



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การสังเคราะห์ยีนของเอนไซม์ leucine aminopeptidase จากพยาธิ  
ใบไม้ ตับ (*Fasciola gigantica*)

โดย วิฑูร ขาวสุข

เมษายน 2553

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ      การสังเคราะห์ยีนของเอนไซม์ leucine aminopeptidase จากพยาธิใบไม้  
ตับ (*Fasciola gigantica*)

ผู้วิจัย          วิฑูร ขาวสุข  
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา  
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ไม่สามารถสำเร็จลงไปได้ถ้าไม่มี สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณที่ได้ให้ความไว้วางใจและสนับสนุนทุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. ประเสริฐ โศภน ที่ปรึกษาโครงการวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ที่ให้โอกาสรวมทั้งทุกคำแนะนำที่มีคุณค่าในการทำวิจัย ตลอดจนเป็นแรงบันดาลใจในการทำงานและการต่อสู้ต่อปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัย

ขอขอบพระคุณคุณครู อาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่าง ๆ จนทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินการวิจัยลุล่วงลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณผู้บริหารภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ และผู้บริหารมหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนการทำวิจัยนี้ และได้อนุญาตให้ใช้เครื่องมือในการทำวิจัยตลอดจนสาธารณูปโภคต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มโครงการฯ จนกระทั่งสิ้นสุดโครงการฯ

ด้วยความรักและเคารพยิ่งของลูกที่มีต่อบิดา มารดา ขอกราบขอบพระคุณท่านทั้งสองที่ได้เลี้ยงดู สั่งสอน และสนับสนุนการในการเล่าเรียน รวมทั้งเป็นกำลังใจในการเล่าเรียนและการทำงาน จนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จได้ในปัจจุบัน

**Project Code:** MRG4780146

**Project Title:** Cloning and characterization of leucine aminopeptidase encoding gene of *Fasciola gigantica*

**Investigator :** Mr. Witoon Khawsuk

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

**E-mail address:** [Witoon@Buu.ac.th](mailto:Witoon@Buu.ac.th)

**Project period :** 1<sup>st</sup> July 2004 – 30<sup>th</sup> June 2006

This research is aimed to synthesize the nucleotide sequences of leucine aminopeptidase (LAP) encoding gene of *Fasciola gigantica*, which is the causative parasite of fasciolosis in the ruminants and human. The infection is leading to the damage of host's liver, the meat and milk productions are limited and resulting in economic loss. The study is divided into 2 parts; first part is the production of polyclonal antibody in the laboratory animals. The polyclonal antibody is used as a tool for studying the characteristics of *F. gigantica* LAP by using western immunoblotting and immunoperoxidase techniques. Then the polyclonal antibody is used for screening the LAP encoding gene from the  $\lambda$  Zap II cDNA library of adult *F. gigantica*. The second part is RT-PCR technique which used for produce the PCR product from the total mRNA from the adult *F. gigantica* by using specific primer.

The results found that the polyclonal antibody against LAP can be produced. This antibody can recognize LAP in every antigen fractions of *F. gigantica* as multiple bands at molecular size ranged 20-40 kDa. The expression of LAP in each stage of parasite is different. The highest relative amount of LAP is presented in embryonated egg fraction. Whereas, LAP is lower expressed in juvenile and adult parasites, respectively. The immunolocalization of LAP shows the strongest reaction in the fluid surrounding the miracidium in embryonated eggs. 4 week old-juveniles express LAP in caecal epithelium and bladder epithelium. Whereas, LAP of adult parasites express in the caecal epithelium and bladder epithelium. Moreover, LAP is found in the reproductive tract, that are head of spermatozoa, epithelium of seminal vesicle, epithelium of cirrus sac, the prostate gland's cells, mature vitelline cell, mature oocyte, Mehlis' gland cells and epithelium of uterus

The cDNA library screening by using this polyclonal antibody is negative. This might be caused by the unable to recognize of protein, which expressed in *E. coli*, by this antibody. The RT-PCR product is not the LAP encoding gene in every condition. This study is a basic knowledge of LAP which use as further study in immunodiagnosis and vaccine development.

**Keywords:** Leucine aminopeptidase, *Fasciola gigantica*, immunolocalization

รหัสโครงการ : MRG4780146

ชื่อโครงการ : การสังเคราะห์ยีนของเอนไซม์ leucine aminopeptidase จากพยาธิใบไม้ตับ (*Fasciola gigantica*)

ชื่อนักวิจัย : ดร.วิฑูร ขาวสุข

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

E-mail address: [Witoon@Buu.ac.th](mailto:Witoon@Buu.ac.th)

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2547 – 30 มิถุนายน 2549

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์ยีนสำหรับเอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAP) ในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ซึ่งพยาธิชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรค Fasciolosis ในปศุสัตว์รวมทั้งมนุษย์ ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของตับอย่างรุนแรง ส่งผลเสียต่อสุขภาพของปศุสัตว์ การศึกษาจะแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 คือ การผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ LAP ในสัตว์ทดลอง แล้วนำ polyclonal antibody ที่ได้ไปศึกษาลักษณะของเอนไซม์ LAP ของ *F. gigantica* ด้วยวิธี western immunoblotting และวิธี immunoperoxidase หลังจากนั้นจะนำ polyclonal antibody ไปเป็นเครื่องมือในการ screen หา LAP encoding gene จาก  $\lambda$  Zap II cDNA library ของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย ส่วนที่ 2 จะทำการตรวจหา sequence ของ LAP encoding gene ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ specific primer

ผลการทดลองพบว่า สามารถผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ LAP ได้ และเมื่อนำไปตรวจสอบคุณสมบัติของ LAP พบว่าสามารถตรวจพบ LAP ได้ในทุก fraction ของ antigen โดยจะปรากฏเป็น multiple band อยู่ระหว่าง น้ำหนักโมเลกุล 20-40 kDa โดยจะพบปริมาณสัมพัทธ์ของ LAP มากที่สุดในระยะไข่ ในขณะที่เพื่อพยาธิมีการเจริญเติบโตมากขึ้นจะมีปริมาณ LAP ที่ลดลงตามลำดับ จากการศึกษาด้วยวิธี immunoperoxidase พบว่าในระยะไข่พบ LAP มากบริเวณ fluid รอบ ๆ ตัว miracidium ที่อยู่ภายในไข่ ในขณะที่พยาธิระยะตัวอ่อนพบ LAP มากบริเวณเยื่อบุผิว caecum และเยื่อบุผิว bladder ในขณะที่พยาธิระยะตัวเต็มวัย พบ LAP มากในเยื่อบุผิว caecum bladder เช่นกัน นอกจากนี้ยังปรากฏในระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ ในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ พบได้ใน head ของ spermatozoa เยื่อบุผิวของ seminal vesicle cirrus sac และในเซลล์ของ prostate gland ส่วนระบบสืบพันธุ์เพศเมียพบ LAP ในเซลล์ vitelline ระยะที่ 5 oocyte ระยะที่ 4 เซลล์ Mehlis และบริเวณเยื่อบุผิว uterus

จากการนำ polyclonal antibody ที่ได้ไป screen หา LAP encoding gene จาก cDNA library พบว่าให้ผล negative ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก polyclonal antibody ที่ผลิตได้ไม่สามารถจดจำ LAP ที่ express ภายใน bacteria ได้ และการศึกษาด้วยวิธี RT-PCR พบว่า PCR product ที่ได้ไม่ใช่ LAP encoding gene ไม่ว่าใน condition ใด ๆ ของการศึกษา การศึกษาในครั้งนี้ถึงแม้ว่าจะไม่ประสบความสำเร็จดังที่คาดหวังไว้ แต่ผลการทดลองที่ได้บางส่วนน่าจะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา LAP ของ *F. gigantica* ได้ในอนาคต ทั้งในด้านการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunodiagnosis และการพัฒนา vaccine ต้านโรค fasciolosis ต่อไป

คำหลัก : Leucine aminopeptidase, *Fasciola gigantica*, immunolocalization

## บทนำ

พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* เป็นสาเหตุของโรค fasciolosis ทั้งในสัตว์ป่า ปศุสัตว์ รวมถึงมนุษย์ (Sukhapesna et al, 1989) พบการระบาดในเขตร้อนทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย (Kachintorn et al, 1988) เนื่องจาก fasciolosis ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ตับอย่างรุนแรง คือ ทำลาย parenchymal cells และอุดตันท่อน้ำดี ทำให้สัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิเติบโตช้าส่งผลให้ผลผลิตทางปศุสัตว์ได้แก่ เนื้อ ขน และการให้นมลดลง รวมถึงเป็นสาเหตุการตายในสัตว์ที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Sukhapesna et al, 1989) นอกจากจะเป็นปัญหาทางปศุสัตว์แล้ว fasciolosis ยังเป็นปัญหาทางเศรษฐกิจ โดยต้องจ่ายค่ารักษาและควบคุมโรคทั่วโลกประมาณ 200 ดอลลาร์สหรัฐต่อปี (Boray, 1988) ในประเทศไทยการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ทำให้มีการสูญเสียทางเศรษฐกิจประมาณ 300–400 ล้านบาทต่อปี (Srihakim และ Pholpark, 1991) ความชุกของการเกิดโรค fasciolosis พบ 30–90 % ในทวีปแอฟริกา 25-90 % ในประเทศ อินโดนีเซีย (Edney และ Muchlis, 1962 , Soesetya, 1975 และ Fabiyi, 1987) และ 4-24 % ในประเทศไทย โดยพบการระบาดมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือตามลำดับ (Pholpark และ Srikijakara, 1989 และ Sukhapena et al, 1994).

การวินิจฉัยโรค fasciolosis ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจนับไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อ แต่วิธีนี้มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอเนื่องจากไม่สามารถวินิจฉัยโรคในระยะแรกของการติดเชื้อได้ (Levine et al., 1980) นอกจากนี้ต้องใช้เวลาในการตรวจนาน อีกทั้งผู้ตรวจต้องมีความชำนาญ เนื่องจากไข่ของ *F. gigantica* มีความคล้ายคลึงกับพยาธิชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไข่พยาธิ *Fasciolopsis* sp., *Echinostroma* sp. (ประยงค์ ระดมยศ, 2545) ดังนั้นจึงมีผู้คิดค้นวิธีการวินิจฉัยโรคแบบใหม่ที่รวดเร็วและสะดวก คือวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunodiagnosis) ซึ่งเป็นการตรวจ serum antibody หรือ serum antigen โดยใช้ purified parasite antigen จับกับ serum antibody ของสัตว์ หรือคนที่ติดเชื้อแต่มีข้อจำกัดคือ การจับกันของ antigen-antibody ไม่มีความจำเพาะเท่าที่ควร เนื่องจากสามารถเกิด cross-reaction กับ serum antigen ที่ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่น ๆ ได้ (Schillhorn และ Buys, 1983, Mansour et al, 1983, Swarup et al, 1968,1987, Youssef และ Mansour, 1991) เมื่อตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหา serum antigen ในกลุ่ม excretory-secretory product พบว่าให้ผลที่แม่นยำมากที่สุด จึงเป็นโปรตีนที่มีการศึกษากันมากในปัจจุบัน (Langley และ Hillyer, 1989, Pfister et al, 1984, Sinclair และ Wassall, 1988 และ Sampaio-Silva et al, 1981) เมื่อใช้ polyclonal หรือ monoclonal antibody ที่ต้านต่อ excretory-secretory product อย่างจำเพาะจะทำให้ sensitivity ในการตรวจเพิ่มสูงขึ้น ปัจจุบันการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่นิยมคือ การตรวจหา *F.gigantica* surface tegumental antigen ในปศุสัตว์ซึ่งมีรายงานพบว่า การตรวจ tegumental antigen ที่น้ำหนักโมเลกุล 66 kDa ด้วย monoclonal antibody ให้ผลมี sensitivity ประมาณ 86.6-100 % (Viyanant et al, 1998).

การควบคุมโรคพยาธิชนิดนี้ทำได้ทั้งวิธีใช้ยาฆ่าพยาธิ ควบคุมคุณภาพของอาหารสัตว์ การทำลายหอยซึ่งเป็น intermediate host วิธีทางชีวภาพ และการใช้วัคซีนซึ่งกำลังจะเกิดขึ้นในอนาคต

การควบคุม intermediate host ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากมีปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมเข้าเกี่ยวข้องสูง ส่วนการใช้ยาฆ่าพยาธิแก่สัตว์ที่ติดเชื้อได้รับความนิยมน้อยในช่วงสูงในปัจจุบัน triclabendazole เป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อพยาธิตัวอ่อนอายุ 1 สัปดาห์หรือมากกว่านั้น (Sukhapesnan et al, 1989 และ Togerson และ Clexton, 1998) ยาชนิดนี้ให้ผลการรักษาสูงโดยเฉพาะในแกะซึ่งสามารถลดจำนวนพยาธิ (worm burden) ได้อย่างมีประสิทธิภาพและออกฤทธิ์นาน กลไกการออกฤทธิ์คือยับยั้งการทำงานของ microtubule เป็นผลให้เกิดการคั่งของ vesicle ภายในชั้นผิวของพยาธิ (Stitt และ Fairweather , 1993,1994) ยับยั้งกระบวนการสร้าง vitelline granule (Stitt และ Fairweather , 1996) และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Stitt et al, 1995) หลังการรักษาด้วย triclabendazole ทำให้จำนวนพยาธิลดลง แต่พยาธิที่ไม่ถูกฆ่าจะมีการต้อยาเมื่อให้การรักษาซ้ำด้วย triclabendazole (Boray, 1990,1997 และ Togerson และ Clexton, 1998) อีกประการหนึ่งยา triclabendazole มีราคาแพง จากข้อมูลข้างต้นจะพบข้อด้อยของการควบคุมด้วยยาฆ่าพยาธิและการควบคุม intermediate host จึงเป็นจุดเริ่มต้นในการศึกษาและผลิต vaccine ต่อต้านโรคพยาธิ fasciolosis ซึ่งวัคซีนน่าจะช่วยลดค่าใช้จ่ายและสามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้ในระยะยาว (Togerson และ Clexton, 1998)

การพัฒนาวัคซีนต่อต้าน *Fasciola* sp. เป็นไปตามแนวทางเดียวกับการพัฒนาวัคซีนต่อต้านพยาธิ schistosome (Wilson, 1998) โดยพบว่าสัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* สามารถต่อต้านการติดเชื้อพยาธิ *S. mansoni* ได้และในทางกลับกันสัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิ *S. mansoni* สามารถต่อต้านการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ได้เช่นกัน (Christensen, 1978) ซึ่งสามารถป้องกันการติดเชื้อ *S. mansoni* ได้ 81% เมื่อใช้ *F. hepatica* crude extract เป็นวัคซีน (Hilyer, 1979) ต่อมาการพัฒนาวัคซีนต้านโรค fasciolosis นิยมใช้โปรตีนบริสุทธิ์ (purified protein) ส่วนใหญ่ประกอบด้วยโปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพยาธิ เช่น fatty acid binding protein (FABP), glutathione s-transferase (GST), cathepsin L (Cat L) และ hemoprotein เมื่อ immunize โคหรือแกะด้วยโปรตีนบริสุทธิ์ข้างต้นสามารถลดจำนวนพยาธิและการผลิตไข่ลง 31-72% และ 69-98% ตามลำดับ ส่วนการศึกษาใน *F. gigantica* นอกจากโปรตีนบริสุทธิ์ที่กล่าวมาแล้ว ยังพบว่า tegumental membrane proteins (น้ำหนักโมเลกุล 28.5 และ 66 kD) มีแนวโน้มที่จะสามารถใช้เป็นวัคซีนได้เช่นกัน (Viyanant, 1998 และ Chaithirayanon, 2002) นอกจากนี้พบว่าเมื่อ immunize แกะ ด้วย Cat L ผสมกับ leucine aminopeptidase (LAP) พบว่าสามารถลดจำนวนพยาธิ ไข่พยาธิที่ปะปนในอุจจาระ จำนวนไข่ที่ฟักเป็นตัวพยาธิและรอยโรคที่ตับได้ (Piacenza et al, 1999)

เมื่อศึกษาโดยใช้วัคซีน DNA เทียบกับวัคซีนที่ศึกษาข้างต้น เนื่องจากการให้ DNA เป็นวัคซีนป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย (malaria) (Sedegah, 1994, Doolan, 1996 และ Hedstrom, 1996) และ Leishmania (Xu, 1995) ในหนู mice ได้สำเร็จ นอกจากนั้นยังมีการศึกษาใน schistosomes โดยใช้ DNA ของ paramyosin (Yang, 1995), GST (Waine, 1997, Dupre, 1999 และ Kayes, 1998), 23 kD surface membrane protein และ 22 kD antigen (Waine et al., 1999a ;1999b) เช่นกัน ส่วนการศึกษาใน *F. hepatica* โดยใช้ DNA encoding *F. hepatica* GST สามารถกระตุ้น immune response ของ host ได้ (Smooker, et al., 1999) นอกจากนี้ DNA ของ

cystein protease ของพยาธิ *F. hepatica* สามารถป้องกันการติดเชื้อในหนู rat เพศผู้และเพศเมียได้ 100% และ 74% ตามลำดับ (Kofta et al, 2000) จากความสำเร็จดังกล่าวข้างต้นทำให้เชื่อว่าวัคซีน DNA encoding specific proteins น่าจะใช้เป็นวัคซีนป้องกันโรค fasciolosis ได้

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า โปรตีนกลุ่มหลักที่ใช้ทดสอบความสามารถในการเป็น วัคซีนจะอยู่ในรูปของ excretory-secretory (ES) antigen ซึ่งสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของ host ต่อต้านได้เป็นอย่างดี metalloprotease enzyme จัดอยู่ในกลุ่ม protease enzyme ซึ่งพบได้ ใน ES antigen ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ leucine aminopeptidase (LAP) LAP เป็น exopeptidase ซึ่งตัด amino acid ทางปลายด้าน amino terminal โดย LAP มีความจำเพาะเจาะจง ในการตัด leucine amino acid residue ออกจาก polypeptide นอกจากนี้ยังสามารถตัด amino acid อื่น ๆ ได้อีกด้วย ยกเว้น arginine, lysine และ proline (Acosta et al, 1998) สามารถ LAP พบได้ทั้งบน cell surface และในไซโตพลาสซึมของเซลล์หลาย ๆ ชนิดในร่างกาย (Wallner et al, 1993) ตัวอย่างเช่น รก ตับ เลนส์ ลำไส้ สมอง ไต และ adipocyte หน้าที่ของ LAP จะมีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดซึ่งมีดังนี้คือ ใช้ในการ metabolize secreted regulatory molecule ได้แก่ hormone, neurotransmitter และสารอาหาร (Tayler และ Dixon, 1978, Ahmad และ Ward, 1990, Nyberg et al, 1990, Squire et al, 1991 และ Wallner et al, 1993) ใช้ในการ ย่อยอาหารในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Botbol และ Scornik, 1986) และแมลงหลายชนิด (Houseman และ Downe, 1981, Ferreira และ Terra, 1989 และ Lenz et al, 1991) เกี่ยวกับการ modulate cell-cell interaction (Watt และ Yip, 1989) และควบคุม plasmid stability (Stirling et al, 1989)

LAP ตัวแรกที่มีการค้นพบและทำการศึกษากันค่อนข้างมากคือ Bovine lens LAP (3.4.11.1) (Smith และ Hill,) bovine lens LAP มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 324 kDa ประกอบด้วย 15 alpha helix, 11 betasheet และอยู่ด้วยกันเป็น hexamer โดย LAP แต่ละ subunit มี molecular weight ประมาณ 52 kDa ประกอบด้วย 487 amino acid (Carmona et al, 1993) การศึกษา characteristic ของ porcine kidney LAP พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 255 kDa โดย 1 โมเลกุลของ porcine kidney LAP จะประกอบด้วย 4 subunit (tetramer) และจากการศึกษา porcine liver LAP พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 326 kDa (Ledeme et al, 1981) จากข้อมูล ข้างต้นจะเห็นว่า LAP เป็นโปรตีนที่ค่อนข้างมีความหลากหลายค่อนข้างมาก เมื่อศึกษาเปรียบเทียบ LAP แต่ละชนิดพบว่า บนโมเลกุลของ LAP แต่ละชนิดจะมีตำแหน่งที่ทำหน้าที่จับกับโลหะหนักอยู่ 2 ตำแหน่งและเหมือนกันใน LAP ทุกชนิด ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวข้างต้นส่วนใหญ่จะเป็นสังกะสี (Zn) นอกจากนี้ยังพบว่า ตำแหน่งที่ทำหน้าที่ในการจับกับ Zn จะอยู่ใกล้กับบริเวณส่วนปลายของโมเลกุล ทางด้าน carbon-terminus โดย Zn ตัวที่หนึ่งจะจับอยู่กับ amino acid Asp-255, Asp-332 และ Glu-334 (Burley et al, 1990) Zn ตัวที่สองจะจับกับ carboxylate oxygen atom ของ Asp-255, Asp-273 และ Glu-334 (Burley et al, 1990) ซึ่งพบ active site อยู่ที่ Lys-250 และ Arg-336 (Burley et al, 1990) จากการศึกษพบว่า การจับของ Zn กับ amino acid ในตำแหน่งที่ 1 เป็น พันธะที่ไม่แข็งแรง ดังนั้นตำแหน่งดังกล่าวจึงสามารถเกิดการแย่งจับจากโลหะหนักตัวอื่น ๆ ได้ ตัวอย่างเช่น Mg Mn และ Co ซึ่งการจับของ Mg ที่ตำแหน่งที่ 1 นี้จะเป็นการกระตุ้นการทำงานของ

enzyme ของ LAP ส่วนตำแหน่งที่ 2 Zn จะจับกับ amino acid ด้วยพันธะที่แข็งแรง การทำงานของ LAP จะถูกยับยั้งด้วย phenanthroline (Barrett, 1994), amastarin, bestatin และ leupeptin (Nakanishi et al, 2000)

การศึกษาตำแหน่งของและการกระจายของ LAP ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า LAP เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในรูป membrane-bound (Schauder et al, 1994, Look et al, 1989, Olsen et al, 1998, Roman และ Hubbard, 1998 และ Ito et al, 2003) cytoplasmic (Funk et al, 1987, Oda et al, 1996) และ secretory protein ในกระแสเลือด (Fukasawa et al, 1996 และ Cadel et al, 1997)

การศึกษา LAP ในพยาธิไส้เดือน *Caenorhabditis elegans* พบว่าประกอบด้วย 2 isotypes คือ LAP-1 (membrane-bound protein) และ LAP-2 (cytosolic protein) การศึกษาตำแหน่งการกระจายของ LAP บริเวณเยื่อทางเดินอาหารในทุกๆระยะการพัฒนของพยาธิ ซึ่ง LAP ในพยาธิ *C. elegans* น่าจะใช้ในกระบวนการลอกคราบและ/หรือในการย่อยอาหาร จนกระทั่งปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ของ LAP ใน *C. elegans* อย่างแน่ชัด (Joshua, 2001)

การศึกษา LAP ใน *Schistosoma mansoni* ในระยะต่าง ๆ โดยพบ LAP ในไข่ miracidia, cercaria, schistosomula, 20 day old และตัวเต็มวัย (Auriault et al, 1982, Cesari et al, 1983 และ Xu และ Dresden, 1986) จากการศึกษาตำแหน่งการกระจายของ LAP พบมากที่สุดที่ใน egg และ hatching fluid (Xu และ Dresden, 1986)

การศึกษาตำแหน่งการกระจายของ LAP ด้วยวิธี histochemistry ในพยาธิ *S. rodhaini* พบ LAP อย่างหนาแน่นบริเวณ dorsal และ lateral tegument ของพยาธิตัวเต็มวัยเพศผู้แต่พบได้น้อยในเพศเมีย (Fripp, 1967) โดยคาดว่า LAP น่าจะเป็น membrane-bound enzyme ทำหน้าที่เกี่ยวกับการฟักตัวของไข่ (Xu และ Dresden, 1986) และย่อย immunoglobulin ของ host ที่จับบริเวณชั้นผิวหนังด้านนอก (Joshua, 2001)

การศึกษา LAP ของ *F. hepatica* ตัวเต็มวัย พบว่า LAP มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 240 kDa ในสภาวะธรรมชาติ แต่เมื่อศึกษาด้วย non-reducing SDS-PAGE จะพบ LAP ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 kDa จึงคาดว่า LAP น่าจะเป็น high molecular weight complex (Acosta et al, 1998) นอกจากนั้นไม่สามารถตรวจพบ LAP ใน ES product ของพยาธิ *F. hepatica* ตัวเต็มวัย (Acosta et al, 1998) การศึกษาตำแหน่งการกระจายของ LAP ด้วยวิธี histochemistry ใน *F. hepatica* ตัวเต็มวัยพบ LAP อย่างหนาแน่นบริเวณเยื่อผนังลำไส้และนอกจากนี้ยังพบ LAP บริเวณเซลล์ชั้นผิวหนังทางด้าน dorsal surface อีกด้วย (Acosta et al, 1998)

การศึกษาความสามารถในการเป็น vaccine ของ LAP ของพยาธิ *F. hepatica* โดยการ immunize LAP โดยผสมกับ Freund's adjuvant ในแกะ แล้ว infect ด้วย metacercaria ประมาณ 49 วันทำการตรวจนับจำนวนพยาธิในตับพบว่า จำนวน worm burden ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control โดยสามารถลดการติดเชื้อพยาธิในแกะลงได้ประมาณ 89 % เมื่อ immunization ด้วย pure LAP และประมาณ 78 % เมื่อ immunization เป็น cocktail vaccine กับ cathepsin L1 และ cathepsin L 2 (Piacenza et al, 1999) จะเห็นได้ว่า LAP สามารถป้องกันการติดเชื้อ *F. hepatica* เป็นอย่างดี ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นวัคซีนตัวเลือกต่อไปในอนาคต

นอกเหนือจากโปรตีนที่กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะพื้นฐานของ LAP ยังมีค่อนข้างน้อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพยาธิ *F. gigantica*

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาการตรวจหา sequence ของ LAP encoding gene การตรวจสอบคุณสมบัติของ gene การ expression และการผลิต polyclonal antibody เพื่อศึกษาลักษณะของ LAP protein รวมถึงศึกษาดำเนินการกระจายของ LAP ในเนื้อเยื่อของ *F. gigantica* เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา LAP และนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันโรค tropical fasciolosis ในอนาคต รวมถึงเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิ fasciolosis ด้วยวิธี immunodiagnosis ต่อไป

## วิธีการทดลอง

### 1. การเก็บตัวอย่างพยาธิ *F. gigantica*

#### 1.1 ไช้

##### 1.1.1 ไช้ระยะ unembryonated (unembryonated eggs)

เก็บไช้จาก *F. gigantica* ตัวเต็มวัยและจากถุงน้ำดีของโคที่มีการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* โดยนำพยาธิตัวเต็มวัยที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์มาแช่ในสารละลาย normal saline เพื่อให้พยาธิปล่อยไช้ออกมา หลังจากนั้นนำ normal saline ที่มีไช้พยาธิปะปนอยู่และน้ำดีของวัวที่มีการติดเชื้อพยาธิ มาตั้งทิ้งไว้ให้ไช้พยาธิตกตะกอน แล้วล้างไช้พยาธิด้วย normal saline หลาย ๆ ครั้งจนกว่าสารละลาย normal saline ใส จากนั้นนำไป centrifuge เก็บไช้พยาธิไปใช้ทำการทดลองต่อไป

##### 1.1.2 ไช้ระยะ embryonated (embryonated eggs)

นำไช้พยาธิที่เก็บจากข้อ 1.1.1 มากระตุ้นการเจริญเติบโตด้วยแสงแดดนาน 2 สัปดาห์ สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่ามีไช้พยาธิบางส่วนพัฒนากลายเป็น miracidium แล้วล้างไช้พยาธิด้วย normal saline จากนั้นนำไป centrifuge เก็บไช้พยาธิไปใช้ทำการทดลองต่อไป

