐบาล ประกอบกับที่ผ่านมามีการวินิจฉัยโรคทำได้โดยการตรวจไข่ของพยาธิในอุจจาระ (วิฑูรย์ และ ไพรรณ 2546)

1. ลักษณะอาการทางคลินิก ในระยะ acute phase การวินิจฉัย fascioliasis ขึ้นกับการสังเกตอาการและอาการแสดงของผู้ป่วยบริเวณที่มีพยาธิชุกชุม เนื่องจากไม่มีพยาธิออกมาให้เห็นในผู้ป่วยระยะนี้ การวินิจฉัยทางปรสิตโดยตรงจึงทำไม่ได้ ยกเว้นในรายที่พยาธิไชออกมาสู่ผิวหนังเอง หรือพบพยาธิระหว่างผ่าตัด อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยทางอิมมูโนวิทยาที่มีประโยชน์เหมือนกัน (วิฑูรย์ และ ไพรรณ, 2546)

2. การตรวจอุจจาระ ในระยะ latent และ chronic phases การวินิจฉัยแน่นอนได้จากการพบไข่พยาธิในอุจจาระ duodenal fluid หรือจากน้ำดี ในกรณีที่มีการกินตับสุก ๆ ดิบ ๆ อาจพบ false fascioliasis ได้ ซึ่งสามารถวินิจฉัยแยกโรคออกไปได้ โดยผู้ป่วยงดรับประทานอาหารที่ประกอบด้วยตับ 3 วัน และตรวจอุจจาระซ้ำอีกครั้ง (วิฑูรย์ และ ไพรรณ, 2546)

3. รังสีวินิจฉัย รังสีวินิจฉัยมีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค fascioliasis แม้ว่าผลที่ได้จะไม่จำเพาะก็ตาม มีรายงานการใช้ ERCP, radioisotope scanning, ultrasound และ computer tomography (CT scan) ในการวินิจฉัยโรค

ภาพจากรังสีเอกซ์ จะเห็นเป็น radiolucent เป็นรูปวงรี จากการทำ cholangiography (Echenique-Elizondo *et al.*, 2005) cholecystography และ ERCP เมื่อใช้ technetium (99 m TC) sulfur colloid จะเห็นตับโตและมี focal defects (cold lesions) ภาพจาก gallium citrate เห็น uptake ของ gallium มากขึ้นใน focal area ดังกล่าว

การตรวจผู้ป่วยด้วยการใช้ ultrasound (Gonzalo-Orden *et al.*, 2003) พบ non-specific findings มีตับโตหรือมี echogenicity ที่ตับเพิ่มขึ้น ในระยะ latent หรือ chronic obstructive phase อาจพบพยาธิตัวเต็มวัยใน gall bladder หรือ common bile duct นอกจากนี้อาจพบท่อน้ำดีมีขนาดโตขึ้นรวมทั้งพบผนังท่อน้ำดีขรุขระด้วย

CT scan มีประโยชน์มากสำหรับช่วยวินิจฉัย fascioliasis โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่พยาธิไชผ่านตับ (Echenique-Elizondo *et al.*, 2005) แต่ในระยะ latent และ chronic obstructive phase พบว่า CT scan ปกติ ลักษณะ CT ใน fascioliasis อาจพบได้ 2 ลักษณะ คือ

ก. พบ multiple nodular, hypodense lesions ขนาด 4.30 มิลลิเมตร ที่ตับกลีบขวาหรือด้านซ้าย ความผิดปกติที่เห็นนั้นเกิดจาก microabscess ที่ตับหรือเนื้อตับที่ถูกทำลาย โดยอาจจะพบที่กลางตับหรือขอบตับก็ได้

ข. พบลักษณะ located branching ที่ขอบตับหรือเห็นเป็นทางคดเคี้ยวไปมา ซึ่งลักษณะเช่นนี้เกิดจากพยาธิที่ไชผ่านตับ

ลักษณะ CT scan ที่พบทั้งสองจะเห็นเด่นชัดขึ้นเมื่อฉีด contrast พบว่าหลังการรักษา ลักษณะความผิดปกติต่าง ๆ จาก CT scan จะหายไป

4. อิมมูโนวินิจฉัย มีวิธีทางอิมมูโนวินิจฉัยสำหรับ *F. hepatica* หลายวิธี แต่วิธีดังกล่าวมีความแตกต่างกันมากในแง่ของความไวและความจำเพาะ อิมมูโนวินิจฉัยมีประโยชน์ในระยะ acute หรือ invasive phase ซึ่งพยาธิยังไม่ปล่อยไข่ออกมา การวินิจฉัยและการรักษาตั้งแต่เริ่มเป็นโรค สามารถป้องกันความรุนแรงของโรค ที่พบในระยะหลัง ๆ ได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) immunofluorescence assays (IFA) และ count electrophoresis (CEP) (คณาจารย์ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2536) เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะมากที่สุด แต่พบว่ายังมีปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่นได้ เช่น schistosome นอกจากนี้ IFA และ CEP อาจไม่ให้ผลบวกในระยะ latent และ chronic obstructive phase พบว่าวิธี enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) (Shaker *et al.*, 1994) มีความจำเพาะในการวินิจฉัย fascioliasis สูงมาก การใช้ CEP เพื่อหาแอนติเจนของพยาธิในอุจจาระผู้ป่วยก็เป็นวิธีการที่ได้ผลดี การทำ skin test เพื่อการวินิจฉัยนั้นปัจจุบันไม่นิยมทำกันแล้วเพราะมีความจำเพาะต่ำ

ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับใช้วิธีการตรวจหาไข่ในอุจจาระของสัตว์ที่เป็นโรค วิธีนี้ทำได้ไม่ยากนักและยังสามารถบอกได้คร่าว ๆ ว่าสัตว์ติดเชื้อมาก ปานกลาง หรือน้อยอีกด้วย ทั้งนี้โดยคำนวณจากจำนวนของไข่ต่อน้ำหนักอุจจาระหนึ่งกรัม อย่างไรก็ตามการตรวจหาไข่ของ

พยาธิใบไม้ตับในอุจจาระเพื่อการวินิจฉัยโรคนั้น ประสบปัญหาหลายประการทั้งในด้านความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) อาทิเช่น ในกรณีที่มีไข่พยาธิอยู่ในอุจจาระจำนวนน้อย ซึ่งอาจเป็นเพราะมีพยาธิตัวแก่น้อย หรือมีการอักเสบของท่อน้ำดีจนทำให้ไข่พยาธิผ่านออกมาในลำไส้ได้น้อยหรือไม่ได้เลย หรือพยาธิตัวเมียออกไข่ได้หลังจากสัตว์ติดเชื้อมาน้อย 8 สัปดาห์ ก็จะทำให้ไม่สามารถตรวจพบไข่พยาธิในอุจจาระได้ นอกจากนี้การตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระด้วยกล้องจุลทรรศน์บางชนิดใช้แสงธรรมดาอาจจะผิดพลาดได้ และไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมสำหรับงานประจำซึ่งอาจต้องตรวจอุจจาระคราวละหลาย ๆ ตัวอย่าง ทั้งยังสิ้นเปลืองเวลา มีกระบวนการยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงอีกด้วย ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้คิดค้นวิธีที่ให้ผลการตรวจที่แน่นอน คือ การตรวจหาแอนติเจนซึ่งเป็น secretory-excretory antigen ในกระแสเลือดของโฮสต์ซึ่งต้องใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะสูง พบว่าแหล่งแอนติเจนที่พบในพยาธิใบไม้ เช่น *Schistosoma* sp. พบบริเวณ tegument ซึ่งแอนติเจนที่พบนี้เหมือนแอนติเจนที่ตรวจพบในกระแสเลือดของสัตว์ที่เป็นโรค (ดวงเดือน และคณะ 2545)

ในปัจจุบันมีการทดลองผลิตวัคซีนต่อแอนติเจนที่ปล่อยออกมาจากพยาธิที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เช่น

1. Glutathione S-transferase (GST) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ขจัดสารพิษออกจากเซลล์ของพยาธิโดยการ neutralize สารพิษให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น มีความเป็นพิษน้อยลง และทำให้ขับสารพิษออกอย่างรวดเร็ว GST มีลักษณะเป็น dimeric enzyme ประกอบด้วย identical และ non-identical subunit มีขนาดประมาณ 24-29 kDa แบ่งได้ 6 class คือ alpha, mu, pi, theta, sigma และ kappa (Pemble *et al.*, 1996 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) เอนไซม์ชนิดนี้มีปริมาณมากและพบได้ในทุก ๆ เนื้อเยื่อของพยาธิ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า GST มีความจำเป็นต่อความอยู่รอดของพยาธิโดยจะรักษา homeostasis ของพยาธิ (Brophy and Pritchard, 1994) มีการทดสอบความสามารถในการเป็นวัคซีนของ GST ในแกะ พบว่า สามารถลดจำนวนพยาธิได้ 57% (Sexton *et al.*, 1990 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) ส่วนการทดสอบในวัว พบว่า สามารถลดจำนวนพยาธิได้ 49-69% (Morrison *et al.*, 1996 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) อีกทั้งไม่ทำให้สัตว์เกิด anemia ลดการเสื่อมสภาพของตับ และลดจำนวนไข่ในอุจจาระอีกด้วย (Sexton *et al.*, 1990 in Fasciolosis (Dalton, 1999))

2. Fatty acid binding protein (FABP) เป็นโปรตีนกลุ่มใหญ่มีขนาดประมาณ 14-16 kDa และยาวประมาณ 127-133 amino acids (Veerkamp *et al.*, 1991 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) พบมากที่ parenchymal cell และ reproductive tissue ส่วนที่ tegument และ caecal epithelium พบน้อย (Sirisriro *et al.*, 2002 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) ทำหน้าที่จับและขนส่งโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว เช่น oleate, palmitate, และกรดน้ำดีต่าง ๆ FABP เป็นโปรตีนชนิดแรกที่น่าสนใจผลิตเป็นวัคซีนป้องกันโรค fasciolosis โดยคัดเลือกโปรตีนจาก *Fasciola* protein ที่สามารถเกิด cross reaction กับ antiserum ต่อโปรตีนจาก *Schistosoma mansoni* (Sm14) (Hillyer *et*

al., 1977 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) โปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 14.7 kDa จึงเรียกว่า Fh15 สามารถป้องกันการติดเชื้อ *F. hepatica* ในวัวได้ 55% (Hillyer *et al.*, 1987 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) และป้องกันการติดเชื้อ *S. mansoni* ได้ 81% (Hillyer *et al.*, 1979 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) ในปัจจุบันมีการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นวัคซีนของ Sm14 โดยใช้ recombinant Sm14 ที่สร้างโดย *E. coli* นำไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่ายและหนู จากนั้น infect ด้วย cercaria ของ *S. mansoni* 1,000 ตัว พบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ 89% ในกระต่ายและ 37-66% ในหนู และเมื่อ infect ด้วย cercaria ของ *F. hepatica* สามารถป้องกันได้ 100% (Tendler *et al.*, 1996 in Fasciolosis (Dalton, 1999))

3. Cathepsin L protease (Cath L) ใน excretory-secretory (ES) material ของพยาธิ *Fasciola* พบว่ามี proteolytic enzyme จำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง cathepsin L protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยเนื้อเยื่อของโฮสต์เพื่อเข้าไปยังอวัยวะต่าง ๆ (Smith *et al.*, 1993 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) ย่อยสารอาหาร (Halton, 1967 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) และการสร้างไข่ (Dalton *et al.*, 1996) นอกจากนี้ Cath L ยังเกี่ยวข้องกับ immune evasion ของพยาธิ โดยการแยก Fc และ Fab region ของแอนติบอดีออกจาก (Smith *et al.*, 1994 in Fasciolosis (Dalton, 1999)), ป้องกันแอนติบอดีจับกับตัวอ่อนของพยาธิ (Carmona *et al.*, 1993 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) และทำให้เกิดการจับตัวกันของ fibrin ที่ผิวของพยาธิ เพื่อไม่ให้เซลล์ในระบบ immune เข้าไปทำลายพยาธิได้ (Dowd *et al.*, 1995 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) ได้มีการทดสอบความสามารถในการเป็นวัคซีนของ Cath L ในแกะ พบว่า ไม่สามารถลดจำนวนพยาธิได้ แต่สามารถลดจำนวนไข่ในอุจจาระได้ถึง 69.7% (Wijffels *et al.*, 1994 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่กระบวนการสร้างไข่ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เพราะพยาธิต้องใช้เอนไซม์นี้ในการสร้าง eggshell protein

Cath L แบ่งได้ 2 ชนิด คือ Cath L1 และ Cath L2 มีการทดลองใช้เป็นวัคซีนป้องกันโรค fasciolosis ผลที่ได้คือ Cath L1 สามารถลดจำนวนพยาธิได้ 33% และลดจำนวนไข่ในอุจจาระได้ 71% ส่วน Cath L2 สามารถลดจำนวนพยาธิได้ 34% และลดจำนวนไข่ในอุจจาระได้ 81% (Piacenza *et al.*, 1998) และเมื่อให้ Cath L2 ร่วมกับ hemoglobin พบว่าสามารถลดจำนวนพยาธิได้ 72% (Dalton *et al.*, 1996)

4. Leucine aminopeptidase (LAP) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนนอกระบบทางเดินอาหารซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีหลายอวัยวะที่สามารถผลิต LAP ได้ เช่น placenta, lens, brain, kidney และ adipocyte ซึ่งใช้ในการย่อยสลาย regulatory molecule เช่น hormone, neurotransmitter และ dietary constituent (Taylor *et al.*, 1987; Nyberg *et al.*, 1990; Squire *et al.*, 1991; Wallner *et al.*, 1993 in Fasciolosis (Dalton, 1999)) ในการทดสอบความสามารถในการเป็นวัคซีนป้องกันโรค fasciolosis ของ LAP โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในแกะ แล้ว infect ด้วย metacercariae พบว่า เมื่อให้ LAP อย่างเดียวในซีรัมของแกะมีแอนติบอดีต่อ LAP ในปริมาณที่

สูง และสามารถลดจำนวนพยาธิได้ 89% แต่เมื่อให้ LAP ร่วมกับ Cath L1 และ Cath L2 จะลดจำนวนพยาธิได้ 78% (Piacenza *et al.*, 1998)

5. Tegumental antigen (TA) พยาธิใบไม้เมื่อเข้าไปอยู่ในร่างกายโฮสต์จะมีการหลั่งสารเข้าไปในระบบไหลเวียนและระบบน้ำเหลืองของโฮสต์ สารคัดหลั่งเหล่านั้นสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ สารคัดหลั่งเหล่านั้นเรียกว่า excretory secretory antigens โดยแหล่งผลิตแอนติเจนหลักของพยาธิได้แก่ อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร ระบบขับถ่าย ระบบสืบพันธุ์ และระบบปกคลุมร่างกาย (tegument) ซึ่งแอนติเจนที่คัดหลั่งจาก tegument นั้นเรียกว่า tegumental antigen จากการศึกษายพยาธิเลือดในกลุ่ม Schistosoma species โดยเฉพาะ *S. japonicum* และ *S. makongi* โดยทำการสกัด tegument ของพยาธิมาวิเคราะห์โดยการทำ immunoblotting แล้วจะพบแถบแอนติเจนที่ให้ผลบวกจำนวน 15-20 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 26-205 kDa (Sobhon *et al.*, (1990); Sobhon *et al.*, (1992) in Khawsuk, 2003) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่น้ำหนักโมเลกุล 97, 86, 68, 50, และ 38 kDa (Taylor *et al.*, in Khawsuk, 2003) ซึ่งแอนติเจนเหล่านี้เป็นแอนติเจนหลักที่ได้จาก surface และ tegument-associated tegument และการศึกษาในพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ตัวเต็มวัยพบว่าที่น้ำหนักโมเลกุล 64-52, 38-24, 17, 15, 13 และ 12 kDa เป็นแอนติเจนหลักของ tegument โดยแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 160 kDa นั้นสามารถตรวจหาได้ในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ ส่วนการตรวจหาแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ นั้นสามารถตรวจหาได้ระยะสุดท้ายของการติดเชื้อ (Itagaki *et al.*, (1995) in Khawsuk, 2003) ในพยาธิ *F. gigantica* ก็เช่นเดียวกัน โดยพบว่าแอนติเจนนั้นจะมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูงที่ 66, 64, 58 และ 54 kDa และ 27 และ 26 kDa ซึ่งแอนติเจนเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มของ tegumental antigen นอกจากนี้ยังพบว่าที่น้ำหนักโมเลกุล 66 และ 28.5 kDa ของ tegumental antigen ที่ได้จากการตรวจสอบด้วย monoclonal antibody จะมี specifically localized ซึ่งพบได้ที่บริเวณส่วนนอกของ tegument cytoplasm และ surface membrane (Chaithirayanon *et al.*, (2002); Kumkate *et al.*, (1999) in Khawsuk, 2003)

เมื่อพยาธิไชเข้าไปในเนื้อเยื่อของโฮสต์ พบว่าพยาธิจะมีการหลั่งแอนติเจนออกมา โดยแหล่งที่หลั่งแอนติเจนหลักที่สำคัญคือ tegument และ caecum และแอนติเจนที่หลั่งออกมานี้สามารถไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ (Khawsuk, 2003) และจากการศึกษา TA ของตัวเต็มวัยและ juvenile โดยใช้ monoclonal antibody ที่ต้านต่อแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 66 และ 28.5 kDa เป็น probe พบว่า ที่น้ำหนักโมเลกุล 66 และ 28.5 kDa นั้น เป็นแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับ tegument, tegument cells และ surface membrane และเมื่อนำแอนติเจนนี้ไปทดสอบ cross reaction กับพยาธิอื่นพบว่าเกิดได้น้อยมาก ดังนั้น tegumental antigen นี้มีศักยภาพที่ใช้สำหรับการทำ immunodiagnosis ได้ (Sobhon *et al.*, 2000)

จากการศึกษาใน *F. hepatica* พบว่า recombinant TA เป็นโปรตีนที่มีการกระจายตัวอยู่ภายในชั้นผิว (tegument) เซลล์ของชั้นผิว (tegumental cell) ผนังมดลูก (uterus) และผนัง

ลำไส้ของพยาธิตัวเต็มวัย ซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายในการทำลายด้วยวัคซีน เมื่อมีการ immunize หนูด้วย recombinant protein พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ได้ และ recombinant protein น่าจะเป็น antigen ที่สามารถสังเคราะห์ใช้ในการทำ immunodiagnosis ได้ (Trudgett et al., 2000)

จากการศึกษาแอนติเจนจาก surface tegument ของพยาธิตัวเต็มวัย *F. gigantica* ที่น้ำหนักโมเลกุล 66 kDa ซึ่งพบมากที่บริเวณ surface membrane ของพยาธิ และแอนติเจนนี้อาจจะเป็นโปรตีนหลักของ surface membrane และน่าจะมีศักยภาพในการใช้เป็นวัคซีน หากระบบ immune ของโฮสต์ไปเกาะและสามารถดึงโปรตีนนี้ออกมาได้ อาจจะเป็นผลทำให้เกิดการทำลาย membrane และ tegument ของพยาธิ ส่งผลให้เกิดการถูกทำลายของชั้นผิว ส่งผลให้สามารถ ทำลายพยาธิได้ (Sobhon et al., 1998)

จากการศึกษาลักษณะของ monoclonal antibody ที่ต้านต่อ 28.5 kDa tegumental antigen ใน *F. gigantica* โดยการทำ western immunoblotting ของ ES, TA และ WB antigen ที่ใช้ MoAb 6E9-1E เป็น probe พบว่าให้ผลบวกต่อแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 28.5 kDa เท่านั้น และความเข้มของแถบโปรตีนมีมากที่ TA, WB และ ES ตามลำดับ ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่าเป็นแอนติเจนที่พบมากบริเวณ tegument และเมื่อนำไปทดสอบ cross reaction กับพยาธิชนิดอื่นโดยใช้ WB ของ *F. gigantica* และของพยาธิชนิดอื่นและใช้ MoAb 6E9-1E เป็น probe พบว่าสามารถพบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 28.5 kDa เท่านั้นและพบเฉพาะใน *F. gigantica* ด้วย ซึ่งจากการศึกษาความจำเพาะของ MoAb ที่ต้านต่อ 28.5 kDa tegumental antigen ของพยาธิ *F. gigantica* พบว่า isotype ของ MoAb คือ IgG₁, k-light chain และจากการศึกษา immunolocalization ของแอนติเจนนี้น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าแอนติเจนเป็นแอนติเจนที่หลักของ tegument, และใน cytoplasm ของ tegument cell ในทุกระยะของพยาธิ และจากการศึกษาตำแหน่งการกระจายตัวของแอนติเจนในระยะตัวเต็มวัย พบการกระจายตัวที่บริเวณขอบของ tegument, tegument cell นอกจากนี้ยังพบที่บริเวณเยื่อบุผิวของ oral sucker ระบบย่อยอาหาร ส่วนต้นจนถึง caecal bifurcation และ genital canal ของพยาธิ ส่วนในระยะ juvenile พบการกระจายตัวใน cytoplasm ของ tegument cell (Chaithirayanon et al., 2002) นอกจากนี้แอนติเจนที่ 28.5 kDa ยังสามารถใช้ตรวจใน ES material ของตัวเต็มวัยของพยาธิโดยใช้ MoAb ได้ด้วย ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่าเป็นแอนติเจนที่อาจจะเป็น surface antigen ที่หลั่งมาจาก tegument ร่วมกับ tegument protein อื่น (Viyanant et al., 1997; Krailas et al., 1999) และอาจจะเป็น metabolic enzymes อย่างเช่น proteases ซึ่งหลั่งมาจาก caecum (Viyanant et al., 1997) นอกจากนี้ที่ 28.5 kDa antigen นั้นสามารถพบได้ใน newly excysted และ juvenile ของพยาธิซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่าเป็นแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบของ tegument หรือ surface membrane ที่แสดงออกในระยะตัวอ่อนของพยาธิ และยังพบว่าแอนติเจนที่ 28.5 kDa นี้เป็นแอนติเจนที่มีความเฉพาะต่อ *F. gigantica* ซึ่งไม่สามารถเกิด cross-reactive ต่อพยาธิชนิดอื่น ซึ่งน่าจะเป็นตัวบ่งชี้

ว่าเป็นแอนติเจนที่ใช้สำหรับ immunodiagnosis เนื่องจากมีความเฉพาะเจาะจงมากกว่า metabolic antigen ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Chaithirayanon et al., 2002)

นอกจากนี้ยังพบว่าระบบสืบพันธุ์เป็นระบบที่มีการสร้างและคัดหลั่งสารมากที่สุดระบบหนึ่งของพยาธิ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง vitelline gland ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกายของพยาธิ และมีการผลิต vitelline cells จำนวนมากแต่ละวัน และเซลล์เหล่านี้จะหลั่งโปรตีนที่จำเป็นต่อการสร้างไข่พยาธิ เช่น vitelline proteins A, B และ C ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลักของเปลือกไข่ของพยาธิ นอกจากนี้ยังมีการหลั่ง phenol oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลง vitelline proteins ให้สามารถเชื่อมต่อกันเป็นเครือข่ายของโปรตีนที่มีความแข็งแรงทนทาน หลังจากการสร้างเปลือกไข่โปรตีนเหล่านี้จะถูกขับออกจากร่างกายพยาธิพร้อม ๆ ไข่ และปนออกมากับอุจจาระของสัตว์เลี้ยง และบางส่วนก็ปนเปื้อนเข้าไปในระบบไหลเวียนเลือดและน้ำเหลืองซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์

เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวมีการคัดหลั่งออกมาในปริมาณสูงและพบได้ทั้งในเลือดและในอุจจาระจึงมีความเหมาะสมต่อการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อด้วยวิธี immunodiagnosis ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาค้นหา genes ที่เป็นรหัสพันธุกรรมและสังเคราะห์โปรตีนเหล่านี้ ตลอดจนทดสอบคุณสมบัติการตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างพยาธิ

ทำการเก็บพยาธิตัวเต็มวัยที่ยังมีชีวิตจากท่อน้ำดีของวัวที่ถูกฆ่าในโรงฆ่าสัตว์มาล้างด้วย normal saline 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออก นำตัวพยาธิแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว

2. การ cloning characterization, expression and localization of vitelline protein B ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*

2.1 การสกัด total RNA

นำพยาธิที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมาบดให้ละเอียดใน TRIZOL reagent (GIBCO BRL) ตามด้วยการปั่นที่ความเร็วที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ดูดเก็บสารละลายชั้นบนใส่ใน tube ใหม่ และตกตะกอน RNA ด้วยการเติม 2.5 เท่าของ isopropanol และปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทสารละลายด้านบนออกและล้างตะกอน RNA ที่ก้น tube ด้วย 75 % ethanol และปั่น 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เท ethanol ออกและตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายนำตะกอน RNA ที่ได้ละลายใน RNase-free water และตรวจสอบคุณภาพ RNA ด้วย 1.2 % agarose gel electrophoresis เพื่อดูการเสื่อมสภาพของ RNA และวัดปริมาณ RNA ด้วย spectrophotometer

2.2 การ Cloning ด้วยวิธี RT-PCR

นำรหัส mRNA ของ vitelline protein BI และ BII ของพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* มาทำการเปรียบเทียบและหารหัส primers จากนั้นนำไปใช้สังเคราะห์ cDNA ของ vitelline protein B ของ *F. gigantica* โดยกระบวนการ reverse transcription เพื่อให้ได้ first strand cDNA โดยใช้ total RNA ที่สกัดมาจาก *F. gigantica* ตัวเต็มวัย และสังเคราะห์ต่อให้เป็น double strand cDNA ด้วยกระบวนการ polymerase chain reaction แล้วนำไปตรวจสอบหา cDNA ด้วย agarose gel electrophoresis จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ใส่ใน pGEM-T easy vector และ E.coli XL1 – Blue ถูก transformed ด้วย ligation product, plasmid DNA สกัดจาก colonies bacteria และตรวจสอบลำดับ nucleotide ที่ใส่ใน cDNA โดย the Bioservice Unit, BIOTEC

2.3 การสร้าง cDNA probe ติดฉลากด้วย DIG

นำ cDNA ที่ได้มาสร้าง probe ด้วยวิธี PCR จากนั้นตรวจสอบปริมาณและประสิทธิภาพของ probe ด้วยการทำ dot blot โดยนำ probe มา dilute ด้วย DNA dilution buffer (50 µg/ml herring sperm DNA ใน 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) ในอัตราส่วน probe ต่อ buffer เป็น 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 หยดลงบน Biodyne nylon membrane

อย่างละ 1 μ l และหยด Labeled Control DNA จาก tube 1-9 (เป็น dilution series โดย dilute Labeled Control DNA เป็น 1 ng/ μ l (tube 1) แล้ว dilute ต่อไปเป็นอัตราส่วน 1:100(tube 2), 1:3.3(tube 3), 1:10(tube 4), 1:10(tube 5), 1:10(tube 6), 1:10(tube 7), 1:10(tube 8) และ DNA dilution buffer อย่างเดียว (tube 9) tube ละ 1 μ l แล้วนำ membrane ผ่านรังสี UV 3 นาที เพื่อให้ DNA ยึดติดกับ membrane จากนั้นนำ membrane ไปอบแห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำ immunodetection โดยนำ membrane แช่ใน maleic acid buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5) 5 นาที จากนั้นเปลี่ยนมาแช่ใน blocking solution (1%(w/v) Blocking reagent ใน maleic acid buffer) 30 นาที เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการจับของ antibody แบบ nonspecific ต่อมาแช่ใน antibody solution (anti-DIG AP conjugate ใน blocking solution อัตราส่วน 1 : 5,000) แช่ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างด้วย washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เพื่อล้าง antibody ที่ไม่ได้จับออก แล้วปรับสภาพ membrane ให้เหมาะกับการทำงานของ alkaline phosphatase ด้วย detection buffer 2-5 นาที จากนั้นแช่ membrane ในที่มีติดกับ color-substrate solution (NBT/BCIP 200 μ l ใน detection buffer 10 ml) ที่เตรียมใหม่ จนกระทั่งเห็นสีเกิดขึ้นบน membrane ชัดเจน แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้าง membrane ในน้ำหรือ TE buffer 5 นาที จากนั้นสังเกตสีที่เกิดขึ้นตรงจุดที่เป็น probe เทียบกับ control เพื่อวัดปริมาณ probe ที่มีอยู่

2.4 การตรวจสอบหา cDNA ของ vitelline protein B จาก cDNA library

ทำการ plaque lifts (50,000 pfu/150 mm plate) ใน λ ZAP II cDNA library ของ *F. gigantea* ตัวเต็มวัย จากนั้นนำไป hybridized ด้วย DIG-labeled RNA probe ที่สังเคราะห์จาก partial FgVBP cDNA ที่ได้มาโดยวิธี RT-PCR Positive plaques ถูกสกัดพิเศษ และ insert ใน cDNA amplified ด้วยวิธี PCR โดยซ้ T3 และ T7 primers PCR product ถูกผูกมัดกับ pGEM-T easy vector หลังจากมีการเปลี่ยนรูปของ E.coli XL -blue แล้ว plasmid DNA ถูกแยกออกและ inserted cDNAs sequenced ตามการอธิบายด้านบน โดย Plasmids ประกอบด้วย coding sequence สำหรับ vitelline protein เก็บไว้สำหรับการทดสอบที่เพิ่มขึ้น

2.5 การตรวจสอบการแสดงออกของ vitelline protein encoding gene ด้วยวิธี

Northern hybridization

นำ 25 ug ของ total RNA ของ *F.gigantica* ระยะตัวเต็มวัยผสมใน denaturing buffer (2.2 M formaldehyde, 50% formamide) จากนั้น incubate 5 นาที อุณหภูมิ 65 c ทำอย่างรวดเร็วในน้ำแข็งและ separated ด้วย 1.2 % agaroseformaldehyde gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 90 โวลต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้น นำ gel ที่ได้ไปย้าย RNA ลงใน nylon membrane และตรึง ด้วยการ

ทำ UV activated-cross linking เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำ membrane ไป hybridized ด้วย DIG DNA labeling probe ที่ผลิตโดยใช้ cDNA ของ vitelline protein B ของ *F. gigantea* เป็นต้นแบบ และตรวจสอบผลการ hybridized ด้วย anti-DIG alkali phosphatase conjugated และ NTB/BCIP substrate

2.6 การตรวจหาการแสดงออกของ vitelline protein B ด้วยวิธี *In situ* hybridization

นำ *F. gigantea* ระยะตัวเต็มวัยมา fix ด้วย 4% paraformaldehyde, embedded ใน paraffin จากนั้นตัด section และวางลงใน glass slide ที่ coat ด้วย poly-L lysine แล้วนำ section ไป deparaffinized และ rehydrated ด้วย ethanol และ DEPC treated water จากนั้นแช่ section ใน 0.1 mM DEPC treated PBS, pH 7.4 และย่อยโปรตีนด้วย proteinase K (10 ug/ml ใน TE buffer) เป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้นล้างสไลด์ ด้วย PBS และ prehybridized ใน 4x SSC (50% v/v) deionized formamide buffer ที่ 60 องศา เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำ section ไป incubated ใน hybridization buffer ที่ ประกอบด้วย 100ng/ml ของ DIG-DNA labeled FgVPB probe ที่อุณหภูมิ 60 องศา เป็นเวลา 14 ชั่วโมง นำ section ไปล้างก็จะแสดงผลของการ hybridization ด้วย anti-DIG alkali phosphatase conjugated และ NTB/BCIP substrate

2.7 Expression and purification of recombinant *F. gigantea* vitelline protein

ทำการตัด Vitelline protein B cDNA และต่อเข้ากับ pET-30b+ expression vector แล้ว transformed เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงใน 10 ml LB medium และมี kanamycin (30 ug/ml) ที่อุณหภูมิ 37 องศา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ให้มีค่า OD ประมาณ 0.6-1.0 หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยนำไป centrifugation ที่ 5000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศา และผสมให้เข้ากันใน 200 ml fresh LB medium และใส่ kanamycin (30 ug/ml) และนำไป shake ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นใส่ 1 mM IPTG แล้ว incubate ต่ออีก 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไป centrifugation เก็บส่วน pellet แล้วผสมใน 0.25 culture volume of cold 20 mM Tris-HCl pH 8.0 แล้วนำไป centrifugation จากนั้นนำ pellet ไปผสมกับ 4 ml ice-cold 1x binding buffer / 100 ml culture volume (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 6M urea, pH 8) แล้ว sonicated ในน้ำแข็ง โดย sonicated 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที แล้วพักให้เย็น 10 วินาที ระหว่างการ sonicated แต่ละครั้ง จากนั้น lysate cell โดย centrifuge ที่ 3,000 g เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บ supernatant ไว้และนำไป centrifugation ต่อที่ 16,000 g เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 4 องศาแล้วนำไป กรองผ่าน 0.45 um membrane ต่อจากนั้นนำ supernatant ไปโหลดลงใน Ni-NTA column แล้วล้าง column 3 ครั้ง ด้วย (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 6M urea, pH 6.3) โดย recombinant

protein ถูกแยกออกมาด้วย (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 6M urea, pH 4.5) จากนั้นนำ sample หรือ protein ที่ elute ออกมาไปวิเคราะห์ด้วย 12.5 % SDS-PAGE และ Immunoblotting

2.8 Production of polyclonal antibodies (PoAb) against recombinant vitelline

protein B

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่ายขาวเพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ด้วย 50 ug ของ purified rFgVPB ใน PBS 250 ul ที่ผสมกับ complete Freund adjuvant เข้าชั้น subcutaneous จากนั้นทำการ boost อีก 2 ครั้ง ด้วย 50 ug of purified rFgVPB ที่ผสมกับ incomplete Freund adjuvant ห่างกัน 2 สัปดาห์ จากนั้น 10 วัน หลังจากการ immunize ครั้งที่ 3 ทำการเก็บ serum จากกระต่าย แล้วนำไปตรวจหาระดับ antibody ด้วยวิธี ELISA assay

2.9 การสกัด Eggshell protein และ whole body protein

นำ *F. gigantea* ตัวเต็มวัยมาล้างด้วย 0.85% NaCl solution หลาย ๆ ครั้ง โดยทำการแยก vitelline gland ออก จากนั้นสกัด eggshell protein (ESP) โดยใช้เทคนิค acid urea ต่อจากนั้นสกัด whole worm protein โดย placing the worms ใน homogenization buffer (10mM Tris-HCl, pH7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Tritonx-100), 10mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) และ 10 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) homogenized ต่อจากนั้นนำไป sonicated ใน ice bath 3 รอบๆ 5 นาที หลังจากทำการ rotation ที่ 4 องศา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยไป centrifuge ที่ 10,000 g ที่ 4 องศา เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วเก็บ supernatant ใช้เป็น whole worm protein ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีน ถูกกำหนดโดย Lowry's method จากนั้นวิเคราะห์โปรตีนด้วย 12.5% SDS-PAGE จากนั้นนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

2.10 Immunoblotting

นำ Protein sample ไปแยกด้วย 12.5% SDS -PAGE แล้ว transfer ลงบน nitrocellulose membrane (ด้วย Hoefer TE 22 , Amersham Biosciences) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 20 volt จากนั้นนำ membrane ไป block nonspecific binding protein ด้วย 5% nonfat dry milk in phosphate buff saline solution (PBS-T: 80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH7.5, 0.1% vol/vol Tween20) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อจากนั้น incubated ด้วย rabbit anti-rFgVPB antiserum อัตราส่วน 1:20,000 ใน PBS-T เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้ง แล้ว incubate ต่อด้วย HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG อัตราส่วน 1:20,000 ใน PBS-T เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ antibody ส่วนเกินจะถูกกำจัดออกไปโดยล้างหลาย ๆ ครั้ง และแสดงผลโดยทำปฏิกิริยากับ TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate solution

2.11 การตรวจหาตำแหน่งและการกระจายของ native protein ด้วยวิธี

Immunohistochemical staining

ทำการ Embed พยาธิ *F.gigantica* ระยะตัวเต็มวัย ใน paraffin block แล้วนำไปตัดเป็น section ที่ความหนา 5 um จากนั้นนำไป dewaxed และ rehydrated และนำไปแช่พยาธิที่เก็บจาก uterus นำไปล้างด้วย 0.01 M PBS จากนั้นนำ section และไปใส่ใน 10 mM citric acid, pH6.0 แล้วนำไปให้ความร้อนด้วย microwave ที่ 700W, 3 ครั้งๆ 5 นาที จากนั้น block endogenous peroxidase โดยการแช่ใน 3% H_2O_2 ใน absolute methanol เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้น block non-specific binding site โดย incubated ใน PBS buffer แล้ว incubated ต่อด้วย 0.1% glycine และ 4% BSA อย่างละ 30 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไป incubated ด้วย rabbit anti rFgVPB antiserum อัตราส่วน 1:200 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น incubated ด้วย Horseradish peroxidase-conjugate goat anti-rabbit IgG ซึ่งเป็น secondary antibody ที่อัตราส่วน 1:400 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และแสดงผลโดยใช้ AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) substrate solution ซึ่งการ แล้วไปศึกษาตำแหน่งของปฏิกิริยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การตรวจหายีนที่แสดงออกใน vitelline cells ของพยาธิ *Fasciola gigantica*

3.1 การสร้าง cDNA probe ติดฉลากด้วย DIG

นำ mRNA ที่สกัดจาก total RNA มาสร้างเป็น single strand cDNA ด้วยกระบวนการ reverse transcription โดยผสม total RNA 1-3 μ g, dNTP 100 mM 1 μ l, reverse transcriptase 1 μ l, oligo-dT primer 1 μ l, 10x reverse transcription buffer 2 μ l และปรับปริมาตรเป็น 20 μ l ด้วย DPEC treated water ปฏิบัติวิธีนี้ทำใน Biometra thermal cycle ตั้งโปรแกรมที่ 25 °C 10 นาที, 42 °C 60 นาที, 95 °C 10 นาที สุดท้ายลดอุณหภูมิลงเป็น 4 °C จากนั้นนำ reverse transcription (RT) reaction มาผ่านกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อทำเป็น double strand cDNA โดยผสม RT reaction 10 μ l, 10x buffer 10 μ l, $MgCl_2$ 25 mM 10 μ l, hexanucleotide primer 1 μ l, taq DNA polymerase 0.25 μ l และปรับปริมาตรเป็น 100 μ l ด้วยน้ำกลั่น ปฏิบัติวิธีนี้ทำใน Biometra thermal cycle ตั้งโปรแกรมที่ 95 °C 5 นาที, 95 °C 1 นาที, 45 °C 1 นาที, 72 °C 1 นาที ทำซ้ำโดยเริ่มที่ขั้นที่ 2 จำนวน 35 รอบ

หลังจากนั้นสร้าง probe นำ PCR product ซึ่งเป็น dscDNA มา 15 μ l ต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เพื่อทำการ denature dscDNA ให้เป็นสายเดี่ยว จากนั้นนำมาผสมกับ 10x Hexanucleotide Mix 2 μ l, dNTP Labeling Mix (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM DIG-11-dUTP pH 7.5) 2 μ l และ Klenow enzyme libeling grade 2 U/ μ l 1

μl ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate ที่ 37 °C overnight จากนั้น ตรวจสอบปริมาณและประสิทธิภาพของ probe ด้วยการทำ dot blot แล้วนำ membrane ผ่านรังสี UV 3 นาที เพื่อให้ DNA ยึดติดกับ membrane จากนั้นนำ membrane ไปอบแห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำ immunodetection โดยนำ membrane แช่ใน maleic acid buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5) 5 นาที จากนั้นเปลี่ยนมาแช่ใน blocking solution (1%(w/v) Blocking reagent ใน maleic acid buffer) 30 นาที เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการจับของ antibody แบบ nonspecific ต่อมา แช่ใน antibody solution (anti-DIG AP conjugate ใน blocking solution อัตราส่วน 1 : 5,000) แช่ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างด้วย washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เพื่อล้าง antibody ที่ไม่ได้จับออก แล้วปรับสภาพ membrane ให้เหมาะกับการทำงานของ alkaline phosphatase ด้วย detection buffer 2-5 นาที จากนั้นแช่ membrane ในที่มีดกับ color-substrate solution (NBT/BCIP 200 μl ใน detection buffer 10 ml) ที่เตรียมใหม่ จนกระทั่งเห็นสีเกิดขึ้นบน membrane ชัดเจน แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้าง membrane ในน้ำหรือ TE buffer 5 นาที จากนั้นสังเกตสีที่เกิดขึ้นตรงจุดที่เป็น probe เทียบกับ control เพื่อวัดปริมาณ probe ที่มีอยู่

3.2 การตรวจหายีนจาก cDNA library

การเตรียม host cells และ transfect phages

ทำการ streak เชื้อ *E. coli* (XL1-Blue) บน ampicillin (50 μg/ml) LB agar plate แล้ว incubate ที่ 37 °C overnight หลังจากนั้นเชื้อแบคทีเรียมา 1 colony ละลายใน LB medium ที่ผสม MgSO₄ 10 mM และ maltose 0.2% (w/v) 5 ml แล้วนำไป incubate ใน incubator shaker ที่ 37 °C 280 rpm จนได้ OD₆₀₀ อยู่ระหว่าง 0.5-1.0 จากนั้นนำมาปั่นเก็บเซลล์และละลาย pellet ด้วย MgSO₄ 10 mM 2.5 ml แล้วเจือจางให้ได้ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 ด้วย MgSO₄ 10 mM หลังจากนั้นนำ λ ZAP II phages cDNA library (ได้จาก Dr. Terry Spithill, Monash University, Victoria, Australia) 15 μl ใส่ใน host cell 500 μl ผสมให้เข้ากันแล้ว incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใส่ LB top agarose 4.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบน LB agar plate ให้ทั่วแล้ว incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา ประมาณ 8 ชั่วโมงหรือจนกระทั่ง plaques เจริญจนมีขนาดประมาณ 1-2 mm

Plaque lift

หลังจากนั้นย้าย plaques ลงบน Biotinylated nylon membrane โดยวาง membrane ลงบนผิวของ top agarose ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้น denature DNA ที่ติดอยู่บน membrane ด้วย 0.5 N NaOH ผสมกับ 1.5 M NaCl ปริมาตร 500 ml เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เป็นสายเดี่ยวให้ probe

เข้าจับได้ และปรับสภาพ membrane ให้เป็นกลาง 0.5 M Tris-HCl pH 7.5 ผสมกับ 1.5 M NaCl ปริมาตร 500 ml เป็นเวลา 5 นาที และนำ membrane ผ่านรังสี UV 3 นาที เพื่อให้ viral DNA ยึดติดกับ membrane ส่วน plaque debris ที่ติดอยู่บน membrane จะขจัดโดยการล้าง membrane ด้วย 1x TBS โดยใช้วิธีที่ใส่ถุงมือลูบเบา ๆ ในสารละลาย จากนั้นนำ membrane ไปอบแห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บ membrane ไว้ที่ -20 °C จนกว่า hybridize กับ probe

การตรวจหายีนขั้นที่ 1

นำ membrane ที่ทำ plaque lift มาแช่ใน prehybridization buffer ที่อุณหภูมิ 60 °C 30 นาที จากนั้นนำ membrane มา hybridize กับ DIG-labeled cDNA probe โดยต้ม probe ในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อ denature cDNA probe ให้เป็น ssDNA ก่อนเติม probe ลงไปใน hybridization buffer อัตราส่วน 25-100 ng/ml แล้ว incubate ใน water bath ที่ 60 °C overnight ต่อมาล้าง membrane ด้วย 2X SSC ผสมกับ 0.1% SDS 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วย 0.1x SSC ผสมกับ 0.1% SDS 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ที่ hybridization temperature แล้วตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยการทำ immunodetection ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น หลังจากนั้นนำ membrane มาเทียบกับ LB top agarose plate เพื่อหา plaque ที่ให้ผลบวกต่อ cDNA probe จากนั้นทำการ pick up plaque ที่ให้ผลบวกจาก LB top agarose แช่ใน λ dilution buffer 350 μ l ที่ 4 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้ phage ละลายออกมาใน buffer

การตรวจหายีนขั้นที่ 2

นำ phage ที่ละลายใน buffer มาเพิ่มปริมาณ inserted DNA ด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ T3 และ T7 primers ที่ complementary กับ T3 และ T7 promoter ที่อยู่บนของจีโนมแบคทีเรียและอยู่ตำแหน่งหน้าและหลัง inserted DNA จากนั้นนำ PCR product มาแยกแแถบ DNA ด้วย 0.7% agarose gel electrophoresis แล้วย้ายลงบน Biodyne nylon membrane ด้วยวิธี southern blot เริ่มจากเตรียม 10x SSC 1 ลิตร ใส่ในภาชนะโดยมีกระดาษกรองทำเป็นสะพานเกลือ ต่อมาแช่ gel ใน 0.25 N HCl เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ เพื่อให้ DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 Kb แยกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อที่จะแน่ใจได้ว่า DNA ถูกย้ายไป Biodyne nylon membrane ทุกชิ้นโดยไม่คำนึงถึงน้ำหนักโมเลกุล จากนั้น denature DNA ใน 3 M NaCl ผสมกับ 0.5 N NaOH เป็นเวลา 30 นาที แล้วปรับสภาพ gel ให้เป็นกลางด้วย 0.5 M Tris-HCl pH 7.0 ผสมกับ 1.5 M NaCl 2 ครั้ง ๆ ละ 20 นาที แล้วแช่ gel ใน 10x SSC เป็นเวลา 30 นาที แล้ววาง gel ลงบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ จากนั้นตัด membrane ให้มีขนาดพอดีกับ gel แช่ใน 10x SSC ให้ชุ่มวางลงบน gel แล้วใช้กระดาษกรองที่ตัดพอดีกับ gel ที่แช่ใน 10x SSC วางทับ จากนั้นตัดกระดาษที่ชุ่มให้มีขนาดพอดีกับวางซ้อนเป็นชั้น ๆ หนาประมาณ 2 นิ้ว ซึ่งกระดาษที่ชุ่มจะดูด 10x SSC ขึ้นมาพร้อมกับ

DNA ให้มาติดอยู่ที่ membrane ระวังอย่าให้กระดาษทุกชนิดที่อยู่บน gel สัมผัสกับกระดาษกรองที่ทำเป็นสะพานเกลือเพราะ buffer จะไม่ซึมผ่าน gel ทั้งไว้ overnight จากนั้นล้าง gel ที่ติดกับ membrane ด้วย 5x SSC แล้วนำไปผ่านรังสี UV เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เกิดการ crosslink ของ DNA กับ membrane และอบให้แห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที นำ membrane มา hybridize กับ DIG-labeled cDNA probe และทำ immunodetection ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

3.3 การตรวจหาลำดับเบส

นำ pBluescript SK vector และ PCR product ที่ให้ผลบวกกับการตรวจหาลำดับเบสที่ 2 มาทำการตัดด้วย enzyme ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *XhoI* ที่ 37 °C 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไปแยกแถบ DNA ด้วย 0.7% agarose gel electrophoresis และตัดแถบ cDNA ที่มีขนาดเท่ากับแถบ DNA ที่ให้ผลบวกจากการตรวจหาลำดับเบสที่ 2 แล้วสกัด cDNA จาก agarose gel ด้วยวิธีการที่แนบมากับ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) จากนั้นนำ vector และ cDNA ที่สกัดได้มา ligate เข้าด้วยกันด้วย T4 DNA ligase ที่ 4 °C overnight ตามด้วยการ transform vector เข้า XL1-Blue competent *E.coli* cell ด้วยวิธี heat shock โดยผสม ligation reaction 10 µl และ competent cell (ที่เตรียมใน CaCl₂ และเก็บเซลล์ไว้ที่ -80 °C) 100 µl ใส่ใน Falcon tube ผสมให้เข้ากันในน้ำแข็ง แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไป incubate ที่ 42 °C 45 วินาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ 2 นาที เติมน้ำ SOC media 900 µl แล้ว incubate ใน incubator shaker ที่ 37 °C 280 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงใน ampicillin LB agar plate ที่ 37 °C overnight จนแบคทีเรียก่อตัวเป็น colony แล้วใช้ loop ตัก colony เดียวมา 1 colony ใส่ใน ampicillin LB broth media 3 ml แล้ว streak ลงบน ampicillin LB agar plate เพื่อ stock แบคทีเรียไว้ นำไป incubate ที่ 37 °C overnight เมื่อครบเวลานำ plate มาพัน parafilm เก็บที่ 4 °C ส่วนแบคทีเรียที่เจริญใน ampicillin LB broth media มาทำ Quick prep. โดยดูด media ที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ 1.5 ml ใส่ใน 1.5 ml Eppendorf tube ม้วนเก็บเซลล์ แล้วเท media ออก เติมน้ำละลาย P1 (25 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM glucose, 10 mM EDTA) 100 µl เพื่อละลาย pellet ให้หมดด้วยการ vortex จะเห็นสารละลายขุ่น จากนั้นเติมน้ำละลาย P2 (0.1 N NaOH, 1% SDS) 100 µl ห้ามเขย่า ให้ผสมโดยการพลิกหลอดกลับไปมา เพื่อ lysis ผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะเห็นสารละลายใสแล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที และตกตะกอนโปรตีนและไขมันด้วยสารละลาย P3 (2.7 M potassium acetate, pH 4.8) 100 µl ห้ามเขย่าเช่นกัน จะเห็นเป็นตะกอนสีขาว จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เท supernatant ใส่ใน tube ใหม่ แล้วเติม isopropanol 180 µl เพื่อตกตะกอน DNA นำไปปั่นที่ 12,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 30 นาที เท supernatant ทิ้ง แล้วเติม 70% ethanol 180 µl เพื่อล้าง isopropanol ที่เหลือออก นำไปปั่นที่ 12,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 2 นาที ทำ ethanol ทิ้ง แล้วตาก pellet ให้แห้ง

ซึ่งจะเห็น pellet ใส จากนั้นละลาย pellet ใน TE buffer 100 µl เก็บไว้ที่ 4 °C overnight หลังจากนั้นทำการตัดด้วย enzyme ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *XhoI* ที่ 37 °C 1-2 ชั่วโมงแล้วนำไปแยกแถบ DNA ด้วยวิธี 0.7% agarose gel electrophoresis เพื่อดู inserted DNA ถ้ามีจะเห็นเป็น 2 แถบ ถ้าไม่มีจะเห็นเป็นแถบเดียว จากนั้นนำ colony จาก plate ที่ stock ไว้ ที่ตรวจสอบแล้วว่า มี inserted DNA มา 1 colony ใส่ใน ampicillin LB broth media 3 ml แล้ว incubate ใน incubator shaker ที่ 37 °C 280 rpm overnight จากนั้นสกัด plasmid ด้วยวิธีการที่แนบมากับ Perfectprep Plasmid Mini (Eppendorf) แล้วทำการตัดด้วย enzymes ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *XhoI* ที่ 37 °C 1-2 ชั่วโมง แล้วแยกแถบ DNA ด้วยวิธี 0.7% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่ามี inserted cDNA เหมือนครั้งแรกหรือไม่ หลังจากนั้นส่ง vector ที่มี inserted cDNA ไปหาลำดับเบสที่ Bioservice Unit (BIOTEC, Thailand) และเทียบหาในที่มีลำดับเบสเหมือนหรือคล้ายกันใน Gen Bank (NCBI) ด้วย BLAST search program

4. การสังเคราะห์และทำบริสุทธิ์โปรตีน

3.1 การตัดต่อ cDNA เข้า PET 30 expression vectors

ทำการตรวจสอบหา open reading frame ของ cDNA encoding genes ที่ได้จากข้อ 3 ที่ตำแหน่งของ restriction enzyme *EcoRI* และเปรียบเทียบกับ open reading frame ของ pET 30a-c expression vector ที่ restriction site เดียวกัน เพื่อเลือกที่ใช้ vector ใด (a, b หรือ c) จากนั้นทำการตัด cDNA และ vector ที่เลือกแล้ว ด้วย restriction enzymes *EcoRI* และ *XhoI* แล้วนำไปแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis และทำการตัดแถบ DNA ที่ต้องการไปทำการแยก DNA หลังจากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปต่อกันด้วย T4 DNA ligase และ transformed เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL₂₁ (DE₃) เพื่อทำการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป

3.2 การสังเคราะห์ recombinant proteins

นำ colony ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL₂₁(DE₃) ที่มีการ transformed pET expression vector แล้ว มาเพาะเลี้ยงใน 3 ml LB (Luria-Bertani) medium ที่มี kanamycin (30 µg/ml) ต่อจากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง incubator shaker ความเร็ว 280 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (overnight) หลังจากนั้นย้ายแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงใน fresh LB medium อัตราส่วน 1:1,000 แล้วนำไปปั่นในเครื่อง incubator shaker 280 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้มีค่า OD (Optical density) ประมาณ 0.6-1.0 จากนั้นใส่ 1 M IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 25 µl แล้วนำไปปั่นในเครื่อง incubator shaker ความเร็ว 280 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเซลล์โดยนำไป centrifuge ที่ความเร็ว

5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เท supernatant ที่ทิ้งก่อน แล้วเติม homogenized buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X, 10 mM EDTA) จากนั้นทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกด้วยวิธี freeze-thaw จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไป sonicated ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง Ultrasonic Processor โดย sonicated 5 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที แล้วพักให้เป็นครั้งละ 1 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วน pellet แล้วผสมใน denaturing solubilization buffer, pH 8.0 (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 8 M urea) ต่อจากนั้นนำไป sonicated และ centrifuge ดังลักษณะดังกล่าวข้างต้นอีกครั้ง เพื่อเก็บ supernatant ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วย 12.5% SDS-PAGE และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย Protino[®] Ni-IDA column

3.3 การ purification ของ recombinant proteins

นำ Protino[®] Ni-IDA column มาปรับสมดุล โดยการเติม denaturing solubilization buffer, pH 8.0 จากนั้นนำ supernatant ที่ผ่านการสังเคราะห์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Protino[®] Ni-IDA column แล้วล้าง column ด้วย denaturing solubilization buffer, pH 8.0 จำนวน 6 ครั้ง โดยใช้ denaturing elution buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 8 M urea, 250 mM imidazole, pH 8.0) เป็นตัวแยก recombinant protein จากนั้นนำ recombinant protein ไปวิเคราะห์ด้วย 12.5 % SDS-PAGE และ western immunoblotting

4. การผลิต polyclonal antibodies ต่อ recombinant proteins

4.1 การ immunization หนู Wistar rat

นำ purified recombinant proteins 50 μg ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอของหนู Wistar rat (priming วันที่ 0) ทำการ immunized หนู rat อีก 2 ครั้งหลังจากการ priming 2 (first boosting วันที่ 14) และ 4 สัปดาห์ (second boosting วันที่ 28) ด้วย purified recombinant proteins 50 μg ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ทางใต้ผิวหนังและ เก็บเลือดหนู Wistar rat ทาง tail vein วันที่ 0, 10, 24 และ 35 ใส่ใน microtube ปล่อยให้ clot ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำไป centrifuge ที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูด serum และเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การตรวจหาปริมาณสัมพัทธ์ของ antibody ด้วยวิธี Indirect ELISA

ทำการหาปริมาณสัมพัทธ์ของ antibody ใน serum ของหนู โดยการ coat polystyrene microtiter plate ด้วย denatured protein ใน 0.1M coating buffer pH 9.6 (3.18% sodium carbonate, 5.86% sodium hydrogen carbonate) ในอัตรา 50 μl /well ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น

เวลาข้ามคืน ล้างด้วย washing solution (10 mM PBS pH 7.2) จำนวน 400 μ l/well 3 ครั้ง แล้ว block non-specific binding ของ antibody ด้วย 10% fetal bovine serum + 0.05% Tween 20 ใน washing solution จำนวน 200 μ l/well ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น incubate ใน preimmunized และ immunized rat sera ใน 1% fetal bovine serum + 0.05% Tween 20 ที่ dilution ต่าง ๆ โดยเริ่มต้นที่ 1:50 และลดความเข้มข้นลง $\frac{1}{2}$ เท่า จำนวน 24 dilution ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง หลังจากนั้นแช่ใน HRP- goat anti-rat IgG ที่ละลายใน 1% skimmed milk + 0.05% Tween 20 ใน 10 mM PBS pH 7.2 ปริมาตร 100 μ l/well ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง เติม TMB substrate 100 μ l/well แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 16.5% sulphuric acid 100 μ l/well นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วย microtiter plate reader (PROGRAMMABLE MPT READER DV 990BV6) ที่ความยาวคลื่น 492 nm

5. การหาความจำเพาะของ polyclonal antibodies ด้วยวิธี westernimmunoblotting

5.1 การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

เตรียม SDS-PAGE โดยใช้ Whole body (WB) จากตัวเต็มวัยของพยาธิ โดยใช้ 4% stacking gel และ 12% running acrylamide gel เตรียมโปรตีนโดยการผสมโปรตีน (ES product) ต่อ 2X simple buffer (350 mM HCl, 10% Sodium dodesyl sulphate, 30% glycerol, 9.3% dithiothreitol DTT 0.012% bromophenol blue) ต่อจากนั้นต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไป load ใน gel ปริมาณ WB 35 μ g/well และ ES 0.13 μ g/well โดยใช้ standard marker (Precision Plus Protein™ Unstained Standards, BIO-RAD) เป็น reference ของ molecular weight ทำการแยก antigens ในสภาวะ constant current กระแสไฟฟ้า 25 mA จากนั้นนำแผ่น gel ไปย้อมสี silver staining หรือ comassie blue เพื่อศึกษาแถบโปรตีนต่าง ๆ

5.2 การย้อม Coomassie blue

นำแผ่น gel แช่ในสี coomassie blue (2.5 mM coomassie blue R 250, 46% methanol, 8% acetic acid) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย shaking ตลอดเวลา แล้วล้างด้วย destaining I (7% acetic acid, 40% methanol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้าง gel ด้วย destaining II (5% acetic acid, 7% methanol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

5.3 Western Immunoblotting

นำแผ่น gel ที่ผ่านการแยกโดย SDS-PAGE มาย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose ด้วยวิธี semidry blotting (Biometra, Fastblot B34) ที่ constant voltage 0.8-1.0 mA/cm² ของพื้นที่ gel เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่น nitrocellulose ที่ได้มาย้อมด้วย 0.1% Ponceau S ใน 5%

acetic acid และนำแผ่น nitrocellulose มาล้างสี Ponceau S ออกด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ใน 5% skimmed milk ใน 10 mM Tris buffer saline, (TBS, 10 mM Tris-HCl + 150 mM NaCl) pH 7.4 + 0.05% Tween 20 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อ block non-specific binding แล้วล้างด้วย 1% skimmed milk ใน 10 mM TBS pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แช่แผ่น nitrocellulose ใน prebleed and second boost rat sera ใน 1% skimmed milk, 10 mM TBS, 0.05% Tween 20 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 1% skimmed milk ใน 10 mM TBS pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วแช่ใน HRP-conjugated goat anti rat-IgG ละลายในอัตราส่วน 1:3,000 ใน 0.1 M TBS pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 1% skimmed milk ใน 10 mM TBS pH 7.4 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วแช่แผ่น nitrocellulose ใน 67 mM diaminobenzidine (10 mM TBS, 0.08% H_2O_2) เป็นเวลา 4 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปคำนวณ molecular weight ของแถบโปรตีนที่ให้ผลบวก

6. การ localization ของ polyclonal antibodies ต่อ recombinant proteins ด้วยวิธี

immunoperoxidase

นำพยาธิที่เก็บรักษาใน 0.1M PBS buffer ไปผ่านกระบวนการ dehydrated ซึ่งเป็นการเอาน้ำออกจากพยาธิโดยใช้ 70%, 80%, 90%, และ 100% ethyl alcohol ขึ้นละ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ clearing โดยการแช่พยาธิลงใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที จากนั้นนำพยาธิลงไปแช่ในสารผสมระหว่าง paraffin ต่อ xylene ในอัตราส่วน 1 : 1 และ pure paraffin ขึ้นละ 30 นาที เพื่อให้ paraffin แทรกเข้าไปแทนที่ xylene ในเนื้อเยื่อ ตามด้วยการฝังใน paraffin โดยใช้เครื่อง Tissue-Tek[®] TEC[™] จากนั้นนำ block ที่ได้มาตัดด้วยเครื่อง microtome (Accu-Cut[®] SRM[™]) ให้มีความหนา 5-7 ไมครอน และนำแผ่น section วางบน slide อุ่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำ slides มาผ่านกระบวนการ deparaffin ใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที dehydration ตามลำดับความเข้มข้นของ ethyl alcohol ที่ 100% 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที 95%, 90%, 80%, 70% ethyl alcohol และน้ำกลั่น ขึ้นตอนละ 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำลาย peroxidase enzyme ภายในตัวพยาธิ (endogenous peroxidase) โดยการแช่ใน 3% H_2O_2 ในน้ำกลั่นหรือ 0.1 M PBS เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย 0.1 M PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำ slide มาทำ antigen retrieving โดยการต้ม section ใน citrate buffer (10 mM citrate buffer pH 6.0) เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วย 0.1 M PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำการป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะเจาะจงของแอนติบอดี (block non-specific binding) ด้วย สารละลาย 0.1 % glycine ใน 0.1M PBS เป็นเวลา 30 นาที 4 % BSA (bovine serum albumin) ใน 0.1 M PBS เป็นเวลา 30 นาที incubate ด้วย immunized rat sera (diluted ใน 0.1 M PBS + 0.05% Tween 20 + 1% BSA) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M PBS ที่ผสมกับ Tween 20

จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที โดย shaking ต่อจากนั้น incubate ด้วย HRP-goat anti rat IgG (diluted ใน 0.1 M PBS + 0.05% Tween 20 + 1% BSA) เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย 0.1 M PBS-T จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที โดย shaking incubate ด้วย AEC single solution chromogen (Zymed[®] Laboratories Inc.) เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที counter stain ด้วย Mayer's hematoxylin 30 วินาที ล้างด้วย tap water 15 นาที จากนั้น mounted ด้วย buffer glycerol ปิดสไลด์ด้วย cover glass ทาขอบกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus BX51 Light microscope)

ผลการทดลอง

1. การ cloning, characterization, expression, purification และ localization ของ vitelline protein B ของพยาธิใบตับ *Fasciola gigantica*

Cloning and Characterization of Genes Encoding Eggshell Proteins

ในพยาธิ *F. hepatica* ได้ทำการสังเคราะห์ vitelline B protein encoding ไว้จำนวน 2 ยีน คือ vitelline protein B1 และ B2 (Rice-Ficht et al., 1992). ยีนทั้งสองสามารถแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 272 amino acids ในขณะที่มีความยาวต่างกันคือ vitelline B1 มีความยาว 888 คู่เบส และ B2 มีความยาว 1260 คู่เบส ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำลำดับเบสของยีนทั้งสองมาออกแบบเป็น primers แล้วนำไปทำ RT-PCR จาก total RNA ของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย แล้วนำไปแยกด้วย agarose gel electrophoreses พบว่าได้ cDNA จาก PCR product จำนวน 2 แถบ คือ 700 และ 250 คู่เบส จากนั้นนำ cDNA ขนาด 700 คู่เบส ไปต่อเข้ากับ pGEMT-easy vector และนำไปตรวจหาลำดับเบส พบว่ามีลำดับเบสที่ชัดเจนจำนวน 660 คู่เบส และนำไปเปรียบเทียบกับ data base ด้วย NCBI Blast search พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของทั้ง vitelline proteins BI and BII ของพยาธิ *F. hepatica* แต่มีความเหมือนกับ vitelline protein BII มากกว่า