#### 1.2 พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์

ป้อน metacercariae จำนวน 15 ตัว ให้หนู mice โดยใช้ feeding tube จากนั้นวันที่ 28 หลังการ infection สลบหนูด้วย diethylether แล้วเก็บพยาธิตัวอ่อนจากตับ ล้างพยาธิด้วยสารละลาย normal saline แล้วเก็บพยาธิตัวอ่อนไว้ทำการทดลองต่อไป

#### 1.3 พยาธิตัวเต็มวัย

เก็บพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยจากถุงน้ำดีและท่อน้ำดีของตับโคที่ถูกฆ่าจากโรงฆ่าสัตว์ จากนั้นนำพยาธิที่ได้มาล้างด้วยสารละลาย normal saline จนกว่าไม่มีเลือดและน้ำดีติดอยู่ที่ตัวพยาธิ แล้วนำไปทำการทดลองต่อไป

### 2. การเตรียมแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*

#### 2.1 Whole body (WB) antigen

นำพยาธิระยะต่างๆ ได้แก่ ไช้ ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ และตัวเต็มวัยมาแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วนำมา homogenize ด้วย tissue grinder tube ใน homogenization buffer ที่เย็น (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X 100, 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM ethylenediaminetetra acetic acid) แล้วนำไป sonicate ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที และ rotate ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ 10,000g นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำ supernatant ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford

#### 2.2 Tegumental (TA) antigen

นำพยาธิตัวเต็มวัยมาล้างด้วยสารละลาย Hank's balance salt solution (Sigma) หลังจากนั้นนำพยาธิตัวเต็มวัยไปแช่ในสารละลาย Tegument extraction buffer (1% Triton-X 100, 50 mM

Tris buffer pH 8.0, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl) นานประมาณ 10 นาที เก็บสารละลายมา centrifuge ที่ 100,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลาย tegumental antigen ใน 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 นำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford

### 2.3 Excretory-secretory (ES) antigen

นำพยาธิตัวเต็มวัยมาแช่ในสารละลาย Hank's balance salt solution ที่อุณหภูมิห้องนาน 3-6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไป centrifuge ที่ 10,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง เก็บ supernatant แล้วกรองด้วย 0.2 ไมครอน Millipore filter นำสารละลายที่ได้ไป lyophilized ด้วยเครื่อง (Snijders Scientific b.v., LY5FME) แล้ววัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford เก็บ ES ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

#### การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford

เตรียมสารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีนโดยผสม dye reagent (Bio Rad Protein Assay, Bio Rad) กับ deionized water ในอัตราส่วน 1:4 หลังจากนั้นเตรียม bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 100, 200, 500, 1000 µg/ml เพื่อใช้เป็น standard protein หลังจากนั้นละลายโปรตีนที่ต้องการวัดปริมาณกับ deionized water ในอัตราส่วน 1:10 และ 1:20 นำ BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และโปรตีนที่ต้องการวัดปริมาณจำนวน 50 µl มาผสมกับ dye reagent ที่ละลายใน deionized water ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex ทิ้งไว้ 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (CECIL CE2501 2000 SERIES) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของ standard protein (BSA) ที่ได้มา plot กราฟระหว่างปริมาณโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งจะได้กราฟเส้นตรงใช้เป็นกราฟมาตรฐาน โดยความเข้มข้นของโปรตีนที่ต้องการวัดปริมาณนั้นหาได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ standard protein

## 3. การผลิต Polyclonal antibody ที่ต้านต่อ leucine aminopeptidase

### 3.1 การ Immunization หนู rat ด้วย leucine aminopeptidase

นำ porcine kidney leucine aminopeptidase (LAP) 200 µg ที่ละลายใน 0.1 M PBS ปริมาตร 500 µl ผสมกับ complete Freund's adjuvant ปริมาตร 500 µl จากนั้นนำไป immunize ทาง subcutaneous โดย immunized บริเวณหลังของหนู rat เพศผู้ และเพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ ประมาณ 10 จุด จุดละประมาณ 100 (priming, วันที่ 0) ทำการ immunization หนู rat อีกครั้ง หลังจากการ priming 2 สัปดาห์ (first boosting, วันที่ 14) และ 4 สัปดาห์ (second boosting, วันที่ 28) ด้วย LAP 100 µg ปริมาตร 500 µl ที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ปริมาตร 500 µl ทาง subcutaneous เก็บเลือดหนูทาง tail vein ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง ได้แก่ วันที่ 0, 12, 26 และเก็บเลือดจากหัวใจในวันที่ 35 ปลอ่ยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องนาน 1-2 ชั่วโมง นำไป centrifuge ที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที แล้วนำ serum ไป screen antibody ที่ต้านต่อ LAP โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ต่อไป

### 3.2 การ Screening antibody ที่ต้านต่อ LAP ด้วยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การ screening antibody โดยวิธี indirect ELISA (Engval และ Perlman) ซึ่งใช้ porcine kidney LAP และ WB ของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย coat microtiterplate และใช้ horseradish peroxidase (HRP) ที่จับอยู่กับ secondary antibody เป็น probe แล้วให้ HRP ทำปฏิกิริยากับ substrate (O-phenylene diamine, OPD) นำไปวัดค่า OD ของ product ที่เกิดขึ้น ซึ่งจะแสดงถึงปริมาณสัมพัทธ์ของ antibody ที่มีอยู่ใน serum โดยมีขั้นตอนดังนี้

#### 3.2.1 Titration ELISA

เป็นการทำ ELISA เพื่อหาปริมาณสัมพัทธ์ของ antibody ใน serum ของหนูตัวที่ 2, 3, 5 และ 6 ว่า มีการสร้าง antibody ต้านต่อ LAP ที่ฉีดเข้าไปหรือไม่ และหลังจากที่มีการฉีด LAP ในแต่ละครั้งปริมาณสัมพัทธ์ของ antibody มีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร ทำการทดลองโดยการละลาย LAP ใน coating buffer (sodium carbonate 0.318%, sodium hydrogen carbonate 0.586%) แล้วนำไป coat polystyrene microtiterplate ปริมาตร 2.5µg/50µl/well ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง ล้าง LAP ส่วนเกิน ด้วย 10 mM PBS pH7.4 จำนวน 3 ครั้ง block nonspecific binding ของ antibody ด้วย 5% skim milk + 0.05% Tween 20 ใน PBS จำนวน 100 µl/well ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้ว incubate ด้วย primary antibody (rat sera) ที่เก็บ ณ วันที่ 0, 12, 26 และ 35 หลังจาก first immunization โดยละลาย primary antibody ด้วย 1% skim milk + 0.05% Tween 20 ใน PBS ที่ dilution ต่าง ๆ ได้แก่ 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200 dilution ละ 100 µl/well incubate ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง หลังจากนั้นแช่ด้วย HRP-conjugated goat anti-rat immunoglobulin ที่ละลายใน 1% skim milk + 0.05% Tween 20 ใน PBS ปริมาตร 100 µl/well ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง สุดท้ายแช่ด้วย OPD + 0.012 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ปริมาตร 100 µl/well ที่ 37°C นาน 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ปริมาตร 100 µl/well นำไปวัดค่า OD ด้วย Microtiter Plate Reader (PROGRAMMABLE MPT READER DV 990BV6) ที่ความยาวคลื่น 492 nm นำค่า OD ของ serum จากหนูแต่ละตัวไป plot กราฟกับค่า dilution factor ต่าง ๆ แล้วเปรียบเทียบจากค่า titer ของ serum โดยค่า titer ได้จาก dilution factor ที่มากที่สุดที่ทำให้ preimmunized sera มีค่า OD ต่ำกว่า 0.3 และ immunized sera มีค่ามากกว่า 1

#### 3.2.2 Checker board titration ELISA

เป็นการทำ ELISA เพื่อหาค่า dilution factor ของ primary และ secondary antibodies ที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยาซึ่งจะต้องนำไปใช้ในการทำ western immunoblotting ทำการทดลองโดยการ coat polystyrene microtiterplate ด้วย porcine kidney LAP 2.5µg/50µl/well เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 นอกจากนี้เพื่อศึกษาว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้มี cross reactivity กับ LAP ของ *F.gigantica* หรือไม่โดยการ coat microtiter palte ด้วย WB ของพยาธิตัวเต็มวัยปริมาณ 2.5, 10 และ 20 µg/50µl/well ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น block ด้วย 5% skim milk ปริมาตร 100 µl นาน 1 ชั่วโมง แล้ว incubate ด้วย serum ของหนูที่มีค่า titer สูงสุด (จากข้อ

3.2.1) ปริมาตร 100  $\mu$ l ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ซึ่ง ละลายที่ dilution ต่าง ๆ ได้แก่ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800 สำหรับการ coat ด้วย LAP และ 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 สำหรับการ coat ด้วย WB แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง หลังจากนั้น incubate ด้วย secondary antibody (goat anti-rat HRP-conjugated Ig, Zymed) ที่ dilution ต่าง ๆ คือ 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 และ 1:6000 ปริมาตร 100  $\mu$ l ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้ว incubate ด้วย OPD ปริมาตร 100  $\mu$ l นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ปริมาตร 100  $\mu$ l นำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง ELISA reader (PROGRAMMABLE MPT READER DV 990BV6) ที่ความยาวคลื่น 492 nm นำค่า OD ที่ได้มาหาค่า dilution factor ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาโดยพิจารณาจาก dilution ของ primary และ secondary antibody ที่มากที่สุดที่ทำให้ preimmunized sera มีค่า OD ต่ำกว่า 0.3 และ immunized sera มีค่า OD สูงกว่า 1

#### 4. การศึกษา leucine aminopeptidase ด้วยวิธี sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ western immunoblotting

การศึกษา antigens ต่าง ๆ ของ *F.gigantica* ทำโดยใช้วิธี reducing SDS-PAGE ซึ่งเป็นการแยก antigen ต่าง ๆ ในสภาวะ reduced form หลังจากนั้นนำ antigen ย้ายลงแผ่น polyvinylidene fluoride (PVDF) โดยวิธี semidry western blotting นำแผ่น blotting ที่ได้ไป immunostaining โดยใช้ polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากข้อ 3 เป็น primary antibody เพื่อให้ทราบว่ามี LAP ใน fraction ต่าง ๆ หรือไม่ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่าไร และในระยะต่าง ๆ ของการพัฒนา มีปริมาณสัมพัทธ์ของ LAP แตกต่างกันมากน้อยเพียง

##### 4.1 Sodium Dodecylsulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ที่ใช้แยก antigens ในการทดลองนี้มีความเข้มข้นของ separating gel 12.5% และ stacking gel 4% เตรียม antigens โดยการละลาย antigens แต่ละชนิด (พยาธิระยะไข่ ตัวอ่อน อายุ 4 สัปดาห์ WB, TA และ ES) ใน reducing sample buffer (350 mM HCl, 10% Sodium dodecyl sulphate, 30% glycerol, 9.3% dithiothreitol (DTT) และ 1.2 mg bromophenol blue) ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปต้มประมาณ 5 นาที centrifuge แล้วนำไป load ใน gel ปริมาณ antigen 1.5  $\mu$ g/well โดยใช้ standard marker (Precision Plus Protein™ Unstained Standards, BIO-RAD) เป็น reference ของ molecular weight และใช้ 25 mM Tris, 192 mM glycine และ 0.1% SDS เป็น running buffer ทำการแยก antigens ในสภาวะ constant current กระแสไฟฟ้า 20 mA, 250 V จาก cathode ไปยัง anode (Biometra Multigel-Long) เมื่อ bromophenol blue marker เคลื่อนมาถึงขอบด้านล่างของแผ่น gel นำแผ่น gel ไปย้อมสี silver staining เพื่อศึกษาแถบโปรตีนต่าง ๆ ที่มีอยู่ใน antigen แต่ละ fraction

##### Silver staining

นำแผ่น gel แช่ใน 25% ethanol + 7% acetic acid นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 10% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 7 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 7 นาที นำ gel ไปแช่ใน 0.6

µg/ml DTT ที่ละลายในน้ำกลั่น นาน 20 นาที แล้วแช่ใน 0.15% silver nitrate ในน้ำกลั่น นาน 20 นาที ล้างแผ่น gel ด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วแช่ใน developer (3% sodium carbonate + 0.05% formaldehyd) จนได้สีที่ต้องการแล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติม citric acid จนกว่าไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น ล้างแผ่น gel ด้วยน้ำกลั่น นำมาคำนวณ molecular weight ของแต่ละแถบ antigens ที่ปรากฏในแต่ละ fraction โดยใช้โปรแกรม Gene Tool (SynGene) และใช้ standard molecular weight marker เป็น reference และเปรียบเทียบปริมาณสัมพัทธ์ของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นโดยดูจากค่า raw volume ซึ่งแถบโปรตีนที่มีปริมาณมากมีค่า raw volume มากกว่า 100,000 แถบโปรตีนที่มีปริมาณปานกลางมีค่า raw volume ตั้งแต่ 50,000 ถึง 100,000 และ แถบโปรตีนที่มีปริมาณน้อยมีค่า raw volume น้อยกว่า 50,000

#### 4.2 Western Blotting

นำแผ่น gel ที่ผ่านการแยกโดย SDS-PAGE จากข้อ 4.1 และยังไม่ได้ย้อมสี silver staining มาย้ายโปรตีนลงแผ่น PVDF ด้วยวิธี semidry blotting โดยนำแผ่น PVDF (Biotrace<sup>TM</sup> PVDF 0.45 µm, Pall Life Science) แช่ใน methyl alcohol 2 นาทีและน้ำกลั่น 5 นาที หลังจากนั้นแช่ PVDF แผ่นกระดาษกรองและแผ่น gel ใน transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine และ 20% methanol) นำกระดาษกรอง 6 แผ่นวางบน blotting cassette (Biometra Fastblot B34) ตามด้วยแผ่น PVDF และแผ่น gel ไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้ววางแผ่นกระดาษกรองอีก 6 แผ่น โดยให้แผ่น gel อยู่ทางด้านขั้ว cathode และแผ่น PVDF อยู่ทางด้านขั้ว anode หลังจากนั้นทำการ transfer ที่ constant voltage 0.8-1.0 mA/cm<sup>2</sup> ของพื้นที่ gel นาน 60 นาที นำแผ่น PVDF ที่ได้ ออกมาย้อมด้วยสี 0.1% Ponceau S ใน 5% acetic acid เพื่อให้เห็นแถบโปรตีนที่แยกได้ ตากให้แห้ง แล้วนำไปทำ immunostaining ต่อไป หากยังไม่ได้ทำการทดลองทันทีสามารถเก็บแผ่น PVDF ที่อุณหภูมิ -20°C

#### 4.3 Immunostaining

นำแผ่น PVDF มาล้างสี Ponceau S ออกด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ใน 5% skimmed milk ที่ละลายใน 10 mM tris buffer saline, TBS (10 mM Tris-HCl + 150 mM NaCl) + 0.05% Tween 20 ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เพื่อ block nonspecific binding แช่แผ่น PVDF ใน primary antibody (rat sera) จาก antigen ที่ผลิตได้ในข้อ 3 ใน 1% skimmed milk ที่ละลายใน 10 mM TBS + 0.05% Tween 20 (dilution ได้จากข้อ 3.2.2) นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย TBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง แช่ใน secondary antibody (HRP-conjugated goat anti rat IgG) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-Tween 20 หลังจากนั้นแช่แผ่น PVDF ใน diaminobenzidine (DAB) + 0.054% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ประมาณ 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่น PVDF ด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งแล้วนำไปคำนวณ molecular weight ของแต่ละแถบโปรตีนที่ปรากฏโดยใช้ standard molecular weight marker เป็น reference และเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นตามวิธีในข้อ 4.1

## 5. การเตรียมเนื้อเยื่อพยาธิ

### 5.1 การเตรียมเนื้อเยื่อพยาธิเพื่อใช้สำหรับการย้อมสี Semichon's carmine

นำพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์และตัวเต็มวัย fix ใน alcohol-formal acetic acid ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำพยาธิชนิดนี้ออก (dehydrate) โดยแช่ใน 50% และ 70% ethyl alcohol ขึ้นตอนละ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสี carmine ต่อไป

### 5.2 การเตรียมเนื้อเยื่อพยาธิเพื่อใช้สำหรับการย้อมสี Hematoxylin-Eosin

นำพยาธิไปไม่ดับ *F. gigantica* ทุกระยะ (unembryonated eggs, embryonated eggs พยาธิตัวอ่อน 4 สัปดาห์และตัวเต็มวัย) Fix ใน Bouin's fixative ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 70% ethyl alcohol นำมาขจัดน้ำออกโดยแช่ใน 80%, 90% และ 95% ethyl alcohol ขึ้นละ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ และแช่ใน 100% ethyl alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที หลังจากนั้น clearing ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที infiltrate ด้วย xylene : paraffin ในอัตราส่วน 2 : 1, 1 : 2 และ pure paraffin ขึ้นตอนละ 30 นาที ตามลำดับ แล้วฝังพยาธิในพาราฟิน (Tissue-Tek® TEC™) นำ block พาราฟินมาตัดด้วยเครื่อง rotary microtome (Accu-cut® SRM™) หนา ประมาณ 5 ไมครอน นำ sections วางบนสไลด์ที่เคลือบด้วย gelatin จากนั้นตากสไลด์บน hot plate ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

### 5.3 การเตรียมเนื้อเยื่อพยาธิเพื่อใช้สำหรับการย้อมด้วยวิธี Immunoperoxidase

นำพยาธิไปไม่ดับ *F. gigantica* ทุกระยะ (unembryonated eggs, embryonated eggs ตัวอ่อน 4 สัปดาห์และตัวเต็มวัย) มา fixed ด้วย 4% paraformaldehyde และ 0.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำเนื้อเยื่อพยาธิฝังใน paraffin ตามวิธีในข้อ 2.2 นำ block พาราฟินมาตัดหนาประมาณ 5 ไมครอน นำ sections วางบนสไลด์ที่เคลือบด้วย 1% gelatin-chromalum ตาก slide ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

## 6. การศึกษาลักษณะทั่วไปของพยาธิ *F. gigantica*

เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างทั่วไปของพยาธิในระยะต่าง ๆ สังเกตการจัดเรียงตัวของอวัยวะภายในตัวพยาธิ รวมถึงการศึกษาลักษณะทาง histology ด้วยวิธีการย้อมสีดังนี้

### 6.1 การย้อมสี Semichon's carmine

นำพยาธิที่เตรียมจากข้อ 2.1 ย้อมด้วยสี Semichon's carmine เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 70% ethyl alcohol และล้างสีส่วนเกินออก (differentiation) โดยแช่พยาธิใน 1% acid alcohol จนกว่าตัวพยาธิเป็นสีชมพูตามต้องการ นำมาขจัดน้ำออกด้วย 80%, 90% และ 100% ethyl alcohol ขึ้นละ 30 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำพยาธิแช่ใน xylene เป็นเวลา 30 นาที mount ด้วย Permount® ตากให้แห้ง นำไปศึกษาและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse E600)

### 6.2 การย้อมสี Hematoxylin-Eosin

นำ sections พยาธิที่เตรียมจากข้อ 2.2 มาย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin โดยนำสไลด์มาละลายพาราฟินออกด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที rehydrate ด้วย 100%, 95%, 90%, 80%, 70% ethyl alcohol และน้ำกลั่นขึ้นละ 5 นาที ตามลำดับ ย้อมด้วยสี Harris's hematoxylin 3 นาที

ล้างด้วยน้ำประปา แล้วตรวจดูการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้สีตามต้องการ นำ sections แช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที แล้วย้อมด้วยสี eosin 30 วินาที จุ่มใน 95% ethyl alcohol 2-3 ครั้ง และแช่ใน 100% ethyl alcohol ตรวจดูการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้สีตามต้องการ clearing sections ใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที mount ด้วย Permount® ตากให้แห้ง นำไปศึกษาและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse E600)

## 7. การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ LAP ในพยาธิ *F. gigantea* ด้วยวิธี immunoperoxidase

นำ sections พยาธิที่เตรียมจากข้อ 2.3 มาละลาย paraffin ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และนำน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (rehydrate) ตามวิธีในข้อ 3.2 ทำลาย endogenous peroxidase ในเนื้อเยื่อพยาธิโดยการ incubate sections ใน 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ในน้ำกลั่น นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำ antigen retrieving โดยการต้ม sections ใน 10 mM citrate buffer (pH 6.0) 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้น block non-specific binding โดย incubate sections ใน 0.1% glycine ใน PBS และ 4% BSA ใน PBS ตามลำดับนานขึ้นละ 30 นาที incubate sections ด้วย primary antibody ที่ต้านต่อ leucine aminopeptidase (rat anti-porcine kidney LAP) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-Tween-20 (0.05% Tween-20, PBS-T) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที incubate sections ด้วย secondary antibody (horseradish peroxidase, HRP-goat anti-rat IgG, Zymed) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้น incubate sections ด้วย aminoethyl carbazole substrate (AEC substrate kit, Zymed) นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นำ sections มาย้อมตัดสี (counterstain) ด้วย Mayer's hematoxylin นาน 30 วินาที ล้างด้วยน้ำประปา mount ด้วย buffer glycerol ทาน้ำยาทาเล็บ นำ sections ไปศึกษาและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse E600)

## 8. การทำ cDNA library screening

### 8.1 Plating phage

#### 8.1.1 XL1-Blue preparation

นำ *E. coli* สายพันธุ์ XL1Blue มา inoculate ใน Luria-Bertani media (LB broth) ปริมาตร 10 ml ที่มีส่วนผสมของ 10 mM MgSO<sub>4</sub> และ 0.2% maltose เขย่าไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนสามารถวัดค่า Optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD<sub>600</sub>) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ได้เท่ากับ 1.0 โดยใช้ LB broth ที่เติม MgSO<sub>4</sub> และ 0.2% maltose เป็น blank หลังจากนั้นทำการแบ่งปริมาตรออกเป็นสองส่วนโดยแบ่งออกใส่หลอดทดลองมีฝาปิด หลอดละ 4 ml นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท media ทิ้ง แล้วนำเซลล์ไปเจือจางด้วย 10 mM MgSO<sub>4</sub> ให้ได้ค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.5 โดยเริ่มจาก นำ 10 mM MgSO<sub>4</sub> ใส่ในหลอดทดลองข้างต้นที่มีเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตรหลอดละ 4 ml

ทำการเขย่าเซลล์แบคทีเรียและ 10 mM MgSO<sub>4</sub> ให้เข้ากัน แล้วนำไป centrifuge อีกครั้ง จากนั้นเทส่วนของ 10 mM MgSO<sub>4</sub> ที่เติม 10 mM MgSO<sub>4</sub> ปริมาตรเท่าเดิม ทำการ resuspension เซลล์ แล้วดูดสารทั้ง 2 หลอดใส่รวมกันลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม 10 mM MgSO<sub>4</sub> เพิ่มเพื่อเจือจางเชื้อให้ได้ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.5 โดยใช้ 10 mM MgSO<sub>4</sub> เป็น blank

### 8.1.2 Transfection

นำเซลล์ XL1 Blue ที่มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.5 มาผสมกับ phage λ Zap II (1:1,000) ที่มี cDNA library ของพยาธิ *F. gigantica* (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Terry Spithill, Monash University, Victoria, Australia) ตามสัดส่วน ดังตารางที่ 3-1 แช่ใน Water bath เป็นเวลา 15 นาที ทำการหลอม Top agarose แล้วตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น จากนั้นนำไปผสมกับ XL1 Blue และ phage λ Zap II ที่เตรียมไว้ผสมให้เข้ากันทันที แล้วเทลง Plate LB media ที่มีส่วนผสมของ 10 mM MgSO<sub>4</sub> ปกป้องให้ Top agarose แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำ plate ไป incubate ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จนเห็น plaque ขนาด 2-3 มิลลิเมตรเกิดขึ้นบน Top agarose

ตารางที่ 3-1 แสดงอัตราส่วนปริมาตรของ *E. coli* และ Top agarose ของ plate แต่ละขนาด

| ขนาด plate | ปริมาณของ phage (จำนวน plaque - forming units) | ปริมาตร <i>E. coli</i> ที่ OD <sub>600</sub> of 0.5 | ปริมาตร top agar |
|------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------|
| 100 mm     | $1.5 \times 10^4$                              | 200 µl                                              | 3.0 ml           |
| 150 mm     | $5.0 \times 10^4$                              | 600 µl                                              | 7.5 ml           |

### 8.2 Plaque lift

นำกระดาษ nitrocellulose ที่ Autoclave แล้วมาแช่ใน 10 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ที่ผ่านการกรองด้วย Syringe filter (0.2 µm) ประมาณ 5 นาที ซับด้วยกระดาษกรอง (Whatman) จนกระทั่งแห้ง นำไปวางบน plate ที่มี plaque เกิดขึ้น (aseptic technique) นำไป incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ plate ไปแช่ตู้เย็นเป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที ทำการ mark plate และกระดาษ nitrocellulose แล้วใช้ forceps ที่เช็ดแอลกอฮอล์แล้วดึงกระดาษ nitrocellulose ขึ้นมา (aseptic technique) นำไปล้างด้วย Tris-buffered saline ที่เติม Tween 20 (TBST) จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เพื่อขจัดวันที่ติดกับกระดาษ nitrocellulose ออกไป แล้วจึงนำไปตากให้แห้งบนกระดาษ Whatman

### 8.3 Immunostaining

นำกระดาษ nitrocellulose จากข้อ 8.2 มาแช่ใน Bacterial lysate ความเข้มข้น 1:10 ในสารละลาย 1% Bovine serum albumin (BSA) ใน TBST เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาตากให้แห้งด้วยกระดาษกรอง (Whatman) แล้วนำไปล้างด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ปกป้องทิ้งไว้ให้หมาดบนกระดาษกรอง แล้วแช่ใน Blocking solution (4 % BSA ใน TBS) เป็นเวลา

1 ชั่วโมง เท Blocking ที่ทิ้ง แล้วแช่ในซีรัมของหนูที่ผลิตได้จากข้อ 3 และทราบค่า titer แล้ว เป็น primary antibody ผสมกับตัวทำลายที่ประกอบด้วย Bacterial lysate ความเข้มข้น 1:10 และ 1% BSA ใน TBST อัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างกระดาษ nitrocellulose ด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วแช่กระดาษใน secondary antibody โดยใช้ Goat anti Rat IgG conjugate HRP ความเข้มข้น 1:5,000 ผสมใน สารละลาย bacterial lysate และ 1% BSA ใน TBST อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และตามด้วย TBS 1 ครั้ง เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น แช่ ใน TMB membrane substrate (Bio FX laboratories) ประมาณ 5-10 นาที ในที่มืด แล้วหยุด ปฏิกริยาด้วยการแช่กระดาษในน้ำกลั่นเป็นเวลาประมาณ 5 นาที นำแผ่น nitrocellulose ที่ได้ไป สังเกตหา positive plaque โดยจะปรากฏให้เห็นเป็นจุดสีม่วงน้ำเงิน ขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดของ plaque ที่เกิดขึ้น

## 9. Cloning of leucine aminopeptidase encoding gene

### 9.1 การสกัด total RNA

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

### 9.2 การ Cloning ด้วยวิธี RT-PCR

นำรหัส mRNA ของ LAP ของพยาธิ *Schistosoma mansoni* มาทำการเปรียบเทียบและหา รหัส primers จากนั้นนำไปใช้สังเคราะห์ cDNA ของ LAP ของ *F. gigantica* โดยกระบวนการ reverse transcription เพื่อให้ได้ first strand cDNA โดยใช้ total RNA ที่สกัดมาจาก *F. gigantica* ตัวเต็มวัยจากข้อ 9.1 โดยใช้ SuperScript RNase H Reversetranscriptase, Invitrogen. ดัง condition ดังนี้