การตรวจหายีน จาก cDNA library screening

จากการนำ cDNA library ที่ผลิตจาก mRNA ของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย และนำไปตรวจหาด้วย DNA probe ที่สร้างจาก cDNA ที่ได้จาก RT-PCR พบว่ามี plaques ที่ให้ผลบวกจำนวน 10 plaques และเมื่อนำ plaques ดังกล่าวไปตรวจหาขนาดของ inserted DNA พบว่ามีขนาดอยู่ระหว่าง 800 ถึง 1600 คู่เบส จากนั้นคัดเลือก cDNA clone Egg-Fg-R7 และ R8 ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ full gene ของ vitelline protein BI และ BII ของพยาธิ *F. hepatica* ไปตรวจสอบลำดับเบสพบว่า cAND ทั้งสอง เป็น vitelline protein BI ซึ่ง, Egg-Fg-R8 มีลำดับเบสครบสมบูรณ์ (ภาพที่ 1)

```

      10      20      30      40      50      60      70
F. gigantica VP BI  GAAAAAGAAATTCACCTTATGCTTCTGTTGGCAATCGTCCCACTCACACTTGTCTGGGACCCGACGGC

      80      90     100     110     120     130     140
F. gigantica VP BI  AAGTTCAACAGACATGCCTCATATGACGACCGTGAGAAGCATCGGGGATATCGAAAGGAGAAATGACTACT

      150     160     170     180     190     200     210
F. gigantica VP BI  TGAACATATGATCTGAAGGGGAAATTTGCCGGACACGGCAAAACATATTTGCATGGTAGCTTCGACAAATA

      220     230     240     250     260     270     280
F. gigantica VP BI  CGGCAACGAGAAATGAACGGGGGAAATATGATGATCAAGGCAAACTCCCTAGCTGGAATAACAGCTCAC

      290     300     310     320     330     340     350
F. gigantica VP BI  GATGGAAATATGGTATGTACGGAAACATGTATGCCAAAGGTGACTTCAAAGCTTACGGAATGAAAGTG

      360     370     380     390     400     410     420
F. gigantica VP BI  AGGGTGCAGAAATTTAGGAGGTTACCACTTCCGTCGTGGTGGGGGATATGACAGCTACGGGAAGAGAA

      430     440     450     460     470     480     490
F. gigantica VP BI  GTCGTATGATGACTATGACACCAAGGGCCATTTGAAGAAAGTTGCTAATAAGGGTAGACAAATCCAAATTC

      500     510     520     530     540     550     560
F. gigantica VP BI  GATATGTATGGAAACGTGAAGGCTGACGGTCAAGCCGTTTCCAATGGCAACATGAACGCCTACGGTATGT

      570     580     590     600     610     620     630
F. gigantica VP BI  TTGACTCCTATGGCAGACACGATCAGTATGGCAAAATGTACGATCAAGGCAAATATGAGGAGCTGGCAA

      640     650     660     670     680     690     700
F. gigantica VP BI  ATACAATGCGCACGGGAACTTAGATCTCTATGGTCATCTGAGGGGATACGGTGGTTTCATCTGCGGCCAGC

      710     720     730     740     750     760     770
F. gigantica VP BI  AAGAGTGAGAATTACGGGAGATGCACATGAATCCGGACGATATGAGCCTTATGGACGATATGAGAAATATG

      780     790     800     810     820     830     840
F. gigantica VP BI  AGGATGATTACCGGAGGAGACTCCATATGACAAATACAGTTAAAGTGAACATTATCAACCTAAAAAGC

      850     860     870     880     890
F. gigantica VP BI  CGGATAATCTAAATGCACCTCATATAAATGTTAGATATACCCAAAAAAAAAAAAA

```

ภาพที่ 1. แสดงลำดับเบสของ Egg-Fg-R8

เมื่อนำ cDNA clone Egg-Fg-R8 ไปทำการเปรียบเทียบกับ genes ของ vitelline protein BI และ BII ของพยาธิ *F. hepatica* ด้วย BioEdit program (down loaded form <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) พบว่ามีความเหมือนกับ vitelline BI และ BII genes ที่ 92% และ 81% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีความเหมือนกับ gene ของ eggshell protein ของ *S. japonicum* 41% (ภาพที่ 2, ตารางที่ 1)

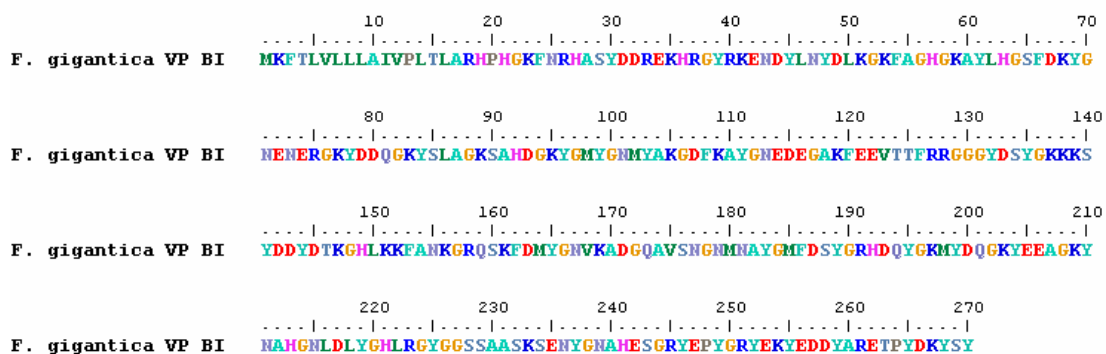
FGIVPBI	1	-----ATGAAATTCACCTTTAGTGCTTCTGTTGGCAATCGTCCCACTCACACTTGC TCGGC	55
FHEVPBI	1	ACCAAATGAAA.....G.....	66
FHEVPBII	1	CATGACCAAAATGAAA.....G.....	70
FGIVPBI	56	ACCCGCACGGCAAGTTCAACAGACATGCCTCATATGACGACCGTGAGAAACATCGGGGATATCGAAAGGA	125
FHEVPBI	67		136
FHEVPBII	71		140
FGIVPBI	126	GAACTGACTACTTGAACATATGATCTGAAGGGGAAATTTGCCGGACACGGCAAGCATATTGTCATGGTAGC	195
FHEVPBI	137		206
FHEVPBII	141		210
FGIVPBI	196	TTCTACAAATACGGCAACGAGAATGAACGGGGCAATATGATGATCAAGGCAATATCTCCCTAAGCTTGAA	265
FHEVPBI	207	CT.....C.....G.....	276
FHEVPBII	211	C.....G.....C.....C.....T.....C.....A.....G.....	280
FGIVPBI	266	AATCAAGCTCAGCATGGAATAATATGATGTACGGAAACATGTATGCCAAAGGTGCTTCAMAGCTTACGG	335
FHEVPBI	277	G.....C.....G.....	346
FHEVPBII	281	C.....AC.....T.....GA.....CGA.....T.....TG.....T.....CC.....	350
FGIVPBI	336	AAATGAAGATGAGGGTGGCAATTTGAGGAGGTTACCACTTCCTCGTCGTGGTGGGGATATGACAGCTAC	405
FHEVPBI	347	C.....C.....A.....	416
FHEVPBII	351	TC.....GA.....A.....CA.....G.....C.....ATAC.....G.....AA.....GTG.....A.....	420
FGIVPBI	406	GGCAAGAAGAAGTGTATGATGATATGACACCAAGGGCCATTTGAAGAACTTCCTATAAGGGTTGAC	475
FHEVPBI	417	G.....	486
FHEVPBII	421	A.....C.....T.....A.....AT.....A.....ACGA.....T.....CG.....TGA.....	490
FGIVPBI	476	AATCCAAATTCGATATGTAATGGAAAGTGAAAGGTGACGGTCAGGCCGTTTCCTAATGGCAACGTGAACGC	545
FHEVPBI	487	TA.....	556
FHEVPBII	491	CT.....C.....T.....G.....A.....GA.....G.....CA.....TAT.....A.....G.....T.....C.....A.....G.....GGT.....	560
FGIVPBI	546	CTACGGTATGTTTGACTCCTATGGCAAGACACGATCAGTATGGCAAAATGTACGATCAAGGCAAAATATGAG	615
FHEVPBI	557	A.....T.....A.....	626
FHEVPBII	561	TCTG.....C.....AA.....C.....A.....T.....A.....	630
FGIVPBI	616	GAACTGGCAAAATACAATGCGCACGGGAACCTAGATCTCTATGGTCACTCGAGGGGATACGGTGGTTCA	685
FHEVPBI	627		696
FHEVPBII	631		700
FGIVPBI	686	CTCGGGCCAGCAAGAGTGGAGATTAAGGAATGCACATGAATCCGGACGATATGAGCCTTATGGACGATA	755
FHEVPBI	697	AGA.....T.....G.....	766
FHEVPBII	701	AGA.....T.....G.....	770
FGIVPBI	756	TGAGAAATATGAGGATGATTACCGAGGGAGACTCCATATGACAAATACAGTTACTAAGTGAAACATT---	822
FHEVPBI	767	G.....T.....	833
FHEVPBII	771	G.....ACTC.....CGGTG.....	840
FGIVPBI	822	ATCAACCTAAAGCGGATAATCAAAATGCACCTAATAAATG-----	867
FHEVPBI	833	T.....C.....G.....GCAT.....TAGATTATTC.....	888
FHEVPBII	841	A.....CT.....CC.....CA.....T.....G.....C.....ATGC.....TTTA.....G.....AATCGCAAGCTGAATGAAATTTA	910
FGIVPBI	867	-----	867
FHEVPBI	888	-----	888
FHEVPBII	911	TTGTTTAGTGCATTTCATAATAACAGAAACGTATCACGAAATCGTGCCACCATCGGGAGACTGGCCAG	980

ภาพที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของ vitelline BI clone Egg-Fg-R8 (FGIVPBI) ของ *F. gigantica* และ vitelline BI (FHEVPBI) และ BII (FHEVPBII) ของ *F. hepatica*

	FGIVBI	FHEVPBII	FHEVPBI	Sj
FGIVPBI	1.000	0.811	0.928	0.420
FHEVPBII	---	1.000	0.842	0.417
FHEVPBI	---	---	1.000	0.419
Sj	---	---	---	1.000

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ FGVPBI (egg-Fg-R8) กับ gene ของ vitelline protein B1 และ B2 ของ *F. hepatica* และ eggshell protein ของ *S. japonicum*

จากการนำลำดับเบสของ FGVPBI มาแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าสามารถแปลงเป็น 270 amino acids รวมทั้ง (ภาพที่ 3). ซึ่งประกอบด้วยชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนดังตารางที่ 2 เมื่อนำไปคำนวณ molecular weight ได้เท่ากับ 30,851 kDa และมีค่า pI เท่ากับ 8.83 เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของพยาธิ *F. hepatica* พบว่ามีความเหมือนกับ vitelline protein BI ถึง 93.1 และ BII 83.4% นอกจากนี้ยังมีความเหมือนกับ egg protein of *Clonorchis sinensis* (CSEP) 29.8% (Lee et al. 2002), vitelline B precursor protein of *Opisthorchis viverrini* 33.2% (Eursitthichai et al. 2001) และ eggshell protein of *S. japonicum* 19% (Sugiyama 2004) (ภาพที่ 4, ตารางที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงลำดับกรดอะมิโนของ vitelline protein BI ของพยาธิ *F. gigantica*

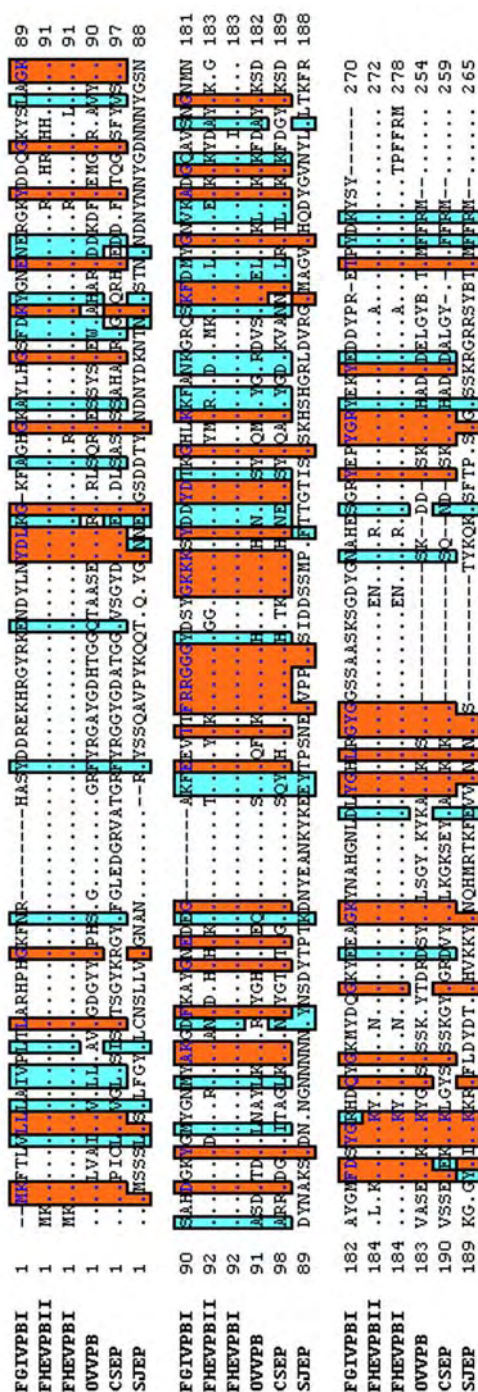
Amino acid

Number of

Mol %

Ala (A)	19	7.00%
Arg (R)	14	5.20%
Asn (N)	15	5.60%
Asp (D)	24	8.90%
Cys (C)	0	0.00%
Gln (Q)	5	1.90%
Glu (E)	15	5.60%
Gly (G)	39	14.40%
His (H)	12	4.40%
Ile (I)	1	0.40%
Leu (L)	14	5.20%
Lys (K)	30	11.10%
Met (M)	7	2.60%
Phe (F)	10	3.70%
Pro (P)	5	1.90%
Ser (S)	15	5.60%
Thr (T)	6	2.20%
Trp (W)	0	0.00%
Tyr (Y)	34	12.60%
Val (V)	5	1.90%
Asx (B)	0	0.00%
Glx (Z)	0	0.00%
Xaa (X)	0	0.00%

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดใน vitelline protein BI ของพยาธิ *F. gigantea*



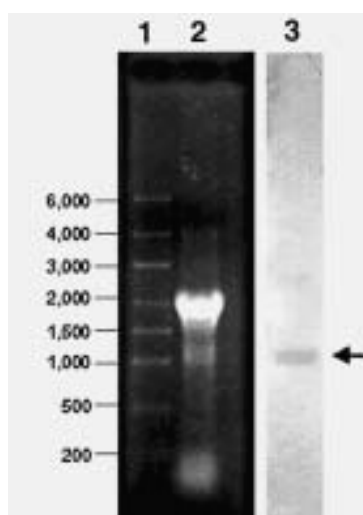
ภาพที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบลำดับ amino acid ของ vitelline protein B1 ของ *F. gigantica* (FGIBI) กับ vitelline protein B1 (FHEBI) และ B2 (FHEBII) ของ *F. hepatica*, egg protein ของ *Clonorchis sinensis* (CSEP), vitelline B precursor protein ของ *Opisthorchis viverrini* (OVVPB) และ eggshell protein ของ *S. japonicum* (SJEP)

	FGBI	FHBII	FHBI	OVB	CSEP	SJEP
FGBI	1.000	0.834	0.931	0.332	0.298	0.150
FHBII	---	1.000	0.845	0.340	0.303	0.156
FHBI	---	---	1.000	0.333	0.293	0.149
OVB	---	---	---	1.000	0.586	0.156
CSEP	---	---	---	---	1.000	0.156
SJEP	---	---	---	---	---	1.000

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบ Amino acid sequence ของ vitelline protein B1 ของ *F. gigantica* (FGBI) กับ vitelline protein B1 (FHBI) and B2 (FHBII) of *F. hepatica*, egg protein ของ *Clonorchis sinensis* (CSEP) (Lee et al. 2002), vitelline B precursor protein ของ *Opisthorchis viverrini* (OVVPB) (Eursitthichai et al. 2001) และ eggshell protein ของ *S. japonicum* (SJEP) (Sugiyama 2004)

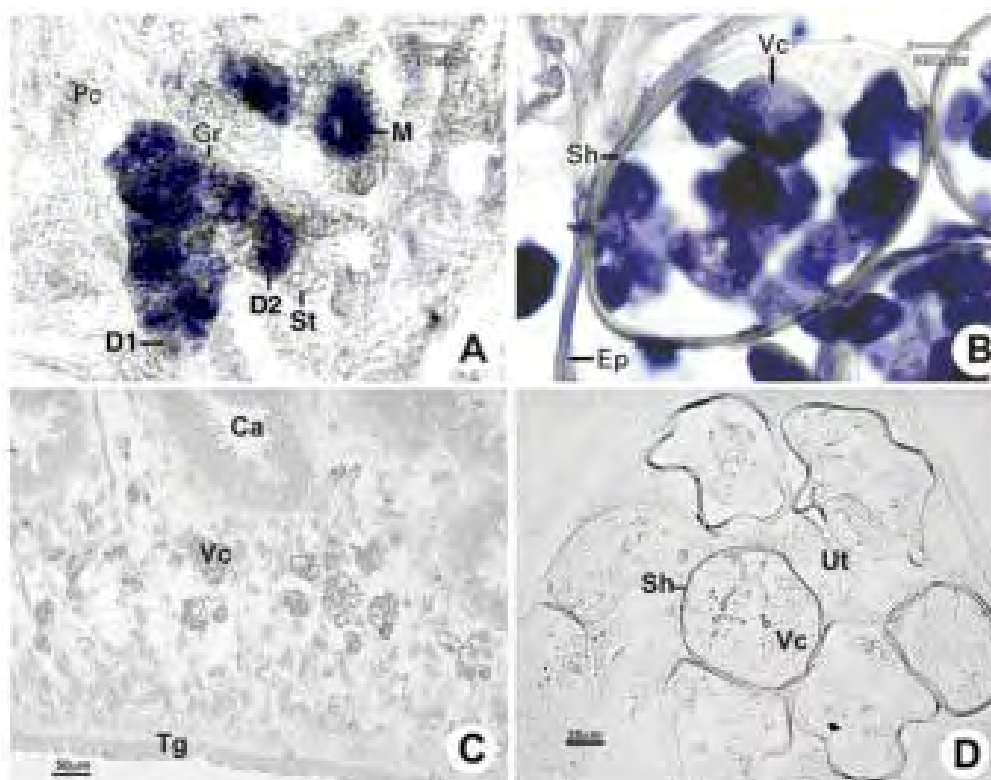
การแสดงออกของ vitelline protein BI encoding gene

จากการนำ DNA probe ที่สร้างจาก cDNA ของ vitelline proteon BI ของพยาธิ *F. gigantica* มาทำ Northern hybridation กับ total RNA ที่สกัดจาก *F. gigantica* ตัวเต็มวัย พบว่ามีแถบ RNA ที่ให้ผลบวกจำนวน 1 แถบ ที่ขนาดประมาณ 1000 คู่เบส (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แสดง 1.2% agarose gel electrophoresis ของ marker RNAs (1) และ total RNA ของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย (2), และ Northern blot (3) hybridized ที่ตรวจจับด้วย vitelline BI-RNA probe แสดงแถบ RNA ที่ให้ผลบวก (ลูกศร)

จากการนำ RNA probe ที่สร้างจาก cDNA ของ vitelline proteon BI ของพยาธิ *F. gigantea* มาทำ in situ hybridization กับเนื้อเยื่อพยาธิ พบว่าเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกคือ vitelline follicles และ egg โดยเซลล์ใน vitelline follicle สามารถแบ่งได้เป็น 5 ระยะ คือ stage1-stage5 (mature vitelline cells) ซึ่ง stage1 vitelline cell ติดสีจาง และติดสีเข้มขึ้นใน mature vitelline cells(stage 5) และ vitelline cells เข้มขึ้นและรวมเป็นกลุ่มใน eggs เมื่อเทียบกับ negative control ที่ไม่ได้ใช้ FgVPBI antisense RNA probe (ภาพที่ 6)

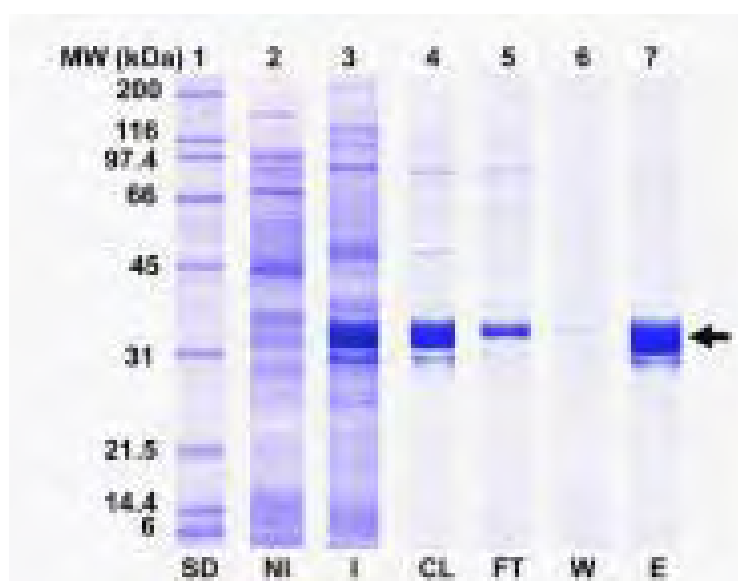


ภาพที่ 6 RNA in situ hybridization ของเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantea* ตัวเต็มวัย ด้วย RNA probe ที่สร้างจาก cDNA ของ vitelline proteon BI ของพยาธิ *F. gigantea*

- (A) ภาพกำลังขยายสูงของ vitelline follicle แสดงผลบวกของการ hybridization ที่ developing vitelline cells (Vc) stage 1 (D1), stage 2 (D2) และ mature stage (M), ในขณะที่ earliest stem cell (St) และ parenchyma (Pc) ให้ผลลบ
- (B) ภาพกำลังขยายสูงของ intrauterine eggs แสดงผลบวกของการ hybridization ที่ vitelline cells (Vc) ที่อยู่ภายในเปลือกไข่ (Sh); Ep= uterine epithelium
- (C) และ (D) แสดงเนื้อเยื่อที่ hybridized ด้วย FgVPBI sense RNA probe ซึ่งไม่พบผลบวกในเนื้อเยื่อต่างๆ; Gr = granule; Sh= eggshell; Ep= uterine epithelium; Ut = uterus; Ca = cecum; Tg = tegument.

การสังเคราะห์และทำบริสุทธิ์ vitelline protein BI (rFg VPBI) ของ *F. gigantea*

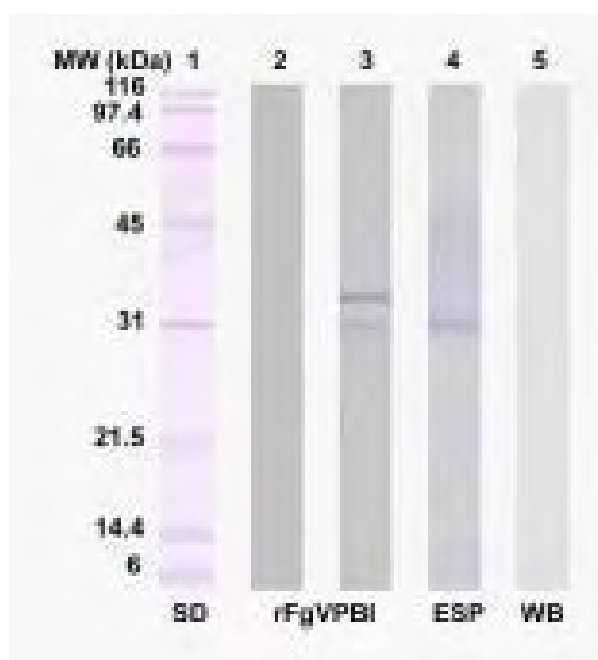
จากการตัดต่อยีน vitelline protein BI ของ *F.gigantica* เข้าสู่ pET30b expression vector แล้วนำไป express ใน *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยการกระตุ้นด้วย IPTG พบว่ามีแถบโปรตีน 2 แถบ ขนาดโมเลกุล 31.5 kDa และ 31kDa ที่แตกต่างจากโปรตีนที่สกัดจาก *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ก่อนการกระตุ้น และเมื่อนำมาทำบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA affinity chromatography พบเฉพาะแถบโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มี 2 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 31.5 kDa และ 31kDa ซึ่งมีขนาดเท่ากับที่คำนวณได้ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงการสังเคราะห์และทำบริสุทธิ์ recombinant vitelline protein BI ของ *F. gigantea* (rFgVPBI) ด้วย Ni-NTA affinity chromatography; 1= standard protein markers (SD); 2 = non-induced fraction (NI); 3 = induced by IPTG fraction (I); 4 = lysate of the expressing cells (CL); 5 = flow-through fraction (FT); 6 = washing fraction (W); 7 = elution fraction (E); ซึ่ง recombinant rFgVPBI ที่ทำบริสุทธิ์ได้มีขนาดเท่ากับ 31.5 kDa (ลูกศร)

การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของ polyclonal antibody ที่ต้านต่อ recombinant vitelline protein BI ของพยาธิ *F. gigantea*

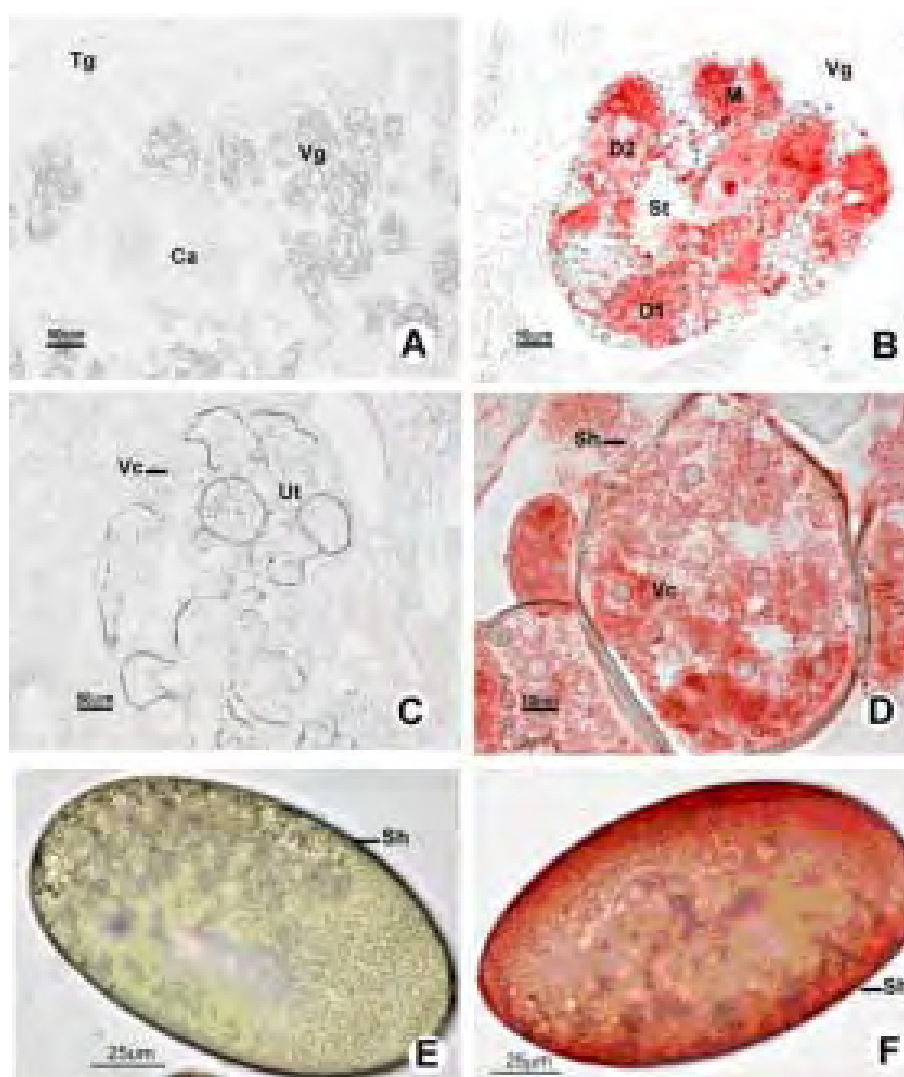
จากการนำ recombinant vitelline protein BI ของพยาธิ *F. gigantea* ไปฉีดกระตุ้น ภูมิคุ้มกันในกระต่าย และทำการเก็บเซรัมของกระต่ายมาทดลองจับกับ rFgVPBI, acid-urea extracted native eggshell precursor protein (ESP) และ whole body extract (WB) ของพยาธิ *F. gigantea* พบว่า polyclonal antibody ที่ผลิตได้สามารถจับกับแถบโปรตีนใน rFgVPBI ที่ 31.5 และ 31 kDa และใน ESP ที่ 31 kDa แต่ไม่สามารถพจับกับโปรตีนใน WB เมื่อเทียบกับการใช้ preimmunized rabbit serum เป็นตัวจับกับโปรตีนต่างๆ ดังกล่าว (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 Immunoblot of *F. gigantea* proteins. The PoAb against rFgVPBI reacted with rFgVPBI at the molecular weight of 31.5 and 31 kDa in lane 3 and acid-urea extracted native eggshell precursor protein (ESP) at the molecular weight 31 kDa in lane 4, but not with the whole body extract (WB) in lane 5, while no positive band appeared when the sera from a normal rabbit (NS) was used as a control in lane 2. SD (lane 1) was the lane containing standard molecular weights.

การศึกษาการจำแนกและตำแหน่งของ native vitelline protein BI โดย anti-rFgVPBI antiserum

จากการนำ polyclonal antibody ศึกษาด้วยวิธี Immunoperoxidase เพื่อดูการกระจายของ native vitelline protein BI antigen เมื่อจับกับ rabbit anti-rFgVPBI พบว่า vitelline cell ติดสีเข้มภายใน vitelline gland และรวมกลุ่มอยู่ในไข่และ eggshell และจากการย้อมติดสีที่ vitelline follicle พบการติดสีของ vitelline cell หลายระดับคือ stage 1 ติดสีอ่อน, stage 2 ติดสีปานกลาง และติดสีเข้มใน mature cell ไม่พบการติดสีใน stem cell และพบการติดสีแดงของ ACE ใน uterus ที่ vitelline cell รอบๆ ovum เมื่อเทียบกับ control ไม่พบการติดสีในไข่และ vitelline cell ทั้งภายใน vitelline gland และ uterus (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อและไข่พยาธิ *F. gigantea* ที่ย้อมด้วย Immunohistochemical staining โดยใช้ polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อ rFgVPBI. เป็นตัวจับกับโปรตีน แสดงผลบวกใน vitelline cells (Vc) ใน vitelline glands (B) และในไข่ที่อยู่ภายใน uterus (ut) (D) และไข่ที่ปล่อยออกนอกตัวพยาธิ (F) ในขณะที่ใช้ preimmunized rabbit serum ให้ผลลบ (A, C, E)

2. การ Cloning และ characterization ของ vitelline cell specific protein encoding genes

จากการนำ cDNA library ของ adult *F. gigantea* (ได้รับการสนับสนุนจาก Dr. Terry Spithill, Austraria) มาเพาะเลี้ยงใน LB top-agarose 1 จนได้ขนาดของ plaque ประมาณ 1 mm จากนั้นทำการโอนย้าย plaques ไปยัง nitrocellulose membrane และทำการตรวจหา plaques ที่ให้ผลบวกต่อการจับกับ probe ที่สังเคราะห์จาก vitelline gland area พบว่ามี plaque ที่ให้ผลบวกชัดเจนจำนวน 60 plaques จากนั้นทำการเก็บ plaques เหล่านั้นมาละลายใน phage diluted buffer โดยตั้งชื่อเป็น VgFg 1-60 และนำมาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ inserted cDNA โดยใช้ T7 และ T3 primers จากนั้นวิเคราะห์ด้วย 0.7 % agarose gel electrophoreses และย้าย cDNA ที่ได้ลงบน nitrocellulose membrane และทำการ hybridized ด้วย DIG-labeled cDNA probe ที่สร้างจาก RNA ที่สกัดจาก testis area เพื่อทำการคัดเลือก cDNA ที่ให้ผลลบ จากการตรวจหาในขั้นที่ 2 พบว่า มี 16 plaques ที่ให้ผลลบต่อ DIG-labeled cDNA probe ที่สร้างจาก RNA ที่สกัดจาก testicular area คือ VgFg 7, 11, 12, 14, 16, 17, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 40, 44, 49

จากการนำ PCR products ที่ได้จากการตรวจหาในขั้นที่ 2 มาทำการตัดต่อเข้า p Bluescript SK+- vector และส่งไปตรวจหาลำดับเบสที่ BSU พบว่า ไม่สามารถหาลำดับเบสที่ชัดเจนได้ จำนวน 4 โคลน คือ VgFg 12, 17, 30 และ 31 เป็นยีนที่มีการตรวจพบแล้วในพยาธิ *F. gigantea* 1 ยีน คือ cathepsin L จำนวน 8 โคลน คือ VgFg 7, 11, 14, 35, 36, 40, 44 และ 49 เป็นยีนที่ยังไม่มีการค้นพบในพยาธิชนิดนี้จำนวน 4 ยีน คือ VgFg 16, 29, 32 และ 37 ดังมีรายละเอียดของแต่ละยีนดังนี้

2.1 การ characterization ของ VgFg 16

จากการนำ cDNA library ของ adult *F. gigantea* มาเพาะเลี้ยงใน LB top-agarose จนได้ขนาดของ plaque ประมาณ 1 mm จากนั้นทำการโอนย้าย plaques ไปยัง Biodyne nylon membrane และทำการตรวจหา plaques ที่ให้ผลบวกต่อการจับกับ probe ที่สังเคราะห์จาก total RNA ของ adult *F. gigantea* (ที่ผลิตโดย อิศรา ลิมเพชรงาม, 2548) พบว่ามี plaques ที่ให้ผลบวกชัดเจนจำนวน 60 plaques จากนั้นทำการสุ่มเก็บ plaques เหล่านั้นมาละลายใน phage diluted buffer และทำการเพิ่มปริมาณ inserted DNA โดยวิธี PCR โดยใช้ primers ไปจับกับ T3 และ T7 promoters ที่อยู่สองข้างของ inserted DNA และตัด PCR products ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI และ EcoRI และต่อเข้า pBlueScript SK vector และส่งไปตรวจหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล

GenBank โดยใช้ Blast search, (NCBI) พบว่า cDNA clone VgFg 16 มีลำดับเบสคล้ายกับลำดับเบสของ Tegumental antigen ของ *F. hepatica* (Trudgett et al., 2000)

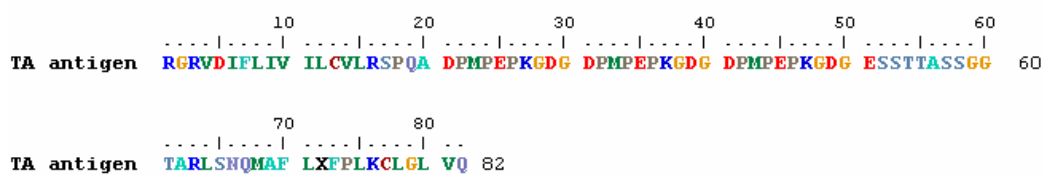
Tegumental antigen encoding gene ที่ทำการสังเคราะห์ได้จาก *F. gigantea* นี้สามารถตรวจหาลำดับเบสได้ชัดเจนมีความยาว 360 bp (ภาพที่ 10) และมีความเหมือนกับ tegumental antigen ของ *F. hepatica* 69.3% เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของทั้งสองพบว่า ลำดับเบสส่วนใหญ่เหมือนกัน โดยไม่พบ start codon ในบริเวณเดียวกับที่พบใน tegumental antigen ของ *F. hepatica* และไม่มีลำดับเบสในส่วนที่เหมือนกับลำดับเบสที่ 93 ถึง 122 ของ *F. hepatica* และ ลำดับเบสที่ 282 ถึง 286 (GATAC), 298 ถึง 310 (CTGAGCTTTACC), 314 ถึง 325 (TGTTTTTTTGTTT) และ 340 ถึง 346 (ACAAATA) ของ *F. gigantea* ไม่พบใน *F. hepatica* (ภาพที่ 12)

จากลำดับเบสดังกล่าวสามารถแปลเป็น amino acid sequence ได้ 82 amino acid (ภาพที่ 11) เมื่อนำ amino acid sequence นี้ไปเปรียบเทียบกับ amino acid sequence ของ tegumental antigen ของ *F. hepatica* โดยใช้ Blast search, (NCBI) พบว่ามีความเหมือนกันถึง 66.2% โดยพบว่า amino acid sequence ของ *F. gigantea* มีลักษณะเป็น repeated sequence โดยมีลำดับ amino acid เป็น DPMPEPK ซึ่งเริ่มตั้งแต่ amino acid ตัวที่ 24 ถึง 50 และ repeated sequence นี้มีความคล้ายคลึงกับที่พบใน *F. hepatica* ยกเว้นที่ amino acid ตำแหน่ง M ที่พบใน repeated sequence ของ *F. gigantea* เปลี่ยนเป็น K ในทุกบริเวณที่เป็น repeated sequence ของ *F. hepatica* และยังมีส่วนที่มีความแตกต่างกันอย่างมากอยู่ที่ c-terminal (ภาพที่ 13)

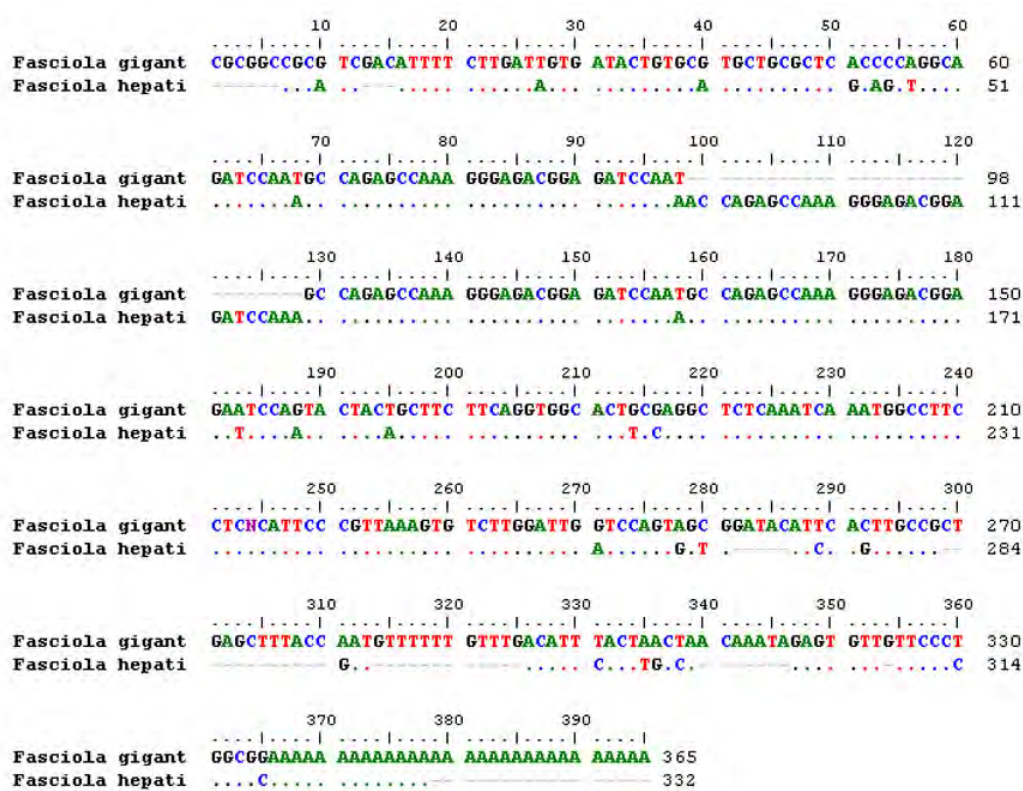
```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |CGGCGCCGCG TCGACATTTT CTGATTGTG ATACTGTGCG TGCTGCGCTC ACCCCAGGCA 60
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |70      80      90      100     110     120
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |GATCCAATGC CAGAGCCAAA GGGAGACGGA GATCCAATGC CAGAGCCAAA GGGAGACGGA 120
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |130     140     150     160     170     180
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |GATCCAATGC CAGAGCCAAA GGGAGACGGA GAATCCAGTA CTACTGCTTC TTCAGGTGGC 180
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |190     200     210     220     230     240
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |ACTGCGAGGC TCTCAATCA AATGGCCTTC CTCNCATTCC CGTTAAAGTG TCTTGATTG 240
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |250     260     270     280     290     300
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |GTCCAGTAGC GGATACATTC ACTTGCCGCT GAGCTTTACC AATGTTTTTT GTTTGACATT 300
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |310     320     330     340     350     360
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      |TACTAACTAA CAAATAGAGT GTTGTTCCT GGGGAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 360
  
```

ภาพที่ 10 ภาพแสดง nucleotide sequence ของ tegumental antigen ของ *F. gigantea* จาก cDNA clone Vg Fg 16



ภาพที่ 11 ภาพแสดง amino acid sequence ของ tegumental antigen ของ *F. gigantica* ที่แปลมาจาก nucleotide sequence ของ cDNA clone VgFg 16



ภาพที่ 12 ภาพเปรียบเทียบ nucleotide sequences alignment ของ tegumental antigen ระหว่าง *F. gigantica* และ *F. hepatica* แสดงตำแหน่งของ nucleotides ที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 13 ภาพเปรียบเทียบ amino acid sequence ระหว่าง tegumental antigen ของ *F. gigantica* และ *F. hepatica* แสดงตำแหน่งของ nucleotides ที่แตกต่างกัน

2.2 การ characterization ของ VgFg 29

จากการตรวจหาลำดับเบสของ cDNA clone VgFg 29 พบว่ามีจำนวน 693 เบส (ภาพที่ 14) เมื่อนำลำดับเบสดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Gen Bank โดยใช้ Blast search, (NCBI) พบว่าลำดับเบสนี้ไม่เหมือนกับยีนใด ๆ ในฐานข้อมูลเลย

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
VgFg 29  TTGGAATTATGCCGCTTACGCCAAGAAATATCATTGTCGGATTGCTCGTCTCGGCGGTCGCACAGTCGGTGTGTCGC
      90     100     110     120     130     140     150     160
VgFg 29  TAACGAGCCACGTGTCTCGGCGGGTTGTCTGGACATCAATGCCCTCTGTGAAAGGTGCACGATTCTCCGCTTTGTGACG
     170     180     190     200     210     220     230     240
VgFg 29  CATTGAGCATCCCTCTGATTACATTTGTGGACGTCCCTGGATTTTGTCCCGGTACCACTCAGGAATATGGCGGAATCATC
     250     260     270     280     290     300     310     320
VgFg 29  CGGCATGGTGCGAAGCTGATCTTTGCTTATGCAGAGGCCACCGTTCCAAAGTTGACTGTAGTCACCCGGAAGCATACGG
     330     340     350     360     370     380     390     400
VgFg 29  CGGTGCTTACTGTGTGATGAGTTCAAAACATCTACGGGTGACATAAATTATGCATGGCCGACAGCTGAGGTGCGTGTCA
     410     420     430     440     450     460     470     480
VgFg 29  TGGGAGCAAAAGGGTGCTGTCAAGATCATTTTCCGCGGCAAGACAAACAGGTTGAAAGCCGAAGATGATTACATCCGCGCA
     490     500     510     520     530     540     550     560
VgFg 29  TTTGCGAATCCGTTCCCGGCCGCAACTCGTGGATTTGTTGATGATGTCATCGACCCGCAAAATAACCCGAATGCGTTTATG
     570     580     590     600     610     620     630     640
VgFg 29  CCGCGATCTGGAATGCTCGAAACAGAGCTGCCTAATCCATGGAAAAAGCATACTAATATGTCCCTGTTAAACCCCTTT
     650     660     670     680     690
VgFg 29  TTTATTCTCTTTCATCAGCCTTGTCTTGCGGCACTTCTCAGTCTAATCTAAT

```

ภาพที่ 14 ลำดับเบสของ cDNA clone VgFg 29

จากลำดับเบสดังกล่าวในไปแปลงเป็น amino acid sequence โดย translated tool (<http://au.expasy.org>) ซึ่งสามารถแปลงเป็นลำดับ amino acid ได้ 209 amino acid (ภาพที่ 15) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Gen Bank โดยใช้ Blast search, (NCBI) พบว่าลำดับเบสนี้ไม่เหมือนกับโปรตีนใด ๆ ในฐานข้อมูลเลย

จากนั้นนำ translated amino acid sequence ไปเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อหา conserved domain พบว่ามีลักษณะคล้ายกับ conserved domain ของ Carboxyl transferase domain; Acetyl-CoA carboxylase, carboxyltransferase component (subunits alpha and beta) และ Acetyl-

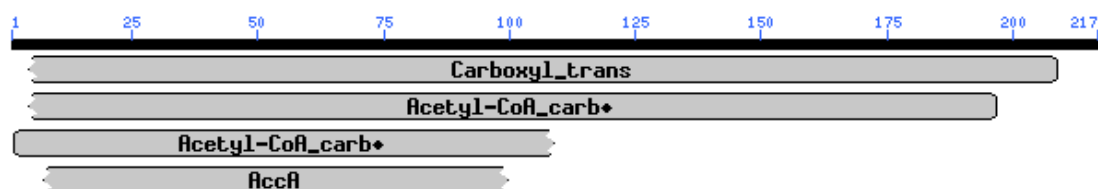
CoA carboxylase alpha subunit ซึ่งเป็น enzymes ที่อยู่ในกระบวนการ lipid metabolism ดังแสดงในภาพที่ 16

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
VgFg 29  FEIMPAYAKNIITVGFARLGGRTVGVVANQPRVSA6CLDINASVKGARFVRFCDAFSIPLITFVDVPGFLPGTSQYGGIIR
      90     100     110     120     130     140     150     160
VgFg 29  HGAKLIFAYA EATVPKLTVVTRKAYGGAYCVMSSKHLRGDIN YAWPTAEVAVMGA KGAVKIIFRGKDNQVEAEDDYTRAF
      170     180     190     200
VgFg 29  ANPFPAA TRGFVDDVIDPQITRMRLCRDLEMLETRSC LINGKSILICPC

```

ภาพที่ 15 ลำดับกรดอะมิโนของ cDNA clone VgFg 29



ภาพที่ 16 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบตำแหน่งของ amino acid sequences ของ VgFg 29 กับตำแหน่งของ conserved domains ต่าง ๆ ที่มีความคล้ายคลึงกัน

จากการนำลำดับ amino acid ที่ได้ไปเทียบกับ conserve domain ทั้ง 3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ Carboxyl transferase domain มากที่สุด และ Acetyl-CoA carboxylase alpha subunit น้อยที่สุด ดังนี้

2. 3 การ characterization ของ VgFg 28

จากการตรวจหาลำดับเบสจาก cDNA clone VgFg 28 ที่ทำการตรวจหาได้ พบว่ามีความยาว 560 เบส (ภาพที่ 17)

```

      10      20      30      40      50      60
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
GCGGCCGCGT CGACACTCAT CGATTTTTCG CAGAGCGTCG AGCTTTGCTT GAAACGTTAA 60

      70      80      90     100     110     120
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
ACCCCATGTC TCCTTTCGTG TTCAGCGAGC ATTGGTTTCA TCGTTTGGAA CCGGAATTGG 120

     130     140     150     160     170     180
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TGCTCGATTT ACTGAATACC AGAGGATATG ACGACACCTC GTTGATGGAT TTGCTTCGTG 180

     190     200     210     220     230     240
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
CGATTCTGTA TAAACACAAC CATTTTTGGC ACCTGCCGGA ACACGTCCGG TCATTGTTCT 240

     250     260     270     280     290     300
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
GCGGTTCCCA GGATGAAATG GCCGTCTACT GGACTACGCG ATTTCTTCA TTGGTCCCAT 300

     310     320     330     340     350     360
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TACTCTATAC CTTGNTGTCT GCATCATTTG TCCGGTTTTA GCGGTCTGTC AGAATTCTA 360

     370     380     390     400     410     420
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
CCAACTCTTC GGTCAAAGAA ATCCCAAACT ACATTGCTC GGCTGTCTGA AAATTCGCGA 420

     430     440     450     460     470     480
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
ACTGCTTGGT TCTCTACAGT ACGGAAACCC AAAATCAGCC TCCTGCAACA GTGAGTCGTA 480

     490     500     510     520     530     540
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TTCAACGATT ATTTCCGCTC GTGCTGAGGC CCTTAAACCT TGGAAACGAG GCGAAGTGGT 540

     550     560
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
CGCATCCAGC GCAACGATCA 560

```

ภาพที่ 17 แสดง nucleotides sequence ของ cDNA clone VgFg 28

จากการนำ nucleotide sequence ที่ได้ ไปเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ Gen Bank โดยใช้ Blast search, (NCBI) เพื่อเปรียบเทียบกับยีนที่ถูกลค้นพบแล้ว พบว่า nucleotide sequence ที่สังเคราะห์ได้ไม่ตรงกับ nucleotide sequence ในฐานข้อมูลดังกล่าว และเมื่อนำ nucleotide sequence ที่ได้ ไปแปลงเป็น amino acid sequence โดย ExPASy program (<http://au.expasy.org>) พบว่าสามารถแปลงเป็น amino acid sequence ได้ทั้งสิ้น 153 amino acid (ภาพที่ 18)

จากการเปรียบเทียบ amino acid sequence กับโปรตีนอื่น ๆ โดยใช้ BLAST search, (NCBI) พบว่า ไม่มีลักษณะคล้ายกับ amino acid sequence ของโปรตีนใด ๆ ในฐานข้อมูลดังกล่าว แต่เมื่อนำ amino acid sequence นี้ ไปตรวจสอบหา conserve domain ของโปรตีน พบว่าส่วนหนึ่ง amino acid sequence มีความคล้ายคลึงกับ คือ Ribonuc_2-5A conserved domain ซึ่ง conserved domain นี้มีความยาว 207 amino acid โดยบริเวณที่ conserved คือ ตำแหน่งที่ 59-78 ซึ่งมี sequence ดังนี้ DLLRAIRNKKHH (ภาพที่ 19) และเมื่อตรวจสอบในฐานข้อมูลเพิ่มเติมพบว่า conserve domain นี้สามารถพบในโปรตีนจำนวนมาก ซึ่งสามารถจัดเป็นกลุ่มได้ดังนี้ คือ

1. โปรตีนในกลุ่ม endoribonuclease/protein kinase (IRE1) ซึ่งพบใน *Caenorhabditis elegans*, *Cryptococcus neoformans*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mus musculus*, *Candida albicans*, *Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Hypocrea jecorina* และ *Rattus norvegicus*
2. โปรตีนในกลุ่ม endoribonuclease/protein kinase (IRE2) ซึ่งพบใน *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Pan troglodytes* และ *Homo sapiens*
3. โปรตีนในกลุ่ม protein kinase ซึ่งพบใน *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum* และ *Entamoeba histolytica*
4. โปรตีนที่ 2-5A-dependent ribonuclease (Ribonuclease L) (RNase L) ซึ่งพบใน *Gallus gallus*
5. โปรตีน exonuclease ซึ่งพบใน *Saccharomyces cerevisiae*
6. โปรตีน aminopeptidase ซึ่งพบใน *Bacillus halodurans*
7. โปรตีนในกลุ่ม hypothetical protein ซึ่งพบใน *Aspergillus nidulans*, *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis briggsae*, *Cryptococcus neoformans*, *Gibberella zeae*,

Magnaporthe grisea, *Polaromonas* sp., *Schizosaccharomyces pombe*, *Ustilago maydis*,
Gallus gallus และ *Neurospora crassa*

		10	20	30	40	50	60	70	80						
consensus	1	KRLSFLRDVSDRVEIEKRKSES	PLLR	LA	EAGS	-RVVV	SDDW	TEKLDKT	LMDDL	GKYRK	YKGD	SVR	-DLLRAIRNKKHHY	77	
query	1	-----rgrvdthrrfaerr	ALL	ET	LNPHA	-PFVFS	SEHW	FHRLE	PELV	LDLL	NTRG	YDDT	SLMet	DLLRAIRNKKHHF	71
gi 3766209	773	KELQFFQDVSDWLE	--KEPDQG	PLVSA	leags	-ykvv	REDW	HKHIS	APLQ	ADLK	RFRS	YKGT	SVR	--DLLRAMRNKKHHY	847
gi 3300094	837	KQLQFFQDVSDRIE	--KESLDG	PIVKQ	lergg	-ravv	KMDW	RENIT	DPLQ	TDLR	KFRTY	YKGS	SVR	--DLLRAMRNKKHHY	911
gi 1353135	799	KRLAYFSDVSDRVE	--KEEDNS	PVRR	ietda	-rivv	CGGW	REKIC	DALK	EDLR	KFRTY	YKFS	SVR	--DLLRAMRNKKHHY	873
gi 10726634	781	KMLSFLQDVSDRVE	--KLQFHA	EPLKS	lekng	-rivv	LDDW	NVHLD	PMIT	DDL	RKYR	GYMG	ASVR	--DLLRALRNKKHHY	855
gi 729857	985	KKLEFLLKVSDRLEIENRDPPS	ALL	LMK	fdagsdfvip	SGDW	TVKFD	KT	FMDN	LE	RYRK	YHSS	KLM	--DLLRALRNKKHHY	1062
gi 4164398	943	KKLDFLIDVSDRFEVEERDPPS	PLL	QM	lenns	-ksvi	GENW	TTCL	HSS	LDNL	GKYR	YDGS	KIL	--DILRVLRNKKHHY	1019
gi 13194578	709	MRLSFLRDASDRVELENREADS	EIL	KA	mesta	-pvaig	GKWK	DEKLE	PFV	ITNI	GRYR	RYKY	DSIR	--DLLRVIRNKLNH	785
gi 16506693	749	MRLSFLRDASDRVELENREEGS	QLLA	A	lesta	-avtln	GRW	DEKLD	SIF	LDNIG	RYR	YKFS	DSIR	--DLLRVIRNKLNH	825
		90	100	110	120	130									
consensus	78	RELPEEVRELL	LGDL	PDGFSR	--YFTSR	FPDLL	IHVY	RAL	-EHCS	YEEHF	KKY	SP	129		
query	72	WHLPEHVRS	LF	GGSQ	DEMET	avYWT	TRFP	SLVP	LLYT	LC	-RH	lsgfsgl	seflp	125	
gi 3766209	848	RELPAEVRQT	LGQL	PAGFIQ	--YFTQ	RFPRL	LLH	THRAM	-RTC	ASES	FLP	YPp	899		
gi 3300094	912	RELPAEVRQT	LGTL	PDDFVC	--YFTSR	FPHLL	AHTY	RAM	-ELC	SHER	LFP	YYfH	963		
gi 1353135	874	RELPEVRS	LGDI	PDQFLH	--YFTSR	FPRLL	LHVY	KAT	-EYCS	GEAV	F	KRY	Ysd	925	
gi 10726634	856	HELTPAAQKML	GCIP	HEFTN	--YwV	DRFP	QLI	SHAYHAF	-SICS	NEPI	F	KPY	Ysa	907	
gi 729857	1063	MDLPEDIAEL	MGPV	PDGFYD	--YFTK	RFPN	LLIG	VYMI	VkEN	LSD	QIL	REF	LyS	1115	
gi 4164398	1020	QDLPESVRRVL	GDLP	DGFTS	--YFVE	KFPML	LLHCY	HLV	kDVL	YEE	SQ	F	KRYLeY	1072	
gi 13194578	786	RELPEIQEL	VGT	VEGFDE	--YFAV	RFPK	LLI	EYVR	VI	sLH	CR	EEV	F	KRYFkC	838
gi 16506693	826	RELPEIQEL	LGSV	VEGFER	--YFSS	RFPK	LLI	QYV	TVL	fDY	CN	EEV	F	FFKYSkT	878

ภาพที่ 19 ตารางการเปรียบเทียบ conserve regions ของ Ribonuclease 2-5A และ genes ในกลุ่มเดียวกัน แสดง conserve region (ตัวอักษรสีแดง) และ similar regions (ตัวอักษรสีน้ำเงิน) {gi:3766209, IRE1 [*Mus musculus*]; gi:3300094, protein kinase/endoribonulcease [*Homo sapiens*]; gi:1353135, Putative serine/threonine-protein kinase C41C4.4 precursor.; gi:10726634, CG4583-PA [*Drosophila melanogaster*]; gi:729857, Serine/threonine protein kinase/endoribonuclease IRE1 precursor (Endoplasmic reticulum-to-nucleus signaling 1) [Includes: Serine/threonine protein kinase ; Endoribonuclease]; gi:4164398, SPAC167.01 [*Schizosaccharomyces pombe*]; gi:13194578, endoribonuclease/protein kinase IRE1-like protein [*Arabidopsis thaliana*]; gi:16506693, endoribonuclease/protein kinase Ire1p-like protein [*Arabidopsis thaliana*].

2.4 การ characterization ของ VgFg 37

ลำดับเบสที่ทำการตรวจหาได้ชัดเจนมีจำนวน 493 เบส (ภาพที่ 20)

```

      10      20      30      40      50      60
VgFg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          TTACGCCAAG CTCGAAATTA ACCCTCACTA AAGGGAAACA AAGCTGGAGC TCCACCGCGG 60

      70      80      90     100     110     120
VgFg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          TGGCGGCCGC TCTAGAACTA GTGGATCCCC CGGGCTGCAG GTCGAGAATG ATATCAAAGA 120

     130     140     150     160     170     180
VgFg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          AATAATGAAG GTGATGCTAG CTGCATTAC AACAGATCAA ACTGCAAAAT TGGAGATAAC 180

     190     200     210     220     230     240
VgFg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          CAAGATCCAG TCGACGTTTC ATTGTGTGG AGCTATTAAT TACGAAGACT GGAATAGTAC 240

     250     260     270     280     290     300
VgFg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          CACTTATTTT GAAGAAAATC ATGATTATCC CCCATCTTGT TGTGAGCCGA AAAACGTCAC 300

     310     320     330     340     350     360
VgFg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          GCATTGAGTC CACACGAAAC ACACATATTC GAACGCAACC GATGCATGCA ACCCGTATAA 360

     370     380     390     400     410     420
VgFg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          AAATGGTTGT CTGTGAGCTT TGAGCGAACA GTTCCATCAG AAATTAACTC TGACCAGTGC 420

     430     440     450     460     470     480
VgFg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          TGTGGGTTTG ATTTTGTCC TGCTCCAAGT TCTGAGTTTG CATGGATCTT GTATACTGAT 480

     490     500     510     520     530     540
VgFg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          ATGTGATTCT CAGCCTTCAC GACCGCCCGT AGGAGTCGAC GAACCAATCT AAACAGTTAA 540

     550     560     570     580
VgFg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          TCTTCGTCT CTCCTTTCT CACTCAACAA TCCACCTTCG TCC 583
  
```

ภาพที่ 20 แสดง nucleotides sequence ของ cDNA clone VgFg 37 (ภาพที่ 21)

จากลำดับเบสดังกล่าวสามารถแปลเป็นลำดับ amino acid ได้ 114 amino acid คือ

```

      10      20      30      40      50      60
vgfg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          ENDIKEIMet KVMetLAAFT TDQTANLEIT KIQSTFHCCG AINYEDWNST TYFEENHDYP 60

      70      80      90     100     110     120
vgfg 37  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          PSCCQPKNVT HSVHTKHTYS NATDACNPYK NGCLSALSEQ FHQKLTLSA VGLIFVLLQV 120

     130     140
vgfg 37  ....|....| ....|....| ....|....|
          LSLHGSCILI CHSQPSRPPV GVDEPI 146
  
```

ภาพที่ 21 แสดง amino acid sequence ของ cDNA clone VgFg 37

จากการนำ translated amino acid sequence ไปเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อหา conserved domain พบว่ามีลักษณะคล้ายกับ conserved domain ของ tetraspannin ซึ่งมีความยาว 207 amino acid โดยบริเวณที่ conserved คือตำแหน่งที่ 133-142 ของ tetraspannin (ภาพที่ 22) ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับ conserve regions ของ genes อื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (ภาพที่ 23)

VgFg 37:	1	END	I	K	E	I	M	E	T	K	V	M	E	T	L	A	A	F	T	T	D	Q	T	A	N	L	E	-	I	T	K	I	Q	S	T	F	H	C	C	G	A	I	N	Y	E	D	W	N	S	T	T	Y	F	E	E	N	H	D	Y		59		
Tetra :	101	R	D	K	L	E	S	S	L	G	E	T	L	K	E	A	I	K	K	Y	D	T	D	D	Y	S	K	E	A	W	D	P	L	Q	S	Q	F	K	C	C	G	V	N	G	Y	T	D	W	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	149			
VgFg 37:	60	P	P	S	C	C	Q	P	K	N	V	T	H	S	V	H	T	K	H	T	Y	S	N	A	T	D	A	C	N	P	Y	K	N	G	C	L	S	A	L	S	E	Q	F	H	Q	K	L	T	L	T	S	A	V	G	L	I	F	V	L	L	Q		119
Tetra :	150	C	S	P	I	Q	S	Q	L	T	C	C	P	A	S	S	S	C	P	Q	D	A	P	L	-	-	N	I	Y	T	R	G	C	K	E	K	L	L	E	W	L	R	S	N	L	L	I	A	G	V	G	I	A	V	I	Q		207					

ภาพที่ 22 ตารางการเปรียบเทียบ amino acid sequence ของ VgFg 37 และ tetraspannin (Tetra) แสดง conserve region (ตัวอักษรสีแดง) และ similar regions (ตัวอักษรสีน้ำเงิน)