- เติม reverse primers 1 µl (1 µg/µl) , mRNA 1 µl และ 25 mM dNTP mix 1 µl และ DEPC H<sub>2</sub>O 19 µl แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้ว incubate ในน้ำแข็งนาน 2 นาที
- เติม 5x RT buffer 6 µl, RNase out (40 U/ µl) 1 µl, Superscript III RT (200 U/ µl) 1 µl และ 0.1 M DTT 1 µl ผสมให้เข้ากัน
- Incubate mixer ที่ประมาณ 50 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที และ inactivate ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และแช่ในน้ำแข็ง

หลังจากนั้นนำ first strand cDNA ที่ได้ไปทำ PCR โดย reaction mix ประกอบด้วย PCR buffer 10  $\mu$ l, 25 mM  $MgCl_2$  1  $\mu$ l, forward primer (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, reverse primer 1  $\mu$ l, Taq DNA polymerase (5u/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l และเติมน้ำกลั่นให้ได้ 100  $\mu$ l. แล้วนำไป incubate ใน Thermal cycler โดยใช้ annealing temperature ที่ 40 หรือ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบหาด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

### 9.3 Ligation, transformation and sequencing

ตัด expected band (ประมาณ 400 bp) จาก gel นำไป eluted แล้วนำไป ligated เข้า multiple cloning site ของ pGEM T-easy vector (Promega). ligation reaction ประกอบด้วย 2X ligation buffer 5  $\mu$ l, pGEM T-easy vector 1  $\mu$ l, eluted PCR product 50 ng และเติมน้ำให้ได้ 10  $\mu$ l, หลังจากนั้นนำไป incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส overnight. หลังจากนั้นนำ ligation product มา transform เข้า DH5- $\alpha$  competent *E. coli* cells ด้วยวิธี heat shock technique. หลังจากนั้น spread ลงบน ampicillin-LB agar plates นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมง

pick up colony ที่เกิดขึ้นบน plate นำไป inoculate ลง LB broth incubate overnight แล้วนำไปสกัด plasmid และตรวจการ insertion โดยการ digest plasmid ด้วย EcoRI ถ้าได้ digestion product ที่ประมาณ 1000 bp ให้นำ clone นั้นส่งทำ sequencing ที่ Bioservice Unit, BIOTEC

## ผลการทดลอง

### 1. การ Screening antibody ที่ต้านต่อ LAP ด้วยวิธี ELISA

#### 1.1 titration ELISA ของ serum

ผลการทดลองพบว่าค่า OD ของ preimmunized sera มีค่าน้อยกว่าค่า OD ของ reaction ของ serum หลังจากการ priming, first boosting และ second boosting อย่างชัดเจน (ภาพที่ 1 ตารางที่ 1) นอกจากนี้พบว่า OD ของ serum หลังจาก priming มีค่าน้อยกว่า serum หลังจาก first boosting และ second boosting (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตามค่า OD ของ serum ของหนูแต่ละตัวก็มีค่าแตกต่างกันออกไป เช่น หนูตัวที่ 2 preimmunized serum ที่ dilution ตั้งแต่ 1/51200 ถึง 1/25 มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.053-0.185 serum หลังจาก priming มีค่า OD อยู่ระหว่าง 2.521-3.597 serum หลังจาก first boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 2.371-3.336 และ serum หลังจาก second boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.088-2.699 หนูตัวที่ 3 preimmunized serum ที่ dilution ตั้งแต่ 1/51200 ถึง 1/25 มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.056-0.167 serum หลังจาก priming มีค่า OD อยู่ระหว่าง 1.447-3.438 serum หลังจาก first boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 2.079-3.482 และ serum หลังจาก second boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.110-2.943 หนูตัวที่ 5 preimmunized serum ที่ dilution ตั้งแต่ 1/51200 ถึง 1/25 มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.050-0.155 serum หลังจาก priming มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.898-3.462 serum หลังจาก first boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 1.126-3.493 และ serum หลังจาก second boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.074-2.683 หนูตัวที่ 6 preimmunized serum ที่ dilution ตั้งแต่ 1/51200 ถึง 1/25 มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.046-0.239 serum หลังจาก priming มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.820-3.405 serum หลังจาก first boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 2.046-3.277 และ serum หลังจาก second boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.093-2.806

เมื่อนำค่า OD ที่ได้มา plot กราฟต่อ dilution ของแอนติบอดี (ภาพที่ 2 ถึง 5) พบว่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP จะเพิ่มมากขึ้นหลังจากการ priming, first boost และ second boost ตามลำดับ โดย serum ของหนูตัวที่ 2, 3 และ 5 หลังจาก first boosting และ second boosting มีค่า titer ไม่แตกต่างกันมากนักแต่จะมีความแตกต่างกันใน serum ของหนูตัวที่ 6 โดย serum จาก first boost จะให้ค่า OD ที่น้อยกว่า second boost ใน dilution factor ที่มากขึ้น ซึ่ง serum ของหนูแต่ละตัวมีการเปลี่ยนแปลงของ titer หลังจากการ immunized แต่ละครั้งดังนี้ หนูตัวที่ 2 priming มีค่า titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP อยู่ที่ 1/800 first และ second boosting มีค่า titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP อยู่ที่ 1/51200 หนูตัวที่ 3 priming มีค่า titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP อยู่ที่ 1/1600 first และ second boosting มีค่า titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP อยู่ที่ 1/51200 หนูตัวที่ 5 priming มีค่า titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP อยู่ที่ 1/800 first boosting มีค่า titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP อยู่ที่ 1/25600 second boosting มีค่า titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP อยู่ที่ 1/51200 หนูตัวที่ 6 priming มีค่า titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP

อยู่ที่ 1/1600 first boosting มีค่า titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP อยู่ที่ 1/25600 second boosting มีค่า titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP อยู่ที่ 1/51200

จากการทดลองเมื่อพิจารณาค่า titer ประกอบกับค่า OD ของ serum หนูแต่ละตัวจะเห็นว่าหนูตัวที่ 2 จะมี titer ของ antibody ที่ต้านต่อ LAP สูงสุด รองลงมาคือ ตัวที่ 3 ตัวที่ 6 และตัวที่ 5 ตามลำดับ

## 1.2 Chequer board titration ELISA (CBT)

จากผลการทดลองพบว่า CBT ELISA ของ immune sera โดยใช้ porcine kidney LAP ปริมาณ 2.5  $\mu\text{g}/\text{well}$  coat plate (ภาพที่ 6) มีค่า OD ที่แตกต่างจากกลุ่ม preimmune อย่างชัดเจน ซึ่งพบว่า dilution factor ที่มากที่สุดของ primary antibody และ HRP-conjugated secondary antibody ที่ให้ค่า OD ของ immunized sera น้อยกว่า 0.3 และ immunized sera มากกว่า 1 คือที่ dilution ของ primary antibody เท่ากับ 1/12800 และ dilution ของ secondary antibody เท่ากับ 1/6400 ซึ่ง OD ของ immunized sera มีค่าประมาณ 3.418 ในขณะที่ OD ของ preimmune sera มีค่าประมาณ 0.058

ผล CBT ELISA ของ immunized sera โดยใช้ WB ของ adult *F. gigantica* ปริมาณ 2.5  $\mu\text{g}/\text{well}$  coat plate (ภาพที่ 6) พบว่ามีค่า OD แตกต่างจากกลุ่ม preimmunized sera ไม่มากนัก โดยต้องใช้ immunized sera ที่ dilution 1:100 และ HRP-conjugated secondary antibody ที่ dilution 1:3000 ซึ่งให้ค่า OD ของ immunized sera เพียง 0.590 และ ค่า OD ของ preimmune sera ประมาณ 0.270

เมื่อเพิ่ม WB ให้มีปริมาณที่มากเกินไป โดยการ coat plate ด้วย WB ปริมาณ 10 และ 20  $\mu\text{g}/\text{well}$  (ภาพที่ 7) ผลการทดลองพบว่า immunized sera มีค่า OD ที่แตกต่างจากกลุ่ม preimmune อย่างชัดเจน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่า OD ระหว่างการ coat plate ด้วย 10  $\mu\text{g}/\text{well}$  และ 20  $\mu\text{g}/\text{well}$  พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่ง dilution ของ immunized sera หรือ preimmunized sera ที่เหมาะสม คือที่ 1/400 ส่วน dilution ของ HRP-conjugated secondary antibody ที่เหมาะสมคือ 1/3000 ซึ่งการ coat plate ด้วย 10  $\mu\text{g}/\text{well}$  และใช้ immunized sera เป็น primary antibody ให้ค่า OD ประมาณ 1.114 และ preimmunized sera ให้ค่า OD ประมาณ 0.346 ในขณะที่การ coat plate ด้วย 20  $\mu\text{g}/\text{well}$  immunized sera ให้ค่า OD ประมาณ 1.128 และ preimmunized sera ให้ค่า OD ประมาณ 0.271

## 2. Western immunoblotting

### 2.1 Rat sera anti FgLAP เป็น primary antigen

พบว่าแผ่น PVDF เกิดแถบที่ให้ผลเป็นบวกกับ primary antibody ในพยาธิทุกระยะที่นำมาศึกษา (ภาพที่ 9) ดังนี้

**Porcine kidney LAP** (ภาพที่ 9, lane 1, LAP) ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56 และ 45 kDa

**Egg antigen** (ภาพที่ 9, lane 2, EG) พบโปรตีนที่ให้ผลบวกทั้งหมด 3 แถบ ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุล 21, 22.5, 24 kDa โดยแถบที่เข้มที่สุดคือน้ำหนักโมเลกุล 21 และ 22.5 kDa (ตารางที่ 2)

**พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์** (ภาพที่ 9, lane 3, JU) พบโปรตีนที่ให้ผลบวกทั้งหมด 3 แถบ ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุล 24, 26.5, และ 33 kDa โดยทั้ง 3 แถบติดสีค่อนข้างน้อย (ตารางที่ 2)

**พยาธิตัวเต็มวัย** (ภาพที่ 9, lane 4, WB) พบโปรตีนที่ให้ผลบวกทั้งหมด 3 แถบ ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุล 21, 22.5 และ 24 kDa โดยทั้ง 3 แถบติดสีค่อนข้างน้อย (ตารางที่ 2)

**Tegumental antigen** (ภาพที่ 9, lane 5, TA) พบโปรตีนที่ให้ผลบวกทั้งหมด 5 แถบ ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุล 20, 28, 33, 35 และ 46 kDa โดยทั้ง 5 แถบติดสีค่อนข้างน้อย (ตารางที่ 2)

**Excretory-secretory antigen** (ภาพที่ 9, lane 6, ES) พบโปรตีนที่ให้ผลบวกเพียง 1 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 24 kDa ซึ่งติดสีเข้มค่อนข้างมาก (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของการติดสีของแถบโปรตีนระหว่างแอนติเจนแต่ละชนิดโดยพิจารณาที่น้ำหนักโมเลกุลเดียวกันพบว่า ES พบแถบโปรตีนที่มีความเข้มมากที่สุด รองลงมาคือ EG JU WB และ TA ตามลำดับ

## **2.2 Non immunized rat serum เป็น primary antibody**

จากการทำ control โดยการย้อมแผ่น PVDF โดยใช้ preimmunized rat serum เป็น primary antibody และใช้ HRP-goat anti-rat IgG เป็น secondary antibody ทุกระยะของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในแบบ reducing ไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่ให้ผลบวก (ภาพที่ 10)

| MW   | EG  | JU  | WB  | TA  | ES  |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 270  | **  |     |     |     |     |
| 250  |     |     |     |     |     |
| 150  |     |     |     |     |     |
| 100  |     |     |     |     |     |
| 97   |     |     | **  |     |     |
| 86   |     |     |     | **  |     |
| 75   |     |     |     |     |     |
| 71   |     | **  | **  | **  |     |
| 68   |     |     |     | **  |     |
| 66   |     |     |     |     |     |
| 61   |     |     |     | **  |     |
| 56   |     |     |     |     |     |
| 55.5 |     | **  |     |     |     |
| 54   |     | **  |     |     |     |
| 53   |     | **  |     |     |     |
| 51   |     | **  |     |     |     |
| 50.5 |     |     | **  |     |     |
| 50   |     |     |     |     |     |
| 49   |     | **  | *** | *** |     |
| 46.5 | **  |     |     |     |     |
| 46   |     | **  |     |     |     |
| 45.5 |     |     | **  | **  |     |
| 45   | **  |     |     |     |     |
| 44   |     |     |     |     |     |
| 43.5 |     | *** | **  | **  |     |
| 41.5 |     | **  |     |     |     |
| 41   |     | **  |     |     |     |
| 37   |     |     |     | **  |     |
| 36.5 |     | **  | **  | **  |     |
| 36   |     | **  |     | **  |     |
| 35.5 |     |     | **  |     |     |
| 35   |     | *** | *** | *** |     |
| 34.5 |     | **  |     |     |     |
| 34   |     |     | **  |     |     |
| 33.5 |     | **  |     | **  |     |
| 33   |     |     | **  |     |     |
| 29.5 |     | **  | **  |     |     |
| 28   |     | *** | *** |     |     |
| 27.5 |     | **  |     | **  |     |
| 27   |     | **  |     | **  |     |
| 26.5 | *** |     |     |     |     |
| 26   | *** | **  | *** | **  | *** |
| 25   | *** | **  | *** | *** | *** |
| 24   | **  | **  | *** | *** |     |
| 23   | **  |     | **  |     |     |
| 20   |     |     |     |     |     |
| 16   |     |     |     |     | **  |
| 15.5 |     |     |     | **  |     |
| 15   |     |     | **  |     |     |
| 14.5 | **  |     |     |     |     |
| 14   |     |     | **  |     |     |
| 13.5 |     | *** | *** | *** | **  |
| 13   |     | *** | **  | *** | **  |
| 12.5 |     |     |     |     |     |
| 12   |     |     | **  | **  | **  |
| 11.5 |     |     |     |     | **  |
| 11   |     |     |     |     | **  |
| 10.5 |     | **  | **  | **  | **  |
| 10   |     |     |     |     | **  |

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มของแถบโปรตีนในแอนติเจน fraction ต่าง ๆ ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยวิธี Silver staining

MW = molecular weight, LAP = porcine kidney LAP, EG = soluble egg antigens, JU = crude antigen ของ 4-week old juvenile, WB = crude antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, TA = tegumental antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, ES = excretory-secretory antigens ของพยาธิตัวเต็มวัย

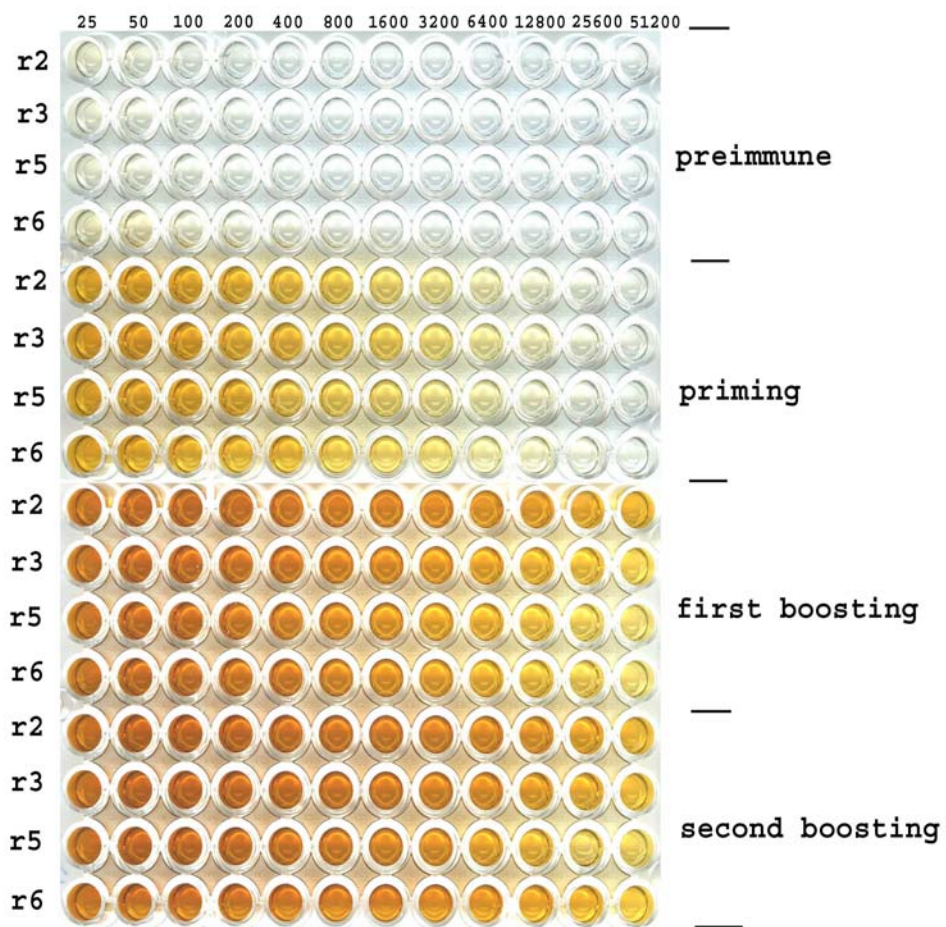
\*\*\* = ความเข้มของแถบโปรตีนที่เข้มที่สุด \*\* = ความเข้มของแถบโปรตีนที่เข้มปานกลาง

| MW   | EG | JU | WB | TA | ES |
|------|----|----|----|----|----|
| 46   |    |    |    | *  |    |
| 35   |    |    |    | *  |    |
| 33   |    | *  |    | *  |    |
| 28   |    |    |    | *  |    |
| 26.5 |    | *  |    |    |    |
| 24   | *  | *  | *  |    | ** |
| 22.5 | ** |    | *  |    |    |
| 21   | ** |    | *  |    |    |
| 20   |    |    |    | *  |    |

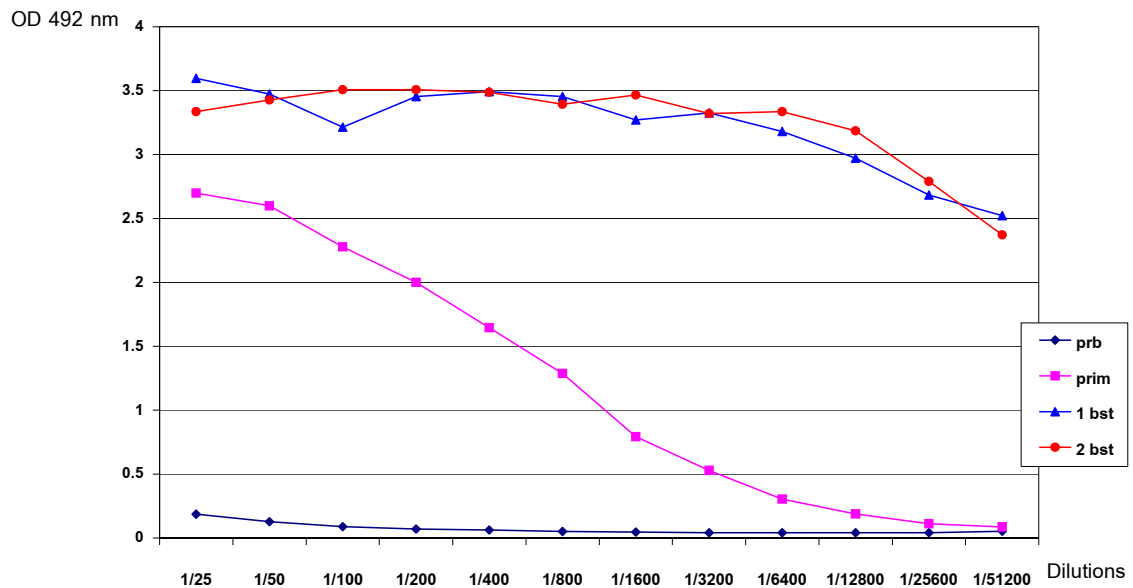
ตารางที่ 2 แสดงความเข้มของแถบโปรตีนในแอนติเจน fraction ต่าง ๆ ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE และ western immunoblotting โดยใช้ Rat serum anti LAP เป็น primary antibody

MW = molecular weight, LAP, EG = egg antigens, JU = crude antigen ของ 4-week old juvenile, WB = crude antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, TA = tegumental antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, ES = excretory-secretory antigens ของพยาธิตัวเต็มวัย

\*\* = ความเข้มของแถบโปรตีนที่เข้มปานกลาง \* = ความเข้มของแถบโปรตีนที่เข้มน้อย

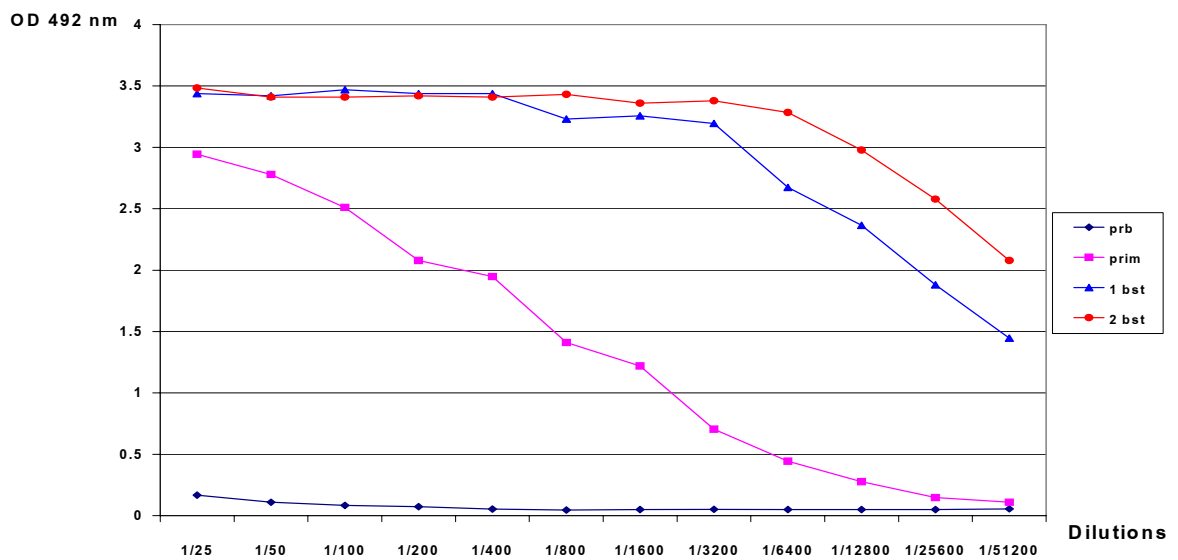


ภาพที่ 1 แสดง titration ELISA ของ serum ได้แก่ preimmunized sera, sera หลังการ priming, first boosting และ second boosting ของหนู rat (r2 = rat number 2, r3 = rat number 3, r5 = rat number 5, r6 = rat number 6)



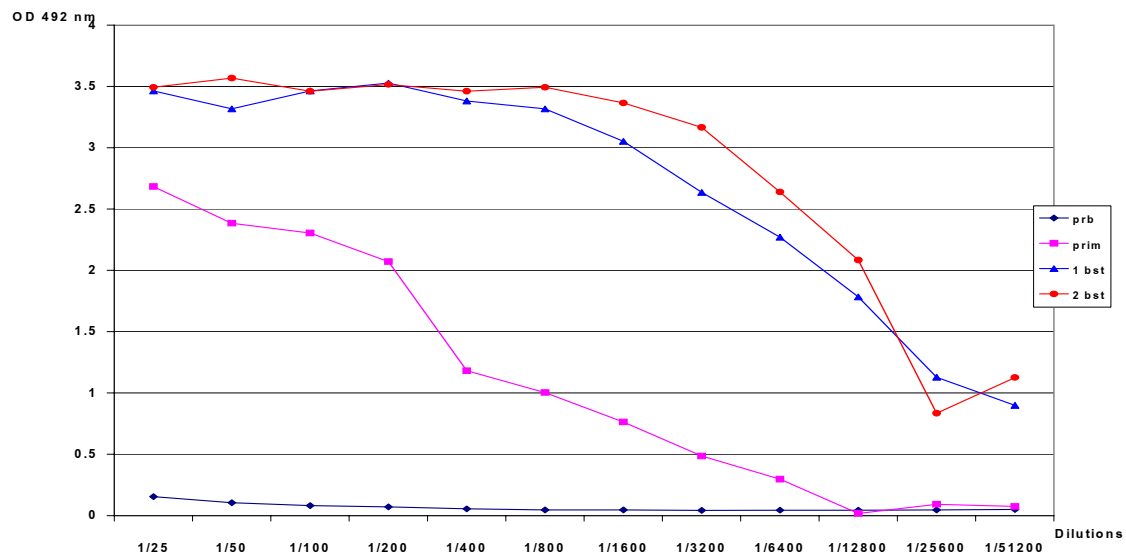
ภาพที่ 2 กราฟเส้นแสดง Titer of the rat sera number 2

prb = preimmunized, prim = priming, 1 bst = first boosting, 2 bst = second boosting



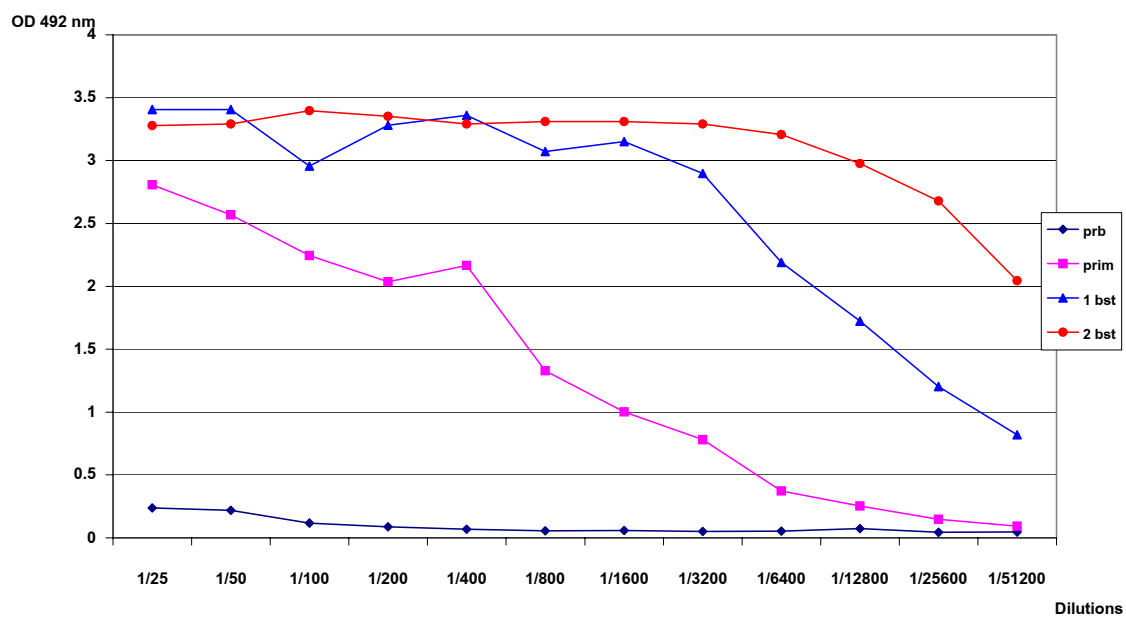
ภาพที่ 3 กราฟเส้นแสดง Titer of the rat sera number 3

prb = preimmunized, prim = priming, 1 bst = first boosting, 2 bst = second boosting