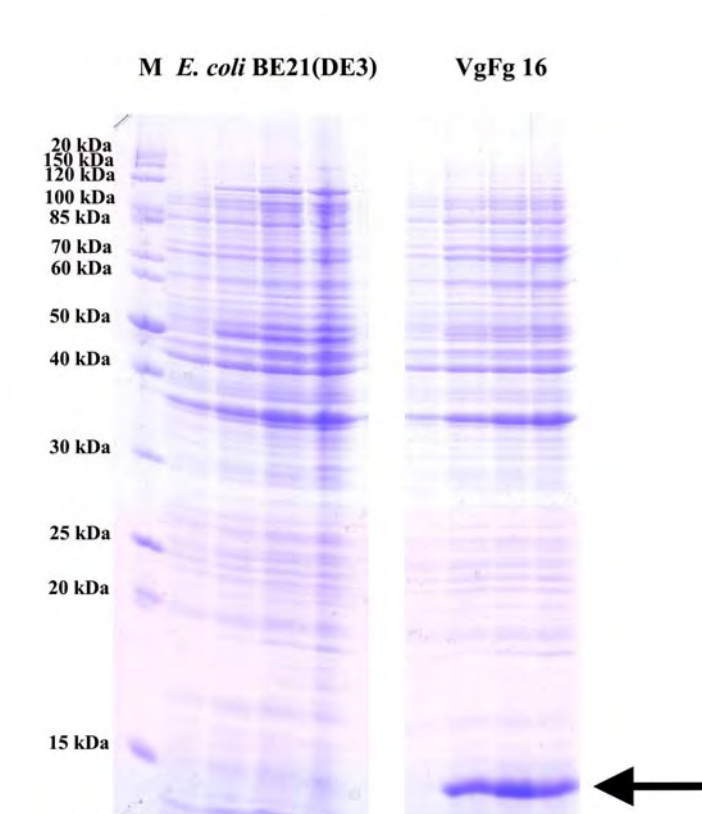
		10	20	30	40	50	60	70	80																				
consensus	1	CLKYL	LFLN	LFWL	LGILL	LGVGI	WLL	IDLGS	FSELL	-----LSSCFYAVPVYILVAGVIFLVGF	62																		
query																													
gi 5824777	7	LARIFL	FFLN	AQTL	VGFT	VIAL	TLWIR	FDKGF	ESEIR	tnilr	dndpe	lagvksd	IRTGI	ISF	WIIIG	FAIAN	VIIG	86											
gi 20141237	15	CLKYLL	FTYN	CCFW	LAGL	AMAV	GIWTL	LALKS	SDYISLL	-----	ASGTY	LATAY	ILVV	AGT	IVVM	VMTGV		76											
gi 2501225	10	CLKSCV	FVLN	IICLL	CSLV	LIGAG	AYVE	VKFS	QYGD	N-----	LHKV	WQAAP	IAIIV	VGVI	ILIV	SF		70											
gi 3876600	7	ALRIVT	FLFN	FAFW	LSGV	VVFL	GLIWL	FDPA	ASDFF	AIh-----	stHPG	AFRYV	GVFL	VAGAG	IIIL	VG		72											
gi 7291663	9	CFKYLV	YSYV	VLALT	GAAQ	IFLGT	SLLW	GHSV	YYGI	-----	VQNK	LWAPA	AILLL	CLGP	VTFIL	CW		69											
gi 3334313	15	KLAQTL	LWLL	SWLS	SVLV	VGCL	TFGM	GIFL	KVQL	WIHNE	V-----	ENTSA	HAVPN	TVIT	AGLV	GILL	GI	76											
gi 3334312	15	KLAQIL	WILN	WVSV	VS	GILF	SLLG	LFKIE	IKKR	NEVM-----	AKGD	INSVP	NMLIS	VGVI	ACVNF			76											
gi 132211	14	KLAQGL	WLMN	WFSV	LAGI	IIIF	LGLF	LKIEL	RKRSD	VM-----	NNSE	HFPNS	LIGV	GVLS	CVFNS			75											
		90	100	110	120	130	140	150	160																				
consensus	63	LGC	-----	CGAI	KESR	CLLG	TYFF	LLLL	FILE	LAA	GI-LAFV	FRD	-KLESS	L-GET	LKEA	IKKY	YD	DDYS	126										
query	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	EN	-DIKE	IM	ETKV	METL	AAFT	DQTAN	26									
gi 5824777	87	VG	V-----	IGAV	IRSK	YLLA	PYFL	FMVL	FLLE	IAIG	I-TVLV	KRR	-----	SV	-RRTV	KEYV	FDS	FNMA	-----	144									
gi 20141237	77	LGC	-----	CATF	KERN	LLRL	YFILL	LIIF	LEII	AGI-LAY	AYYQ	-QLN	TEL	-KEN	LKDT	TRRY	YHQ	SGHE	a-v	142									
gi 2501225	71	LGC	-----	CGAI	KENV	CLMY	MYAFF	LIILL	IAEL	AAAI-VAVV	YKD	-RID	SEI	-DAL	MTGA	LDPK	TPET	-----		131									
gi 3876600	73	FGC	-----	IGAW	KMNQ	CALAF	CCIL	ILAF	FELE	AAAV-TL	FHKQE	-HIKH	YV	ESSM	YDTI	RNR	YSSET	AF	-----	136									
gi 7291663	70	MGC	-----	QATN	QRKR	CLLGM	FAALL	VACI	CVQFI	ICGw	SLAMRE	lpTS	VEI	FIDDS	FVEF	LDKF	SRTK	VDN	-----	137									
gi 3334313	77	YAGk	vsqas	mdV	TKYQ	RWKS	FMMP	FFFL	AILS	CLVCL	AALV-LS	VALRG	-TLEE	SL	-KIGL	KNAI	RFYK	DTDP	Gr	cryq	152								
gi 3334312	77	LGK	icydc	sd	ANKF	SRW	KLIM	LPYI	ICTF	CF	TC	ICLL	GAL-MC	YTM	RN	-ELEES	L-YLGL	RDAI	KFYK	DTDP	Gr	crl	152						
gi 132211	76	LAGk	icydal	d	PAKY	AKW	KPW	LKPY	LAVC	VL	FN	VLFL	VAL-CC	LLRG	-SLEST	L-AHGL	KNGM	KFYR	DTDP	Gr	crl	151							
		170	180	190	200	210	220	230	240																				
consensus	127	KEAWD	PLQS	QFK	CCGV	NGY	TDW	-----	-----	-----	-----	-----	N	-----	CS	-----					151								
query	27	LE	-ITK	IQST	FHCC	GA	IN	YEDW	-----	-----	-----	-----	Nstty	feen	hdy	PP	-----				61								
gi 5824777	145	QADIS	AFN	FRY	NCC	GA	EN	-----	Lpnl	nc	-----	-----	-----	-----	-----	-----					168								
gi 20141237	143	TSADV	QLQ	QEF	HCCG	SNN	SQD	Wr	ds	ewi	-----	-----	-----	-----	-----	-----					170								
gi 2501225	132	TEFMD	LQSS	FHCC	GA	KGP	QDY	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----					153								
gi 3876600	137	KDAFD	TVQ	EKFE	CCG	VKT	YTD	Wls	ar	wd	ae	pstq	-----	lev	need	ag	rieh	-----	GI	ga	189								
gi 7291663	138	LHLWN	RMQ	SQ	LQCC	G	VDG	p	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----					157								
gi 3334313	153	KRSMD	KLQ	MD	FQCC	GNNH	PKD	W	fev	qwis	nryl	df	fs	kev	kdriks	nvdg	ryl	md	sv	pf	sccN	-----	PS	sp	219				
gi 3334312	153	KKTVD	MLQ	IG	FQCC	GNNG	FRD	W	fev	qwis	saryl	n	mas	kev	mdrf	ksnvdg	kfl	vdg	vp	pf	sccN	-----	PS	sp	219				
gi 132211	152	KKTID	MLQ	IE	FKCC	GNNG	FRD	W	feiq	wis	nryl	df	fs	kev	kdriks	nvdg	ryl	vdg	vp	pf	sccN	-----	PN	sp	218				
		250	260	270	280	290	300	310																					
consensus	152	-----	-----	PCIQ	SQ	LTC	CPAS	SSS	CPQ	DAPL	-NIY	TR	-----	GCKE	KLLE	WLRS	NLLI	AGV	GIG	IAV	IQ	207							
query	62	-----	-----	SCQP	KNV	THSV	HTKH	TYN	ATD	ac	NPY	KN	-----	GCLS	ALSE	QFH	QKLT	TS	AVG	LIF	VLLQ	119							
gi 5824777	169	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	fagqp	TCSS	AVW	drld	FTMM	IFG	ICML	IIV	VLO	201						
gi 20141237	171	-----	-----	rsq	eag	GRV	VPD	SCCK	TV	VAL	CG	QR	DHAS	-----	NIYK	Ve	-----	gGC	ITK	LET	fiq	EHL	RVI	GA	VGI	ACVQ	234		
gi 2501225	154	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	198			
gi 3876600	190	-----	-----	gnkgt	gygr	vpss	CCNE	HG	KL	SY	PN	NC	GR	SFS	QA	PL	-----	NTYA	Qf	intr	GCAD	AVYE	svs	SSL	SL	IVG	CV	VLLCIVQ	263
gi 7291663	158	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	214			
gi 3334313	220	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	273			
gi 3334312	220	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	273			
gi 132211	219	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	272			

ภาพที่ 23 ตารางการเปรียบเทียบ conserve regions ของ tetraspannin และ genes ในกลุ่มเดียวกัน

แสดง conserve region (ตัวอักษรสีแดง) และ similar regions (ตัวอักษรสีน้ำเงิน) {gi:5824777 Hypothetical protein Y39E4B.4 [Caenorhabditis elegans]; gi:20141237, Platelet-endothelial tetraspan antigen 3 (PETA-3) (GP27) (Membrane glycoprotein SFA-1); gi:2501225, 23 kDa integral membrane protein (Sh23; gi:3876600, Hypothetical protein F33C8.3 [Caenorhabditis elegans]; gi:7291663, CG11303-PA [Drosophila melanogaster]; gi:3334313, RDS/peripherin-like protein XRDS35; gi:3334312, Photoreceptor outer segment membrane glycoprotein 2 (CRDS2); gi:132211, Peripherin (Retinal degeneration slow protein)}

3. การ expression และ purification ของ tegumental antigen (VgFg 16)

จากการตัดต่อ CDNA Clone VgFg 16 เข้าสู่ PET 30 c expression vector ซึ่งสามารถ translated เป็น amino acid ได้ 134 amino acid (ภาพที่ 24) และคำนวณ Molecular weight ได้ 17 kDa แล้วนำไป transformed เข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE₃) (BL21-pET30-VgFg16) และเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 จากนั้น กระตุ้นด้วย IPTG และทำการเก็บเซลล์ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำการแยก โปรตีนด้วย 12.5% SDS polyacrylamide gel electrophoresis และทำการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุล กับ standard molecular weight marker และเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE₃) ที่ไม่มีการ transformed vector ใดใด โดยใช้โปรแกรม GeneTools พบว่า มีแถบโปรตีนที่ 15 kDa ซึ่งเป็นน้ำหนัก โมเลกุลที่ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของ recombinant VgFg 16 ที่คำนวณได้จากระดับ amino acid ปรากฏขึ้นอย่างเป็นได้ชัด และมีความเข้มของแถบโปรตีนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในโปรตีนที่ สกัดจาก BL21-pET30-VgFg16 ที่เวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ในขณะที่โปรตีนที่สกัดจาก BL21-pET30-VgFg16 ที่เวลา 0 ชั่วโมงและ โปรตีนที่สกัดเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL₂₁ (DE₃) ไม่พบแถบ โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลดังกล่าว (ภาพที่ 25)

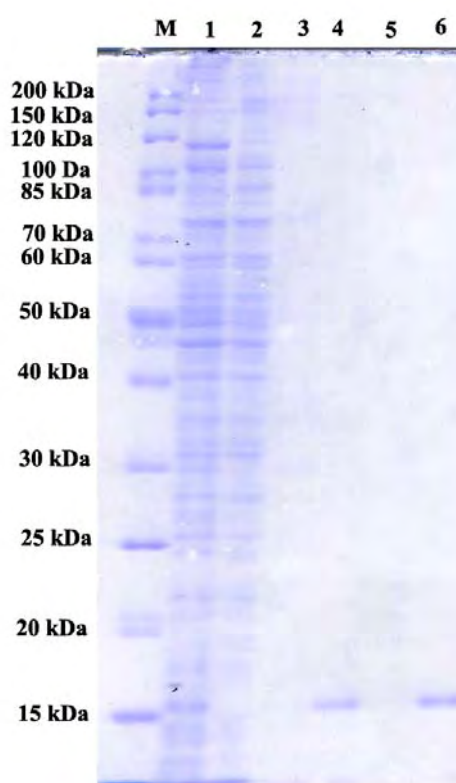


ภาพที่ 25 (A) ภาพถ่าย 12.5% SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue แสดงแถบโปรตีนที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่เพาะเลี้ยงใน LB broth ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วย IPTG; M = standard molecular weight marker

(B) ภาพถ่าย 12.5% SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue แสดงแถบโปรตีนที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BE21(DE3) ที่มีการการ transformed pET30-VgFg16 ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วย IPTG ซึ่งแถบโปรตีนที่ 15 kDa (ลูกศร) ปรากฏขึ้นเฉพาะที่เวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมงเท่านั้น

การทำบริสุทธิ์ Recombinant VgFg 16 protein

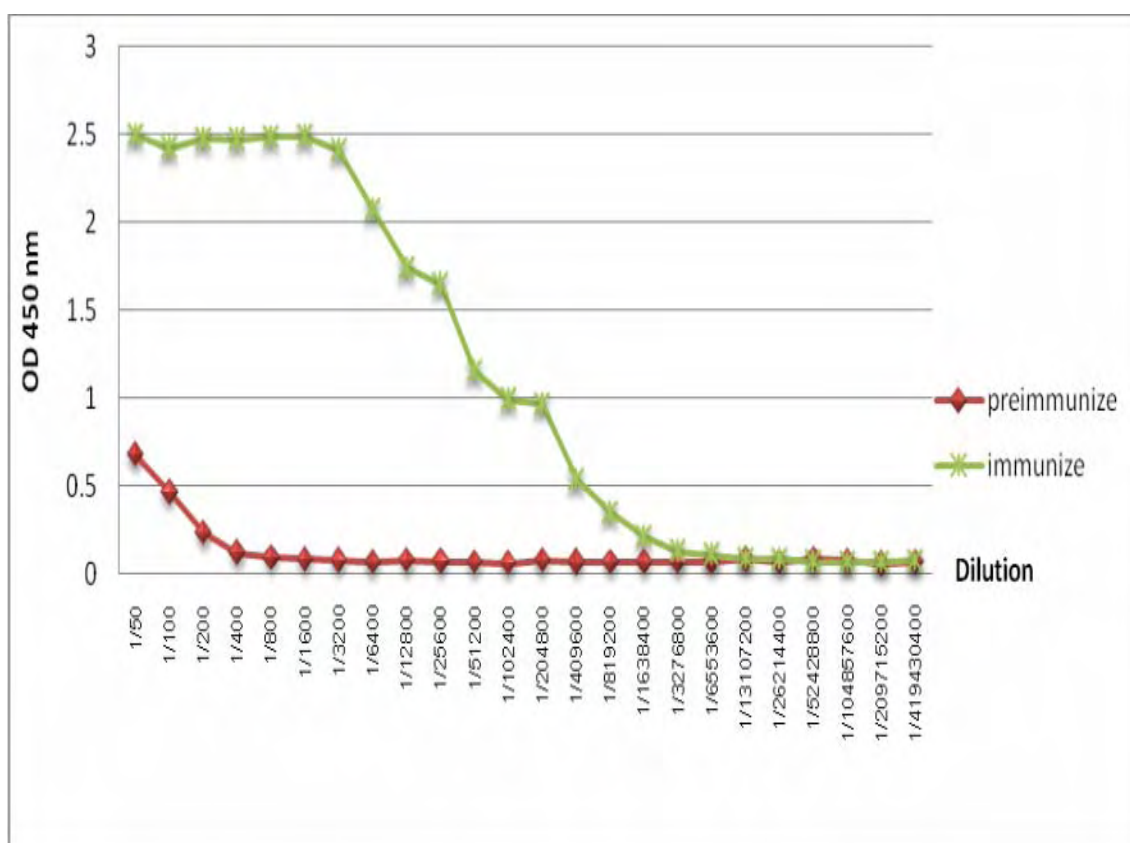
จากการนำ pET30-VgFg16 มาเพาะเลี้ยงใน LB broth และกระตุ้น ด้วย IPTG แล้วทำการเก็บเซลล์มาสกัด inclusion protein ด้วย 8M urea จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Protino[®] Ni-IDA column แล้วแยกโปรตีนด้วย denature elution buffer จากนั้นนำไปแยกแแถบโปรตีนด้วย 12.5% SDS polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมด้วยสี coomassie blue พบว่า มีแแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 15 kDa เพียงแแถบเดียวที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ได้จาก Protino[®] Ni-IDA column นอกจากนี้แแถบโปรตีนดังกล่าวยังสามารถพบได้ใน (ภาพที่ 26) โปรตีนที่ยังไม่ผ่าน Protino[®] Ni-IDA column และในสารละลายที่ใช้ในการล้าง Protino[®] Ni-IDA column แต่ไม่พบแแถบโปรตีนดังกล่าวใน โปรตีนที่ผ่าน Protino[®] Ni-IDA column



ภาพที่ 26 ภาพถ่าย 12.5% SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue แสดงแแถบโปรตีนที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย BL21-pET30-VgFg16 และนำไปทำบริสุทธิ์ด้วย Protino[®] Ni-IDA column; M = standard molecular weight marker, 1=, 2=, 3=, 4=, 5=, 6=

การผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ Recombinant VgFg 16 protein

จากการนำ rVgFg 16 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว (Wista rat) และฉีดกระตุ้นอีก 2 ครั้งในวันที่ 14 และ 28 หลังการฉีดกระตุ้นครั้งแรก แล้วทำการเก็บเลือดจากหางหนูในวันที่ 7 หลังการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย จากนั้นนำไปแยกเม็ดเลือดแล้วเก็บ serum มาตรวจหาค่า titer ของ polyclonal antibody ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ rVgFg16 เคลือบ plate พบว่าค่า ELISA titer ของ immunized rat serum มีค่าสูงกว่า ค่าของ preimmunized rat sera โดยที่ immunized rat serum มีค่า OD₄₅₀ อยู่ระหว่าง 2.491-0.062 ทั้งนี้ที่ความเข้มข้น 1:3276800 เริ่มมีความแตกต่างกับ preimmunized rat serum และที่ความเข้มข้นที่ 1:3200 ถึง 1:50 มีค่าสูงคงที่ ในขณะที่ค่า OD₄₅₀ preimmunize rat serum มีค่าอยู่ระหว่าง 0.676-0.062 โดยที่ค่า OD₄₅₀ เริ่มเพิ่มสูงขึ้นที่ความเข้มข้น 1:400 และเมื่อนำค่าดังกล่าวไปหาค่า titer ของ antibody ค่าประมาณ 1:25600 (ภาพที่ 27, ตารางที่ 4)



ภาพที่ 27 กราฟเส้นแสดงค่า OD₄₅₀ ของ serum ของหนูทั้งก่อน (preimmunized) และหลังการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunized) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

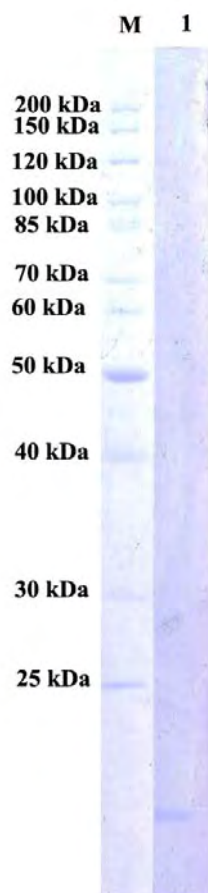
Dilution	OD	
	preimmunize	immunize
1/50	0.676	2.491
1/100	0.461	2.419
1/200	0.229	2.471
1/400	0.117	2.467
1/800	0.09	2.482
1/1600	0.08	2.487
1/3200	0.076	2.406
1/6400	0.064	2.069
1/12800	0.072	1.735
1/25600	0.068	1.646
1/51200	0.063	1.149
1/102400	0.059	0.986
1/204800	0.072	0.962
1/409600	0.066	0.533
1/819200	0.064	0.346
1/1638400	0.061	0.21
1/3276800	0.062	0.126
1/6553600	0.065	0.108
1/13107200	0.08	0.081
1/26214400	0.062	0.079
1/52428800	0.08	0.068
1/104857600	0.071	0.063
1/209715200	0.057	0.062
1/419430400	0.062	0.069

ตารางที่ 4 แสดงค่า OD₄₅₀ ของ titration ELISA ของ serum ที่ได้มาจากการ นำ rVgFg 26 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว

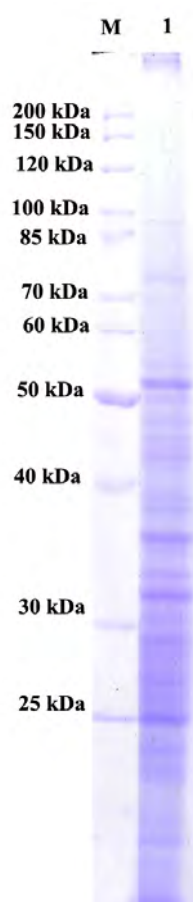
การทดสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ที่ต้านต่อ Recombinant VgFg 16 protein

จากการนำ rVgFg 16 ที่ทำบริสุทธิ์แล้วมาแยกแแถบโปรตีนด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้วนำไปย้ายโปรตีนลงบน nitrocellulose membrane จากนั้นนำไปทำ immunostaining โดยใช้ immunized rat serum เป็น primary antibody และใช้ preimmunized rat serum เป็น negative control ของการ ทดลอง จากนั้นใช้ HRP-conjugated goat anti rat IgG เป็น secondary antibody แล้วพบว่าเมื่อใช้ immunized rat serum เป็น probe พบแแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกจำนวน 2 แแถบ คือ 32 และ 15 kDa (ภาพที่ 31) จากจำนวนแแถบโปรตีนที่พบใน rVgFg 16 ที่มีแแถบโมเลกุล 1 แแถบ คือ 15 kDa (ภาพที่ 28) โดยที่แแถบที่ 15 kDa มีความเข้มสูงกว่า ในขณะที่ใช้ preimmunized rat serum เป็น probe ไม่พบแแถบโปรตีนที่ให้ผลบวก (ภาพที่ 31)

เมื่อนำ WB-extract protein และ Tegumental extracted proteins ของพยาธิ *F. gigantica* แยกแแถบโปรตีนด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้วนำไปย้ายโปรตีนลงบน nitrocellulose membrane จากนั้นนำไปทำ immunostaining โดยใช้ immunized rat serum เป็น primary antibody และใช้ preimmunized rat serum เป็น negative control ของการ ทดลอง จากนั้นใช้ HRP-conjugated goat anti rat IgG เป็น secondary antibody แล้วพบว่าเมื่อใช้ immunized rat serum เป็น probe พบว่าใน WB-extracted proteins ให้ผลบวกจำนวน 10 แแถบ คือ 70, 59, 58, 54, 52, 49, 43, 38, 22, 17 และ 15 kDa (ภาพที่ 32) จากจำนวนแแถบโปรตีนที่พบทั้งหมด 17 แแถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 74, 54, 52, 47, 45, 43, 38, 37, 33, 29, 27, 25, 22, 17, 15, 12 และ 7 kDa (ภาพที่ 29) และใน Tegumental extracted proteins พบว่า ให้ผลบวกจำนวน 4 แแถบ คือ 68, 59, 49 และ 15 kDa (ภาพที่ 33) จากจำนวนแแถบโปรตีนทั้งหมด 7 แแถบ คือ 53, 33, 30, 28, 22, 16 และ 15 kDa (ภาพที่ 30) ในขณะที่ใช้ preimmunized rat serum เป็น probe ไม่พบแแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกจากทั้ง WB-extracted proteins และ Tegumental extracted proteins (ภาพที่ 32, 33)



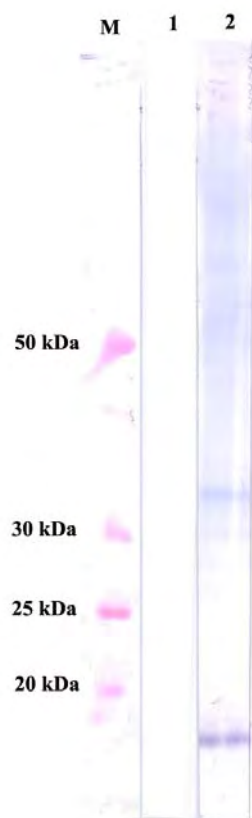
ภาพที่ 28 ภาพถ่ายของ 12.5% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie blue แสดงแถบโปรตีนใน purified rVgFg 16 (1) ของ *F. gigantea* เทียบกับ molecular weight marker (M)



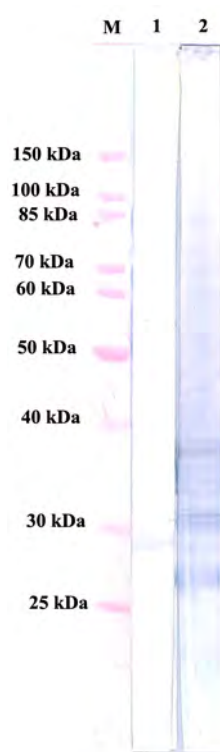
ภาพที่ 29 ภาพถ่ายของ 12.5% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie blue แสดงแถบโปรตีนใน WB-extract protein (1) ของพยาธิ *F. gigantica* เทียบกับ molecular weight marker (M)



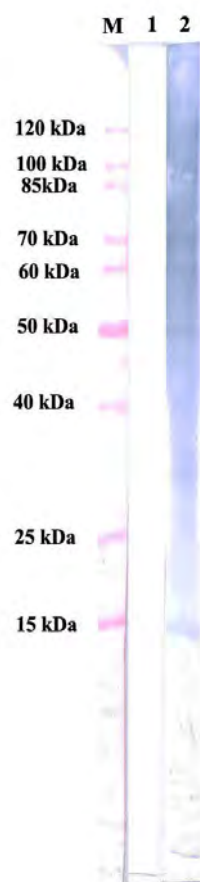
ภาพที่ 30 ภาพถ่ายของ 12.5% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie blue แสดงแถบโปรตีนใน Tegumental extracted proteins (1) ของพยาธิ *F. gigantea* เทียบกับ molecular weight marker (M)



ภาพที่ 31 ภาพถ่ายแสดงแถบโปรตีนใน rVgFg 16 ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้วเชื่อมด้วยวิธี western immunoblotting โดยใช้ preimmunized rat serum (1) และ immunized rat serum (2) เป็น primary antibody; M= molecular weight marker



ภาพที่ 32 ภาพถ่ายแสดงแถบโปรตีนใน WB-extract protein ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยวิธี western immunoblotting โดยใช้ preimmunized rat serum (1) และ immunized rat serum (2) เทียบกับ molecular weight marker (M)



ภาพที่ 33 ภาพถ่ายแสดงแถบโปรตีนใน Tegumental extracted proteins ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยวิธี western immunoblotting โดยใช้ preimmunized rat serum (1) และ immunized rat serum (2) จากการนำ rVgFg 16 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว เป็น probes; M= molecular weight marker

การตรวจหาบริเวณที่พบ rVgFg 16 protein ในพยาธิ *F. gigantica* ด้วยวิธี immunoperoxidase staining

จากการนำ rVgFg 16 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวเก็บ preimmunized rat sera และ immunize rat serum เพื่อนำมาใช้เป็น primary antibody ซึ่งจำเพาะต่อ rVgFg 16 protein ของ พยาธิตัวเต็มวัย *F. gigantica* ด้วยวิธี immunoperoxidase โดยการนำ preimmunized rat sera และ immunize rat serum ของหนูขาวมาใช้ในการทดสอบ โดยมีการติดฉลาก secondary antibody ด้วย HRP-conjugated goat anti rat IgG โดยศึกษาตำแหน่งที่พบ rVgFg 16 protein (ภาพที่ 34) ในเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยพบว่า เซลล์หรืออวัยวะที่ให้ตะกอนของ aminoethyl carbazole substrate (AEC substrate kit, Zymed) ซึ่งเป็นผลบวกของปฏิกิริยาเข้มที่สุด คือ บริเวณเนื้อเยื่อปกคลุมร่างกายซึ่งทำหน้าที่ปกคลุมผิวด้านนอกของพยาธิซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (syncytial layer) และชั้นใน (tegument cell layer) ที่อยู่ใต้กล้ามเนื้อโดยมีแขนงของเซลล์ (cytoplasmic processes) เชื่อมเนื้อเยื่อ 2 ชั้นเข้าด้วยกัน จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายปานกลาง (ภาพที่ 34 C,D) พบตะกอนสีเข้มที่สุดบริเวณผิวด้านนอกเนื้อเยื่อปกคลุม (tegument surface) เนื้อเยื่อปกคลุมร่างกายชั้นนอก (syncytial layer) และ พบกระจายตัวอยู่ในไซโตพลาสซึมของเนื้อเยื่อปกคลุมร่างกายชั้นใน แต่ไม่พบตะกอนสีที่เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (muscular tissue) รวมทั้งหนาม (spine) ที่แทรกอยู่บริเวณ tegument (ภาพที่ 34 B-F)

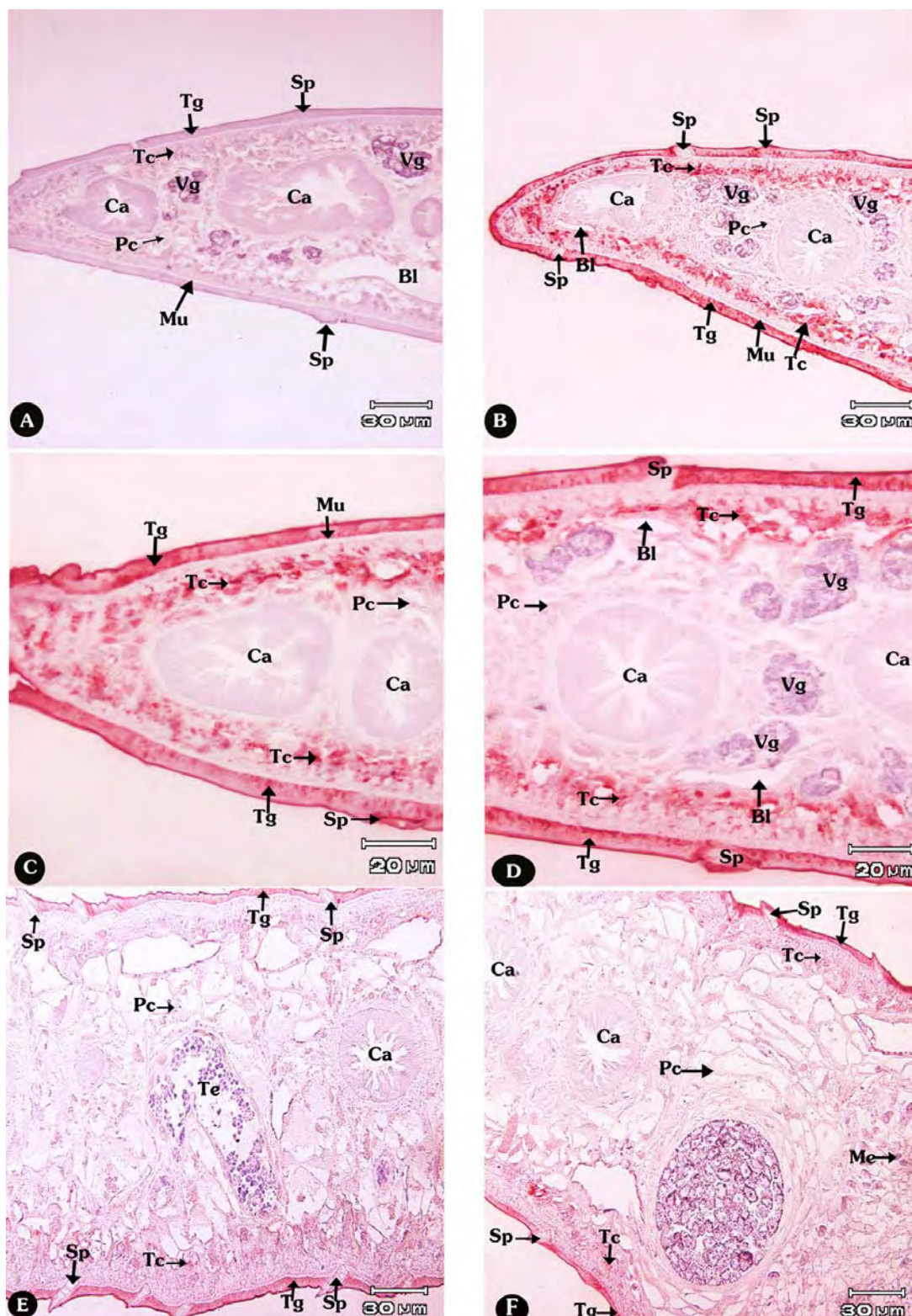
ระบบทางเดินอาหารของ *F. gigantica* เริ่มตั้งแต่ oral sucker, pharynx หลอดอาหารซึ่งเป็นรูปตัว Y ตัวกลับ และลำไส้ (Ca) แตกแขนงออกเป็นจำนวนมากไปต้นที่บริเวณปลายหางของพยาธิ จากการย้อมด้วย immunoperoxidase พบว่า ไม่พบตะกอนสีในลำไส้ ทั้งในส่วนเซลล์บุผนังลำไส้ ส่วนฐานของเซลล์ แขนงของเซลล์ค้ำจุน และบริเวณไซโตพลาสซึม (ภาพที่ 34 B-F)

ท่อระบบขับถ่ายเป็นระบบท่อที่มีการแตกแขนงจำนวนมากแทรกตัวอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อค้ำจุนและทั้งหมดซึ่งอยู่ทางด้านปลายหางเปิดออกทาง excretory pore ที่อยู่ตรงปลายของพยาธิ จากการย้อมด้วย immunoperoxidase technique ไม่พบตะกอนสีทั้งในบริเวณไซโตพลาสซึมของเยื่อบุผิวของท่อระบบขับถ่ายทั้งส่วนที่เป็นท่อหลักซึ่งมีขนาดใหญ่ และแขนงที่มีขนาดเล็ก

เนื้อเยื่อค้ำจุน (parenchyma) เป็นเนื้อเยื่อที่แทรกอยู่ภายในตัวพยาธิทำหน้าที่ในการยึดและเชื่อมโยงโครงสร้างต่างๆ เข้าด้วยกัน จากการศึกษาพบว่าไม่พบตะกอนในเนื้อเยื่อค้ำจุน (parenchyma) ทั้งในบริเวณที่ติดกับ ไซโตพลาสซึมของเนื้อเยื่อปกคลุม(Tc), vitelline glands และบริเวณลำไส้ (Ca) (ภาพที่ 34 B-F)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ คือ อัณฑะ ไม่พบตะกอนสีในส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ ไซโตพลาสซึม และเซลล์อสุจิที่บรรจุอยู่ภายใน (ภาพที่ 34 E) อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียถัดจากอัณฑะไปด้านหลัง มี ootype เห็นเป็นก้อนซึ่งล้อมรอบด้วย Mehlis' gland ไม่พบตะกอนสีในส่วนไซโตพลาสซึมและแขนงของ

Mehlis' gland (ภาพที่ 34 F) ส่วนบริเวณทางด้านข้างลำตัวมี vitelline glands ก้อนเล็กๆ ตั้งแต่บริเวณ บ่ามาบรรจบส่วนท้ายลำตัว จากการย้อมด้วย immunoperoxidase พบว่า ไม่พบตะกอนสีในไซโทพลาสซึมของ vitelline cell (ภาพที่ 34 B-D)



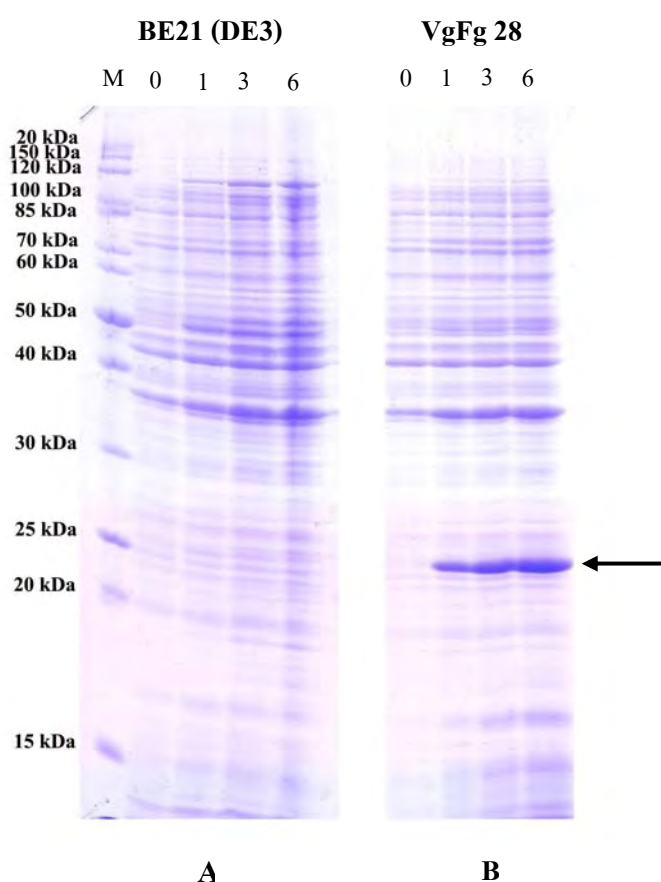
ภาพที่ 34 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantica* ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase staining โดยใช้ preimmunized rat serum (A) และ immunize rat serum (B-F) จาก rVgFg 16 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาติดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวเป็น probe

A) ภาพกำลังขยายต่ำแสดง ผลลบของปฏิกิริยา (ไม่พบตะกอนสีแดง) ในเนื้อเยื่อปกคลุม (Tg), ไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้อเยื่อปกคลุม (Tc), เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (Mu), หนาม (Sp), เซลล์คำจุน (Pc), เนื้อเยื่อลำไส้ (Ca), ท่อระบบขับถ่าย (BI) และ vitelline gland (Vg) เมื่อใช้ preimmunized rat serum เป็น probe

B-F) ภาพกำลังขยายต่ำ (B, E, F) และปานกลาง (C, D) แสดงผลบวกของปฏิกิริยา (พบตะกอนสีแดง) ในเนื้อเยื่อปกคลุม (Tg) และ ไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้อเยื่อปกคลุม (Tc) และผลลบของปฏิกิริยาปฏิกิริยา (ไม่พบตะกอนสีแดง) ใน เซลล์คำจุน (Pc), เนื้อเยื่อลำไส้ (Ca), ท่อระบบขับถ่าย (BI), vitelline gland (Vg), อัณฑะ (Te) และ Mehlis' gland เมื่อใช้ immunized rat serum เป็น probe

4. การ expression และ purification ของ VgFg 28 (protein kinase / endoribonulcease like protein)

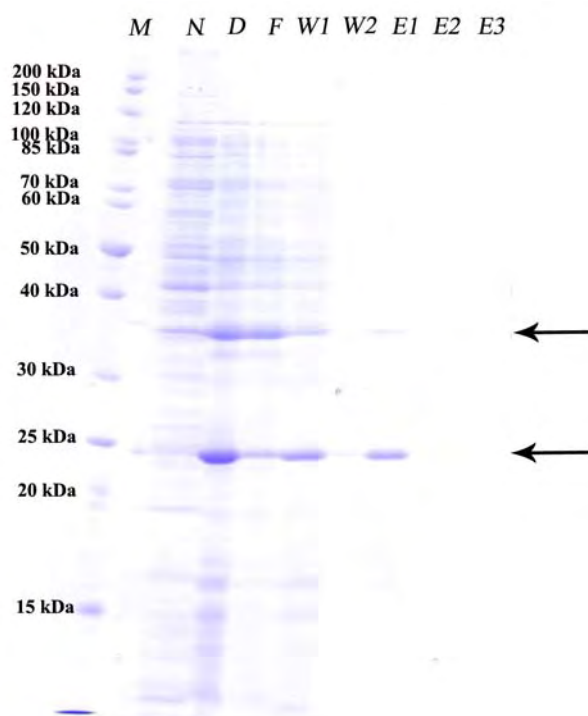
จากการนำ cDNA clone VgFg 28 มาตัดต่อเข้า pET-30 expression vector ที่ตำแหน่ง EcoRI และ XhoI (pET30-VgFg28) แล้วนำไป transformed เข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) (BL21-pET30-VgFg28) และเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 จากนั้นกระตุ้นด้วย IPTG และทำการเก็บเซลล์ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำการแยกโปรตีนด้วย 12.5% SDS polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับ standard molecular weight marker ด้วยโปรแกรม GeneTools พบว่า มีแถบโปรตีนขนาด 25 kDa ปรากฏขึ้นในโปรตีนที่สกัดมาจาก BL21-pET30-VgFg28 ที่เวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วย IPTG ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของ recombinant VgFg28 ที่คำนวณได้จากลำดับ amino acid ในขณะที่โปรตีนที่สกัดมาจาก BL21-pET30-VgFg28 ที่เวลา 0 ชั่วโมง และโปรตีนที่สกัดจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ไม่มีการ transformed expression vector ไม่พบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa ดังกล่าว (ภาพที่ 35 A, B)



- ภาพที่ 35** (A) ภาพถ่าย 12.5% SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue แสดงแถบโปรตีนที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่เพาะเลี้ยงใน LB broth ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วย IPTG; M = standard molecular weight marker
- (B) ภาพถ่าย 12.5% SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue แสดงแถบโปรตีนที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย BE21-pET30-VgFg 28 ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วย IPTG ซึ่งพบแถบโปรตีนที่ 25 kDa (ลูกศร) ปรากฏขึ้นเฉพาะที่เวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นเท่านั้น

การทำบริสุทธิ์ Recombinant VgFg 28 protein

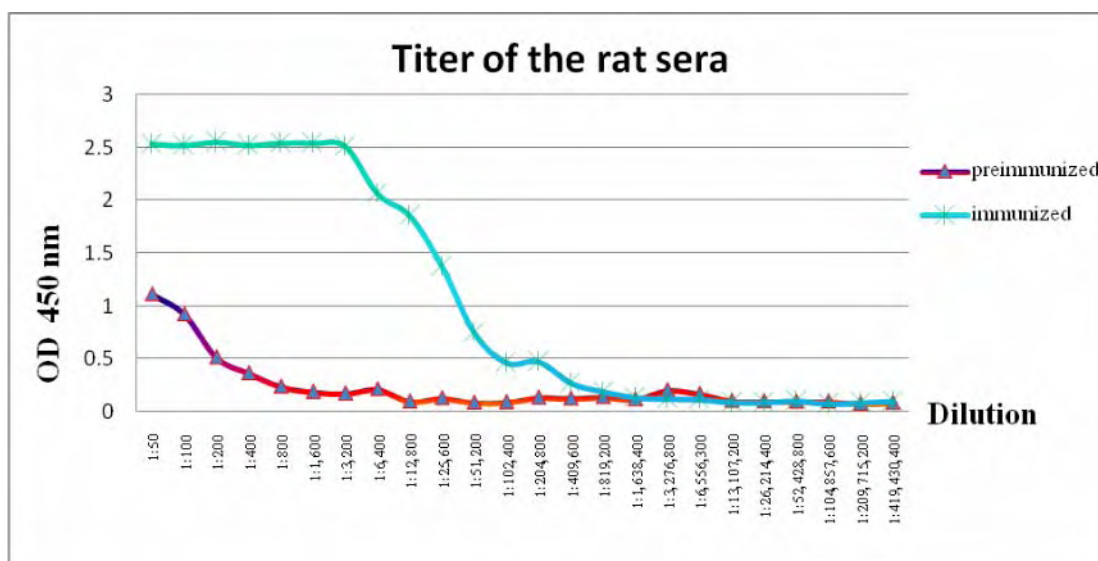
จากการนำ BL21-pET30-VgFg28 ที่ตรวจสอบแล้วว่าการแสดงออกของแถบโปรตีนที่ 25 kDa มาทำการเพาะเลี้ยงและกระตุ้นด้วย IPTG แล้วนำไปสกัด inclusion protein มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Protino[®] Ni-IDA column แล้วทำการเก็บ fractions ต่าง ๆ นำไปแยกแถบโปรตีนด้วย 12.5% SDS PAGE และย้อมด้วยสี coomassie blue พบว่าใน native BL21-pET30-VgFg28 extracted protein มีแถบโปรตีนขนาด 25 kDa ในปริมาณน้อย แต่พบโปรตีนมากที่สุด ใน denature BL21-pET30-VgFg28 extracted protein ในขณะที่ column flowed through protein พบแถบโปรตีนดังกล่าวน้อยลง นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ใน column washed protein 1 และ 2 ส่วน column eluted protein 1 พบ แถบโปรตีนจำนวน 7 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 52, 37, 25, 18, 17, 16 และ 14 kDa โดยแถบโปรตีนที่ 25 kDa มีความเข้มมากที่สุด และไม่พบแถบโปรตีนใดๆ ใน column eluted protein 2 และ 3 (ภาพที่ 36)



ภาพที่ 36 ภาพถ่าย 12.5% SDS-PAGE ย้อมด้วยสี coomassie blue แสดงแถบโปรตีนใน fractions ต่างๆ ของ induced BL21-pET30-VgFg28 proteins ที่นำมาทำบริสุทธิ์ด้วย Protino[®] Ni-IDA column; M = standard molecular weight marker, N = native extracted BL21-pET30-VgFg28 protein, D = denature extracted BL21-pET30-VgFg28 protein, F = column flow through protein, W 1 = column washed protein 1, W2 = column washed protein 2, E1 = column eluted protein 1, E 2 = column eluted protein 2 และ E 3 = column eluted protein 3

4.3 การผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ Recombinant VgFg 28 protein

จากการนำ BL21-pET30-VgFg28 มาสกัดจนกระทั่งได้ inclusion protein แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว (Wista rat) และฉีดกระตุ้นอีก 2 ครั้ง ในวันที่ 14 และ 28 แล้วทำการเก็บเลือดหนูในวันที่ 35 จากนั้นนำไปแยกเม็ดเลือดแล้วเก็บ serum มาตรวจหา titer ของ polyclonal antibody ด้วยวิธี indirect ELISA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm จากนั้นนำข้อมูลมาแสดงในรูปแผนภูมิเส้น แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD_{450}) และค่าความเข้มข้น (dilution) ต่าง ๆ (1/50 ถึง 1/419,430,300) ของแอนติบอดี พบว่า ค่า OD_{450} ของ immunized rat serum มีค่าอยู่ระหว่าง 0.105-2.534 ในขณะที่ preimmunized rat serum มีค่าอยู่ระหว่าง 0.084-1.115 (ตารางที่ 5) โดยที่ค่าความเข้มข้น 1/409,600 immunized rat serum เริ่มมีค่า OD_{450} สูงกว่า preimmunized rat serum (ภาพที่ 37) และค่า OD_{450} ของ immunized rat sera มีการเปลี่ยนแปลงสูงขึ้นและคงที่ที่ 1/3,200 จากผลการทดลองสามารถคำนวณหาค่า titer ของ polyclonal antibody ได้เท่ากับ 1:25600



ภาพที่ 37 แผนภูมิเส้นแสดงค่า ELISA titer ของ polyclonal antibody; preimmunized = preimmunized rat serum และ immunized = immunized rat serum ของหนูขาว ก่อนและหลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย rVgFg 28 protein ตามลำดับ

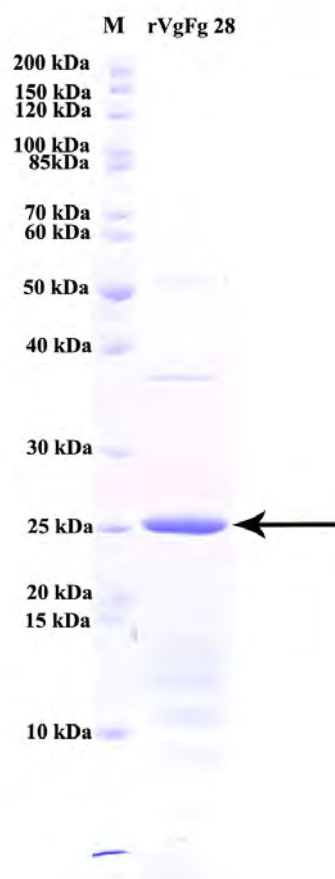
Dilution	ค่าการดูดกลืนแสง (OD ₄₅₀)	
	Preimmunized rat serum	Immunized rat serum
1:50	1.115	2.534
1:100	0.926	2.529
1:200	0.515	2.56
1:400	0.366	2.529
1:800	0.238	2.55
1:1,600	0.187	2.55
1:3,200	0.172	2.517
1:6,400	0.212	2.069
1:12,800	0.097	1.86
1:25,600	0.127	1.379
1:102,400	0.09	0.469
1:204,800	0.133	0.478
1:409,600	0.125	0.277
1:819,200	0.138	0.194
1:1,638,400	0.117	0.14
1:3,276,800	0.203	0.126
1:6,556,300	0.167	0.12
1:13,107,200	0.102	0.092
1:26,214,400	0.099	0.092
1:52,428,800	0.094	0.107
1:104,857,600	0.096	0.079
1:209,715,200	0.074	0.09
1:419,430,400	0.084	0.105

ตารางที่ 5 แสดงค่า OD₄₅₀ ของ titration ELISA ของ preimmunized rat serum และ immunized rat serum ที่ระดับความเข้มข้น 1/50 ถึง 1/419,430,400

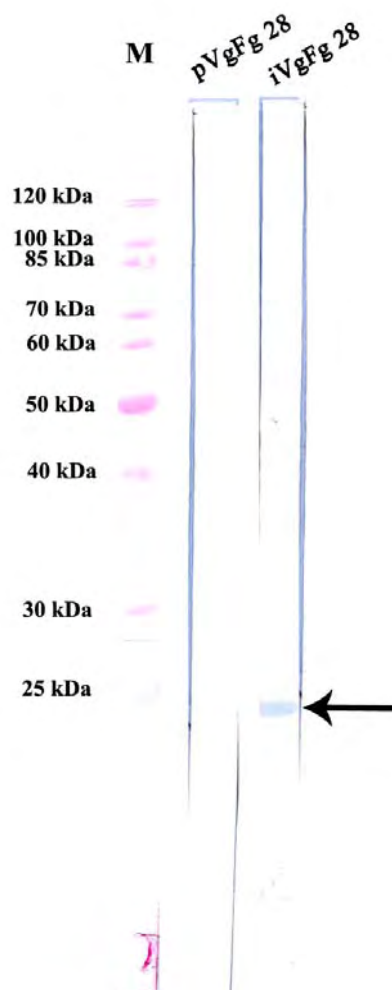
การทดสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ที่ต้านต่อ Recombinant VgFg 28 protein

จากการนำ column eluted protein 1 มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้ว transfer โปรตีนลง nitrocellulose membrane จากนั้นนำไปตรวจสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ด้วยวิธี western immunoblotting โดยใช้ preimmunized rat serum เป็น primary antibody ของกลุ่ม control และใช้ immunized rat serum เป็น primary antibody พบว่า มีแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกจำนวน 1 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa (ภาพที่ 39) จากจำนวนแถบโปรตีนทั้งหมด 7 แถบ (52, 37, 25, 18, 17, 16 และ 14 kDa) (ภาพที่ 38)

และเมื่อนำ WB-extract protein มาตรวจสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ด้วยวิธี western immunoblotting โดยใช้ preimmunized rat serum เป็น primary antibody ของกลุ่ม control และใช้ immunized rat serum เป็น primary antibody ของกลุ่มการทดลอง พบว่า WB-extract protein มีแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกจำนวน 3 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 63, 56, 25 kDa (ภาพที่ 41) โดยมีแถบโปรตีนที่ 25 kDa มีความเข้มมากที่สุด จากจำนวนทั้งหมด 12 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 74, 52, 47, 43, 37, 34, 30, 28, 24, 20, 19 และ 15 kDa (ภาพที่ 40)



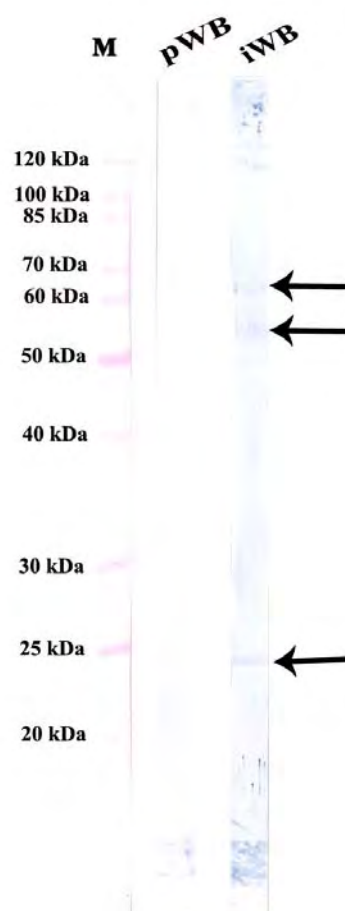
ภาพที่ 38 ภาพถ่าย 12.5% SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie blue ของ column eluted protein ของ BL21-pET30-VgFg28 (rVgFg 28) แสดงแถบโปรตีนที่ 25 kDa ซึ่งมีความเข้มมากที่สุด (ลูกศร); M = molecular weight marker



ภาพที่ 39 ภาพถ่าย western immunoblotting ของ column eluted protein ของ BL21-pET30-VgFg28 ที่ probed ด้วย preimmunized rat serum (pVgFg28) และ immunized rat serum (iVgFg28) แสดงแถบโปรตีนที่ให้ผลบวก (ลูกศร); M = molecular weight marker



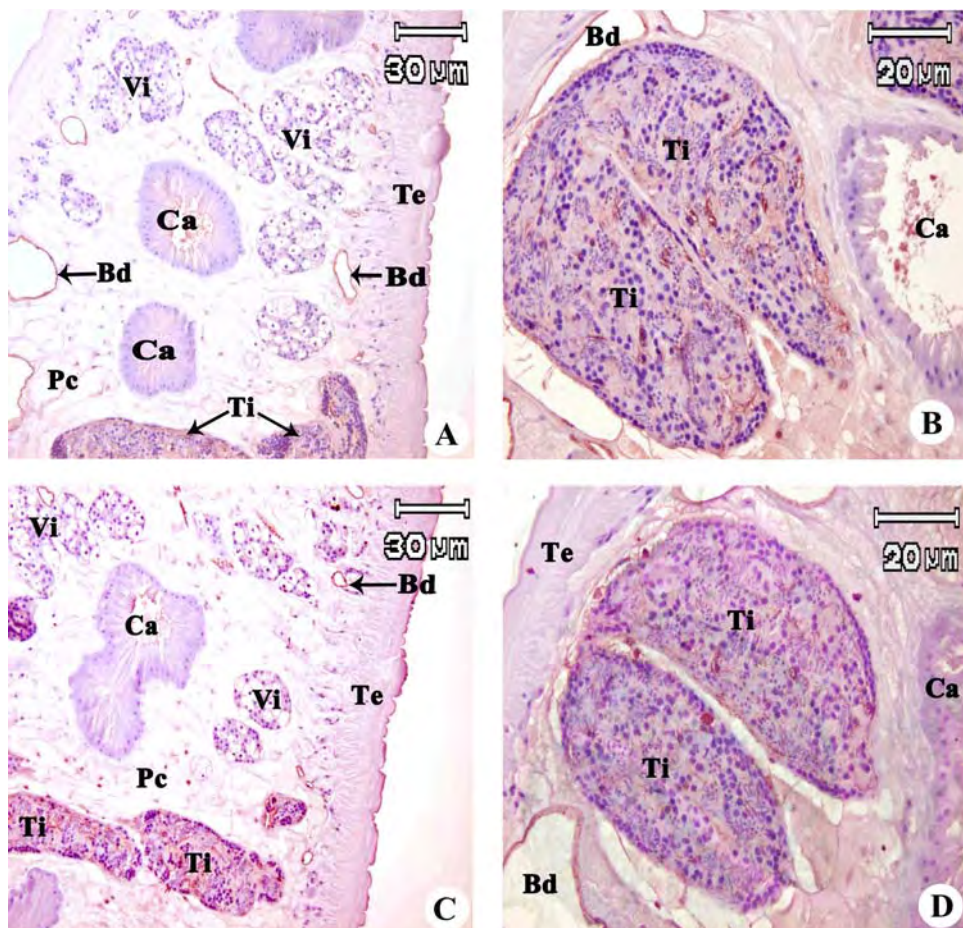
ภาพที่ 40 ภาพถ่าย 12.5% SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie blue แสดงแถบโปรตีนใน WB-extract protein (WB) ของ *F. gigantea*; M = molecular weight marker



ภาพที่ 41 ภาพถ่าย western immunoblotting ของ WB-extract protein ของพยาธิ *F. gigantica* ที่ probe ด้วย preimmunized rat serum (pWB) และ immunized rat serum (iWB) แสดงแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกของปฏิกิริยา (ลูกศร); M = molecular weight marker

4.5 การศึกษาคุณสมบัติของ polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 28 protein ในเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantea* ตัวเต็มวัยด้วยวิธี immunoperoxidase staining

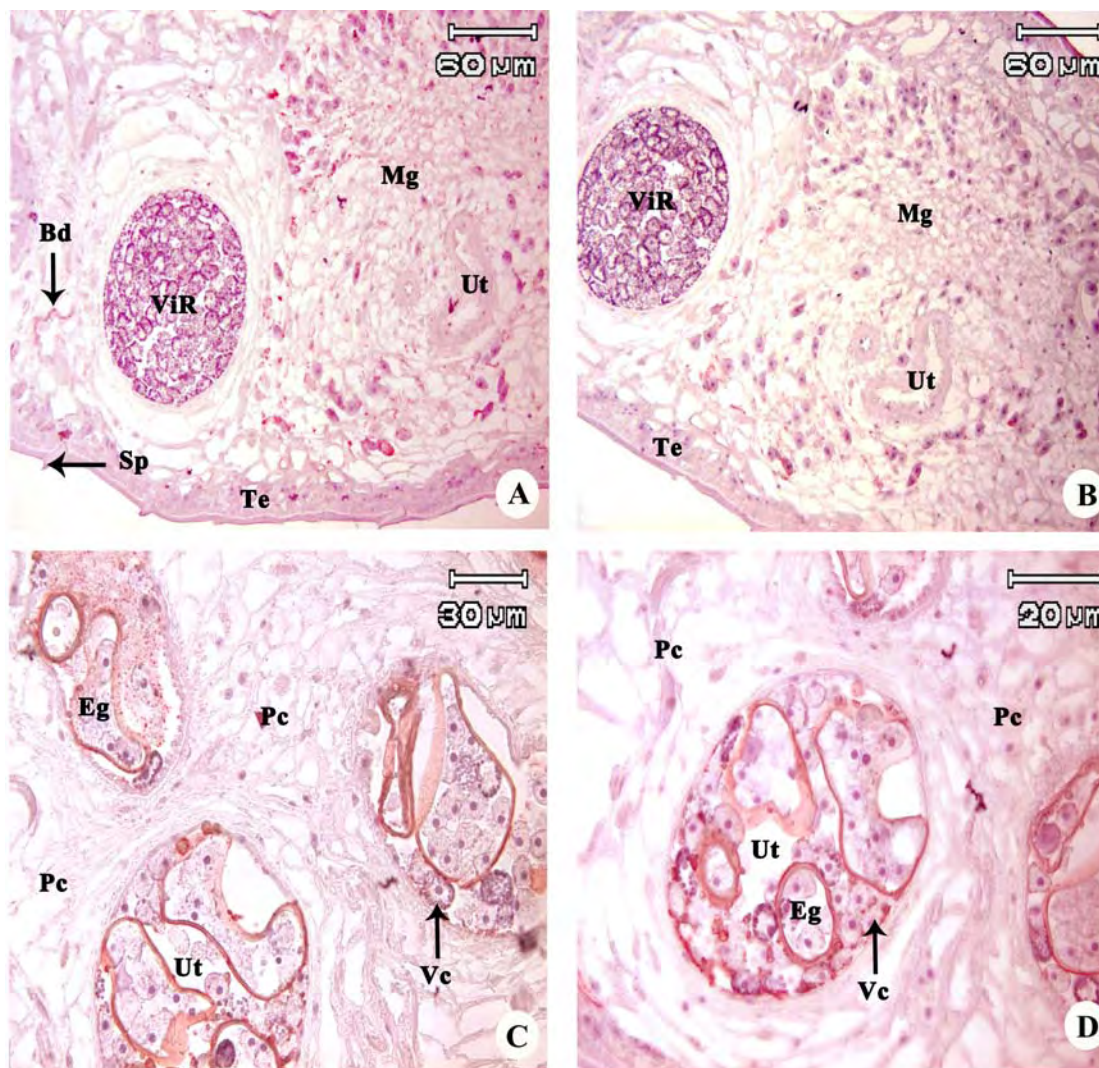
จากการใช้ polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อ rVgFg 28 ของพยาธิ *F. gigantea* ตรวจหาตำแหน่งของเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะที่สามารถจับได้ด้วย immunized rat serum และ preimmunized rat serum ด้วยวิธี immunoperoxidase พบว่า ทั้ง preimmunized และ immunized rat sera ได้ผลไม่แตกต่างกัน คือพบผลบวกของปฏิกิริยา침ใน ท่อระบบขับถ่าย (excretory bladder) อัณฑะ (Testis) และ Mehlis' gland cells (ภาพที่ 42A, B, 43A, B) ในขณะที่เนื้อเยื่อปกคลุมร่างกาย (Tegument) หนาม (spine) ลำไส้ (Caecum) ในส่วนของเซลล์เยื่อผนังลำไส้ (ภาพที่ 42A, B) และในเนื้อกล้ามเนื้อ (Muscular tissue) ให้ผลลบ



ภาพที่ 42 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantica* ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase staining โดยใช้ preimmunized rat serum (A-B) และ immunized rat serum (C-D) และย้อมนิวเคลียสด้วยสี Mayer's haematoxylin

A-B ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และปานกลาง (B) แสดง negative reaction (ไม่พบตะกอนสีแดง) ในเนื้อเยื่อปกคลุม (Te), เนื้อเยื่อคำจุนบริเวณอวัยวะ (Pc), หนาม (Sp) และ vitelline gland (Vi) และ positive reaction ในเนื้อเยื่อลำไส้ (Ca), ท่อระบบขับถ่าย (Bd) และอวัยวะ (Testis) เมื่อใช้ preimmunized rat serum เป็น probe

C-D ภาพกำลังขยายต่ำ (C) และกำลังขยายสูง (D) แสดง positive reaction (พบตะกอนสีแดง) เนื้อเยื่อลำไส้ (Ca), ท่อระบบขับถ่าย (Bd) และอวัยวะ (Ti) และ negative reaction (ไม่พบตะกอนสีแดง) ใน vitelline gland (Vi) ในเนื้อเยื่อปกคลุม (Te) และเนื้อเยื่อคำจุน (Pc) เมื่อใช้ immunized rat serum เป็น probe



ภาพที่ 43 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantea* ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase staining โดยใช้ preimmunized rat serum (A, C) และ immunize rat serum (B, D) และย้อมนิวเคลียสด้วยสี Mayer's haematoxylin

- A** ภาพกำลังขยายต่ำแสดง negative reaction (ไม่พบตะกอนสีแดง) ในบริเวณ vitelline resirvior (ViR), เซลล์ค้ำจุน (Pc), หนาม (Sp), Tegument (Te) และ Uterus (Ut) และ positive reaction ในบริเวณ Mehlis' gland cell (Mg) และท่อระบบขับถ่าย (Bd) เมื่อใช้ preimmunized rat serum เป็น probe
- B** ภาพกำลังขยายต่ำแสดง positive reaction (พบตะกอนสีแดง) ในบริเวณ Mehlis' gland (Mg) และท่อระบบขับถ่าย (Bd) และ negative reaction (ไม่พบตะกอนสีแดง) ในบริเวณ vitelline resirvior (ViR), เซลล์ค้ำจุน (Pc), หนาม (Sp), Tegument (Te) และ Uterus (Ut) เมื่อใช้ immunized rat serum เป็น probe
- C** ภาพกำลังขยายปานกลาง (C) แสดง positive reaction (พบตะกอนจุดสีแดง) ในบริเวณ Egg (Eg) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ eggshell และ Uterus (Ut) และแสดง negative reaction (ไม่พบตะกอนสีแดง) ในเนื้อเยื่อค้ำจุน (Pc) และ Vitelline cell (Vc) เมื่อใช้ preimmunized rat serum เป็น probe
- D** ภาพกำลังขยายสูง (D) แสดง positive reaction (พบตะกอนจุดสีแดง) ใน บริเวณ Egg (Eg) และแสดง negative reaction (ไม่พบตะกอนสีแดง) ในเนื้อเยื่อค้ำจุน (Pc) และ Vitelline cell (Vc) เมื่อใช้ immunized rat serum เป็น probe

บทวิจารณ์

1. การ cloning, characterization, expression, purification และ localization ของ vitelline protein B ของพยาธิใบตับ *Fasciola gigantica*

หนอนพยาธิ ปกป้องไข่จาก host immune reaction และสิ่งแวดล้อม โดย chemically resistant scleroprotein eggshell ซึ่ง eggshell precursor protein สร้างและเก็บใน vitelline cells ของพยาธิ (Stephenson, 1947). ซึ่งได้มีการศึกษาใน *F. hepatica* (Waite and Rice-Ficht, 1987, 1989; Zurita *et al*, 1987, 1989; Rice-Ficht *et al*, 1992), *S. japonicum* (Sukiyama *et al*, 1997), *S. mansoni* (Chen *et al*, 1992), *P. westermani* (Bae *et al*, 2007), *O. viverini* (Ruangsittichai *et al*, 2006) และ *C. sinensis* (Yang *et al*, 2000; Lee *et al*, 2005; Tang *et al*, 2005)

จากการแยก *F.gigantica* vitelline protein BI (cDNA) พบว่ามีความเหมือนกับ *F.hepatica* vitelline BI และ BII cDNA สูง 92% และ 81% ตามลำดับ translate amino มีความเหมือนกับ vitelline BI และ BII ของพยาธิ *F.hepatica* 96%และ 84% ตามลำดับ มีความเหมือนกับ eggshell protein ของ *P.westermani* (36%) (Bae *et al*, 2007), vitelline B precursor protein of *O.viverini* (33%) และ vitelline B precursor protein B1 ของ *C.sinensis* (Tang *et al*, 2005)

ลำดับกรดอะมิโนของ FgVPBI เมื่อเปรียบเทียบกับ eggshell protein ของพยาธิตัวอื่นๆ ที่กล่าวมาข้างต้นโดยพบว่ามี glycine และ tyrosine มากคล้ายกับพยาธิตัวอื่นๆ ส่วนประกอบของ native vitelline protein B ของ *F. hepatica* แสดงปริมาณของ tyrosin น้อย (2.1%) แต่ DOPA สูง (10.6%) โดยผู้เขียนได้อธิบายว่า tyrosin residues เปลี่ยนเป็น DOPA โดย tyrosyl 3 – hydroxylase และเป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการ eggshell formation และค่า PI ของ native vitelline B ของ *F. hepatica* =7.4 (Rice-Ficht *et al*, 1992) ซึ่งต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ FgVPBI (PI=8.83)

จากการศึกษา Northern hybridization ของ FgVPBI antisense RNA probe แสดงใน single 1,000 คู่เบส ใน adult stage total RNA เมื่อสังเกตรหัส transcript ระหว่าง 950 คู่เบส และ 1400 คู่เบส กับ FhVPBI cDNA probe ซึ่งมีความแตกต่างกันในกระบวนการ และพบว่าขนาดของ mRNA ของ trematode eggshell protein ตัวอื่นๆมีความแตกต่างกัน เช่น pBCS44 ใน *C. Sinensis* ซึ่งยาว 2000 คู่เบส (Tang *et al*, 2005), OvESP ใน *O. Viverini* ซึ่งยาว 800 คู่เบส