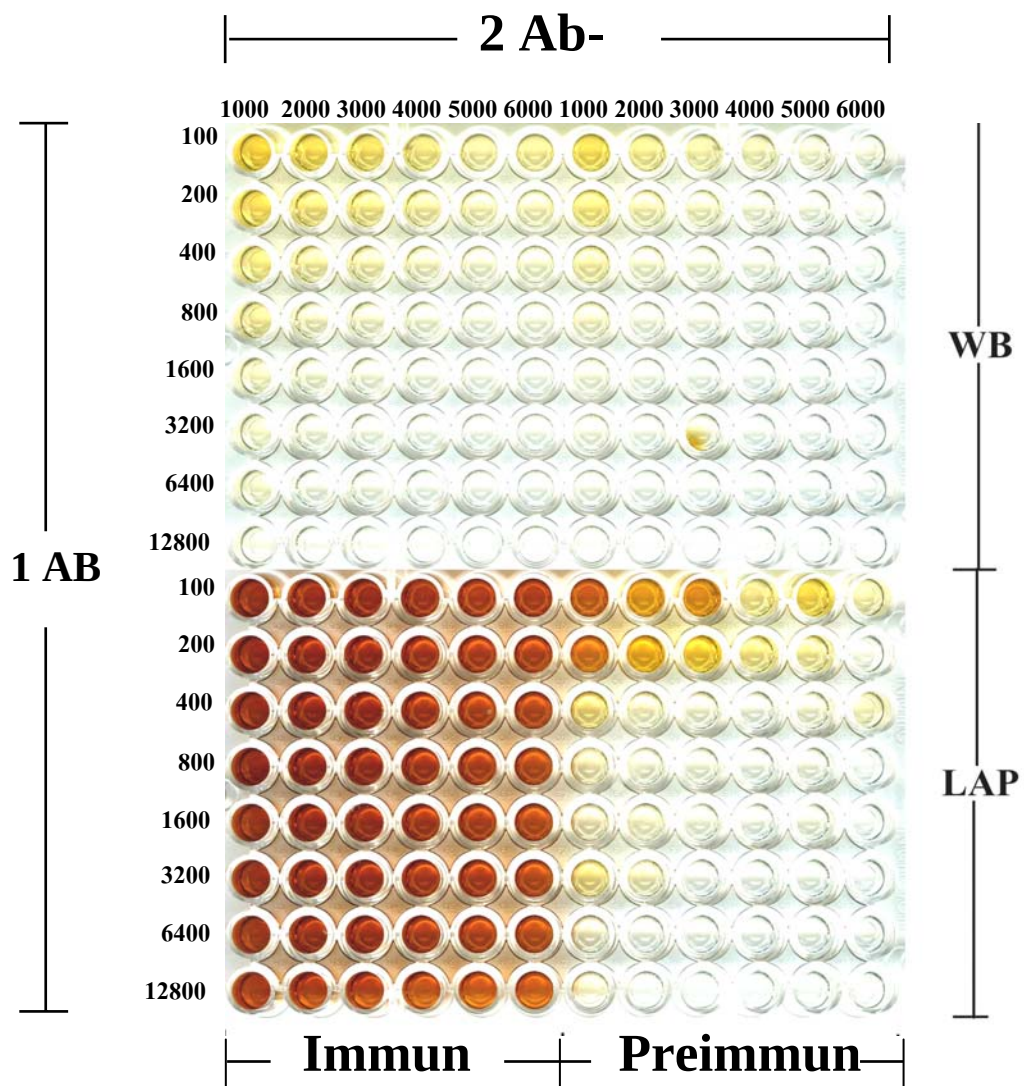
ภาพที่ 4 กราฟเส้นแสดง Titer of rat sera number 5

prb = preimmunized, prim = priming, 1 bst = first boosting, 2 bst = second boosting



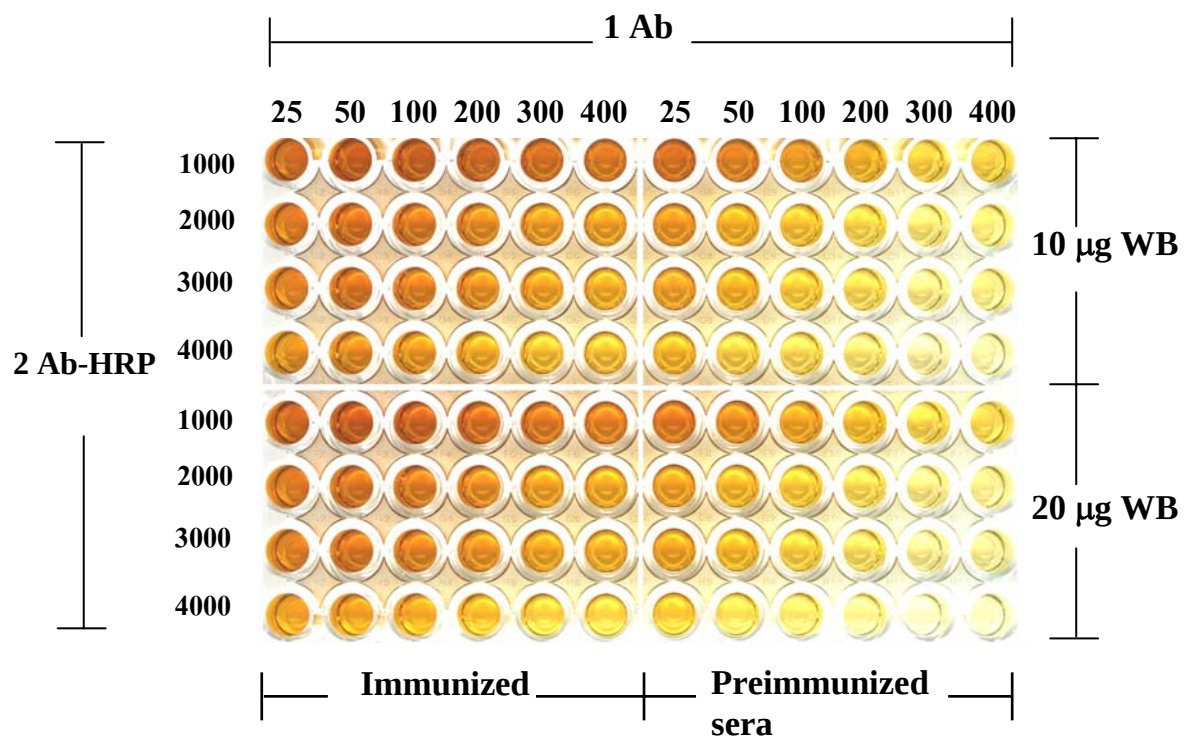
ภาพที่ 5 กราฟเส้นแสดง Titer of rat sera number 6

prb = preimmunized, prim = priming, 1 bst = first boosting, 2 bst = second boosting



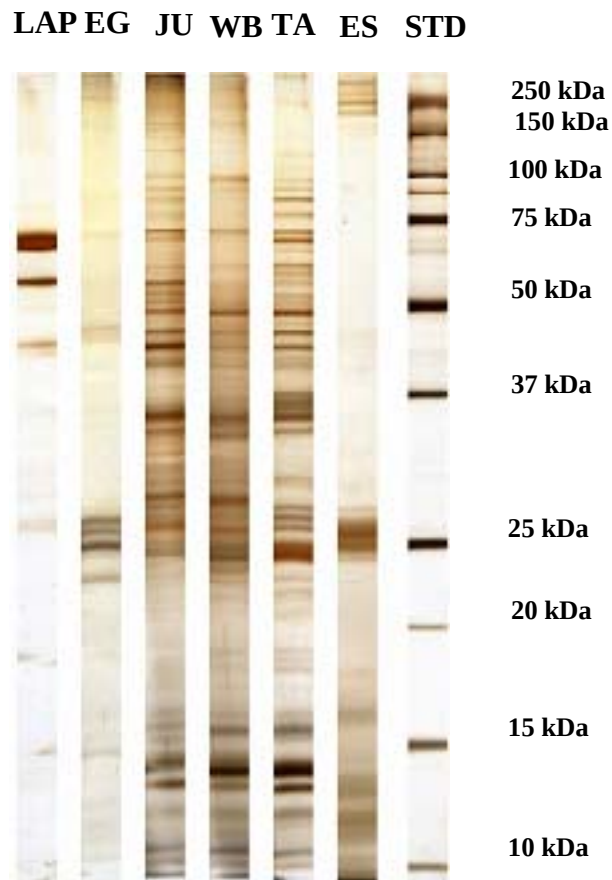
ภาพที่ 6 แสดง Chequer board ELISA ของ serum หนู number 2 ซึ่ง coated plate ด้วย porcine kidney LAP หรือ crude extract ของ adult *F. gigantica* ปริมาณ 2.5  $\mu\text{g}/\text{well}$

1 Ab = primary antibody, 2 Ab-HRP = HRP-conjugated secondary antibody, WB = whole body antigen, LAP = porcine kidney LAP



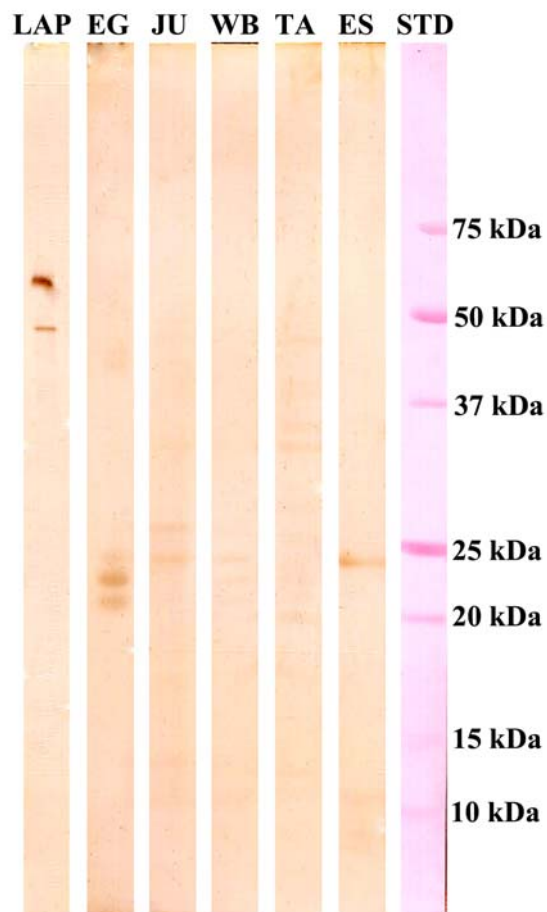
ภาพที่ 7 แสดง C-Cross ELISA ของ serum หนู number 2 ซึ่ง coated plate ด้วย crude extract ของ adult *F. gigantica* ปริมาณ 10 และ 20 µg/well

1 Ab = primary antibody, 2 Ab = secondary antibody, WB = whole body antigen



**ภาพที่ 8** แสดงแถบโปรตีนของแอนติเจน fraction ของ *F. gigantica* ต่าง ๆ ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยวิธี Silver staining

LAP = porcine kidney LAP, EG = soluble egg antigens, JU = crude antigen ของ 4-week old juvenile, WB = crude antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, TA = tegumental antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, ES = excretory-secretory antigens ของพยาธิตัวเต็มวัย, STD = standard molecular weight marker



ภาพที่ 9 แสดงแถบโปรตีนแอนติเจน fraction ต่าง ๆ ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE และ western immunoblotting โดยใช้ rat anti LAP เป็น primary antibody  
 LAP = porcine kidney LAP, EG = soluble egg antigens, JU = crude antigen ของ 4-week old juvenile, WB = crude antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, TA = tegumental antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, ES = excretory-secretory antigens ของพยาธิตัวเต็มวัย, STD = standard molecular weight marker



ภาพที่ 10 แสดงแถบโปรตีนของแอนติเจน fraction ต่าง ๆ ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE และ western immunoblotting โดยใช้ normal rat serum เป็น primary antibody  
 LAP = porcine kidney LAP, EG = soluble egg antigens, JU = crude antigen ของ 4-week old juvenile, WB = crude antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, TA = tegumental antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, ES = excretory-secretory antigens ของพยาธิตัวเต็มวัย, STD = standard molecular weight marker

### 3. ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *F. gigantea* ระยะ unembryonated eggs, embryonated eggs, ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์และตัวเต็มวัย

#### 3.1 ระยะ unembryonated egg

พยาธิ *F. gigantea* ระยะ unembryonated eggs (ภาพที่ 11 A-C) พบได้ใน uterus (ภาพที่ 11 A และ B) และไข่ที่เพิ่งออกมาจากตัวพยาธิ (ภาพที่ 11 C) ซึ่งมีลักษณะรูปไข่สีน้ำตาลแดงอ่อน มีความยาวประมาณ 140 ไมครอนและกว้างประมาณ 86 ไมครอน ภายในประกอบด้วย ovum 1 เซลล์และเซลล์ vitelline ประมาณ 30 เซลล์ ขั้วด้านหนึ่งของไข่จะพบ operculum ซึ่งเป็นบริเวณของเปลือกไข่ที่หนาตัวมากกว่าบริเวณอื่น

#### 3.2 ระยะ embryonated egg

พยาธิ *F. gigantea* ระยะ embryonated egg (ภาพที่ 11 D-F) ซึ่งพบได้หลังจากการกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วยแสงนาน 2 สัปดาห์ ขนาดและรูปร่างลักษณะภายนอกเหมือนกับ unembryonated eggs แต่ภายในไข่พบ miracidium 1 ตัว และเซลล์ vitelline ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่า ระยะ unembryonated eggs (ภาพที่ 11 D และ E) ส่วนไข่ที่มี miracidium เจริญเติบโตเต็มที่ที่ไม่พบ vitelline cell เหลือภายใน (ภาพที่ 11 F)

#### 3.3 ระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์

พยาธิ *F. gigantea* ระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 12) มีลำตัวยาวประมาณ 4 มิลลิเมตรและกว้างประมาณ 1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 12 A) ลำตัวของพยาธิระยะนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่ oral cone และส่วนหาง โดยเมื่อแบ่งลำตัวพยาธิออกเป็น 3 ส่วนพบว่า ทางด้านหน้าประมาณ 1 ใน 3 ของลำตัวจะเป็น oral cone และทางด้านหลังประมาณ 2 ใน 3 ของลำตัวจะเป็นส่วนหางซึ่งแบ่งกันด้วย ventral sucker พยาธิในระยะนี้มีอวัยวะที่ปรากฏชัดเจนได้แก่ อวัยวะในระบบย่อยอาหาร ระบบขับถ่ายและระบบสืบพันธุ์ อวัยวะในระบบย่อยอาหารประกอบด้วย oral sucker ด้านหน้าสุด (ภาพที่ 12 A และ B) ต่อมาเป็น pharynx (ภาพที่ 12 A และ C), esophagus และ caecal bifurcation (ภาพที่ 12 A) หลัง caecal bifurcation พบ caecum แยกออกเป็น 2 แขนงตามความยาวของลำตัว ซึ่ง caecum ในส่วนท้ายของลำตัวพบการแตกแขนงจำนวนมาก โดยจะแตกแขนงเป็น primary, secondary และ tertiary duct บริเวณด้านข้างของลำตัว อวัยวะในระบบขับถ่ายที่สามารถสังเกตได้ คือ bladder มีลักษณะเป็นท่อนิดสีค่อนข้างจางเมื่อย้อมด้วยสี carmine และ Hematoxylin-Eosin (H&E) ซึ่งสังเกตได้ชัดเจนบริเวณแนวกลางลำตัวในส่วนหางของพยาธิ (ภาพที่ 12 A และ F) และอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ที่สามารถสังเกตได้ทั้งในเพศผู้และเพศเมียมีดังนี้ คือ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้พบ testis บริเวณกลางลำตัว มีลักษณะเป็นท่อแตกแขนงแต่ภายในยังไม่มี การพัฒนาของ spermatozoa (ภาพที่ 12 A และ F) นอกจากนี้พบ cirrus sac มีลักษณะเป็นถุง บริเวณ dorsal และ anterior ของ ventral sucker (ภาพที่ 12 D) ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียพบ ovary มีลักษณะเป็นท่อแตกแขนงอยู่บริเวณด้านข้างของ Mehlis gland เชื่อมกันโดย oviduct (ภาพที่ 12 A) Mehlis' gland เป็นต่อมที่อยู่บริเวณกลางลำตัวหน้าต่อ testis ระหว่าง ventral sucker และ Mehlis' gland พบ uterus ลักษณะเป็นท่อขดไปมา (ภาพที่ 12 A และ E).

### 3.4 ระยะตัวเต็มวัย

พยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย (ภาพที่ 12 A - G) มีรูปร่างคล้ายใบไม้ โดยลำตัวยาวประมาณ 32 มิลลิเมตรและกว้างประมาณ 12 มิลลิเมตร oral cone มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับลำตัว โดยลำตัวของพยาธิระยะนี้เจริญยืดยาวกว่าระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ อวัยวะของพยาธิระยะนี้เจริญเต็มที่ในทุกระบบ อวัยวะในระบบทางเดินอาหารมีลักษณะเหมือนในพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ แต่มีขนาดเล็กกว่าและพบการแตกแขนงของ caecum ตลอดความยาวลำตัวมากกว่าในพยาธิระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ อวัยวะในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ได้แก่ testis ลักษณะเป็นท่อแตกแขนงมากมายบริเวณกลางลำตัวของพยาธิ ภายในพบการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ seminal vesicle มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 12 A และ D) อวัยวะในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ได้แก่ Mehlis' gland, ovary, และ uterus (ภาพที่ 12 A และ F) โดยภายใน uterus พบไข่มีสีน้ำตาลหรือสีดำจำนวนมาก (ภาพที่ 12 A และ E) นอกจากนี้พบ vitelline gland มีลักษณะเป็นก้อนสีน้ำตาลจำนวนมากกระจายอยู่ด้านข้างและส่วนท้ายของลำตัว (ภาพที่ 12 A และ G)

## 4 การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ LAP ภายในพยาธิ *F. gigantica* ระยะ unembryonated eggs, embryonated eggs, พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์และตัวเต็มวัยด้วยวิธี Immunoperoxidase

### 4.1 ระยะ unembryonated egg

พบ positive reaction ของ LAP มีลักษณะเป็นจุดสีแดงจาง ๆ ในเซลล์ vitelline ภายในไข่ นอกจากนี้ยังพบ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงระหว่างเซลล์ vitelline (ภาพที่ 16 A และ C)

### 4.2 ระยะ embryonated egg

ระยะ embryonated egg ของพยาธิ *F. gigantica* พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มค่อนข้างหนาแน่นภายใน fluid รอบ ๆ miracidium ในขณะที่ภายในตัว miracidium พบ positive reaction ค่อนข้างน้อย (ภาพที่ 16 C และ D)

### 4.3 พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์

ตำแหน่งและการกระจายของ LAP ในพยาธิระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 16 E – G) สามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนเพียง 2 ระบบ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย

#### 4.3.1 ระบบทางเดินอาหาร

ทางเดินอาหารส่วนต้นของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ได้แก่ oral sucker pharynx esophagus และ caecal bifurcation พบว่าไม่ปรากฏ positive reaction ของ LAP ในอวัยวะดังกล่าวแต่พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงใน caecum ซึ่งเป็นทางเดินอาหารส่วนปลาย (ภาพที่ 16 F และ G) เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ positive reaction สีแดงเข้มปานกลางบริเวณ luminal projection ของเซลล์เยื่อบุผิว caecum แต่ภายใน cytoplasm พบ positive reaction เป็นจุดสีแดงค่อนข้างจาง ในขณะที่ nucleus ไม่พบ positive reaction เมื่อเปรียบเทียบ reaction ระหว่าง caecum แต่ละบริเวณพบว่าไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 16 G)

#### 4.3.2 ระบบขับถ่าย

ระบบขับถ่ายของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงค่อนข้างเข้มบริเวณเซลล์เยื่อบุผิวของ bladder เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ reaction สีแดงเข้มบริเวณ luminal projection และภายใน cytoplasm ในขณะที่ nucleus ไม่พบ positive reaction (ภาพที่ 16 E และ G) เมื่อเปรียบเทียบ reaction ระหว่าง bladder แต่ละบริเวณพบว่าไม่มีลักษณะไม่แตกต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่า positive reaction ใน bladder จะเข้มกว่าใน caecum

#### 4.4 ระยะตัวเต็มวัย

ตำแหน่งการกระจายของ LAP ในพยาธิตัวเต็มวัยสามารถแบ่งตามระบบต่าง ๆ ได้ดังนี้

##### 4.4.1 ระบบทางเดินอาหาร

ระบบทางเดินอาหารของพยาธิตัว *F. gigantica* แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนต้นประกอบด้วย oral sucker pharynx esophagus และ caecal bifurcation ซึ่งไม่พบ positive reaction ของ LAP ภายในอวัยวะดังกล่าว (ภาพที่ 17 A และ B) แต่พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มใน caecum ซึ่งเป็นทางเดินอาหารส่วนปลาย เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ positive reaction ของ LAP สีแดงเข้มบริเวณ luminal projection ของเซลล์เยื่อบุผิว caecum นอกจากนั้นยังพบ positive reaction ลักษณะเป็นจุดสีแดงภายใน cytoplasm (ภาพที่ 17, 18) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของ positive reaction ระหว่าง caecum แต่ละบริเวณ พบว่ามีความแตกต่างกันคือ main caecum และแขนง proximal ที่แตกแขนงมาจาก main caecum ซึ่งพบอยู่บริเวณกลางลำตัว (ภาพที่ 17 F, 18 B และ D) รวมทั้งแขนง recurrent ซึ่งพบบริเวณส่วน oral cone (ภาพที่ 17 C และ D) มี positive reaction สีแดงเข้มปานกลางบริเวณ luminal projection ในขณะที่ภายใน cytoplasm พบ positive reaction ค่อนข้างน้อย ส่วนแขนง distal ของ caecum ซึ่งพบด้านข้างของลำตัวมี positive reaction เข้มมากทั้งบริเวณ luminal projection และภายใน cytoplasm (ภาพที่ 17 E, 18 A และ C)

##### 4.4.2 ระบบขับถ่าย

การกระจายของ LAP ในระบบขับถ่ายของพยาธิตัวเต็มวัยคล้ายกับพยาธิตัวอ่อน 4 สัปดาห์ โดยพบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มสม่ำเสมอบริเวณบริเวณ luminal projection และใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิว bladder (ภาพที่ 18 E และ F) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของ positive reaction ระหว่าง bladder แต่ละบริเวณพบว่าไม่แตกต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่า positive reaction ใน bladder จะเข้มกว่าใน caecum

##### 4.4.3 ระบบสืบพันธุ์

###### 4.4.3.1 ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย

**Vitelline gland** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มภายในเซลล์ vitelline ที่เจริญเต็มที่ ในขณะที่เซลล์ vitelline ในระยะอื่น ๆ ไม่พบ positive reaction เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction ภายใน cytoplasm แต่ไม่ปรากฏใน egg shell globules

และ nucleus (ภาพที่ 19 A - C) นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์ vitelline ที่อยู่ภายใน vitelline duct ก็พบ positive reaction เช่นกัน

**Ovary** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงบริเวณ mature oocyte (Oc<sub>4</sub>) ซึ่งอยู่บริเวณตอนกลางของ ovary (ภาพที่ 19 D - F) เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ positive reaction บริเวณ subplasmalemma ของ Oc<sub>4</sub> แต่ไม่พบ positive reaction ใน oocyte ระยะอื่น ๆ (ภาพที่ 19 F)

**Mehlis' gland** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มในเซลล์ Mehlis gland cell ทั้งหมด gland เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ LAP ลักษณะเป็นจุดกระจายอยู่ภายใน cytoplasm โดยแต่ละเซลล์มีความเข้มของ LAP แตกต่างกันไปเล็กน้อย (ภาพที่ 20 A - C)

**Uterus** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดง 2 บริเวณคือภายใน unembryonated eggs ซึ่งมีกระจายของ reaction ค่อนข้างสม่ำเสมอ แต่ไม่พบบริเวณเปลือกไข่ (ภาพที่ 20 E) และเยื่อบุผิวของ uterus ซึ่งเมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ positive reaction เข้มบริเวณ luminal projection แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ โดย LAP บริเวณ luminal projection มีความหนาแน่นมากกว่าภายใน cytoplasm (ภาพที่ 20 F และ G) นอกจากนี้ยังพบ positive reaction ของ LAP เข้มมากในกลุ่มของ sperm ที่อยู่ภายใน uterus (ภาพที่ 20 G)

**Vitelline reservoir** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มปานกลางภายในเซลล์ vitelline แต่ไม่พบ positive reaction ที่เซลล์เยื่อบุผิว vitelline reservoir ทั้งใน luminal projection และ cytoplasm (ภาพที่ 20 C และ D)

#### 4.4.3.2 ระบบสืบพันธุ์เพศผู้

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ที่พบการกระจายของ LAP ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่

**Testis** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มมากกระจายอย่างสม่ำเสมอบริเวณ spermatozoa ตรงกลางของท่อและอาจพบบริเวณ subplasmalemma ของ spermatozoon และ spermatogonia แต่ไม่พบ positive reaction ใน spermatozoon และ spermatogonia ทั้งที่บริเวณ cell membrane ภายใน cytoplasm และ nucleus ของเซลล์ (ภาพที่ 21 A - C)

**Seminal vesicle** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มบริเวณ spermatozoa ภายใน seminal vesicle เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ positive reaction บริเวณ luminal projection และภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผนัง seminal vesicle เช่นกัน (ภาพที่ 21 D และ E)

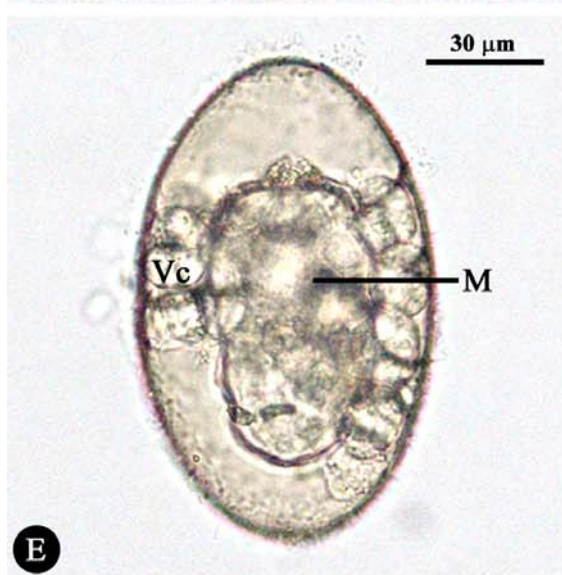
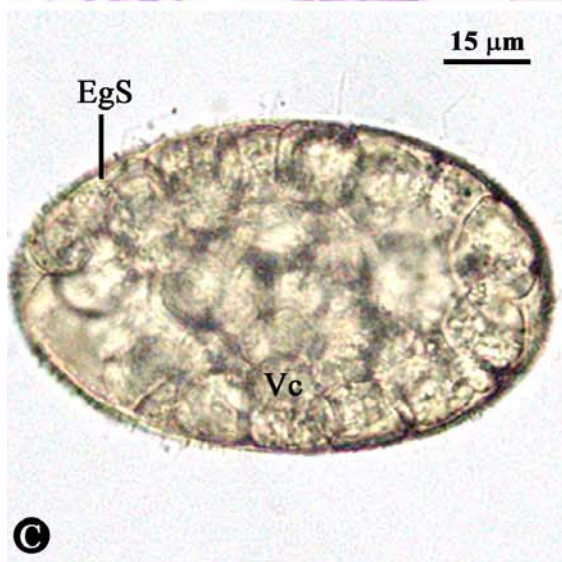
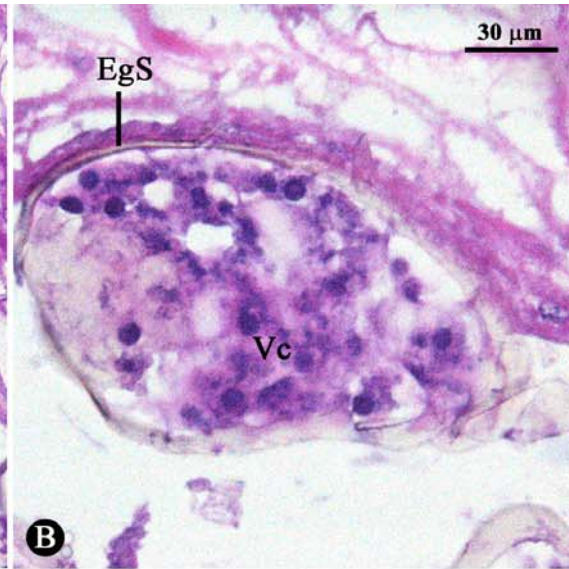
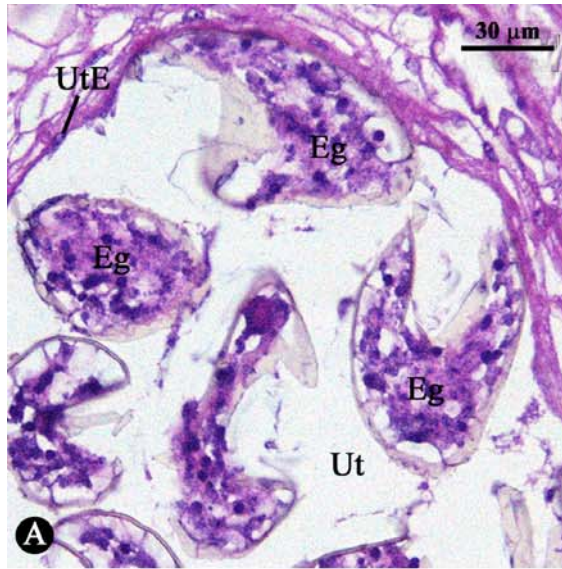
**Cirrus sac** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงบริเวณ luminal projection และภายใน cytoplasm ของเซลล์ภายใน cirrus sac (ภาพที่ 21 F)