จากการศึกษาด้วยวิธี *in situ* hybridization, FgVPBI m RNA ซึ่งพบอยู่ใน cytoplasm ของ vitelline cell ระหว่าง vitelline gland และในไข่ภายใน uterus ในทางตรงกันข้าม hybridization signal ไม่ได้อยู่ในเนื้อเยื่อ ขึ้นอยู่กับระดับขั้นการพัฒนาของ vitelline cell โดย hybridization signal มีความหลากหลายทั้งความเข้มข้นต่ำและสูง ใน vitelline follicle ย้อมติดสีแยกกระต่ายการพัฒนาของ vitelline cell จาก stage1 ถึง mature (meepool *et al*, 2006) พบว่า

ใน stage1 มีการติดสีน้อยซึ่งสามารถบอกได้ว่า มีการ transcript น้อย ใน stage2 ระดับของสีมีความเข้มข้น เริ่มมีการสร้าง eggshell globule และเริ่มติดสีเข้มข้นใน mature cell พบการรวมกลุ่มของ eggshell globule ใน vitelline cell ติดสีเข้มรวมกลุ่มอยู่ในไข่ซึ่งคล้ายกับ Pw-Vit20 และ Vit 36 ของ eggshell protein ใน *P. westermani* และพบอยู่รอบ globulelike structure ใน vitelline follicle และแพร่กระจายในไข่เมื่อใช้ทดสอบกับ Pw-Vit antisense riboprobe (Bae *et al*, 2007) ในทางตรงกันข้ามในของ *F. hepatica* เมื่อทดสอบกับ FhVPBI antisense probe สามารถค้นพบ transcript ใน mature vitelline cell ภายใน vitelline follicle และความเข้มข้นของ hybridization signal ลดลงใน vitelline cell ใน vitelline reservoir และไม่พบใน vitelline cell ในไข่ที่อยู่ใน uterus (Rice-Ficht *et al*, 1992) ใน mature vitelline cell ของ *S.mansoni* การ transcript ของ p48 eggshell protein ถูกพบใน vitelline cell ที่อยู่ใน vitelria (Ruangsittichai *et al*, 2006) ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงน่าจะบอกได้ว่าการแสดงออกของ vitelline protein B gene ของพยาธิ *F. gigantica* น่าจะคงรูปหรือ active ในระยะสุดท้ายของการพัฒนา

ในกระบวนการผลิตไข่ของพยาธิ vitelline cell มีบทบาทที่สำคัญหลายประการ คือเป็นแหล่งของ eggshell precursor protein และสารอาหารสำหรับการพัฒนาของตัวอ่อน (Threadgold, 1982). ดังนั้นการแสดงออกของ gene ของ eggshell protein ใน vitelline cell มักเกิดพร้อมกับการผลิตไข่ (Waikagul *et al*, 1986; Robinson *et al*, 2001) จากการศึกษาพบว่า Recombinant FgVPBI แสดงที่น้ำหนัก 31.6 kDA ซึ่งใหญ่กว่า native eggshell precursor protein (31kDA) โดยการใส่ His-tag และ FLAG peptide เริ่มทำการอธิบายจาก Proteolytic degradation หรือ secondary site translation (Preibish *et al*, 1988)

Polyclonal antiserum against rFg VBPI ใช้สำหรับหาตำแหน่งที่เปรียบเหมือนกับตำแหน่งของ native protein ใน *F. gigantica* ซึ่งทำปฏิกิริยากับ rFgVPBI ที่ 31.5 และ 31 kDA และ 31 kDA native eggshell precursor protein (ESP) ใน Immunoblot แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีนี้ไม่สามารถจับได้กับ protein ใน whole worm extract ซึ่งอาจเกิดมาจากการสกัดโปรตีนด้วยวิธีดังกล่าวสามารถสกัด vitelline protein ออกมาได้ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับการใช้ acid urea extraction เนื่องจาก vitelline protein สามารถละลายได้เฉพาะในสารละลายที่เป็นกรด ซึ่งสามารถ hydrolysis ได้ด้วย acid protease ที่ pH ที่เป็นกรดจากลำไส้ของ *F. hepatica* (Simpkin *et al*, 1980) เนื่องจาก eggshell protein สร้างและเก็บเข้าไปใน vesicle ใน vitelline cell ซึ่งภายใน vesicle ซึ่งเป็นที่สะสมของ eggshell precursor material นั้นมีสถานะที่เป็นกรด และสถานะที่เป็นกรดนี้ป้องกันการไม่ให้โปรตีนดังกล่าวไม่เกิดการ crosslink เป็น eggshell ก่อนที่จะมีการหลั่งออกจากเซลล์ (Wells and Cordingley, 1991)

Native *F. gigantica* vitelline B protein สามารถตรวจพบได้ในพยาธิตัวเต็มวัยโดยไซโตเคมี และ immunoperoxidase technique ซึ่งสามารถย้อมติดใน vitelline cell ระยะต่างๆ ภายใน vitelline follicle และใน vitelline cell ในไข่ที่อยู่ภายใน uterus เช่นเดียวกับ anti-

rPw-Vit20 และ vit 36 antibody ของ *P. westermanni* ที่ย้อมติดที่ vitelline follicle และ shell ของไข่ (Bae *et al*, 2007) และ anti vitelline B ของ *F. hepatica* พบ eggshell protein ใน vitelline globules ของ vitelline cell ภายใน vitellaria และพบใน *S. japonicum* เมื่อทดสอบด้วย antiserum against 34kDA recombinant eggshell protein และใน *C. sinensis* เมื่อใช้ against *C. sinensis* และ vitelline protein B1 (Rice-Ficht *et al*, 1992; Sukiyaama *et al*, 1997; Yang *et al*, 2000; Tang *et al*, 2005) และ intrauterus egg ของ adult *C. sinensis* เมื่อทำปฏิกิริยากับ recombinant Cs 28 egg protein (Lee *et al*, 2005)

ในการศึกษาครั้งนี้ Immunoperoxidase ให้ผลเหมือนกับ RNA in situ hybridization ซึ่งเกิดการ transcript ในไซโทพลาสซึม ตั้งแต่ระยะแรกถึงระยะสุดท้ายของ vitelline cell ใน vitellaria และใน vitelline cell ของ intrauterus egg ผลครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า vitelline cell ยังคงสร้าง FgVPBI หลังแยกจาก follicle

2. การสังเคราะห์ Tegumental antigen encoding gene (VgFg 16) โดยการตรวจหาจาก cDNA library

การทดลองครั้งนี้ทำการตรวจหา ยีนที่แสดงออกในพยาธิตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ โดยใช้ cDNA probe ที่สังเคราะห์จาก poly A RNA ของพยาธิตัวเต็มวัยไปทำการตรวจหา ยีนจาก cDNA library ที่สังเคราะห์จาก poly A RNA ของพยาธิตัวเต็มวัย วิธีการนี้จะสามารถตรวจหาได้เฉพาะยีนที่มีการแสดงออกในปริมาณมากเท่านั้น เพราะยีนที่มีการแสดงออกน้อยก็จะมีปริมาณ mRNA ต่ำด้วย และเมื่อทำการแปรเป็น cDNA probe ก็จะมีปริมาณต่ำด้วยเช่นกัน ทำให้เมื่อนำไปตรวจสอบหา ยีนจาก cDNA library ก็จะทำให้สัญญาณต่ำในการตรวจสอบ ในการทดลองนี้พบว่า cDNA ที่เป็นรหัสของ tegumental antigen เป็นยีนที่ตรวจหาได้ จากวิธีนี้แสดงได้ว่ายีนที่เป็นรหัสของ tegumental antigen เป็นยีนหนึ่งที่มีการแสดงออกสูงในพยาธิตัวเต็มวัย ซึ่งหมายถึงมีการผลิตโปรตีนชนิดนี้ในปริมาณมาก และอาจมีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพยาธิตลอดจนเป็นเป้าหมายในการควบคุมพยาธิด้วยวัคซีนหรือการตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาโดยโปรตีนชนิดนี้

ยีนที่เป็นรหัสของ tegumental antigen ที่สังเคราะห์ได้จาก *F. gigantica* นี้มีส่วน 3' end คล้ายกับยีนที่เป็นรหัสของ tegumental antigen ของ *F. hepatica* 69.3% (Trudgett et al., 2000) ในขณะที่ 5' end มีความแตกต่างกัน และเมื่อทำการเปรียบเทียบยีนทั้งสองไม่พบ start codon ในบริเวณเดียวกันกับยีนที่พบใน *F. hepatica* จึงเป็นไปได้ว่ายีนที่สังเคราะห์ได้นี้อาจเป็น partial sequence และจากผลการวิจัยในครั้งนี่ยังไม่สามารถระบุความยาวของยีนนี้ได้ ซึ่งจะทำให้การตรวจหาความยาวของ mRNA ด้วยวิธี northern immunoblotting โดยใช้ cRNA ที่สร้างจาก VgFg 16 เป็น probe และทำการตรวจหา ยีนนี้จาก cDNA library เพื่อหา clone ของ phage ที่มี inserted DNA ที่ยาวกว่านี้ไปตรวจหาลำดับเบสให้มีขนาดสอดคล้องกับความยาวของ mRNA ที่ได้จากการทำ northern immunoblotting ต่อไป

จากการนำลำดับเบสไปแปลงเป็น amino acid sequence ได้ 82 amino acid และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ amino acid sequence ของ tegumental antigen ของ *F. hepatica* พบว่าตลอดสายของ amino acid มีความคล้ายคลึงกันถึง 66.2% โดยส่วนที่แตกต่างกันเป็นอย่างมากอยู่ที่บริเวณ C-terminal และยังพบว่า amino acid ของ *F. gigantica* มีลำดับ amino acid เป็น repeated sequence ที่คล้ายคลึงกับที่พบใน *F. hepatica* ถึง 93% และมี proline เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก และคล้ายกับโปรตีนในกลุ่ม gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit epsilon [Mus musculus] (gi|8393396|ref|NP_059065.1); Hemolysin-type calcium-binding region: Cadherin [Trichodesmium erythraeum IMS101] (gi|71671906|gb|EAO28570.1); Endoglucanase-like [Saccharophagus degradans 2-40] (gi|89952265|gb|ABD82280.1); peptidase, M23/M37 family protein [Oceanicaulis alexandrii HTCC2633] (gi|83852772|gb|EAP90625.1); surface protein EP3-3 procyclin precursor [Trypanosoma brucei brucei] (gi|14485024|gb|AAK62894.1) และ Agarase

[*Saccharophagus degradans* 2-40] (gi|89951900|gb|ABD81915.1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มี proline rich เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งลำดับ amino acid PEP แต่อย่างไรก็ตามจากข้อมูลที่ได้ยังไม่สามารถระบุหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ได้ แต่อาจเป็น membrane bound protein ที่ทำหน้าที่เป็น receptor หรือ peptidase enzyme

การสังเคราะห์ Recombinant VgFg 16 protein ที่ได้จาก cDNA library

จากการสังเคราะห์ Recombinant VgFg 16 protein (rVgFg16) ที่ได้จาก cDNA library โดย นำไป transformed เข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE₃) (BL21-pET30-VgFg16) นำเซลล์ที่ได้ไปทำการแยกโปรตีนด้วย 12.5% SDS PAGE พบว่า มีแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 15 kDa ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของ rVgFg16 ที่คำนวณได้จากระดับ amino acid ในโปรตีนที่สกัดจาก BL21-pET30-VgFg16 หลังการกระตุ้นด้วย IPTG แต่ไม่พบใน BL20 และ BL21-pET30-VgFg16 ก่อนการกระตุ้นด้วย IPTG แสดงว่า แถบโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ด้วยการกระตุ้นด้วย IPTG ผ่านทาง lac operon ที่มีอยู่ใน pET 30 expression vector และโปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับที่คำนวณไว้ แสดงว่าแถบโปรตีนดังกล่าวเป็น recombinant VgFg16 (rVgFg16) ที่ทำการตัดต่อ cDNA เข้า vector ดังกล่าว

การทำบริสุทธิ์ Recombinant VgFg 16 protein

จากการนำ rVgFg16 ที่สังเคราะห์ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Protino[®] Ni-IDA column นำมาแยกแถบโปรตีนด้วย 12.5% SDS PAGE และย้อมด้วยสี coomassie blue พบว่า มีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 15 kDa เพียงแถบเดียวแสดงให้เห็นว่า rVgFg16 ถูกแยกออกจากโปรตีนอื่น ๆ ที่มีอยู่ในแบคทีเรียได้ด้วย Protino[®] Ni-IDA column เนื่องจากมี Ni-IDA มีคุณสมบัติในการจับกับ His-tag โปรตีน และสามารถทำให้แยกออกจากกันด้วย elution buffer ที่มี Imisazole ในขณะที่โปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่สร้างโดยแบคทีเรียไม่มีโครงสร้างของ His-tag จึงไม่สามารถจับกับ Ni-IDA ได้ หรืออาจจับได้น้อย ดังนั้นเมื่อนำ eluted protein มาแยกด้วย 12.5% SDS PAGE จึงพบแถบโปรตีนที่โมเลกุล 15 kDa เพียงแถบเดียว อย่างไรก็ตามการย้อมด้วย coomassie blue มีความไวน้อย ซึ่งถ้ามี contamination protein ที่มีปริมาณน้อยอาจไม่สามารถตรวจพบได้

การผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 16 protein

จากการนำ rVgFg 16 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว (Wista rat) เก็บเลือด และนำมา ตรวจหาค่า titer ของ polyclonal antibody ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า immunized rat serum มีค่า OD₄₅₀ เพิ่มขึ้น อยู่ระหว่าง 2.491-0.062 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าใน immunized rat serum มี antibody ที่ต้านต่อ rVgFg16 protein และ ค่า OD₄₅₀ ลดลงเมื่อค่า dilution เพิ่มขึ้น โดยพบว่า ที่ค่า dilution ที่ 1:50 – 1:3,200 มีความเข้มของ OD₄₅₀

คงที่ โดยที่ค่า OD₄₅₀ เริ่มเพิ่มสูงขึ้นที่ความเข้มข้น 1:400 และเมื่อนำค่าดังกล่าวไปหาค่า titer ของ antibody มีค่าประมาณ 1:25600 ซึ่งเป็นค่า dilution มากที่สุดที่สามารถพบ antibody ที่ต้านต่อ rVgFg16 protein แสดงให้เห็นว่าที่ค่า dilution 1:25600 มี sensitivity สูงเพราะถึงแม้ว่าจะมีการเจือจางมากแต่ยังสามารถตรวจพบ antigen ได้ เมื่อเทียบกับ preimmunized rat serum พบว่าค่า OD₄₅₀ ต่ำลงแสดงให้เห็นว่าไม่มีการสร้าง antibody จาก หนูขาว (Wista rat)

การทดสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 16 protein

จากการใช้ immunized rat serum ที่ได้จากการนำ rVgFg16 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว (Wista rat) ตรวจหาแถบโปรตีนจาก rVgFg 16 พบแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกจำนวน 2 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 15 kDa และ 33 kDa ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่น้ำหนักโมเลกุล 15 kDa และ 33 kDa มีความจำเพาะกับ antibody เนื่องจากมีแถบโปรตีนขึ้นทั้งสองน้ำหนักโมเลกุล อาจเนื่องมาจากที่ 33 kDa เป็นโปรตีนของ bacteria ที่ปนเปื้อนมาจากกระบวนการทำบริสุทธิ์ เมื่อนำโปรตีนดังกล่าวไปทำการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองจึงทำให้มีการผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อโปรตีนดังกล่าวด้วย แต่การผลิต polyclonal antibody นี้มีปริมาณน้อยกว่า antibody ที่ความจำเพาะกับ rVgFg16 จึงพบว่าความเข้มของแถบโปรตีนน้อยกว่าที่น้ำหนักโมเลกุล 15 kDa

จากการตรวจหาแถบโปรตีนที่สามารถจับด้วย polyclonal antibodies ที่ต้านต่อ rVgFg16 ใน WB-extract protein พบผลบวกจำนวน 3 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 37, 30 และ 25 kDa ซึ่งเป็นไปได้ว่า antibody ที่ใช้ในการศึกษาเป็น polyclonal antibodies ซึ่งสามารถจับกับโปรตีนได้หลาย epitopes ซึ่งโปรตีนจากพยาธิ *F. gigantica* อาจมี epitope ที่คล้ายคลึงกันมากกว่าหนึ่งโปรตีน หรือก่อนการนำ rVgFg 16 มากระตุ้นเพื่อผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 16 อาจมีโปรตีนที่มี His-tag และไม่ได้ทำการตัดออกก่อนการนำไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง จึงอาจมี antibody ที่มีความจำเพาะกับ His-tag และ antibody ดังกล่าวอาจจับกับ histidine rich protein ทำให้ polyclonal antibodies ดังกล่าวสามารถจับกับโปรตีนได้มากกว่า 1 แถบโปรตีน

จากการตรวจหาแถบโปรตีนที่สามารถจับด้วย polyclonal antibodies ที่ต้านต่อ rVgFg16 ใน Tegumental extracted proteins ของ *F. gigantica* พบผลบวก ที่น้ำหนักโมเลกุล 50 และ 25 kDa อาจเนื่องมาจาก มีการ contaminate ของโปรตีนตั้งแต่ขั้นตอนในการ purified และมี Histidine rich จึงทำให้พบแถบโปรตีนจำนวน 2 แถบใน Tegumental extracted proteins การศึกษาครั้งนี้พบว่าใน Tegumental extracted proteins มีแถบโปรตีนที่จำเพาะกับ antibody ที่ต้านต่อ rVgFg16 อาจเป็นไปได้ว่าน้ำหนักโมเลกุลดังกล่าวอาจมีโปรตีนที่ศึกษาอยู่ อย่างไรก็ตามผลการศึกษพบว่า มีแถบโปรตีนที่ 25 kDa ทั้งจาก WB-extract protein และ

Tegumental extracted proteins ให้ผลบวกตรงกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่า native protein ของ gene นี้มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 25 kDa

การศึกษาตำแหน่งของเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantica* ที่สามารถจับได้ด้วย polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อ rVgFg 16 protein ด้วยวิธี immunoperoxidase staining

จากการนำ polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 16 มาทดสอบจับกับ native protein ในเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย พบว่าสามารถย้อมติดเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อปกคลุมร่างกายชั้นนอก (syncytial layer) และ เนื้อเยื่อปกคลุมร่างกายชั้นใน (tegumental cell layer) ของพยาธิตัวเต็มวัย *F. gigantica* ซึ่งมีความสอดคล้องกับ tegumental antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย *F. hepatica* ที่พบการทำปฏิกิริยาบริเวณ tegumental syncytium, cytoplasm ของ tegumental cell (Trudgett et al., 2000) แต่อย่างไรก็ตาม tegumental antigen ของพยาธิ *F. hepatica* ยังสามารถย้อมติดเยื่อของ caecum ของพยาธิ *F. hepatica* ระยะวัยรุ่น และ ย้อมติดเข้มในผนัง uterus ของพยาธิ *F. hepatica* ตัวเต็มวัย ในขณะที่ polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 16 นี้ ไม่สามารถย้อมติดอวัยวะดังกล่าว ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยีนดังกล่าวมีการแสดงออกในอวัยวะที่แตกต่างกันในแต่ละระยะของการพัฒนาของพยาธิ ดังนั้นตำแหน่งที่พบการทำปฏิกิริยาบริเวณเยื่อของ caecum จึงพบเฉพาะในพยาธิ *F. hepatica* ระยะวัยรุ่น เท่านั้น และพบการทำปฏิกิริยาใน uterus เฉพาะในพยาธิ *F. hepatica* ตัวเต็มวัย (Trudgett et al., 2000) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงไม่สามารถย้อมติดเยื่อของ caecum ในพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย และการศึกษานี้ยังไม่มีทดลองกับพยาธิ *F. gigantica* ระยะวัยรุ่นจึงยังไม่สามารถระบุได้ว่า polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 16 นี้สามารถย้อมติดเยื่อของ caecum ได้หรือไม่ แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 16 ไม่สามารถย้อมติดเยื่อของ uterus ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะลำดับ amino acid ของโปรตีนของพยาธิทั้งสองชนิด มีบางตำแหน่งที่แตกต่างกันซึ่งอาจทำให้มี epitope บาง epitope แตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถย้อมติดใน uterus ของ *F. gigantica* ได้

นอกจาก tegumental antigen ของ *F. hepatica* ดังกล่าวแล้วยังพบว่า monoclonal antibody ที่ต้านต่อ tegumental antigen ที่น้ำหนักโมเลกุล 28.5 kDa (Chaithirayanon K., 2006), 54 kDa (Itagaki et al., 1995), 66 kDa (Viyanant et al., 1997) ของ *F. gigantica* พบว่าให้ผลบวกบริเวณผิวหนังด้านนอกเนื้อเยื่อปกคลุม (tegument surface), เนื้อเยื่อปกคลุมร่างกายชั้นนอก (syncytial layer) ซึ่ง Tegumental antigen ที่น้ำหนักโมเลกุล 28.5 kDa, 54, 66 kDa นี้ ยังมีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ได้ ซึ่งพบว่า ที่น้ำหนักโมเลกุล 28.5 kDa ไม่พบ cross-reactivity กับพยาธิตัวอื่นๆ และพบว่า ที่น้ำหนักโมเลกุล 54 และ 66 kDa ซึ่งอยู่ในกลุ่ม tegument associated antigen มีความจำเพาะมากกว่า caecal-associated antigen ที่น้ำหนักโมเลกุล 27-26 kDa ที่จะใช้ในการวินิจฉัยโรค fasciolosis ในโค กระบือ และมีความจำเพาะต่อ tegument ที่น้ำหนักโมเลกุล 66 kDa เพื่อใช้ในการจำแนก

circulating antigen จากการติดเชื้อในโค กระบือ (Viyanant et al., 1997) จึงเป็นไปได้ว่า polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 16 นี้จะสามารถใช้เป็นตัวตรวจสอบการติดเชื้อได้ หรือ rVgFg 16 ที่สังเคราะห์ได้นี้อาจจะมีศักยภาพในการใช้เป็นวัคซีนป้องกันโรคดังกล่าวได้

3. การสังเคราะห์ Ribonuclease like protein encoding gene (VgFg 28) โดยการตรวจหาจาก cDNA library

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสังเคราะห์ยีนใหม่ซึ่งยังไม่มีรายงานในพยาธิชนิดนี้จำนวน 1 ยีน คือ VgFg 28 ซึ่งให้ผลบวกต่อการตรวจหาทั้ง 2 ชั้น ซึ่งน่าจะเป็นยีนที่มีการแสดงออกในหลายชนิดของเซลล์หรือหลายอวัยวะ แต่เนื่องจากเป็นยีนใหม่ และยังไม่มีรายงานในพยาธิชนิดนี้หรือพยาธิในกลุ่มนี้ ประกอบกับยีนที่สังเคราะห์ได้นี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งของ 3'end ของยีนเท่านั้น ทำให้ยังไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้อย่างชัดเจนนัก จากการวิเคราะห์ข้อมูลเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล พบว่า มีเพียงช่วงสั้น ๆ ของ amino acid sequence เท่านั้นที่แสดงว่าคล้ายกับ conserved domain ของ ribonuclease 2-5A ซึ่ง domain นี้สามารถพบได้ในโปรตีนหลายกลุ่มซึ่งมีบทบาทหน้าที่แตกต่างกันไป โปรตีนกลุ่มสำคัญ ๆ ที่มี domain นี้ คือ

โปรตีนในกลุ่ม endoribonuclease/protein kinase (Ire1) ซึ่งพบใน *Caenorhabditis elegans* (Urano *et al.*, 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (Johnston *et al.*, 1994), *Mus musculus* (Wang *et al.*, 1998), *Candida albicans* (Jones *et al.*, 2004), *Homo sapiens* (Iwawaki *et al.*, 2001) และ *Hypocrea jecorina* (Valkonen *et al.*, 2004) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วยกัน 2 domain ที่มีหน้าที่ต่างกัน คือ domain ที่เป็น endoribonuclease มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิด hydrolysis ของ ester linkages ภายใน ribonucleic acid โดยทำให้พันธะแตกออก (<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=keyword&id=2245>) และ domain ที่เป็น protein kinase มีหน้าที่ กระตุ้นให้มีการขนส่ง phosphate group จาก ATP ไปยัง substrate (<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=keyword&id=2953>) และมีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในกลุ่ม endoribonuclease/protein kinase (Ire1) ในคนและในยีสต์ โดยในคนจะทำหน้าที่ในการรับรู้ unfolded proteins ใน lumen ของ endoplasmic reticulum แล้วจะกระตุ้นเอ็นไซม์ให้พร้อมที่จะทำงาน (enzyme auto-activation) ซึ่ง active endoribonuclease domain จะตัด XBP1 mRNA ทำให้เกิดปลาย C-terminus ใหม่ เปลี่ยนเป็น unfolded-protein response (UPR) กระตุ้นให้เกิด transcription เพื่อสร้างโปรตีนออกมาใหม่ ส่วน unfolded proteins จะหยุดการพัฒนาและสลายตัวไป (<http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?O75460>) ส่วนในยีสต์โปรตีนนี้จะรับรู้ unfolded proteins ใน lumen ของ endoplasmic reticulum เหมือนกับในคน แต่เอ็นไซม์จะตัด HAC1 precursor mRNA เกิด mRNA ที่สมบูรณ์ จากนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิด transcription ของ UPR target genes (<http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P32361>)

โปรตีนในกลุ่ม endoribonuclease/protein kinase (IRE2) ซึ่งพบใน *Mus musculus* (Wang *et al.*, 1998) และ *Homo sapiens* (Ota *et al.*, 2004) โดยโปรตีนในกลุ่ม endoribonuclease/protein kinase (Ire2) ทำหน้าที่ควบคุมการ transcription ผ่าน 28S ribosomal RNA ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อเกิด ER stress ซึ่งเอ็นไซม์นี้ไม่ผลต่อ unfolded-protein response (<http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q76MJ5>)

โปรตีนในกลุ่ม protein kinase ซึ่งพบใน *Saccharomyces cerevisiae* (Nikawa and Yamashita, 1992), *Caenorhabditis elegans* (Shen *et al.*, 2001) และ *Entamoeba histolytica* (Loftus *et al.*, 2005) โดยโปรตีนในกลุ่ม protein kinase ในคนจะทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิด phosphorylation ที่ threonine และ tyrosine residue ใน Thr-Glu-Tyr sequence ใน MAP kinases ได้เป็น activates ERK1 and ERK2 MAP kinases ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์(differentiation)

(<http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q02750>) และในยีสต์ KSS1, FUS3 เป็น final kinase ใน signal transduction cascade ควบคุมการ mating และ filamentation pathways ซึ่งกระบวนการนี้ถูกเหนี่ยวนำโดย pheromone และปริมาณของ nitrogen/carbon การเกิด Phosphorylated FUS3 กระตุ้นการ mating แต่ยับยั้ง filamentation pathway ในขณะที่ activated KSS1 กระตุ้นทั้ง 2 pathways การทำงานของ FUS3 ที่ถูกกระตุ้นโดย pheromone จะไปยับยั้งการจับกันของ กับ filamentation specific genes แต่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกัน mating specific genes กับ transcriptional activator STE12 เข้าด้วยกัน ส่วน non-activated FUS3 มีผลยับยั้ง STE12 transcriptional activity ในบางครั้งเมื่อ FUS3 ขาดแคลน KSS1 สามารถทำงานทดแทนได้บางส่วนแต่จะเกิดการ mating ลดลง (<http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P16892>)

โปรตีน 2-5A-dependent ribonuclease (Ribonuclease L) (RNase L) ซึ่งพบใน *Gallus gallus* โดยโปรตีน 2-5A-dependent ribonuclease (Ribonuclease L) (RNase L) ทำหน้าที่เป็น Endoribonuclease ซึ่งเป็นสารสื่อของ interferon action โดยเป็นสื่อให้มีความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสและเกิดการสลายของเซลล์ และอาจมีบทบาทในการควบคุม mRNA turnover (<http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q05823>)

โปรตีน exosome complex exonuclease ซึ่งพบใน *Saccharomyces cerevisiae* (Sterky *et al.*, 1996) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ exosome 3' -> 5' exoribonuclease complex เพื่อทำให้เกิด 3'processing ของ 7S pre-RNA ให้กลายเป็น 5.8S rRNA และทำให้ 18S and 25S rRNAs สมบูรณ์ อีกทั้งยังสามารถตัด spacer sequence และทำให้เกิดการสลายของ mRNA และอาจทำลาย pre-rRNAs ที่ผิดปกติได้ (<http://au.expasy.org/uniprot/P25359>)

โปรตีน aminopeptidase ซึ่งพบใน *Bacillus halodurans* (Takami *et al.*, 1999) โดยโปรตีน aminopeptidase ทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ตัด amino acid ชนิด methionine ที่อยู่ที่ต้นสายของการสร้างโปรตีน (<http://au.expasy.org/uniprot/Q9Z9J4>)

จากการเปรียบเทียบดังกล่าวจะเห็นว่า ยีนที่สังเคราะห์ได้นั้นส่วนใหญ่มี conserved domain ที่พบในโปรตีนกลุ่ม endoribonuclease/protein kinase และ protein kinase ทำให้มีความน่าจะเป็นไปได้ที่ว่ายีนที่สังเคราะห์ได้น่าจะเป็นช่วงหนึ่งของยีนในกลุ่ม protein kinase ที่มีช่วงของ endoribonuclease อยู่ส่วนหนึ่ง ซึ่งในการทดลองนี้สังเคราะห์ได้เพียงช่วงสั้น ๆ ของยีนที่เป็นช่วงของ endoribonuclease คือ ribonuclease 2-5A

การสังเคราะห์ recombinant VgFg 28

จากการค้นพบยีนที่มีการแสดงออกในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย คือ VgFg 28 (cDNA ที่สร้างจาก RNA ซึ่งสกัดจาก vitelline gland area) ซึ่งเป็น clone ที่ให้ผลบวกจากการคัดเลือก clone ของแบคทีเรียต่อการตรวจหาทั้ง 2 ขั้นตอน คือ การตรวจหาด้วย probe ที่สังเคราะห์จาก vitelline gland area และการตรวจหาด้วย DIG-labeled cDNA probe ที่สร้างจาก RNA ที่สกัดจาก testicular area ซึ่งการผลิต probe ด้วยวิธีการนี้จะสร้าง cDNA จาก mRNA เฉพาะยีนที่มีการแสดงออกจำนวนมาก ดังนั้นผลของการตรวจหายีนจะต้องแสดงออกจำนวนมาก และน่าจะเป็นยีนที่มีการแสดงออกในเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะหลายชนิด แต่ VgFg 28 เป็นยีนใหม่และยังไม่มีรายงานในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* รวมไปถึงพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ ด้วย โดยที่ VgFg 28 ที่สังเคราะห์ได้นั้นเป็นเพียงส่วนหนึ่งของ 3' end ของยีนเท่านั้น ทำให้ยังไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้อย่างชัดเจน แต่จากการวิเคราะห์ข้อมูลแล้วนำไปเทียบกับฐานข้อมูล พบว่ามี amino acid sequence บางส่วนคล้ายกับ conserve domain ของ ribonuclease 2-5A ซึ่ง domain ลักษณะนี้สามารถพบได้ในโปรตีนกลุ่ม endoribonuclease/protein kinase และ protein kinase ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงได้สังเคราะห์ recombinant clone VgFg 28 protein (rVgFg 28) จากการนำ cDNA clone VgFg 28 มาตัดต่อเข้า pET-30c⁺ expression vector ที่ตำแหน่ง EcoRI และ XhoI (pET30-VgFg28) แล้วนำไป transformed เข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) (BL21-pET30-VgFg28) และเพาะเลี้ยงใน LB broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 จากนั้นกระตุ้นด้วย IPTG และทำการเก็บเซลล์ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำการแยกโปรตีนด้วย 12.5% SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนขนาด 25 kDa ปรากฏขึ้นในโปรตีนที่สกัดมาจาก BL21-pET30-VgFg28 หลังการกระตุ้นด้วย IPTG ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของ recombinant VgFg28 ที่คำนวณได้จากลำดับ amino acid และจากการสังเคราะห์โปรตีนดังกล่าวข้างต้นนี้มีความเป็นไปได้สูงที่โปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นนี้จะ เป็น rVgFg 28 protein เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันมาก

การทำบริสุทธิ์ Recombinant VgFg 28 protein

จากการนำ BL21-pET30-VgFg28 ที่ตรวจสอบแล้วว่าการแสดงออกของแถบโปรตีนที่ 25 kDa มาทำการเพาะเลี้ยงและกระตุ้นด้วย IPTG แล้วนำไปสกัด inclusion protein มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Protino[®] Ni-IDA column แล้วทำการเก็บ fractions ต่าง ๆ นำไปแยกแถบโปรตีนด้วย 12.5% SDS PAGE และย้อมด้วยสี coomassie blue พบว่าใน denature BL21-pET30-VgFg28 extracted protein มีแถบโปรตีนขนาด 25 kDa ในปริมาณมากที่สุด ในขณะที่ column flowed through protein พบแถบโปรตีนดังกล่าวลดลง แสดงว่าโปรตีนที่ 25 kDa บางส่วนจับติดกับ column ทำให้แถบโปรตีนขนาดดังกล่าวมีความเข้มข้นน้อยลงในโปรตีนที่ผ่าน column แล้ว นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ใน column washed protein 1 และ 2 ส่วน แสดงว่ามีโปรตีนที่มีปริมาณมากกว่าที่ประสิทธิภาพของ column จะจับได้หมด ดังนั้นจึงมีโปรตีน

ขนาดดังกล่าวถูกชะล้างออกมากับ washing buffers ด้วย และจากการที่ column eluted protein 1 พบแถบโปรตีนจำนวน 7 แถบ โดยแถบโปรตีนที่ 25 kDa มีความเข้มมากที่สุด และไม่พบแถบโปรตีนใดๆ ใน column eluted protein 2 และ 3 แสดงว่ามีการปนเปื้อนโปรตีนจากแบคทีเรีย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Ni-IDA column มี ligands สำหรับจับกับ His-tag จำนวนถึง 3 ligands ซึ่งมีความไวต่อกับกับ histidine สูงมาก และทำให้มีโอกาสที่โปรตีนของแบคทีเรียที่มีองค์ประกอบของ histidine สูง สามารถจับกับ column ได้ ในการนี้ถ้าต้องการได้ his-tag protein ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นอาจต้องใช้ column ที่มีความไวน้อยลงเช่น Ni-NTA หรือ Ni-TED

การผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ Recombinant VgFg 28 protein

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 28 protein เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาคุณลักษณะและความจำเพาะของ rVgFg 28 protein ด้วยวิธี western immunoblotting โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunized) ของหนูขาว (Wista rat) เพศเมียในครั้งแรกด้วยการสกัดและทำบริสุทธิ์ BL21-pET30-VgFg28 จนได้เป็น column eluted protein 1 ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ทาง subcutaneous โดยร่างกายของหนูจะมีการสร้าง antibody ชนิด IgM ตอบสนองต่อ rVgFg 28 ในระยะเวลา 7-10 วัน และ antibody ชนิดนี้จะค่อยๆ ลดลงในช่วงวันที่ 7 ของการ immunized เรียกการตอบสนองระยะแรกนี้ว่า primary immune response หลังจากนั้นอีก 14 และ 28 วัน immunized ด้วย column eluted protein 1 ที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant (IFA) ซึ่งเป็น antigen ชนิดเดิม ร่างกายหนูจะเกิดการตอบสนองที่เรียกว่า secondary immune response ซึ่งจะใช้เวลาสั้นลงเพียง 2-7 วัน และมีการสร้าง antibody ชนิด IgG เพิ่มสูงขึ้นและมีปริมาณมากในช่วงวันที่ 12 ของการได้รับ antigen และหลังจากการ immunized ครั้งสุดท้ายประมาณ 1 สัปดาห์ เก็บเลือดจากหัวใจหนูแล้วนำไปแยกเม็ดเลือดเพื่อเก็บ serum แล้วนำมาตรวจหาค่า titer ของ polyclonal antibody ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า immunized rat serum เริ่มมีค่า OD₄₅₀ สูงกว่า preimmunized rat serum ที่ความเข้มข้น 1:409,600 และค่า OD₄₅₀ ของ immunized rat sera มีการเปลี่ยนแปลงสูงขึ้นและคงที่ที่ 1:3,200 จากผลการทดลองสามารถคำนวณหาค่า titer ของ polyclonal antibody ได้เท่ากับ 1:25,600 แสดงว่า polyclonal antibody ที่ได้มีความเข้มข้นสูงมาก ถึงแม้ว่าจะมีการเจือจางลงอย่างมากก็สามารถตรวจหาแอนติเจนได้

การทดสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 28 protein ด้วยวิธี western immunoblotting

จากการนำ column eluted protein 1 (rVgFg 28) มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้ว transfer โปรตีนลง nitrocellulose membrane จากนั้นนำไปตรวจสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ด้วยวิธี western immunoblotting โดยใช้ preimmunized rat serum และ immunized rat serum เป็น probe พบว่า มีแถบโปรตีนที่

ผลบวกจำนวน 1 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa จากจำนวนแถบโปรตีนทั้งหมด 7 แถบ เนื่องจากโปรตีนขนาดดังกล่าวมีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับโปรตีนอื่นๆ ทำให้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูได้ดีกว่า ดังนั้นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแถบดังกล่าวจึงมีปริมาณสูงกว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแถบอื่น ๆ จึงทำให้ปรากฏแถบโปรตีนที่แสดงผลบวกเพียงแถบเดียวเท่านั้น

และเมื่อนำ WB-extract protein (native *F. gigantea* protein) มาตรวจสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น พบว่า WB-extract protein มีแถบโปรตีนที่แสดงผลบวกจำนวน 3 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 63, 56, 25 kDa โดยมีแถบโปรตีนที่ 25 kDa มีความเข้มมากที่สุด จากจำนวนทั้งหมด 12 แถบ อย่างไรก็ตามจากข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถระบุได้ว่าแถบโปรตีนใดเป็นโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษา เนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาเป็น polyclonal antibodies ซึ่งสามารถจับกับโปรตีนได้หลาย epitopes ซึ่งโปรตีนจากพยาธิ *F. gigantea* อาจมี epitope ที่คล้ายคลึงกันมากกว่าหนึ่งโปรตีน นอกจากนี้ rVgFg28 protein เป็นโปรตีนที่มี His-tag อยู่และไม่ได้ทำการตัดออกก่อนการนำไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง จึงอาจมีแอนติบอดีที่เจาะเพาะกับ His-tag และแอนติบอดีดังกล่าวอาจจับกับ histidine rich protein ทำให้ polyclonal antibodies ดังกล่าวสามารถจับกับโปรตีนได้มากกว่า 1 แถบโปรตีน

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 28 protein ได้ และมีความจำเพาะกับ rVgFg 28 protein ที่น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa

จากการนำ column eluted protein 1 (rVgFg 28) มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้ว transfer โปรตีนลง nitrocellulose membrane จากนั้นนำไปตรวจสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ด้วยวิธี western immunoblotting โดยใช้ preimmunized rat serum และ immunized rat serum เป็น probe พบว่า มีแถบโปรตีนที่แสดงผลบวกจำนวน 1 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa จากจำนวนแถบโปรตีนทั้งหมด 7 แถบ เนื่องจากโปรตีนขนาดดังกล่าวมีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับโปรตีนอื่นๆ ทำให้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูได้ดีกว่า ดังนั้นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแถบดังกล่าวจึงมีปริมาณสูงกว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแถบอื่นๆ จึงทำให้ปรากฏแถบโปรตีนที่แสดงผลบวกเพียงแถบเดียวเท่านั้น

และเมื่อนำ WB-extract protein (native *F. gigantea* protein) มาตรวจสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น พบว่า WB-extract protein มีแถบโปรตีนที่แสดงผลบวกจำนวน 3 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 63, 56, 25 kDa โดยมีแถบโปรตีนที่ 25 kDa มีความเข้มมากที่สุด จากจำนวนทั้งหมด 12 แถบ อย่างไรก็ตามจากข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถระบุได้ว่าแถบโปรตีนใดเป็นโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษา เนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาเป็น polyclonal antibodies ซึ่งสามารถจับกับโปรตีนได้หลาย epitopes ซึ่งโปรตีนจากพยาธิ *F. gigantea* อาจมี epitope ที่คล้ายคลึงกันมากกว่าหนึ่งโปรตีน นอกจากนี้

rVgFg28 protein เป็นโปรตีนที่มี His-tag อยู่และไม่ได้ทำการตัดออกก่อนการนำไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง จึงอาจมีแอนติบอดีที่เจาะเพาะกับ His-tag และแอนติบอดีดังกล่าวอาจจับกับ histidine rich protein ทำให้ polyclonal antibodies ดังกล่าวสามารถจับกับโปรตีนได้มากกว่า 1 แอปโปรตีน อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษา 2-5A-dependent ribonuclease (Ribonuclease L) ที่พบใน murine EAT cell มีน้ำหนักโมเลกุล 185 kDa (Slattery *et al.*, 1979) แต่ใน mouse spleen พบที่ 185 kDa และ 40 kDa ขึ้นอยู่กับแต่ละ species (Bisbal *et al.*, 1989) ใน human cell lines พบที่ 40, 46, 67 และ 100 kDa โดยน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันพบในบริเวณที่แตกต่างกัน เช่น 100 kDa ใน microsome, 67, 46 และ 40 kDa พบใน nuclei, 67 kDa ใน membrane structures และพบมากใน plasma membrane ของเซลล์ Daudi lymphoblastoid (Chebath *et al.*, 1987) และ human Daudi cell ในรูป heterodimer พบที่ 160 kDa (Salehzasa *et al.*, 1993) และจาก peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของมนุษย์ พบในรูป homodimer ที่น้ำหนักโมเลกุล 80 kDa (Robert *et al.*, 2009) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากการทดลองอาจสรุปได้ว่า VgFg 28 protein ที่พบใน WB-extract protein มีน้ำหนักโมเลกุล 63 kDa ซึ่งเป็นน้ำหนักที่ใกล้เคียงมากที่สุดและจากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสามารถผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ rVgFg 28 protein ได้ และค่อนข้างมีความจำเพาะกับ rVgFg 28 protein ที่น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa

การตรวจหาบริเวณที่พบ rVgFg 28 protein ในพยาธิ *F. gigantica* ด้วยวิธี immunoperoxidase staining

จากการใช้ polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อ rVgFg 28 ของพยาธิ *F. gigantica* เพื่อตรวจหาตำแหน่งของเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะที่สามารถจับได้ด้วย immunized rat serum และ preimmunized rat serum ด้วยวิธี immunoperoxidase โดยเกิดตะกอนสีแดงจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง HRP-conjugated goat anti rat IgG และ AEC substrate จากนั้นย้อมสีนิวเคลียสด้วย Mayer's haematoxylin พบว่าทั้ง preimmunized และ immunized rat sera ได้ผลไม่แตกต่างกัน คือพบผลบวกของปฏิกิริยาเกิดเป็นตะกอนสีแดงเข้มใน ท่อระบบขับถ่าย (excretory bladder) อัณฑะ (Testis) ลำไส้ (Caecum) ในส่วนของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ Mehlis' gland cells และไข่ (Egg) โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณเปลือกไข่ (Eggshell) ในขณะที่เนื้อเยื่อปกคลุมร่างกาย (Tegument) หนาม (spine) เนื้อเยื่อค้ำจุน (Parenchyma cell), Vitelline gland และในเนื้อกล้ามเนื้อ (Muscular tissue) ให้ผลลบ

จากผลการตรวจหาตำแหน่งการกระจายของ VgFg 28 protein ให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่ม control เนื่องจากสัตว์ทดลองอาจมีการติดเชื้อแล้วสร้างภูมิคุ้มกันออกมาซึ่งจำเพาะกับการแสดงออกของโปรตีนที่พบได้ในพยาธิ จึงพบตะกอนสีแดงในบริเวณดังกล่าวข้างต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีแสดงออกของ mRNA ที่สร้างจาก *BmRLI* ซึ่งเป็น Ribonuclease L inhibitor (RLI) ที่สกัดจากตัวไหม (silkworm, *Bombyx mori*) ในตำแหน่งของ testis, ovary และ

fat body (Maeda *et al.*, 2005) ดังนั้นจากการทดลองนี้น่าจะพบตำแหน่งการกระจายของโปรตีนที่ศึกษา (VgFg 28 protein) ในบริเวณของ testis และ ovary เช่นกัน

หนังสืออ้างอิง

- Bae YA, Kim SH, Cai GB, *et al.* Differential expression of *Paragonimus westermani* eggshell proteins during the developmental stages. *Int J Parasitol* 2007; 37: 295-305.
- Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Dalton, J. P. and Goni, F. (2000). *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp Parasitol*.94: 9099-9110.
- Bisbal, C., Salehzada, T., Lebleu, B. and Bayard, B. (1989). Characterization of two murine (2'-5')(A)_n-dependent endonucleases of different molecular mass. *FEBS*, 179(3), 595-602.
- Bobek LA, Rekosh DM, Keulen H, LoVerde PT. Small gene family encoding an eggshell (chorion) protein of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol Cell Biol* 1988; 8:3008-16.
- Chen LL, Rekosh DM, LoVerde PT. *Schistosoma mansoni* p48 eggshell protein gene: characterization, developmentally regulated expression and comparison to the p14 eggshell protein gene. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 52: 39-52.
- Chaithirayanon K., Wanichanon C., Vichasri-Grams S., Ardseungneon P., Grams R., Viyanant V., Upatham E.S., & Sobhon P., (2002). Production and characterization of a monoclonal antibody against 28.5 kDa tegument antigen of *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica*; 84, 1-8.
- Chebath, J., Benech, P., Hovanessian, A., Galabru, J. and Revel, J. (1987). Four Different Forms of Interferon-induced 2',5'-Oligo(A) Synthetase Identified by Immunoblotting in Human Cells. *J. Biol. Chem.* 262(8),3852-3857.
- Dawes, B. (1960). Elucidation of the life-cycle of *Fasciola hepatica*. *Nature*. 185: 331-332.
- Dalton, J. P. (1999). *Fasciolosis*. CABI Publishing, New York.
- Dalton, J. P., McGonigle, S., Rolph, T. P. and Andrews, S. J. (1996). Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun* 64: 5066-5074.
- Dong, B. and Silverman R.H. (1995). 2-5A-dependent RNase Molecules Dimerize during Activation by 2-5A. *J. Biol. Chem.* 270, 4133-4137.

- Echenique-Elizondo, Miguel., Amondarain, Jose., Robles, Carlos Liron de. (2005). Fascioliasis: An Exceptional Cause of Acute Pancreatitis. *J Pancreas*. 6(1): 36-39.
- Gonzalo-Orden, M., Millan, L., Alvarez, M., Sanchez-Campos, S., Jimenez, R., Gonzalez-Gallego, J., Tunon, M. J. (2003). Diagnostic imaging in sheep hepatic fascioliasis: ultrasound, computer tomography and magnetic resonance findings. *Parasitol Res*. 90: 359–364.
- Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A. and Kohno, K.. (2001). Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nature Cell Biology*. 3(2): 158-164.
- Johnston, M., Andrews, S., Brinkman, R., Cooper, J., Ding, H., Dover, J., Du, Z., Favello, A., Fulton, L. and Gattung S.. (1994). Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII. *Science*. 265(5181): 2077-2082.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Newport, G., Thorstenson, Y. R., Agabian, N., Magee, P. T., Davis, R. W. and Scherer, S.. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(19): 7329-7334.
- Kendall, S.B. (1965). Relationships between the species fasciola and their molluscan. – *Adv. Parasitol*. 3: 59-98.
- Lee M, Chung YB, Lee SK, *et al*. The identification of *Clonorchis sinensis* gene encoding an egg antigenic protein. *Parasitol Res* 2005; 95: 224-6.
- Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M. and Hirt, R. P.. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 433(7028): 865-868.
- Meepool A, Wanichanon C, Viyanant V, Sobhon P. Development and roles of vitelline cells in eggshell formation in *Fasciola gigantica*. *Invertebr Reprod Dev* 2006; 49: 9-17.
- Michel A, Knobloch J, Kunz W. P19: a female and tissue specifically expressed gene in *Schistosoma mansoni*, regulated by pairing with the male. *Parasitology* 2003; 127: 519-24.
- Maeda, T., Lee, J.M., Miyagawa, Y., Koga, K., Kawaguchi, Y. and Kusakabe, T. (2005). Cloning and characterization of a ribonuclease L inhibitor from the silkworm, *Bombyx mori*. *Mitochondrial DNA*. 16, 21-27.

- Nikawa, J., and Yamashita, S.. (1992). IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 6(11): 1441-1446.
- Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., Wakamatsu, A., Hayashi, K., Sato, H., Nagai, K., Kimura, K. and Makita, H.. (2004). Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nature Genetic.* 36(1): 40-45.
- Piacenza, L., Acosta, D., Dowd, A., McGonicle, S., Dalton, J.P., Carmona, C.. (1997). Cathepsin L proteinases secreted by *Fasciola hepatica*: inhibitory effect of serum from experimentally infected rabbits demonstrated by gelatin-substrate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Helminthology.* 71: 333-338.
- Piacenza, L., R. Radi, F. Gon~ I and Carmona, C.. (1998). CuZn superoxide dismutase activities from *Fasciola hepatica*. *Parasitology.* 117: 555–562.
- Piedrafita, D., Raadsma, H.W., Prowse, R., and Spithill, T.W. (2004). Immunology of the host–parasite relationship in fasciolosis (*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*). *Can. J. Zool./Rev. Can. Zool.* 82(2): 233-250
- Rice-Ficht AC, Dusek KA, Kochevar GJ, Waite JH. Eggshell precursor proteins of *Fasciola hepatica*, I structure and expression of vitelline protein B. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 54: 129-41.
- Ruangsittichai J, Viyanant V, Vichasri-Grams S, *et al.* *Opisthorchis viverrini*: identification of a glycine-tyrosine rich eggshell protein and its potential as a diagnostic tool for human opisthorchiasis. *Int J Parasitol* 2006; 36: 1329-39.
- Salehzasa, T., Silhol, M., Steff, A.M., Lebleu, B. and Bisbal, C. (1993). 2',5'-Oligoadenylate-dependent RNase L is a dimer of regulatory and catalytic subunits. *J. Biol. Chem.* 268, 7733-7740.
- Shaker, Z. A., Demerdash, Z. A., Mansour, W. A., Hassanein, H. I., el Baz, H. G., el Gindy, H. I. (1994). Evaluation of specific *Fasciola* antigen in the immunodiagnosis of human fascioliasis in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* 24(3) : 463-470.
- Shen, X., Ellis, R. E., Lee, K., Liu, C. Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D. M., Mori, K. and Kaufman, R .J.. (2001). Complementary Signaling Pathways Regulate the Unfolded Protein Response and Are Required for *Caenorhabditis elegans* Development. *Cell.* 107(7): 893-903.

- Slattery, E., Ghosh, N., Samanta, H. and Lengyel, P. (1979). Interferon, double-stranded RNA, and RNA degradation: activation of an endonuclease by (2'-5')A_n. *PNAS*, 76, 4778-4782.
- Smither, S. R. (1982). Fascioliasis and other trematode infection. In : Cohen, S., Warren, K. S. eds. *Immunology of parasitic infections*. 2 nd ed. London : Blackwell, Scientific Publication.
- Sobhon P., Anatavara S., Dangprasert T., Viyanant V., Krailas D. & Upatham E.S. (1998). *Fasciola gigantica*: studies of the tegument as a basis for the development of immunodiagnosis and vaccine. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health*; 29, 387-400.
- Sterky, F., Holmberg, A., Pettersson, B. and Uhlen, M.. (1996). The sequence of a 30 kb fragment on the left arm of chromosome XV from *Saccharomyces cerevisiae* reveals 15 open reading frames, five of which correspond to previously identified genes. *Yeast*. 12 (10): 1091-1095.
- Sukhapesna, V., Tantasuvan, D., Sarataphan, N. and Imsup, K. (1994). Economic impact of fascioliasis in buffalo production. *J Thai Vet Med Assoc*. 45: 45-52.
- Sugiyama H, Kawanaka M, Kameoka Y, Nakamura M. A novel cDNA clone of *Schistosoma japonicum* encoding the 34,00 dalton eggshell precursor protein. *Int J Parasitol* 1997; 27: 811-17.
- Suhadolnik, R.J., Peterson, D.L., O'Brien, K., Cheney, P.R., Herst, C.V.T., Reichenbach, N.L., Kon, N., Horvath, S.E., Iacono, K.T., Adelson, M.E., Meirleir, K.D., Becker P.D., Charubala, R. and Pfeleiderer W. (1997). Biochemical Evidence for a Novel Low Molecular Weight 2-5A-Dependent RNase L in Chronic Fatigue Syndrome. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 17(7), 377-385.
- Takami, H. and Horikoshi, K.. (1999). Reidentification of facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. C-125 to *Bacillus halodurans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 63: 943-945.
- Trudgett A., McNair A.T., Hoey E.M., Keegan P. S., Dalton J. P., Rima B. K., Miller A. and Ramasamy P. (2000). The major tegumental antigen of *Fasciola hepatica* contains repeated elements. *JP*; 121, 185-191.
- Urano, F., Calfon, M., Yoneda, T., Yun, C., Kiraly, M., Clark, S. G. and Ron, D.. (2002). A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. *J Cell Biol*. 158(4): 639-646.

- Valkonen, M., Penttilä, M. and Saloheimo, M.. (2004). The ire1 and ptc2 genes involved in the unfolded protein response pathway in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Mol. Genet. Genomics*. 272(4): 443-451.
- Viyanant V., Upatham E.S., Sobhon P Krailas D Ardseungnoen P., & Anatavara S. (1997). Development and characterization of monoclonal antibodies against excretory-secretory antigens of *Fasciola gigantica*. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health*; 28, 128-133.
- Waite JH, Rice-Ficht AC. Presclerotized eggshell protein from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Biochemistry* 1987; 26: 7819-25.
- Wang, X. Z., Harding, H. P., Zhang, Y., Jolicoeur, E. M., Kuroda, M. and Ron, D.. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J*. 17(19): 5708-5717.
- Wells KE, Cordingley JS. *Schistosoma mansoni*: eggshell formation is regulated by pH and calcium. *Exp Parasitol* 1991; 73: 295-310.
- Yang HJ, Park SJ, Im KI, Yong TS. Identification of a *Clonorchis sinensis* gene encoding a vitellaria antigenic protein containing repetitive sequences. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 111: 213-6.
- Zurita M, Bieber D, Ringold G, Mansour TE. Cloning and characterization of a female genital complex cDNA from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2340-44.
- Zurita M, Bieber D, Mansour TE. Identification, expression and in situ hybridization of an eggshell protein gene from *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 37: 11-17.

Output จากโครงการ

1. ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ

1. Cloning, characterization, expression of tegumental protein and its encoding gene of Fasciola gigantica. (อยู่ระหว่างดำเนินการ)

2. การจดทะเบียน cDNA ในฐานข้อมูลนานาชาติ

1. Fasciola gigantica vitelline protein BII mRNA, complete cds, GenBank No: EF110993.1
2. Fasciola gigantica vitelline protein BI mRNA, complete cds GenBank No: EF108313.1
3. Fasciola gigantica tegumental antigen mRNA; อยู่ระหว่างดำเนินการ
4. Fasciola gigantica tetraspanin like protein mRNA; อยู่ระหว่างดำเนินการ
5. Fasciola gigantica protein kinase / endoribonulcease like protein mRNA; อยู่ระหว่างดำเนินการ
6. Fasciola gigantica carboxyltransferase like protein mRNA; อยู่ระหว่างดำเนินการ

3. การนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

1. Meepool A, Sobhon P. Cloning, identification and characterization of genes encoding eggshell proteins in Fasciola gigantica. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส (poster presentation) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมการวิจัย 2548; หน้า 49
2. Meepool A, Sobhon P. Cloning, Characterization and Expression of Tegumental antigen of Fasciola gigantica. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส (oral presentation) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมการวิจัย 2549; หน้า 74

4. โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) คณะวิทยาศาสตร์ และ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1. อิศรา ลิ้มเพชรงาม. การสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของยีนที่แสดงออกในพยาธิใบไม้ตับ ตัวเต็มวัย Fasciola gigantica. โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 2548, 64 หน้า.
2. สุรชาติพย์ ชัยเขว้า. Cloning, expression and purification of tegumental antigen in Fasciola gigantica. โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 2549, 79 หน้า.
3. อังศดา พูลสวัสดิ์. Production and characterization of polyclonal antibodies against recombinant tegumental antigen protein (rVgFg16) of Fascola gigantica. โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 2553 (อยู่ระหว่างดำเนินการ).
4. ศศิณภา กระจ่างศรี. Production and characterization of polyclonal antibodies against recombinant protein kinase / endoribonulcease like protein (rVgFg28) of Fascola gigantica. โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 2553 (อยู่ระหว่างดำเนินการ).

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ vitelline protein BII mRNA ของ *fascola gigantica* ที่ลงทะเบียนในฐานข้อมูล Gen Bank

GenBank: EF110993.1

Fasciola gigantica vitelline protein BII mRNA, complete cds

LOCUS EF110993 908 bp mRNA linear INV 10-DEC-2006
 DEFINITION *Fasciola gigantica* vitelline protein BII mRNA, complete cds.
 ACCESSION EF110993
 VERSION EF110993.1 GI:118738181
 KEYWORDS .
 SOURCE *Fasciola gigantica*
 ORGANISM [Fasciola gigantica](#)
 Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea;
 Echinostomida; Echinostomata; Echinostomatoidea; Fasciolidae;
Fasciola.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 908)
 AUTHORS Meepool,A., Homwutthiwong,K., Grams,R., Vichasri-Grams,S.,
 Wanichanon,C., Viyanant,V., Upatham,E.S. and Sobhon,P.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (09-NOV-2006) Medical Science, Faculty of Science,
 Burapha University, Chonburi 20131, Thailand
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..908
 /organism="Fasciola gigantica"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:[46835](#)"
 /dev_stage="adult"
 /country="Thailand"
 CDS
 22..834
 /note="vit-BII"
 /codon_start=1
 /product="vitelline protein BII"
 /protein_id="ABL11192.1"
 /db_xref="GI:118738182"
 /translation="MKSTLVLLLAIVPLTLALYPHGEFNRHASYYDDREKHRGYRKEND
 YLNYYDLKGFAGHGKAYLHGSFDKYGNENERGYDDRGHSLAGKSTHDGKYDMYGRM
 YAKGEFDAHGHEKEGTFEEYTKFRRGGGFGGYGKKSYDDYDTKGYLKRFADKGIKS
 KFDLYGNVGAAGKYDAYRKMGALGKFDSYGYDQYQKMYDQGYEEAGKYNAHGNLNL
 YGHLLRRYGGSSAASKSENYGNARESGRYEPYGRYEKEDDYARETPYDKYSY"
 ORIGIN
 1 aatagatata accaaacgaa aatgaagtcc acttttagtgc ttttgttggc aatcgtccca
 61 ctcacacttg ctctataccc gcacggcgag ttcaacagac atgcctcata tgacgaccgt
 121 gagaacatc ggggatatcg aaaggagaat gactacttga actatgatct gaaggggaaa
 181 ttgcccggac acggcaaaagc atatttgcac ggtagcttcg acaaatacgg caacgagaat
 241 gaacggggga gatatgacga tcgaggccac cactctctcg cagggaaatc cactcacgat
 301 gggaaatatg atatgtacg tagaatgtat gccaaaggcg aatttgatgc ccacggtcat
 361 gagaaagagg gcacgaagtt cgaggaatac acgaaattcc gtcgtggtgg tggatttggg
 421 ggatatggaa agaagaagtc atacgatgat tatgacacaa agggatacct gaaacgattt
 481 gccgataaag gtataaaatc caaattcgac ttgtacggaa atgtgggagc taagggcaaa
 541 tatgatgcct accgaaagat ggggtgctcg ggcaaatcgc actcctatgg caaatacgat
 601 cagtatggca aaatgtacga tcaaggcaaa tatgaggaag ctggcaaaata caatgcgcac
 661 gggaacttag atctctatgg tcatctgagg agatacggtg gttcatctgc ggccagcaag
 721 agtgagaatt acgggaatgc acgtgaatcc ggacgatatg agccttatgg acgatatgag
 781 aaatatgagg atgattacgc gagggagact ccatatgaca aatacagtta ctaaaactcac
 841 aagggtgaacc actctccaac actggtaaat attgatttta ttatgataaa tataatccaaa
 901 aaaaaaaaa

//

ภาคผนวก 2

ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ **vitelline protein BI mRNA** ของ **fascola gigantea** ที่ลงทะเบียนในฐานข้อมูล Gen Bank

GenBank: EF108313.1

Fasciola gigantea vitelline protein BI (Vit-BI) mRNA, complete cds

LOCUS EF108313 896 bp mRNA linear INV 11-DEC-2006
 DEFINITION Fasciola gigantea vitelline protein BI (Vit-BI) mRNA, complete cds.
 ACCESSION EF108313
 VERSION EF108313.1 GI:118776351
 KEYWORDS .
 SOURCE Fasciola gigantea
 ORGANISM [Fasciola gigantea](#)
 Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea;
 Echinostomida; Echinostomata; Echinostomatoidea; Fasciolidae;
 Fasciola.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 896)
 AUTHORS Homwutthiwong,K., Meepool,A., Grams,R., Vichasri-Grams,S.,
 Wanichanon,C., Viyanant,V., Upatham,E.S. and Sobhon,P.
 TITLE Molecular cloning and expression of vitelline protein BI from
 Fasciola gigantea
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 896)
 AUTHORS Homwutthiwong,K., Grams,R., Vichasri-Grams,S., Wanichanon,C.,
 Viyanant,V. and Upatham,E.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (08-NOV-2006) Anatomy, Faculty of Science, Mahidol
 University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..896
 /organism="Fasciola gigantea"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:46835"
 /dev_stage="adult"
 /country="Thailand"
[gene](#) 1..896
 /gene="Vit-BI"
[CDS](#) 5..817
 /gene="Vit-BI"
 /codon_start=1
 /product="vitelline protein BI"
 /protein_id="[ABL14193.1](#)"
 /db_xref="GI:118776352"
 /translation="MKFTLVLLLAIVPLTLARHPHGKFNHRHASYDDREKHRGYRKEND
 YLNYDLKGKFAGHGKAYLHGSFDKYGNERGKYDDQKGYSLAGKSAHDGKYGMYGNM
 YAKGDFKAYGNEDEGAKFEEVTFRRGGGYDSYGKKSYDDYDTKGHLKKFANKGRQS
 KFDMYGNVKADGQAVSNGNMNAYGMFDSYGRHDQYGKMYDQKGYYEAGKYNAHGNLNL
 YGHLRGYGGSSAASKSENYGNAHESGRYEPYGRYEKYEDDYARETPYDKYSY"

ORIGIN

```

1  gaaaatgaaa  ttcactttag  tgcttctggt  ggcaatcgtc  ccactcacac  ttgctcgcca
61  cccgcacggc  aagtcaaca  gacatgcctc  atatgacgac  cgtgagaagc  atcggggata
121  tcgaaaggag  aatgactact  tgaactatga  tctgaagggg  aaatttgccg  gacacggcaa
181  agcatatttg  catggtagct  tcgacaaata  cggcaacgag  aatgaacggg  ggaaatatga
241  tgatcaaggc  aaatactccc  tagctggaaa  atcagctcac  gatggaaaat  atggtatgta
301  cggaaacatg  tatgccaagg  gtgacttcaa  agcttacgga  aatgaagatg  agggtagcga
361  atttgaggag  gttaccacct  tccgtcgtgg  tgggggatat  gacagctacg  ggaagaagaa
421  gtcgtatgat  gactatgaca  ccaagggcca  tttgaagaag  ttcgctaata  agggtagaca
481  atccaaattc  gatatgtatg  gaaacgtgaa  ggctgacggg  caagccgttt  ccaatggcaa
541  catgaacgcc  tacggtatgt  ttgactccta  tggcagacac  gatcagtatg  gcaaaatgta
601  cgatcaaggc  aaatatgagg  aagctggcaa  atacaatgcg  cacgggaact  tagatctcta
661  tggatcatctg  aggggatacg  gtggttcac  tcgagccagc  aagagtgaga  attacgggaa
721  tgacatgaa  tccggacgat  atgagcctta  tggacgatat  gagaatatg  aggtatgata
781  cgcgagggag  actccatatg  acaaatcacg  ttactaagtg  aacattatca  acctaaaagc
841  cggataatct  aaatgcactc  ataataaatg  ttagatatata  ccaaaaaaaaa  aaaaaa

```

//