**Prostate gland** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มใน prostate gland cell (PgC) ทั้งหมด gland โดยพบ positive reaction ภายใน cytoplasm ของเซลล์ แต่ความหนาแน่นของ LAP ในเซลล์แต่ละเซลล์อาจไม่เท่ากัน (ภาพที่ 21 F และ G)

**ภาพที่ 11**      ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของไข่พยาธิ *F. gigantica*

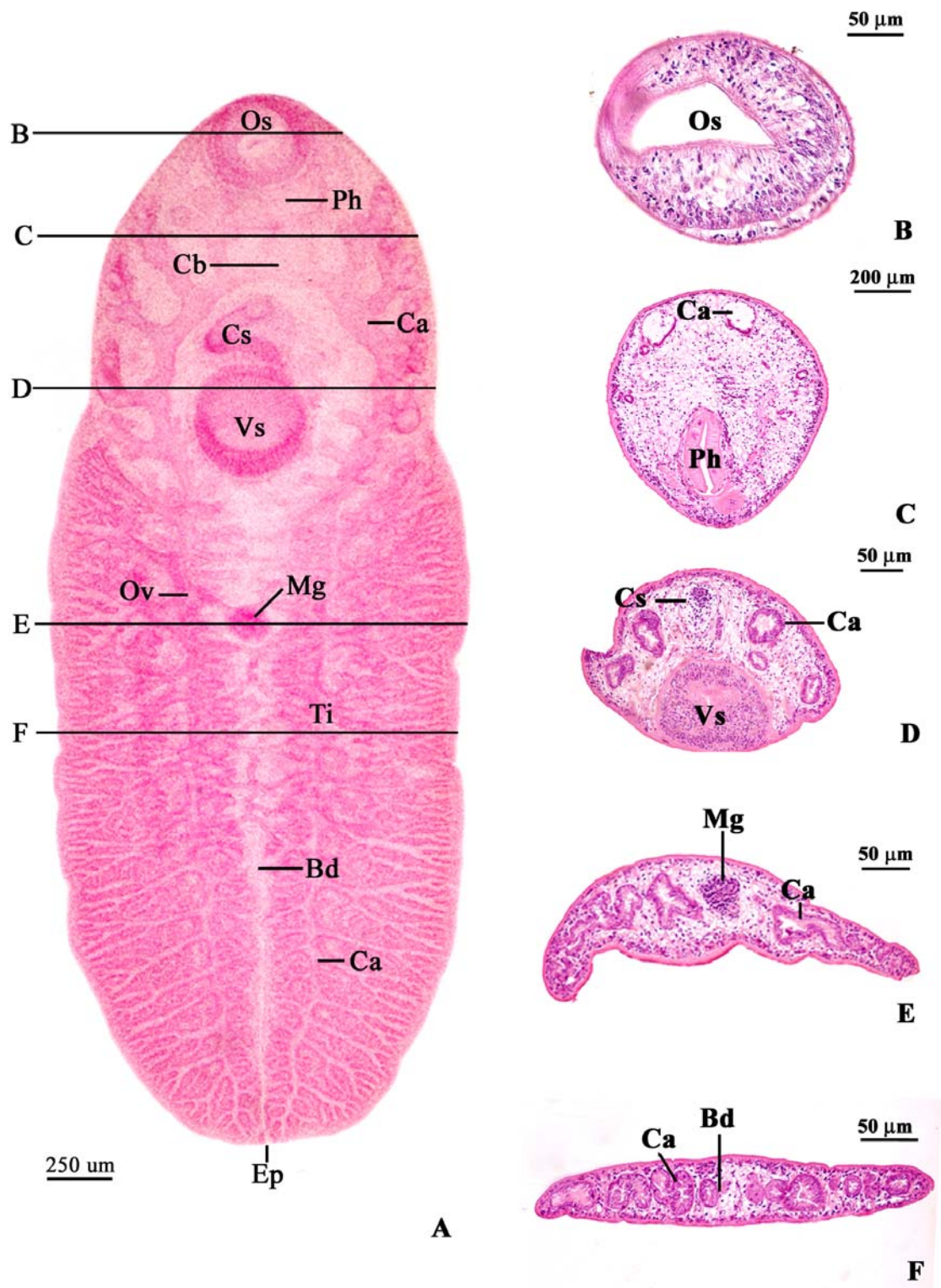
- A – B      ภาพกำลังขยายปานกลาง ที่ย้อมด้วยสี H&E แสดงโครงสร้างภายในไข่พยาธิระยะ unembryonated egg (Eg) ภายใน uterus (Ut)
- C          ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงโครงสร้างภายในไข่พยาธิระยะ unembryonated egg (Eg) ซึ่งเป็นตัวอย่างสด พบกลุ่มของ vitelline cell (Vc) ภายในไข่พยาธิ
- D – F      ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงโครงสร้างภายในของไข่พยาธิระยะ embryonated egg พบ miracidium (M) และ vitelline cell (Vc)

(EgS = egg shell, UtE = uterine epithelium)



## ภาพที่ 12

- A ภาพถ่ายภาพกล้องจุลทรรศน์ของพยาธิตัวอ้วนอายุ 4 สัปดาห์ ภาพกำลังขยายต่ำ ย้อมด้วยสี carmine แสดงโครงสร้างและอวัยวะของพยาธิตัวอ้วนประกอบด้วย oral sucker (Os) ซึ่งล้อมรอบช่องปากบริเวณส่วนหัว caeca (Ca) เป็นส่วนที่ต่อมาจาก pharynx (Ph) และ esophagus (Es) ซึ่งเริ่มตั้งแต่บริเวณ caecal bifercation (Cb) โดย caeca จะแตกออกเป็น 2 แขนงทอดไปทางด้านข้าง ลำตัวทั้งสองข้างตลอดความยาวของพยาธิตัวอ้วน ventral sucker (Vs) บริเวณแนวกลางลำตัวของพยาธิตัวอ้วนและด้านบนต่อ ventral sucker พบ cirrus sac (Cs) ซึ่งเป็นอวัยวะของระบบสืบพันธุ์เพศผู้โดยจะส่งท่อมาเปิดที่ genital pore ใกล้กับ ventral sucker Mehlis' gland (Mg) ลักษณะเป็นก้อนกลมบริเวณกึ่งกลางลำตัวของพยาธิตัวอ้วน โดยด้านข้างพบ ovary (Ov) ลักษณะเป็นท่อขดไปมา testis (Ti) ลักษณะเป็นท่อแตกแขนงจำนวนมากด้านข้างลำตัวทั้งสองข้างติดต่อ Mehlis' gland bladder (Bd) ลักษณะเป็นท่อแตกแขนงจำนวนมากโดยมีท่อใหญ่อยู่แนวกลางลำตัว ส่วนท่อแขนงจะทอดไปทางด้านข้างของลำตัวและส่วนท้ายสุดเป็น excretory pore (Ep) เป็นรูเปิดสำหรับขับถ่ายของเสียออกจากตัวพยาธิตัวอ้วน
- B - F ภาพตัดขวางกำลังขยายต่ำของพยาธิตัวอ้วนอายุ 4 สัปดาห์ ย้อมด้วยสี H&E
- B แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน oral sucker (Os) ซึ่งล้อมรอบช่องปากของพยาธิตัวอ้วน
  - C แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน pharynx (Ph)
  - D แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน ventral sucker (Vs) และ cirrus sac (Cs)
  - E แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน Mehlis gland (Mg)
  - F แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่านส่วนหางของพยาธิตัวอ้วน



### ภาพที่ 13

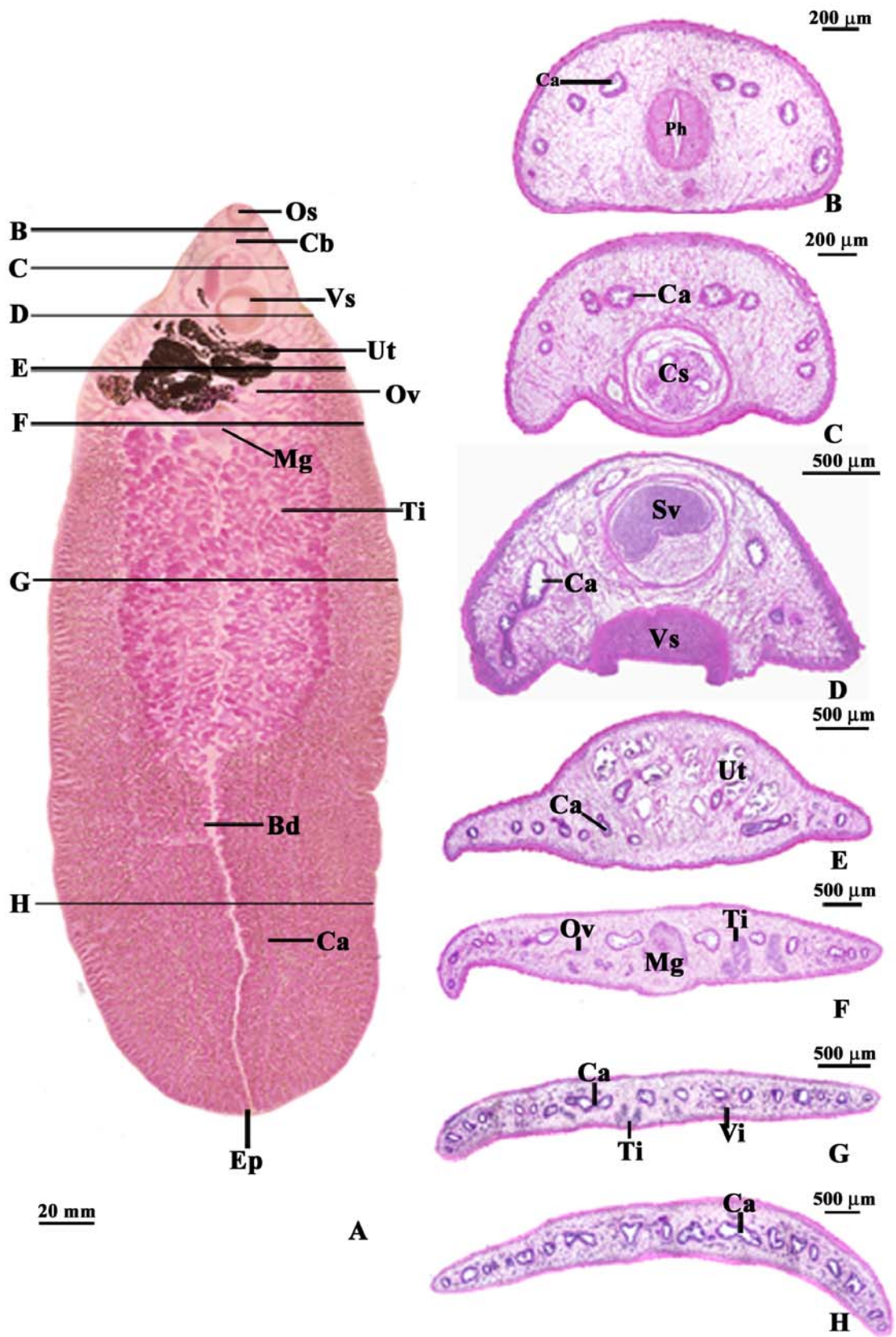
ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของพยาธิตัวโตเต็มวัย *F. gigantea*

A

ภาพกำลังขยายต่ำ ย้อมด้วยสี carmine แสดงโครงสร้างและอวัยวะของพยาธิตัวโตเต็มวัย ประกอบด้วย oral sucker (Os) ซึ่งล้อมรอบช่องปากบริเวณส่วนหัว caeca (Ca) เป็นส่วนที่ต่อมาจาก pharynx (Ph) และ esophagus (Es) ซึ่งเริ่มตั้งแต่บริเวณ caecal bifercation (Cb) โดย caeca จะแตกออกเป็น 2 แขนงทอดไปทางด้านข้าง ลำตัวทั้งสองข้างตลอดความยาวของพยาธิตัวโตเต็มวัย ventral sucker (Vs) บริเวณแนวกลางลำตัวของพยาธิตัวโตเต็มวัยและด้านบนต่อ ventral sucker พบ cirrus sac (Cs) ซึ่งเป็นอวัยวะของระบบสืบพันธุ์เพศผู้โดยจะส่งท่อมาเปิดที่ genital pore ใกล้กับ ventral sucker Mehlis' gland (Mg) ลักษณะเป็นก้อนกลมบริเวณกลางลำตัวของพยาธิตัวโตเต็มวัย โดยด้านข้างพบ ovary (Ov) ลักษณะเป็นท่อขดไปมา testis (Ti) ลักษณะเป็นท่อแตกแขนงจำนวนมากด้านข้างลำตัวทั้งสองข้างติดต่อ Mehlis' gland bladder (Bd) ลักษณะเป็นท่อแตกแขนงจำนวนมากโดยมีท่อใหญ่อยู่แนวกลางลำตัว ส่วนท่อแขนงจะทอดไปทางด้านข้างของลำตัวและส่วนท้ายสุดเป็น excretory pore (Ep) เป็นรูเปิดสำหรับขับถ่ายของเสียออกจากตัวพยาธิตัวโตเต็มวัย

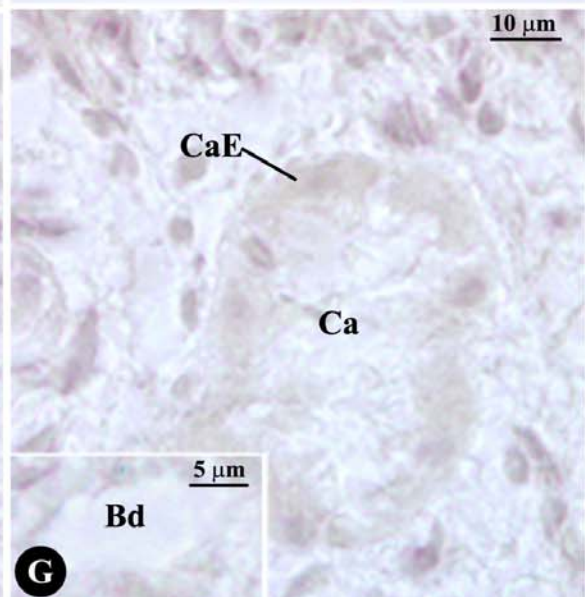
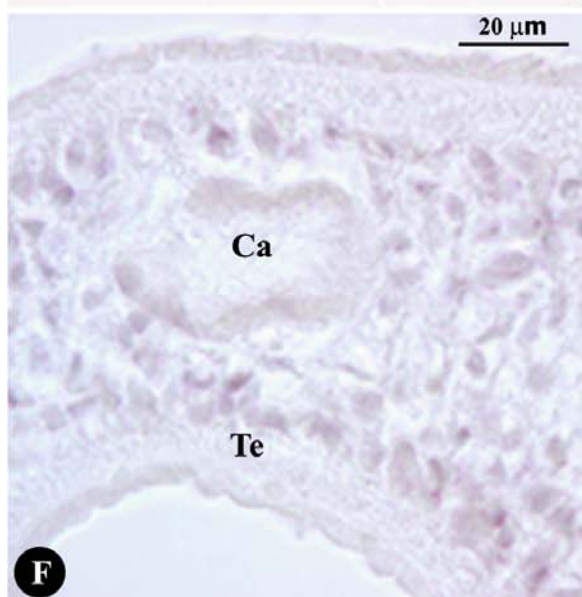
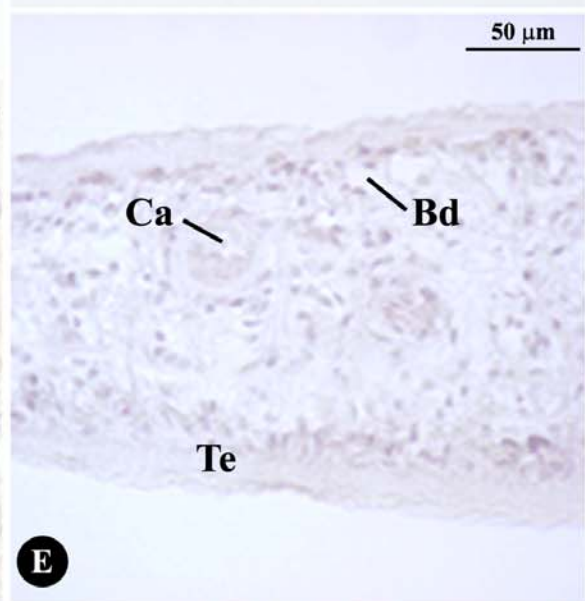
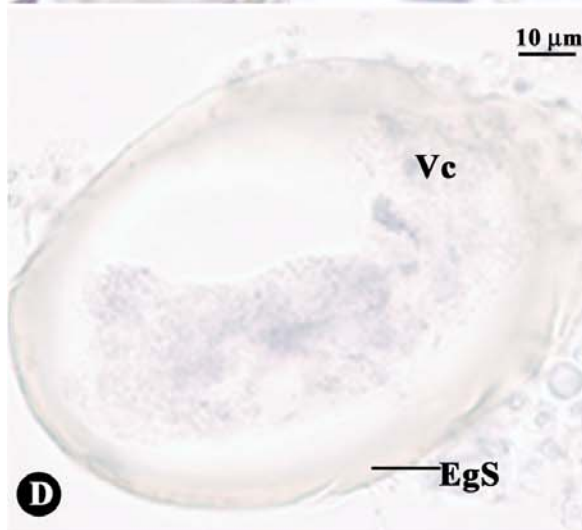
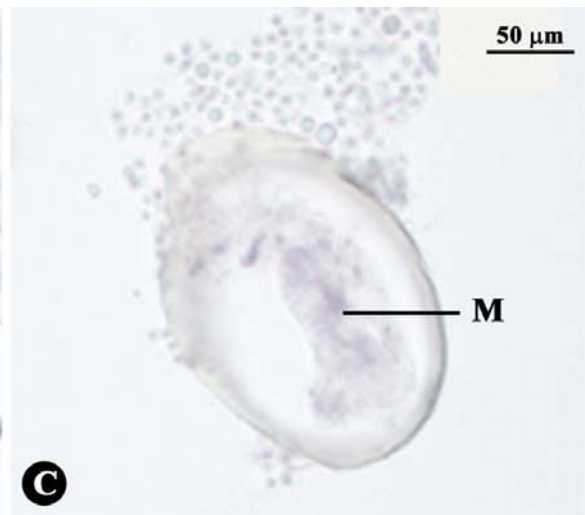
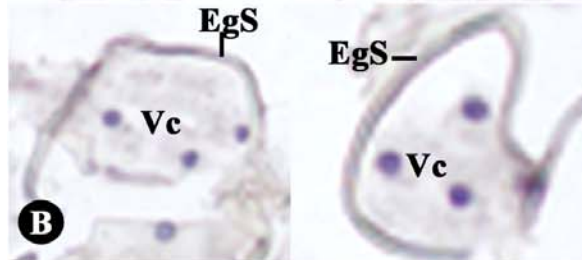
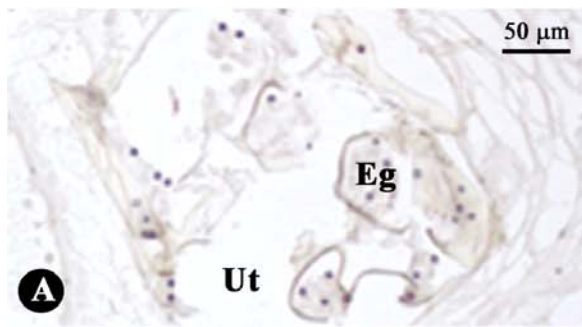
B - G ภาพตัดขวางกำลังขยายต่ำของพยาธิตัวโตเต็มวัย *F. gigantea* ย้อมด้วยสี H&E

- B แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน pharynx (Ph)
- C แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน cirrus sac (Cs)
- D แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน ventral sucker (Vs) และ seminal vesicle (Sv)
- E แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน uterus (Ut)
- F แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน testis (Ti) และ vitelline gland (Vi)
- F แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่านส่วนหางของพยาธิตัวโตเต็มวัย



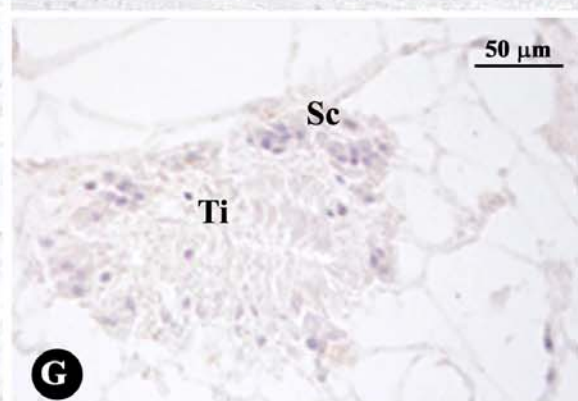
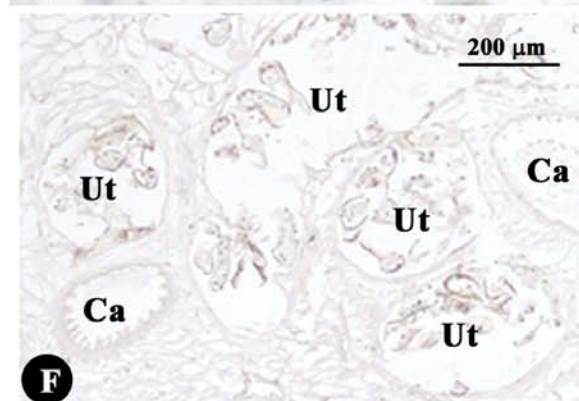
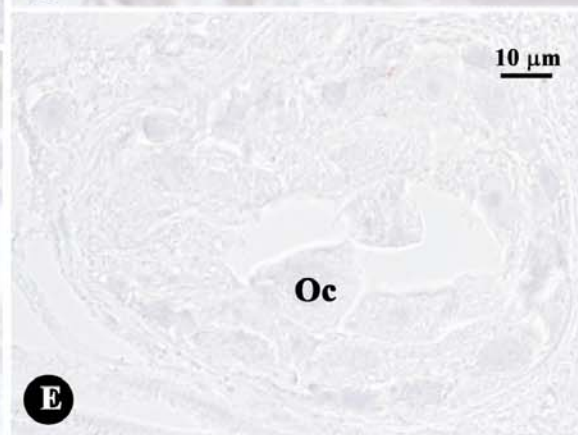
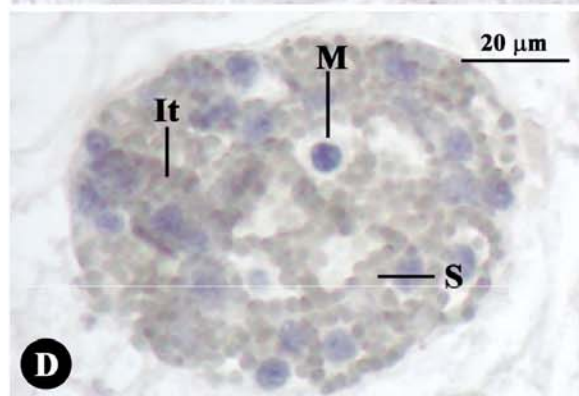
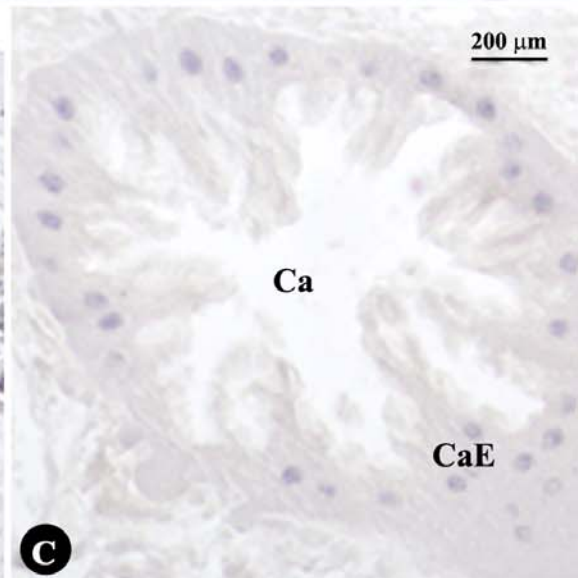
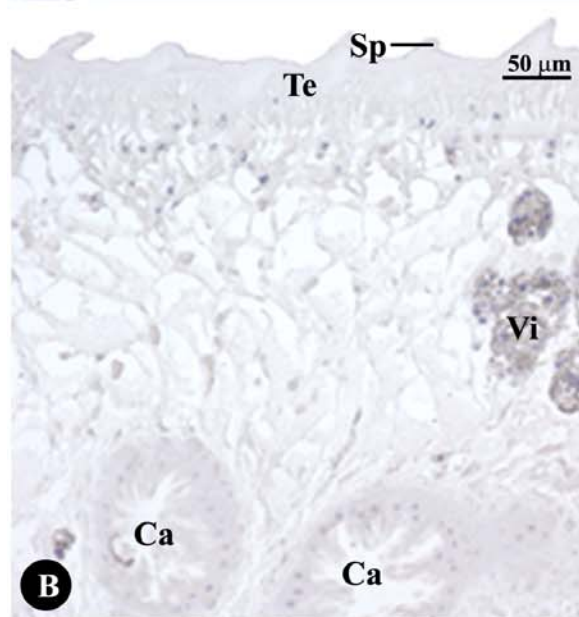
- ภาพที่ 14** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของพยาธิระยะ unembryonated egg, embryonated egg และพยาธิตัวอ่อน 4 สัปดาห์ กลุ่มควบคุมที่ย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin แสดง negative staining ของแอนไชม์ LAP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ
- A – B ภาพกำลังขยายปานกลาง unembryonated egg (Eg) ภายใน uterus (Ut)
  - C – D ภาพกำลังขยายปานกลาง (C) และภาพกำลังขยายสูง (D) ของ embryonated egg และ miracidium (M) อยู่ภายในไข่พยาธิ
  - E ภาพกำลังขยายปานกลาง ของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์
  - F –G ภาพกำลังขยายสูง แสดง caecum (Ca) และ bladder (Bd)

(CaE = caecal epithelium, EgS = egg shell, Os = oral sucker, Te = tegument, Vc = vitelline cell, และ Vs = ventral sucker)

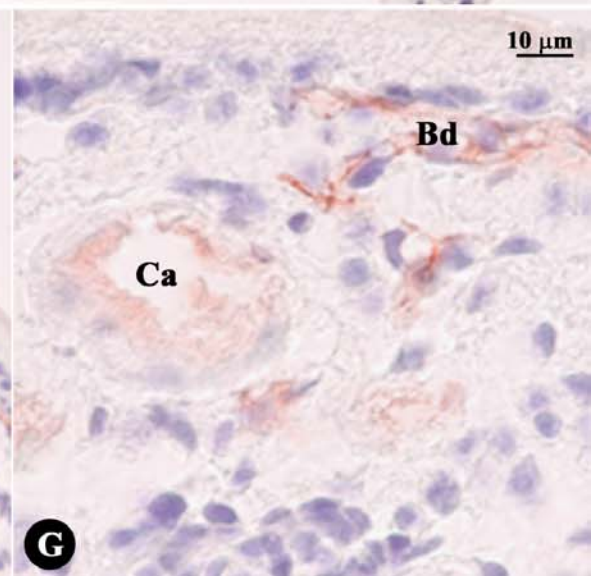
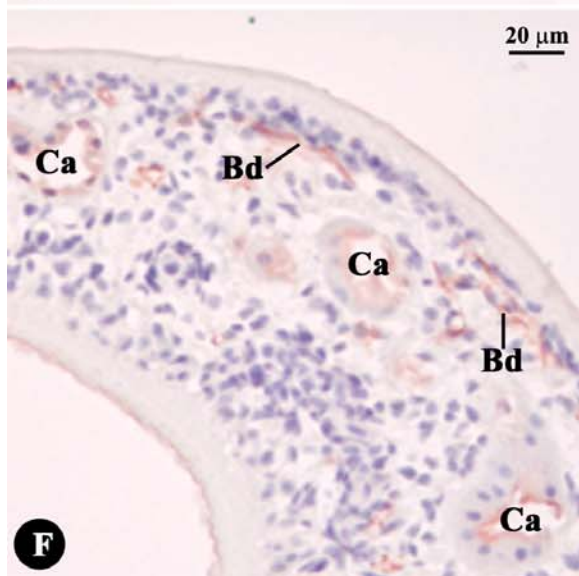
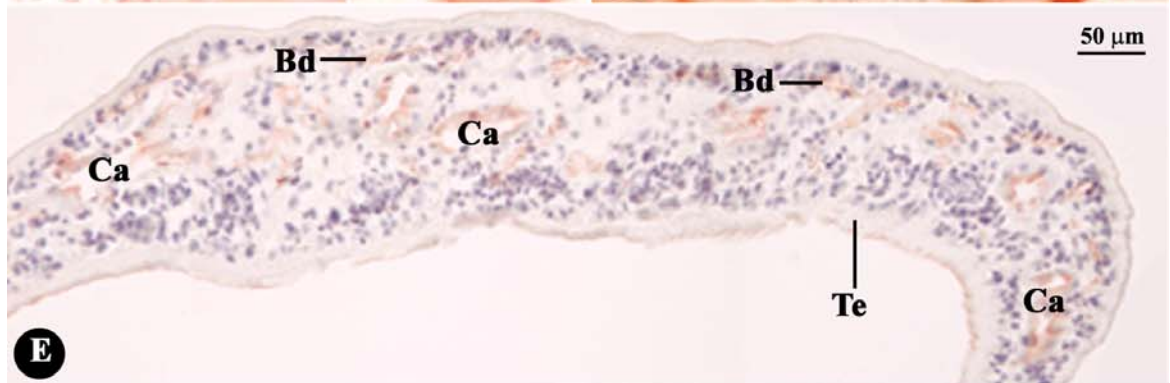
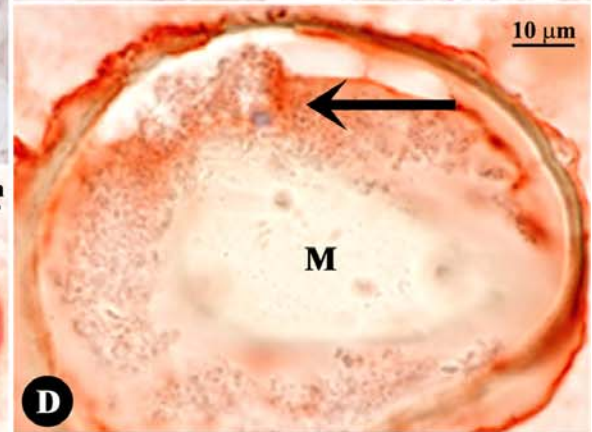
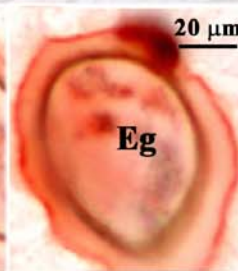
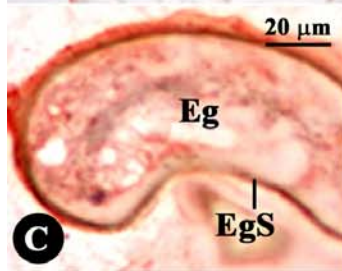
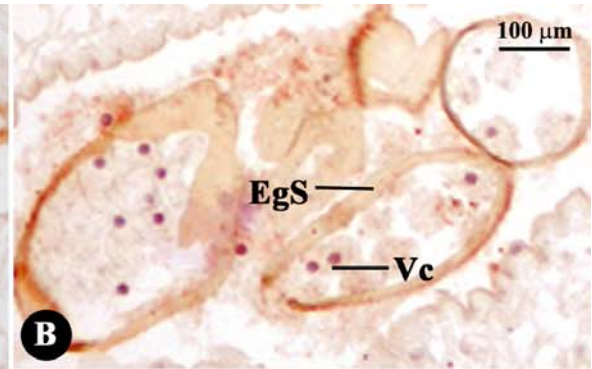
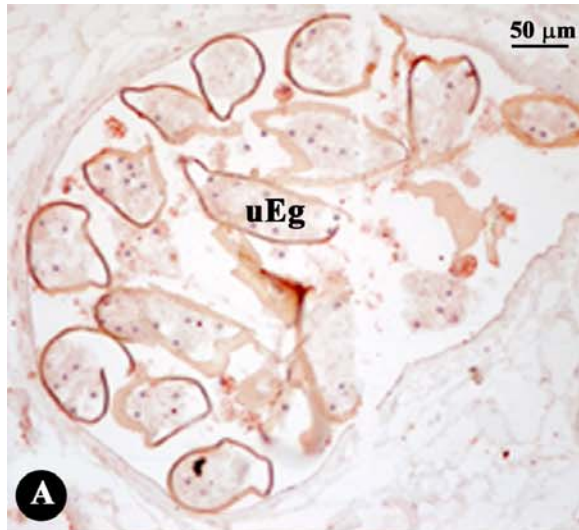


- ภาพที่ 15** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงโครงสร้างของพยาธิระยะตัวเต็มวัยกลุ่มควบคุม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin แสดง negative staining ของเอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAP) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ
- A – B ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงโครงสร้างของภายในของพยาธิที่ตัดผ่าน uterus
  - C ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง caecum (Ca)
  - D ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง vitelline gland (Vi)
  - E ภาพกำลังขยายสูง แสดง oocyte (Oc) ภายใน ovary (Ov)
  - F ภาพกำลังขยายต่ำ แสดง uterus (Ut)
  - G ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง testis (Ti) ซึ่งพบ spermatocyte (Sc) อยู่ภายใน

(CaE = caecal epithelium, Sp = spine)

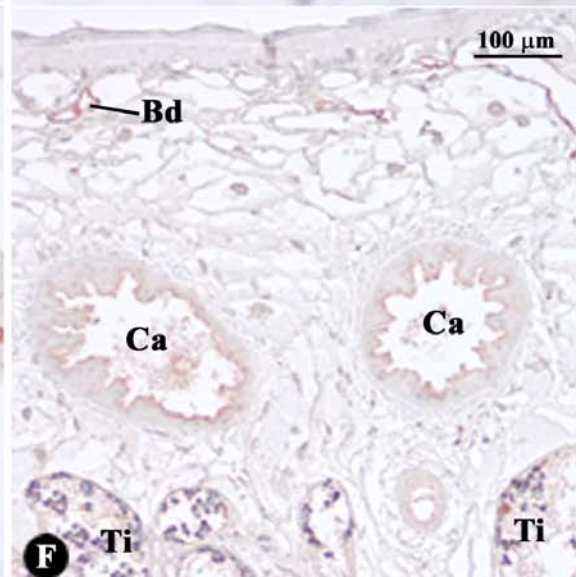
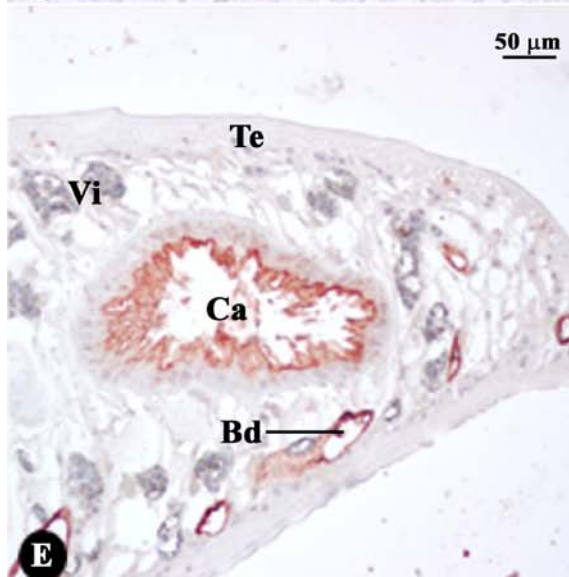
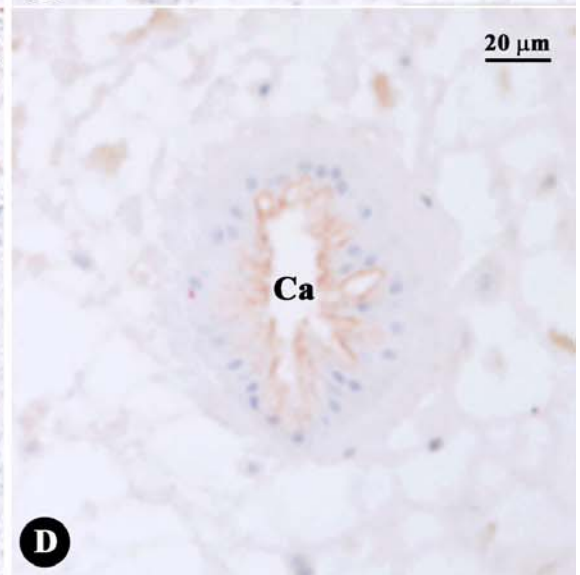
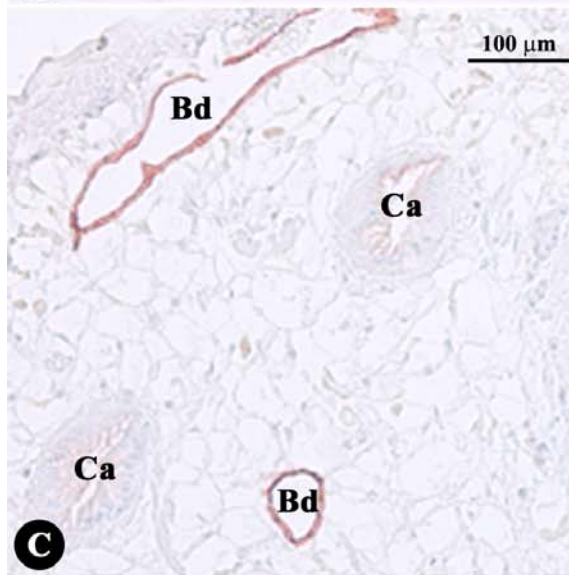
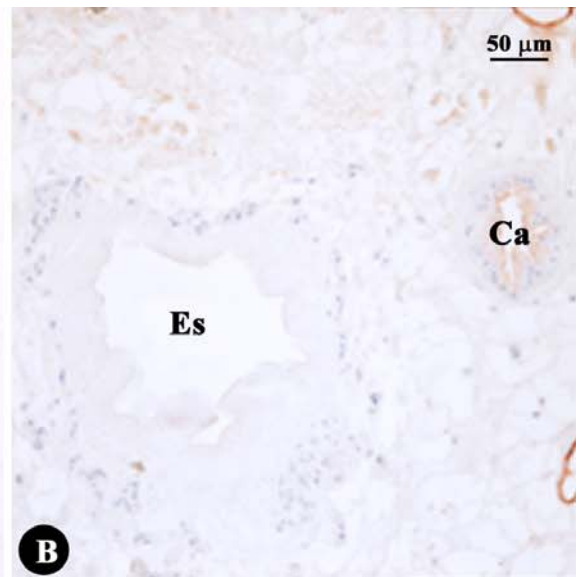
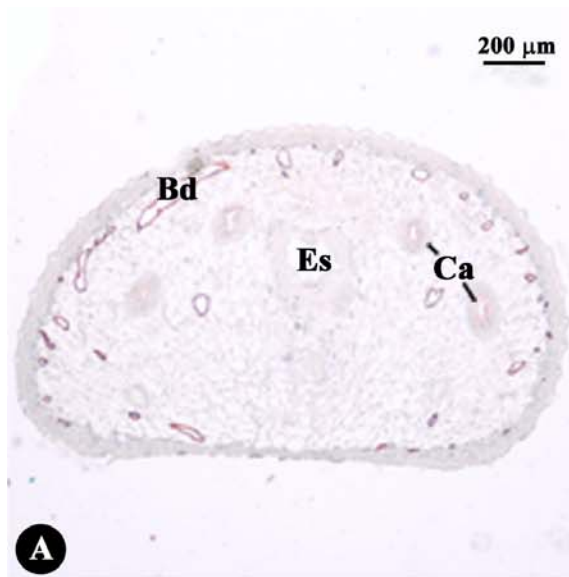


- ภาพที่ 16** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพยาธิระยะ unembryonated egg, embryonated egg และพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin
- A – B ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน unembryonated egg (uEg) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงอย่างสม่ำเสมอภายในของเหลวในภายในและ vitelline cell (Vc) โดยไม่พบบริเวณเปลือกไข่ (EgS)
- C – D ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน embryonated egg (Eg) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงอย่างสม่ำเสมอภายใน hatching fluid (ลูกศร) และ miracidium (M) ภายในไข่ โดยไม่พบที่เปลือกไข่เช่นกัน
- E ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ในพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์
- F – G ภาพกำลังขยายสูง แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน caecum (Ca) และ bladder (Bd) ของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงบริเวณ luminal projection และเซลล์เยื่อบุผิวทั้ง caecum และ bladder



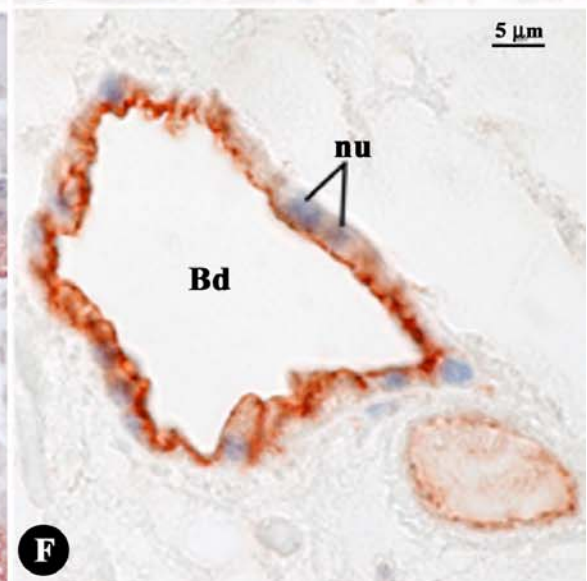
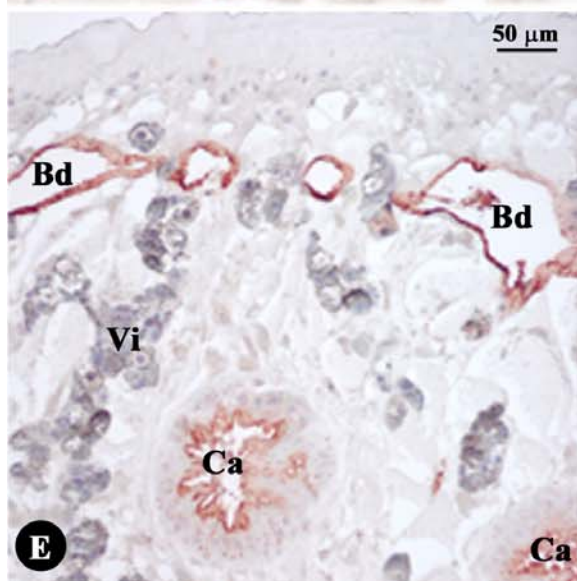
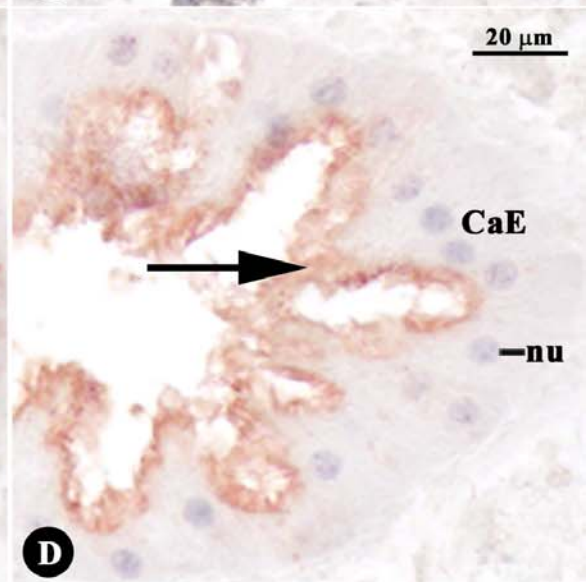
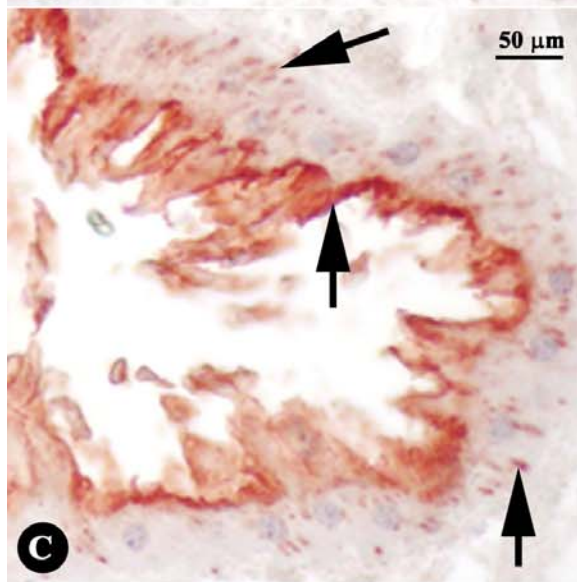
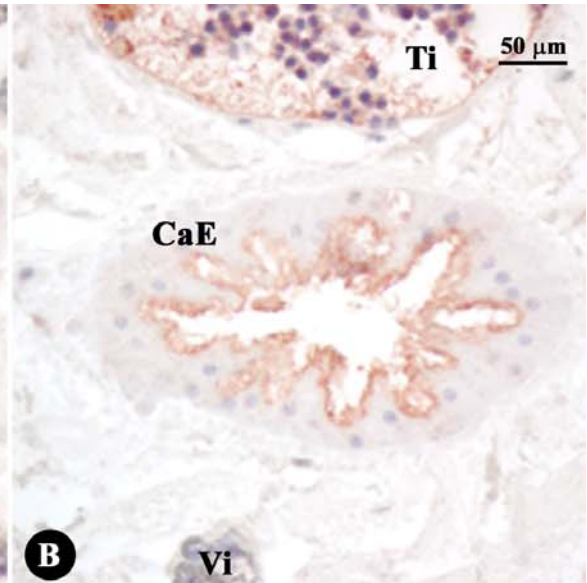
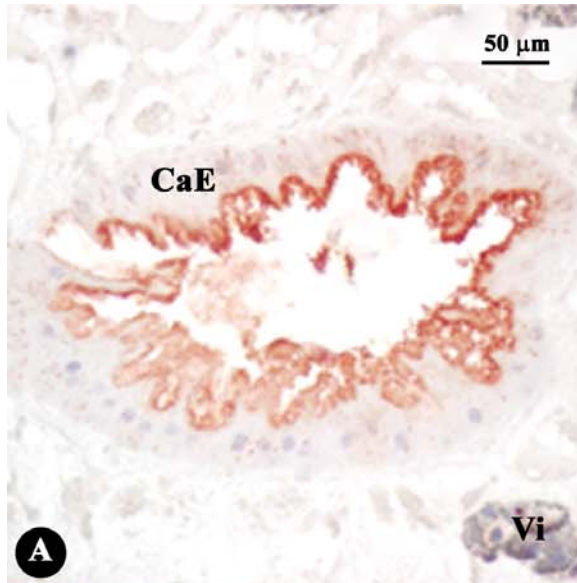
- ภาพที่ 17** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน caeca (Ca) พยาธิระยะตัวเต็ม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxin
- A – B ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และปานกลาง (B) แสดงเซลล์เยื่อบุผิว esophagus (Es) ซึ่งไม่พบ การกระจายของเอนไซม์ LAP
- C – D ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ในแขนง recurrent branch ของ caecum (Ca) บริเวณส่วนหัวของพยาธิ ลักษณะสีแดงอย่างสม่ำเสมอบริเวณ luminal projection ส่วน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุ caecum มี LAP ค่อนข้างน้อย
- E ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ในในแขนง lateral branch ของ caecum (Ca) บริเวณด้านข้างลำตัวของพยาธิ ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มมากภายใน luminal projection และ cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุ caecum
- F ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ในแขนง medial branch ของ caecum บริเวณแนวกลางลำตัวของพยาธิ ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มปานกลางภายใน luminal projection และ cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุ caecum ซึ่งเหมือนกับใน แขนง recurrent branch ของ caecum

(Bd = bladder, Te = tegument และ Vi = vitelline gland)



- ภาพที่ 18** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ในแขนง recurrent branch และ medial branch ของ caeca และ bladder พยาธิระยะตัวเต็ม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxylin
- A , C ภาพกำลังขยายปานกลาง (A) และสูง (C) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน lateral branch ของ caecum (Ca) บริเวณแขนง บริเวณด้านข้างลำตัวของพยาธิ ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มมากภายใน luminal projection และใน granule (ลูกศร) ภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุ caecum (CaE)
- B , D ภาพกำลังขยายปานกลาง (B) และสูง (D) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน recurrent branch ของ caecum (Ca) บริเวณส่วนหัวของพยาธิ และ medial branch บริเวณด้านข้างลำตัวของพยาธิ ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มปานกลางภายใน luminal projection และใน granule (ลูกศร) ภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุ caecum (CaE)
- E - F ภาพกำลังขยายต่ำ (E) และสูง (F) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน bladder (Bd) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มมากบริเวณ luminal projection ซึ่งเข้มกว่าภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิว

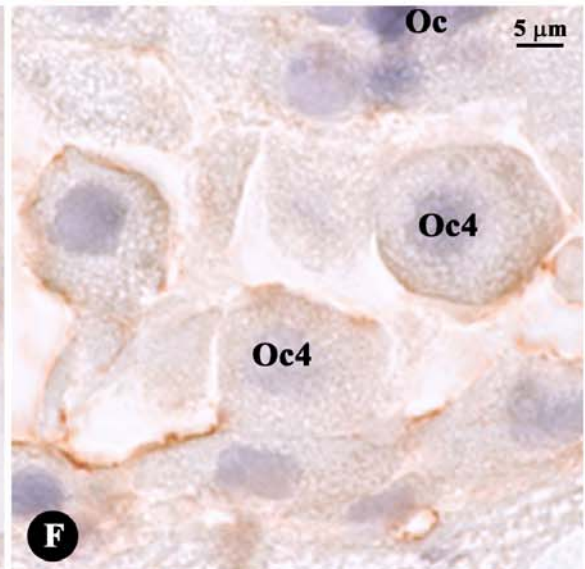
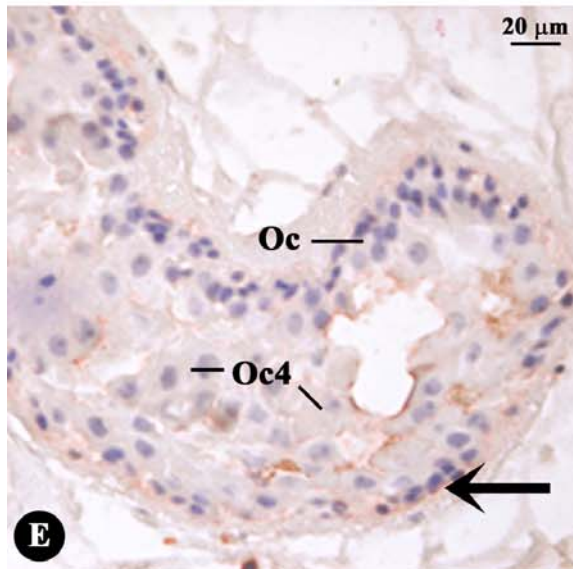
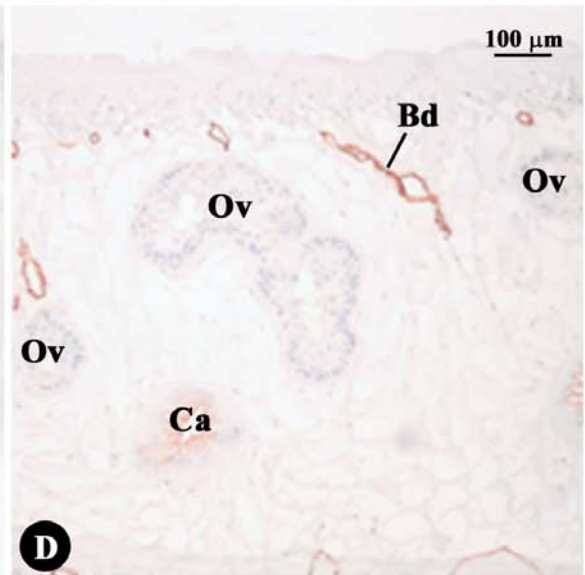
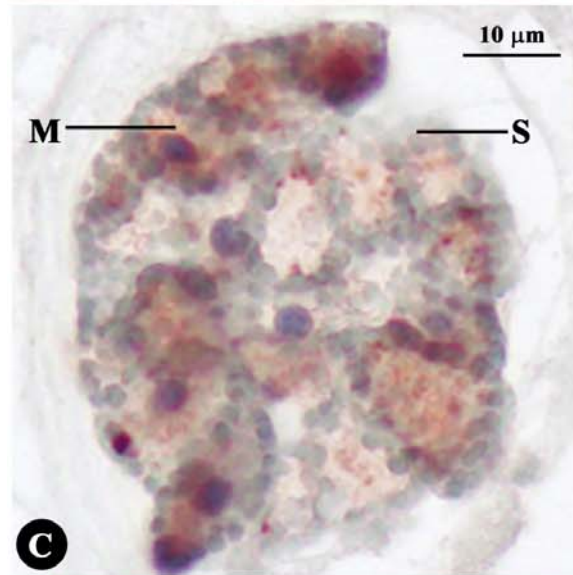
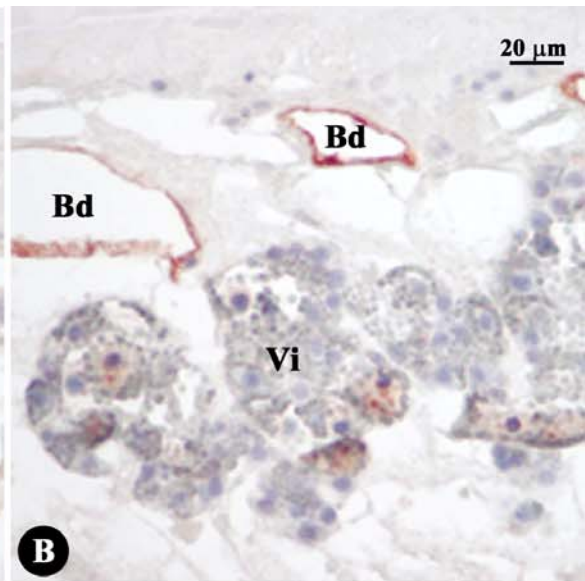
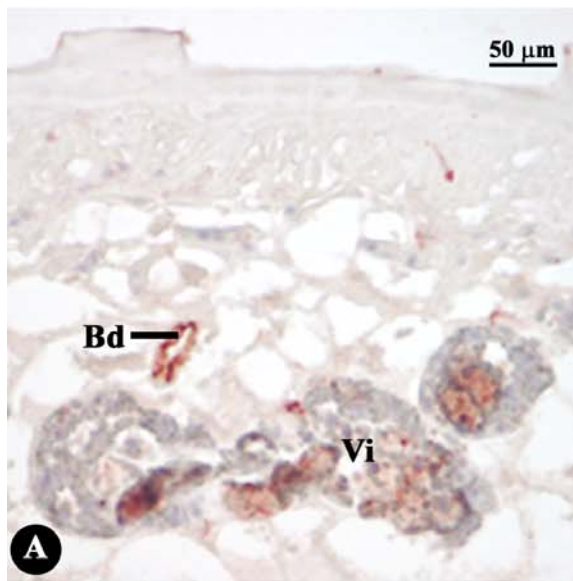
(nu = nucleus และ Vi = vitelline gland)



**ภาพที่ 19**      ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน vitelline gland (Vi) และ ovary (Ov) ของพยาธิระยะตัวเต็ม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin ใน

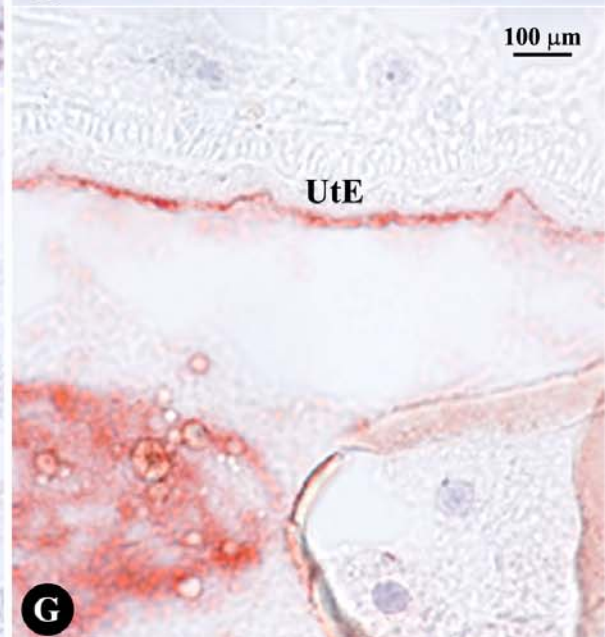
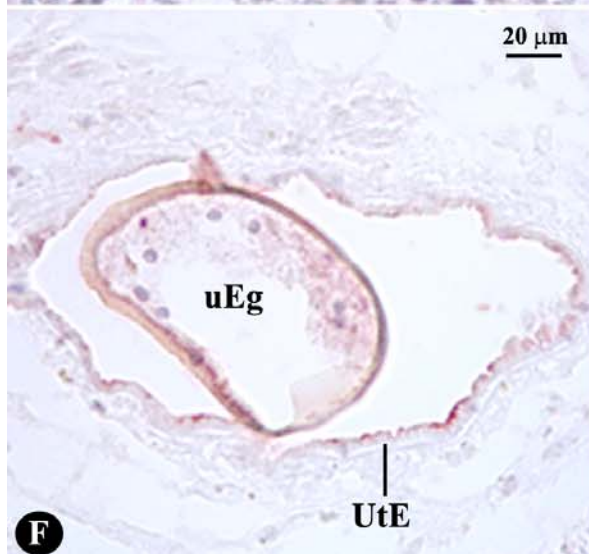
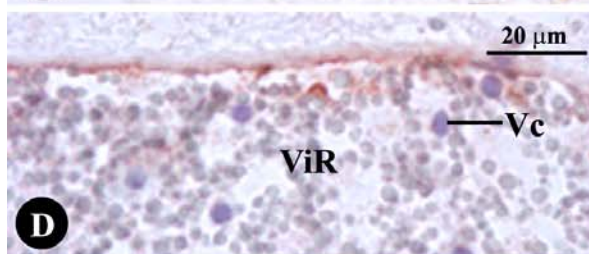
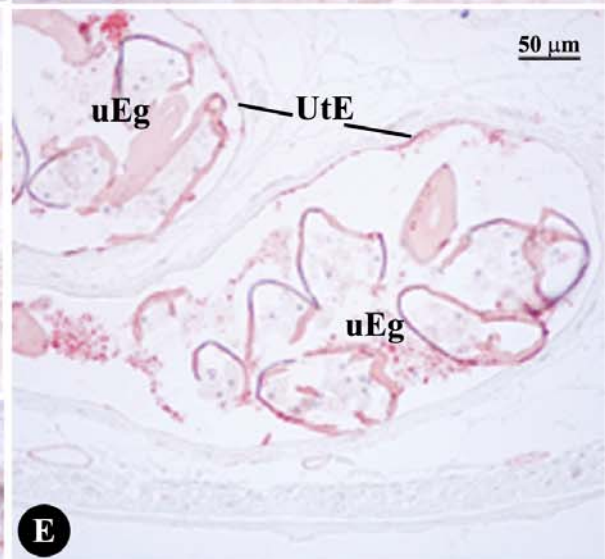
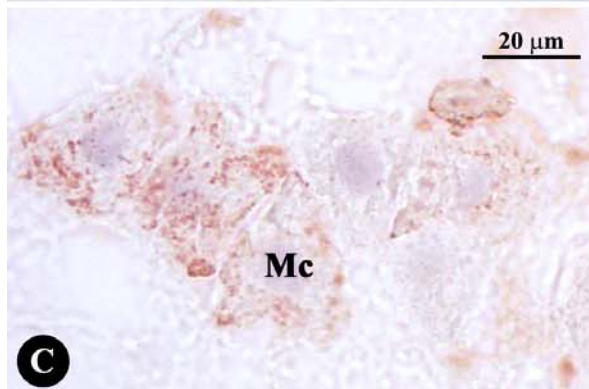
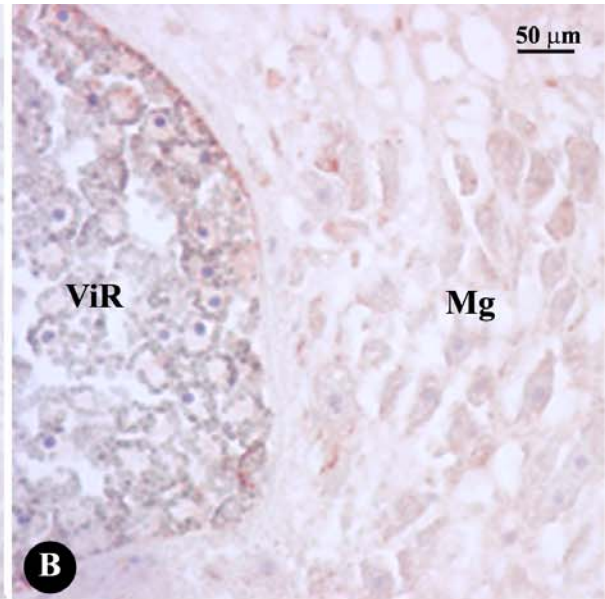
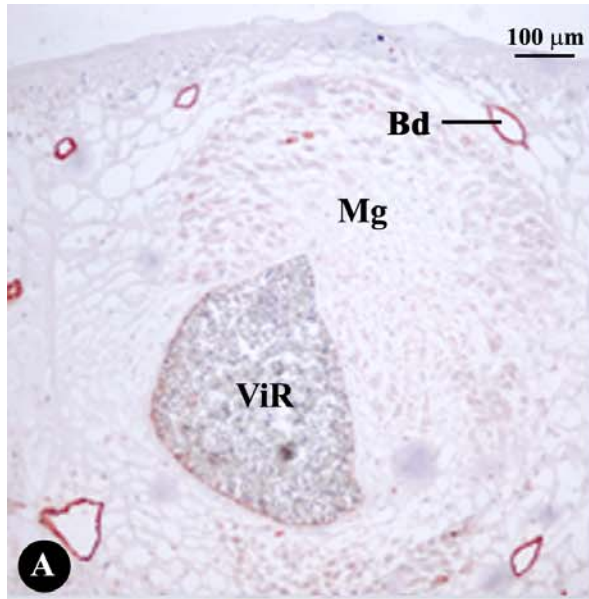
- A - C ภาพกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน vitelline gland (Vi) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มใน mature vitelline cell (M) โดยไม่พบในระยะอื่น ๆ ของ Vi
- D - F ภาพกำลังขยายต่ำ (D) ปานกลาง (E) และสูง (F) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ลักษณะเป็นแถบสีแดงปานกลางบริเวณ plasma membrane ของ mature oocyte (Oc4) และ nurse cell (ลูกศร) บริเวณด้านในสุดติดกับเซลล์เยื่อ ovary (Ov)

(Bd = Oc = oocyte, S = shell globules)



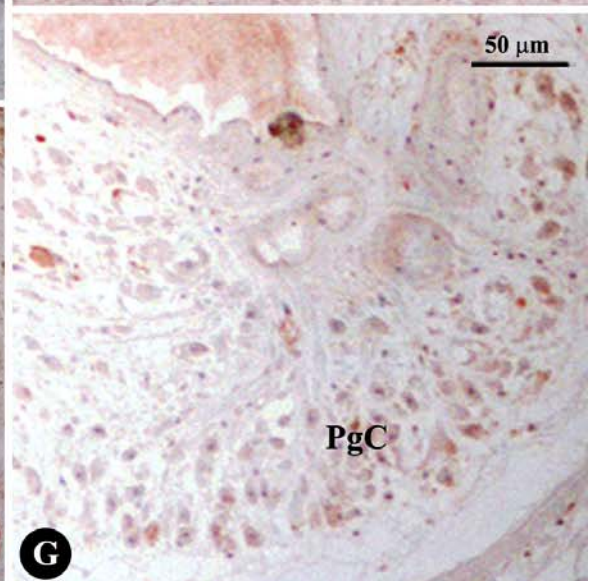
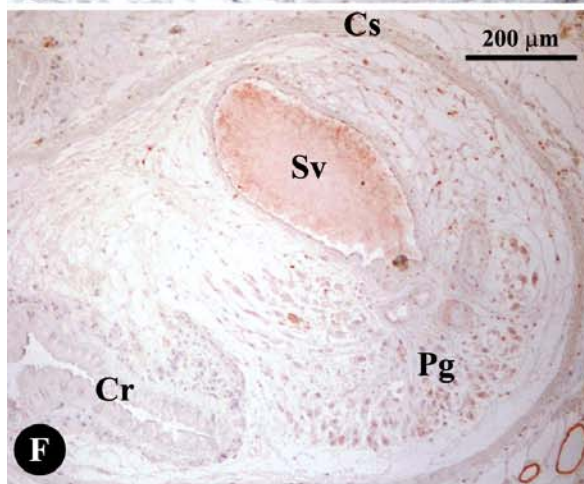
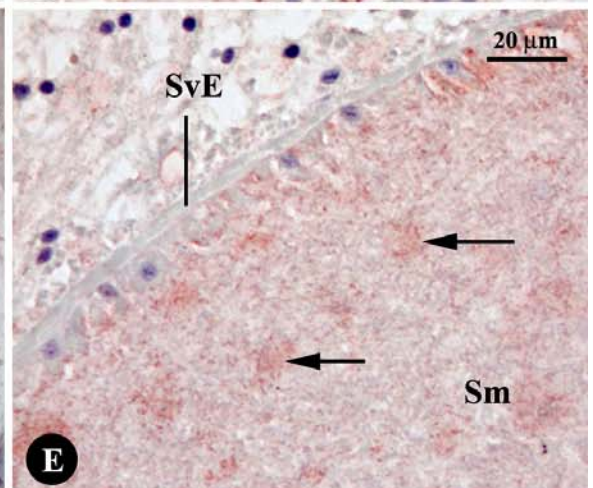
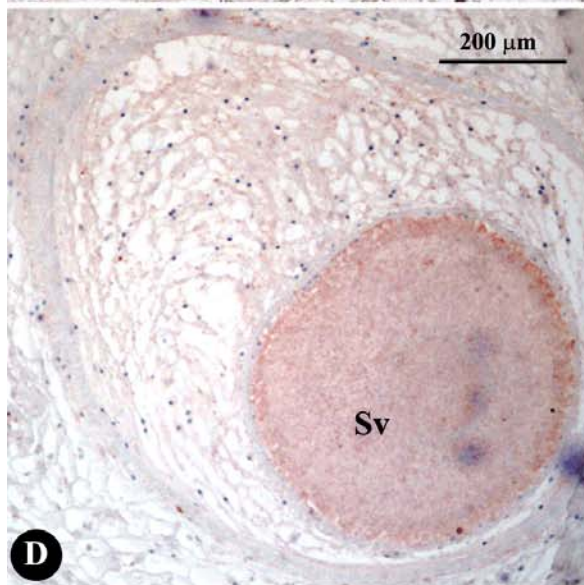
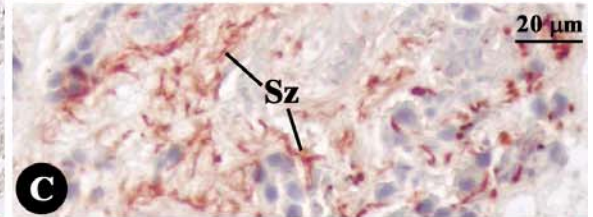
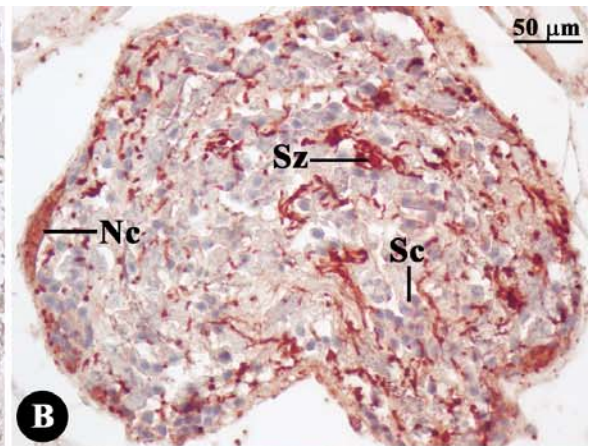
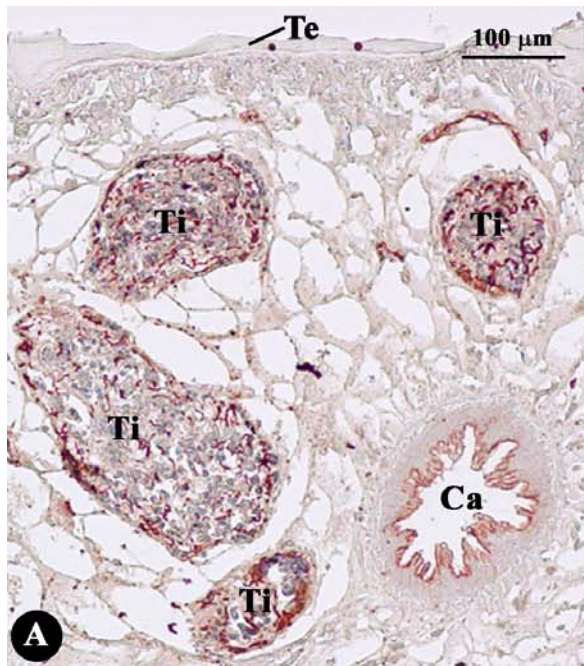
- ภาพที่ 20**      ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน Mehlis' gland, vitelline reservoir และ uterus ของพยาธิตัวเต็ม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxin
- A - D   ภาพกำลังขยายต่ำ (A, B) และสูง (C, D) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP Mehlis' gland (Mg) และ vitelline reservoir (ViR) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มใน cytoplasm ของ Mehlis' gland cell (Mc) และใน mature vitelline cell (Vc)
- E - F   ภาพกำลังขยายปานกลาง (E) และสูง (F) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ลักษณะเป็นแถบสีแดงเข้มบริเวณ luminal projection ของเซลล์เยื่อบุผิว uterus (UtE)

(uEg = unembryonated egg)



- ภาพที่ 21** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน testis (Ti), seminal vesicle (Sv) และ prostate gland (Pg) ของพยาธิระยะตัวเต็ม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin
- A - C ภาพกำลังขยายปานกลาง (A) และสูง (B, C) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน testis (Ti) ลักษณะเป็นแถบสีแดงเข้มมากบริเวณ spermatozoa (Sz) และภายใน nurse cell (Nc)
- D - E ภาพกำลังขยายต่ำ (D) และสูง (E) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน seminal vesicle (Sv) ลักษณะเป็นแถบสีแดงเข้มมากบริเวณ spermatozoa (Sz) ภายใน seminal vesicle (Sv) และมีสีค่อนข้างน้อยภายในเยื่อบุผิว seminal vesicle (SvE)
- F - G ภาพกำลังขยายต่ำ (F) และสูง (G) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน prostate gland (Pg) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มภายใน cytoplasm ของ prostate gland cell (PgC)

(Cr = cirrus และ Cs = cirrus sac)



## 5. cDNA Library screening

หลังจากการทำ plaque lift และนำแผ่น nitrocellulose มาทำ immunostaining โดยใช้ polyclonal antibody anti LAP ที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า ไม่ปรากฏ positive reaction เกิดขึ้นบนแผ่น nitrocellulose แต่อย่างใด แสดงให้เห็นว่า polyclonal antibody ที่ผลิตได้ไม่สามารถจับกับ protein ที่อยู่บนแผ่น nitrocellulose ได้ แม้กระทั่งเมื่อปรับความเข้มข้นของ primary antibody หรือการปรับเวลาในการ incubate ด้วย primary antibody ก็ตาม แสดงว่าไม่สามารถนำ polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากการทดลองในครั้งนี้ไปเป็นเครื่องมือในการ screening หา gene ของ LAP ด้วยวิธีการข้างต้นได้

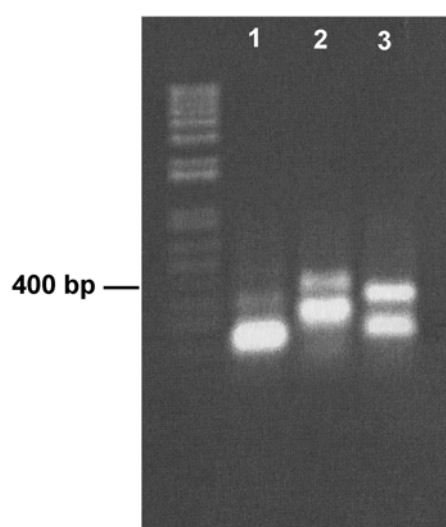
## 6. การ clone gene ด้วยวิธี RT-PCR

### 6.1 RT-PCR

จากการทำ RT product ที่ได้ไปทำ PCR แล้วนำ PCR product ไปตรวจสอบด้วย agarose gel พบว่าการใช้ specific primer ที่มี sequence แตกต่างกัน จะให้ PCR product ที่แตกต่างกัน คือ การใช้ forward primer fLAP 1 + rLAP1 หรือ fLAP2 + rLAP 2 โดย anneal ที่ 40 องศาเซลเซียส ปรากฏแถบให้เห็นเฉพาะที่ 20 bp ในขณะที่ การใช้ fLAP 3 + rLAP 1 หรือ rLAP 2 หรือ rLAP 3 โดย anneal ที่ 50 องศาเซลเซียส จะปรากฏแถบให้เห็นหลายแถบ โดยจะมีแถบที่ใกล้เคียงกับ expected band คือประมาณ 400 bp (ภาพที่ 22)

### 6.2 sequencing

เมื่อตัด gel ที่ได้ แล้วนำไป sequence แล้วนำ sequence ที่ได้ไป blast กับฐานข้อมูลของ Gen Bank พบว่า sequence ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ rRNA แสดงให้เห็นว่า PCR product ที่ได้จากการทดลองนี้ ไม่ใช่ LAP encoding gene



ภาพที่ 22 แสดงแถบของ PCR product ที่แยกด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis

- |        |                                |
|--------|--------------------------------|
| Lane 1 | ใช้ fLAP 3 + rLAP1 เป็น primer |
| Lane 2 | ใช้ fLAP 3 + rLAP2 เป็น primer |
| Lane 3 | ใช้ fLAP 3 + rLAP3 เป็น primer |

## บทวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. Western immunoblotting

LAP เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม metalloprotease สามารถพบ LAP ได้ทั้งในพืชและสัตว์ พบทั้งบน cell surface ไซโตพลาสซึมของเซลล์หลายชนิดในร่างกาย (Wallner, et al., 1993) และยังสามารถพบ LAP ได้ในรก ตับ เลนส์ ลำไส้ สมอง ไต และ adipocyte หน้าที่ของ LAP จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Nakanishi, et al., 2000) แต่ LAP ส่วนใหญ่จะเหมือนกันคือ LAP เป็น exopeptidase ซึ่งตัด amino acid ทางด้าน amino terminal มีความจำเพาะเจาะจงในการตัด leucine amino acid residue ออกจาก polypeptide นอกจากนี้ยังสามารถตัด amino acid อื่น ๆ ได้อีกด้วย ยกเว้น arginine, lysine และ proline LAP แต่ละชนิดมีลักษณะที่เหมือนกันคือมีตำแหน่งบนโมเลกุลที่ทำหน้าที่จับกับโลหะหนักอยู่ 2 ตำแหน่ง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสังกะสี (Zn) จากการศึกษาโมเลกุลของ LAP พบว่าตำแหน่งที่ทำหน้าที่ในการจับกับ Zn อยู่ใกล้บริเวณส่วนปลายของโมเลกุลทางด้าน C-terminus Zn ตัวที่หนึ่งจับอยู่กับ amino acid Asp-255, Asp-332 และ Glu-334 Zn ตัวที่สองจับโดย carboxylate oxygen atom ของ Asp-255, Asp-273 และ Asp-334 โดย active site อยู่ที่ Lys-250 และ Arg-336 (Burley, et al., 1990) Zn ในตำแหน่งที่ 1 จะจับกับ amino acid ได้ไม่ถาวรแข็งแรง เพราะฉะนั้นทำให้โลหะหลักตัวอื่น ๆ ได้แก่ Mg Mn และ Co เข้ามาแย่งจับได้ ซึ่งการจับของ Mg ในตำแหน่งที่ 1 นี้จะเป็นการ activate การทำงานของ enzyme ชนิดนี้ ส่วน Zn ในตำแหน่งที่ 2 จะสามารถจับกับ amino acid ได้ค่อนข้างดี

จากการทดลองในครั้งนี้ น้ำหนักโมเลกุลของ LAP ในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่าในพยาธิชนิดอื่น ๆ ที่ได้เคยศึกษามาก่อนหน้านี้ เพราะเนื่องจากการทดลองครั้งนี้ใช้ cytosolic antigen แต่ในงานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็น membrane bound antigen ซึ่งน่าจะมี ความแตกต่างกันตรงบริเวณของ conserved sequence ในพยาธิใบไม้ในเลือด *S. mansoni* และ *S. japonicum* ซึ่งเป็น membrane bound antigen มีบริเวณด้าน C-terminal เป็นบริเวณ conserved sequence ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 57.5 และ 52 kDa (McCarthy, et al., 2004)

เมื่อนำ immunized sera ไปทำปฏิกิริยากับ antigen ต่าง ๆ ของ *F. gigantica* ในระยะไข่ พบแถบโปรตีน 3 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 21, 22.5 และ 24 kDa ระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ พบแถบโปรตีน 3 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 24, 26.5 และ 33 ในระยะตัวเต็มวัยแบบ WB พบแถบโปรตีน 3 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 21, 22.5 และ 24 kDa TA ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยพบแถบโปรตีน 5 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 20, 28, 33, 35 และ 46 kDa ES ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยพบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 24 kDa ในขณะที่กลุ่ม control ไม่ปรากฏแถบโปรตีน จากการทดลองจะเห็นได้ว่า polyclonal antibody (immunized sera) ที่ผลิตได้จากการทดลองน่าจะสามารถทำปฏิกิริยากับ LAP ของพยาธิ *F. gigantica* ได้ อย่างไรก็ตาม แถบโปรตีนที่ได้จาก western immunoblotting มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่าการทดลองที่ผ่านมาค่อนข้างมาก ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า LAP ของ *S. mansoni* ซึ่งสกัดด้วย 1% Triton-X มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 140 kDa เมื่อศึกษาด้วยวิธี reducing SDS-PAGE และมากกว่า 654

kDa เมื่อศึกษาด้วยวิธี non-reducing SDS-PAGE (Xu et al., 1990) ในขณะที่ LAP ของ *F. hepatica* ซึ่งสกัดด้วย deoxycholic acid มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 65 kDa เมื่อศึกษาด้วย reducing SDS-PAGE และเมื่อศึกษาด้วยวิธี non-reducing SDS-PAGE มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 240 kDa (Acosta et al., 1998) จะเห็นได้ว่า LAP จากพยาธิตัวทั้ง 2 ชนิด ถูกสกัดด้วย detergent แสดงให้เห็นว่า LSP จากพยาธิตัวทั้ง 2 ชนิด เป็น LAP ที่จับอยู่กับ cell membrane แต่จากการทดลองในครั้งนี้ porcine LAP ที่นำมา immunize หนู เป็น cytosolic LAP เพราะฉะนั้น LAP ที่พบจากการทดลองในครั้งนี้ น่าจะเป็น cytosolic LAP เช่นเดียวกัน ซึ่งน่าจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างจาก membrane LAP

จากผลการทดลองพบว่าแถบโปรตีนที่พบในพยาธิตัวทั้ง 2 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้น TA ซึ่งไม่พบแถบโปรตีนที่ 24 kDa และ ES ซึ่ง พบเฉพาะแถบโปรตีนที่ 24 kDa เท่านั้น จากผลการทดลองเรื่อง immunolocalization พบว่ามี LAP ค่อนข้างมากภายในเยื่อผิวของ caecum และ bladder แต่ไม่พบใน tegument แสดงให้เห็นว่าจากการทดลองในครั้งนี้ น่าจะไม่สามารถตรวจพบ LAP ใน TA ได้ เพราะฉะนั้นแถบโปรตีนที่พบในพยาธิตัว *F. gigantica* จากการทดลองในครั้งนี้คือ แถบโปรตีนที่ไม่พบใน TA แสดงให้เห็นว่า PoAb จากการทดลองน่าจะสามารถทำปฏิกิริยากับ LAP ได้หลายค่าที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกัน จะเห็นได้ว่า LAP ที่ได้จากการทดลองน่าจะเป็น LAP family ซึ่งน่าจะประกอบด้วย LAP หลาย isotype ดังเช่นที่พบใน mammal นอกจากนี้แถบโปรตีนที่ 24 kDa พบได้ในพยาธิตัวทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่าเป็น isotype ที่มีการสร้างในพยาธิตัวทั้ง 2 ชนิด ส่วนแถบที่ 21 และ 22.5 มีความเข้มมากในไข่ หรือ miracidium แต่ในระยะอื่นๆ พบน้อยมาก แสดงว่าแถบโปรตีนทั้งสองน่าจะเป็น miracidium specific

อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20, 28, 35, และ 46 kDa ใน TA แต่ไม่พบใน fraction อื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจาก TA เป็น antigen ที่ได้จากการ extract ด้วย Triton-X ซึ่งคล้ายกับการทดลองใน *F. hepatica* และ *S. mansoni* ซึ่ง LAP มีน้ำหนักโมเลกุล 65 kDa และ 140 kDa ตามลำดับ (Xu et al., 1990, Acosta et al., 1998) เพราะฉะนั้นแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 46 kDa จากการทดลองน่าจะเป็น LAP ชนิด membrane bound ซึ่งไม่พบใน fraction ที่เป็น water soluble

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนในพยาธิตัวทั้ง 2 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kDa พบว่า ES มีความเข้มของโปรตีนมากที่สุดเพราะ ES เป็น cytosolic LAP จะถูก release ออกมาและเมื่อศึกษา ES ของ *F. gigantica* ด้วยวิธี immunolocalisation พบ LAP กระจายตัวมากบริเวณ caecum และ bladder ซึ่งทั้ง 2 บริเวณมีหน้าที่ excretion และ secretion ให้กลายเป็น ES และในการทดลองครั้งนี้ได้นำ ES antigen ไป lyophilized เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนมากขึ้นทำให้ LAP ใน ES มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น นอกจากจะพบ LAP ค่อนข้างมากใน ES แล้วยังสามารถพบ LAP ในช่วงต้นของการพัฒนาพยาธิตัวในปริมาณค่อนข้างสูงเพราะฉะนั้น LAP จึงมีศักยภาพสูงที่จะนำไปพัฒนาเป็น immunodiagnosis เพื่อใช้ในการตรวจโรค Fasciolosis ในช่วงต้นได้

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนที่ 24 kDa ในพยาธิตัวทั้ง 2 ชนิด พบว่า LAP ใน crude extract ของไข่มีความเข้มมากที่สุด รองลงมาคือ ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ในขณะที่ WB มี

ความเข้มข้นที่สุด แสดงให้เห็นว่า LAP ถูกสร้างในปริมาณมากตั้งแต่ระยะไข่ จากการทดลองใน *S. mansoni* พบว่า hatching fluid ของไข่มี specific activity ของ LAP สูงกว่าระยะอื่นๆ ของพยาธิ เช่นกัน โดย LAP ดังกล่าวน่าจะมีหน้าที่ในการ hatching ออกจากไข่ และการพัฒนาตัวอ่อนพยาธิ เข้าสู่ระยะต่าง ๆ (McCarthy, et al., 2004) ซึ่งจะทำงานร่วมกับ Cat B ในขณะที่ตัวอ่อน 4 สัปดาห์มี LAP ปริมาณลดลง เนื่องจากเมื่อตัวอ่อนของพยาธิเข้าสู่ host แล้ว LAP จะมีหน้าที่ในการ ย่อยเนื้อเยื่อของ host เป็นหลัก (Nakanishi, et al., 2000) และยังทำงานร่วมกับ Cat L และ Cat B นอกจากนี้ LAP ยังมีหน้าที่ในการย่อยเนื้อเยื่อของ host (Nakanishi, et al., 2000) เพื่อการเคลื่อนที่ เข้าไปในเนื้อตับและดูดสารอาหารเพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอ่อน 4 สัปดาห์ และตัวเต็มวัยพบว่า LAP ในตัวอ่อน 4 สัปดาห์มี ปริมาณมากกว่าตัวเต็มวัย เพราะในระยะตัวอ่อนต้องใช้ LAP ย่อยเนื้อเยื่อของ host และต้องการ สารอาหารมากเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต จึงมีปริมาณของ LAP มากกว่าระยะตัวเต็มวัยที่จะอาศัย อยู่ใน bile duct จึงมีการย่อยเนื้อเยื่อของ host น้อยลง LAP ในตัวเต็มวัยจึงมีน้อยกว่าในระยะตัว อ่อนที่กำลังพัฒนา

## 2. Immunolocalization

จากผลการทดลองพบว่าไข่พยาธิ *F. gigantica* ระยะ unembryonated eggs มี LAP ใน vitelline cells และบริเวณช่องว่างระหว่าง vitelline cell ส่วนระยะ embryonated eggs พบ LAP ภายใน egg solution รอบ ๆ ตัว miracidium และบริเวณเปลือกไข่ ในขณะที่ภายในตัว miracidium พบ LAP ค่อนข้างน้อย นอกจากนั้นยังพบอีกว่าความหนาแน่นของ LAP ใน fluid ของ embryonated egg มากกว่าใน unembryonated egg ทำให้คาดได้ว่า LAP น่าจะถูกปล่อยออกมา จาก miracidium ในปริมาณที่มากกว่าจาก vitelline cell จากการศึกษเกี่ยวกับ ultrastructure ของ miracidium พบว่า ด้านหน้าสุดของลำตัวพบ apical gland ลักษณะเป็น flask – shaped ขนาดใหญ่ และจะส่งท่อไปเปิดที่ปลายของ apical papilla apical gland และต่อมเล็ก ๆ อีก 4 ต่อมหทำหน้าที่ สร้างและหลั่ง proteolytic enzyme ซึ่งคาดว่าน่าจะมี LAP เป็นองค์ประกอบ (Buzzell, 1983) จาก การศึกษาในพยาธิ *S. mansoni* พบ LAP มากใน hatching fluid และ egg homogenate โดยพบ LAP ชนิด membrane – bound และ water soluble เชื่อว่า LAP ในไข่พยาธิน่าจะทำหน้าที่ควบคุม ความเข้มข้นของ bile salt ที่ผ่านเข้าออกไข่พยาธิในช่วงที่เกิดกระบวนการ hatching และอาจทำ หน้าที่ย่อย egg protein ในช่วงการ hatching (Xu และ Dresden, 1986, Xu et al, 1990 และ McCarthy et al, 2004) จากการทดลองโดยยับยั้งการทำงานของ LAP โดยใช้ bestatin พบว่า สามารถยับยั้งการ hatching ของไข่พยาธิ *S. mansoni* ได้ (Xu et al, 1986) ซึ่ง LAP ที่พบใน vitelline cell และ hatching fluid ของพยาธิ *F. gigantica* น่าจะมีหน้าที่เช่นเดียวกัน ส่วนภายใน miracidium ที่พบ LAP น้อยมากน่าจะเกิดจาก secretion ที่สร้างจาก apical gland จะถูกหลั่งออก จากต่อมโดยไม่เก็บสะสมภายในต่อม จึงไม่พบ LAP ภายใน miracidium

จากการศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ LAP ในทางเดินอาหารของพยาธิ *F. gigantica* พบ LAP ในเยื่อผิว caecum ของพยาธิระยะตัวอ่อน 4 สัปดาห์และตัวเต็มวัย ในขณะที่ไม่พบ LAP

ในทางเดินอาหารส่วนต้น ได้แก่ oral sucker pharynx esophagus และ caecal bifurcation เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ LAP มีลักษณะเป็นจุดภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิว caecum ซึ่งเชื่อว่าน่าจะอยู่ใน zymogen granule นอกจากนั้นยังพบ LAP ปริมาณมากบริเวณ luminal projection ของเซลล์ ตำแหน่งที่พบ LAP ภายใน caecum สอดคล้องกับตำแหน่งของ LAP ที่พบในพยาธิ *S. mansoni* (McCarthy et al, 2004), *F. hepatica* (Acosta et al, 1998) และ *C. elegans* (Joshua, 2001) ซึ่งพบ LAP ภายใน zymogen granule เช่นกัน จึงเชื่อว่า LAP ภายใน zymogen granule จะถูกหลั่งเข้าสู่ caecal lumen ในขณะที่ LAP ที่พบบริเวณ luminal projection น่าจะเป็น เอนไซม์ที่อยู่บริเวณ apical plasma membrane จากการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่ามี LAP บางชนิดมีลักษณะเป็น integral membrane glycoprotein ซึ่งพบในบริเวณ apical plasma membrane ของ enterocyte, kidney epithelial cell และ bile canaliculi (Roman และ Huthard, 1984) โดย LAP ที่พบบริเวณ luminal projection จะถูกหลั่งเข้าสู่ lumen ทำหน้าที่ในการย่อย dipeptide เป็น monopeptide ก่อนที่จะถูกดูดซึมเข้าเซลล์เยื่อบุผิว caecum (Acosta et al, 1998) จากการศึกษาเอนไซม์ภายใน zymogen granule พบว่าประกอบด้วย proteolytic enzyme หลายชนิด เช่น เอนไซม์ในกลุ่ม cysteine protease (Cat L และ B) (Smyth et al, 1983, Wilson et al, 1998 และ Meemon et al, 2004) และเอนไซม์กลุ่ม metalloprotease (LAP) (McCarthy et al, 2004) เป็นต้น จากการศึกษา Cat L ในพยาธิ *S. mansoni*, *F. hepatica* และ *F. gigantica* เชื่อว่าทำหน้าที่ย่อย hemoglobin ภายในเม็ดเลือดแดงของ host (Smith et al, 1994 และ Day et al., 1995) ย่อยเนื้อเยื่อของ host (Smith et al, 1993, McGinty et al, 1993 และ Berasain et al, 1997) ย่อยอาหาร (Dalton และ Haffernan, 1989, Rege et al, 1989, Smith et al, 1993, Dowd et al, 1994 และ Yamasaki et al, 1992) เกี่ยวข้องกับการสร้างเปลือกไข่ (Wijffels et al, 1994, Dalton et al, 1996) host immune invasion โดยยับยั้งการจับของ antibody จาก eosinophil และจากเซลล์อื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันของ host (Carnoma et al, 1993) และทำลาย fibrinogen เพื่อลดการเกิด fibrin clot ในช่วงที่พยาธิไชผ่านเนื้อเยื่อของ host (Dowd et al, 1995) จากการศึกษา Cat B ในพยาธิ *S. mansoni* ตัวเต็มวัย *F. hepatica* และ *F. gigantica* เชื่อว่าทำหน้าที่ย่อย hemoglobin ของ host เพื่อเป็นอาหาร (Lipps et al, 1996) host-immune invasion (Caffrey et al, 2002) ย่อยเนื้อเยื่อของ host เพื่อไชเข้าอวัยวะต่าง ๆ ช่วยในกระบวนการสร้างไข่และ sperm ช่วยสร้างสารตั้งต้นของ egg shell protein และ glycogen ใน vitelline cell และช่วยในการปฏิสนธิ เนื่องจาก acrosomal enzyme มี Cat B เป็นส่วนประกอบ (Meemon et al, 2004)

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ LAP ระหว่าง caecum ในแต่ละบริเวณ พบว่า main caecum, แขนงส่วนต้นของ main caecum และ caecum บริเวณ oral cone มี LAP น้อยกว่าแขนงส่วนปลาย จากการศึกษา caecum ของพยาธิ *F. hepatica* พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวของแขนง proximal กับ distal ของ caeca แตกต่างกันคือแขนง distal พบ secretory granule ภายใน cytoplasm บริเวณฐานและส่วนยอดของเซลล์จำนวนมากแต่ในแขนง proximal พบ secretory granule ภายใน cytoplasm น้อยกว่า จากความแตกต่างดังกล่าวทำให้หน้าที่ของ caeca ทั้ง 2 บริเวณต่างกัน โดยแขนง proximal ทำหน้าที่หลักในการบีบตัวเพื่อให้อาหารเคลื่อนที่ผ่านไปมา โดยมีการย่อยและ

ดูดซึมค่อนข้างน้อย ส่วนแขนง distal จะทำหน้าที่ย่อยและดูดซึมเป็นหลัก ซึ่งพบว่าการย่อยมี 2 แบบคือ exodigestion คือการย่อยสารอาหารภายใน caecal lumen โดย LAP ที่ luminal surface และ proteolytic enzyme อื่น ๆ ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เยื่อบุผิว caecum เพื่อย่อยอาหารก่อนที่จะดูดซึมเข้าภายในเซลล์เยื่อบุผิว และแบบที่ 2 คือ endodigestion เป็นการย่อยอาหารภายในเซลล์ โดยอาหารจะถูก endocytosis เข้าสู่ cytoplasm ในรูปของ food vesicle ก่อนแล้วรวมกับ lysosome ซึ่งน่าจะมีเอนไซม์ LAP อยู่ภายใน ได้เป็นสารโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถซึมผ่าน vesicle เข้าสู่ cytoplasm ได้ (Robinson และ Threadgold, 1975, Acosta et al, 1998)

จากการศึกษา histochemical localization ในพยาธิ *S. mansoni* พบ LAP กระจายตัวมากบริเวณ oral sucker, gut รวมถึง tegument ของพยาธิตัวเต็มวัยและพบในพยาธิเพศเมียมากกว่าเพศผู้ (McCarthy, et al., 2004) ตำแหน่งการกระจายของ LAP ของพยาธิทั้ง *F. gigantica* แตกต่างจาก *S. mansoni* เนื่องจาก LAP มีหน้าที่ในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ซึ่งระยะตัวเต็มวัยของ *S. mansoni* จะอาศัยอยู่บริเวณเส้นเลือด และมีสารอาหารมาก tegument จึงเป็นบริเวณหลักที่ใช้ในการดูดซึมและย่อยสารอาหาร ส่วนตัวเต็มวัยของ *F. gigantica* จะอาศัยอยู่ใน bile duct ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสารอาหารน้อย ดังนั้นบริเวณ tegument จึงมีความจำเป็นน้อยหรือไม่มีความจำเป็นเลยในการใช้ดูดซึมและย่อยสารอาหาร

ระบบขับถ่ายของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยและพยาธิตัวอ่อน 4 สัปดาห์ พบ LAP บริเวณ luminal projection และใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิว bladder โดย bladder แต่ละบริเวณพบ LAP หนาแน่นใกล้เคียงกัน จากการศึกษาใน *F. hepatica* พบว่า เซลล์เยื่อบุผิว bladder เป็นชนิด syncytium โดยมี apical lamella ยื่นเข้าภายใน lumen (Bennett และ Threadgold, 1973) ทำหน้าที่ขับถ่ายของเสียจากกระบวนการ metabolism เช่น ammonia, urea, amino acid และไขมัน (Lutz และ Siddiqi, 1971, Burren et al, 1967 และ Bennett, 1977) รวมทั้งการดูดกลืนสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต (Threadgold, 1968) โดยทั้งกระบวนการขับถ่ายและดูดกลืนสารต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ phosphatase (Threadgold, 1968 และ Fujino et al, 1989) ดังนั้น LAP ที่พบในเซลล์เยื่อบุ bladder ของ *F. gigantica* น่าจะอยู่ในรูปของ membrane bound form ซึ่งพบได้บริเวณ luminal projection และ cytosolic form ซึ่งพบภายใน cytoplasm อาจจะทำหน้าที่ในกระบวนการขับถ่ายของเสียหรือดูดกลืนสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพยาธิ ซึ่งอาจทำงานร่วมกับเอนไซม์ acid phosphatase และ alkaline phosphatase

ระบบสืบพันธุ์เพศเมียพบ LAP ได้ในเกือบทุกอวัยวะ ได้แก่ vitelline gland, vitelline reservoir, ovary, Mehlis' gland และ uterus โดยที่ภายใน vitelline cell พบ LAP เฉพาะใน cytoplasm ของเซลล์ในระยะ mature ที่อยู่ภายใน vitelline gland, vitelline duct, vitelline reservoir และภายใน unembryonated egg แต่ไม่พบใน egg shell globule, nucleus และ vitelline cell ระยะอื่น ๆ และจากการศึกษา vitelline gland ของพยาธิ *F. hepatica* พบว่า mature vitelline cell ประกอบด้วย shell protein globule, glycogen granule, yolk material (Irwin และ Threadgold, 1970 และ Threadgold, 1982) ซึ่ง shell globule จะต้องถูกกระตุ้นจาก Mehlis' gland ให้เกิดการหลั่งสารที่อยู่ภายในออกไปล้อมรอบ ๆ กลุ่มของ ovum และ vitelline cell ขณะมีการสร้างเปลือกไข่

และจะถูก modify โดยเอนไซม์ phenol oxidase ที่อยู่ภายใน globule เอง ทำให้เกิดการ polymerization ของ shell protein ซึ่ง LAP ภายใน cytoplasm อาจมีส่วนช่วยในกระบวนการสร้างเปลือกไข่

Ovary พบ LAP บริเวณขอบของ mature oocyte ( $Oc_4$ ) ตรงกลางของ ovary และบางส่วนของบริเวณขอบนอกของ ovary จากการศึกษา ovary ของ *F. hepatica* พบว่าบริเวณขอบนอกของ ovary ประกอบด้วย nurse cell ซึ่งทำหน้าที่แยก germ cell ออกจาก parenchymal cell นอกจากนี้ยังพบว่า germ cell ระยะ oogonia และ immature primary oocyte จะยื่น process ไปยัง nurse cell โดยเชื่อว่า nurse cell น่าจะทำหน้าที่ขนส่งสารอาหารให้แก่ germ cell (Bjorkman และ Thorsell, 1964) จากการศึกษาใน ovary ของมนุษย์ พบ LAP ในเซลล์ theca interna ของ ovarian follicle ซึ่ง nonovulatory tertiary follicle มี LAP ปริมาณปานกลางและจะเพิ่มขึ้นเมื่อพัฒนาเป็น Graffian follicle (Breiteuecker et al, 1978) ดังนั้น LAP ที่พบบริเวณขอบนอกของ ovary น่าจะกระจายอยู่ใน nurse cell ซึ่งน่าจะเทียบได้กับ granulosa cell ของ ovarian follicle ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วน LAP ที่พบบริเวณขอบนอกของ  $Oc_4$  ซึ่งอยู่กลาง ovary น่าจะอยู่ในรูปของ membrane – bound LAP ซึ่งน่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ fertilization ของ sperm และ ovum

Mehlis' gland พบ LAP ภายใน cytoplasm ของ Mehlis' gland cell ลักษณะเป็นจุดอยู่ภายใน cytoplasm รวมทั้ง process ของเซลล์ที่ยื่นเข้าภายใน ootype จากการศึกษา Mehlis gland cell ในพยาธิ *F. hepatica* พบว่า ประกอบด้วย secretory cell 2 ชนิด โดยเซลล์ชนิดแรกจะสร้าง mucus secretion และเซลล์ชนิดที่ 2 สร้าง serous secretion (Rao, 1959, Gonnert, 1962 และ Clegg, 1965) ซึ่งประกอบด้วย protein เป็นหลัก (Clegg, 1965) ดังนั้น LAP ที่พบใน Mehlis' gland cell น่าจะเป็นองค์ประกอบของ secretion ดังกล่าว นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเอนไซม์ Cat L ใน Mehlis' gland cell ซึ่งจะหลั่งเข้าสู่ ootype เช่นกัน secretion ที่หลั่งออกจาก Mehlis' gland cell มีหน้าที่ปรับสภาพ pH ภายใน ootype ให้เป็นเบสเพื่อให้ shell protein globule สามารถรวมตัวกันได้ นอกจากนั้นยังกระตุ้นการหลั่งสารออกจาก shell protein globule และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Cat L และ LAP น่าจะสามารถกระตุ้นกระบวนการ quinine – tanning process โดย cleavage vitelline protein ที่หลั่งจาก vitelline cell (Fairweather et al, 1999)

ภายใน Uterus นอกจากพบ LAP ใน vitelline cell ของ unembryonated eggs บริเวณ luminal projection และภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อผิวของ uterus โดยคาดว่า LAP ในบริเวณนี้น่าจะเป็นทั้ง cytosolic และ membrane – bound LAP ซึ่งทำหน้าที่หลั่งและดูดกลับสารต่าง ๆ หรือเกี่ยวกับการหลั่งสารเพื่อหล่อลื่น uterus

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ พบ LAP ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ testis พบ LAP หนาแน่นมากภายใน head ของ spermatozoa แต่ไม่พบในส่วน tail เซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatogonia spermatocyte และ spermatid จากการศึกษาพยาธิ *F. gigantica* พบว่า spermatozoa ไม่มี acrosome ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ spermatozoa ของพยาธิ *C. sinensis* (Jeong et al, 1976), *H. medioplexus* (Burton, 1960), *P. ohirai* และ *E. panacaticum* เพราะฉะนั้น LAP น่าจะอยู่ในรูป membrane –

bound form ซึ่งน่าจะทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ fertilization โดยอาจจะ modulate protein บริเวณผิว ovum ในช่วง fertilization

Seminal vesicle พบ LAP ภายใน spermatozoa บริเวณ luminal projection และภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อผนัง seminal vesicle จากการศึกษาเซลล์เยื่อ seminal vesicle ของพยาธิ *F. hepatica* พบว่า ทำหน้าที่สร้างและหลั่ง lucid secretion ในรูปของ lucid secretory granule เข้าสู่ lumen เพื่อเป็นอาหารของ spermatozoa (Threadgold, 1975a) ดังนั้น LAP ที่พบในเซลล์เยื่อ seminal vesicle น่าจะทำหน้าที่ modify secretory granule ก่อนที่จะหลั่งเข้าไปภายใน seminal vesicle นอกจากนี้ยังพบว่า reproductive tract ของพยาธิสามารถ endocytose sperm ที่อ่อนแอเพื่อทำลายภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อผนัง ซึ่ง LAP น่าจะพบใน lysosome ของเซลล์แล้วทำหน้าที่ย่อย sperm ที่อ่อนแอดังกล่าว

Cirrus sac พบ LAP ภายใน cytoplasm ของ parenchymal cell ภายใน cirrus sac จากการศึกษา cirrus sac ของพยาธิ *F. hepatica* พบว่า parenchymal cell รอบ ๆ cirrus sac จะเชื่อมต่อระหว่างเซลล์เยื่อ seminal vesicle กับ cirrus sac (Threadgold, 1975a) ซึ่งน่าจะพบ LAP อยู่ในรูป cytosolic LAP และอาจทำหน้าที่การขนส่งสารอาหารจาก cirrus sac ไปยัง seminal vesicle และ sperm ต่อไป

Prostate gland พบ LAP ใน cytoplasm ของ prostate gland cell ทั่วทั้ง gland จากการศึกษาใน *F. hepatica* พบว่า prostate gland ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดทำหน้าที่สร้างและหลั่ง lucid secretion ในรูปของ lucid secretion granule เพื่อกระตุ้นและเป็นอาหารของ spermatozoa (Threadgold, 1975b) ดังนั้น *F. gigantica* LAP ที่พบใน cytoplasm ของ prostate gland cell น่าจะมีหน้าที่เกี่ยวกับกลไกการ cleavage โมเลกุลของสารที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้น sperm หรือ สารอาหารของ sperm ที่หลั่งมาจาก prostate gland cell เช่นเดียวกับที่พบใน seminal vesicle

### 3. cDNA library screening

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าไม่สามารถนำ polyclonal antibody ที่ผลิตได้มาใช้ในการ screen LAP encoding gene จาก library ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหลายสาเหตุ คือ อาจจะเป็นเนื่องจากในขั้นตอนการทำ library จะมีการ digest gene ด้วย restriction enzyme ทำให้ mRNA ของ LAP ซึ่งมีความยาวค่อนข้างมากนั้นขาดเป็นท่อนๆ ทำให้เมื่อมีการ express ของ LAP แล้ว LAP ที่ได้จะมีการขาดเป็นท่อนๆ ประกอบกับการ express ใน eukaryote การ folding ของ protein ไม่มี จึงทำให้ antibody ไม่สามารถจดจำ LAP ที่ผลิตออกมาได้ นอกจากนี้อาจเนื่องมาจาก Library ที่ใช้เป็น library ที่ผลิตมาจาก mRNA ของ adult *F. gigantica* แต่จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า adult มีการสร้าง LAP ออกมาในปริมาณน้อยกว่าพยาธิระยะอื่นๆ ทำให้สัดส่วนของ mRNA ของ LAP มีปริมาณน้อย จึงทำให้โอกาสในการ screen แล้วเกิดผล positive มีน้อยตามไปด้วย

## References

- ประยงค์ ระดมยศ. (2535). Atlas of medical parasitology. กรุงเทพฯ : เมดิคัล มีเดีย
- Acosta D, Goni F, Carmona C. (1998). Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. J Parasitol; 84: 1-7
- Ahmad S, Ward PE (1990). Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. J Pharmacol Exp Ther; 252: 643-50.
- Auriault C, Pierce R, Cesari IM, Capron A (1982). Neutral protease activities at different development stages of *Schistosoma mansoni* in mammalian hosts. Comp Biochem Physiol B; 72: 377-84.
- Bennett CE. (1977) *Fasciola hepatica* :development of excretory and parenchymal systems during migration in the mouse. Exp Parasitol.41(1):43-53
- Bennett CE and Threadgold, LT. (1973) Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. XIII. Fine structure of newly excysted juvenile. Exp Parasitol 34,85 – 99.
- Berasain P, Goñi F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B, Carmona C. (1997) Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. J Parasitol.83(1):1-5.
- Bjorkman N and Thorsell W. (1964) On the ultrastructure of the ovary of the liver fluke (*Fasciola hepatica* L.). Zeitschrift fur Zellforschung and Mikroskopische Anatomie 63, 538 – 549.
- Boray JC. (1988) Flukes of domestic animal. In: Gaafar SM, Howard WE, Marsh RE, editors. Parasites, pests and predators. New York; Elsevier:. 179-218.
- Boray JC. Drug resistance in *Fasciola hepatica*. (1990) In: Boray, J.C., Martin, P.J. and Roush, R.T. editors. Chemotherapy of parasitic disease. New York: Plenum Press, 401-425.
- Boray JC. Chemotherapy of infections with Fasciolidae. 1997) In: Boray, J.C. editor. Immunology, pathology and control of fasciolosis. New Jersey, Rathway: MSD AGVET, 83-97.
- Botbol V, Scornik OA. (1986) Measurement of instant rates of protein degradation in the livers of intact mice by the accumulation of bestatin-induced peptides. J Biol Chem; 266: 2151-7.
- Breitenecker G, Friedrich F, Kemeter P. (1978) Further investigations on the maturation and degeneration of human ovarian follicles and their oocyte. Fertil Steril.;29(3):336-

- Burley SK, David PR, Taylor A, Lipscomb WN. (1990) Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 87(17):6878-82.
- Burren CH, Ehrlich I and Johnson P. (1967) Excretion of lipid by liver fluke (*Fasciola hepatica* L). *Lipid* 2, 353 – 365.
- Burton PR. (1960) Gametogenesis and fertilization in the frog lung fluke, *Haematoloechus medioplexus* Stafford (Trematoda: Plagiorchiidae). *J Morphol.* 107:93-121
- Buzzell GR. (1983) Composition, secretion and fate of the glands in the miracidium and sporocyst of *Fasciola hepatica* L. *J Helminth* 57, 79 – 84.
- Chaithirayanon K, Wanichanon C, Grams SV, Ardseungneon P, Grams R, Viyanant V, et al. (2002) Production and characterization of monoclonal antibody against 28.5 kDa tegument antigen of *Fasciola gigantica*. *Acta Trop*; 84: 1-8
- Cadel S, Foulon T, Viron A, Balogh A, Midol-Monnet S, Noel N and Cohen P. (1997) Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA*;94:2963-2968.
- Caffrey CR, Salter JP, Lucas KD, Khien D, Hsich I, Lim KC, et al. (2002) SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*; 121: 49-61.
- Carmona C, Dowd AJ, Smith AM and Dalton JP. (1993) Cathepsin L protease secreted by *Fasciola hepatica* *in vitro* prevents antibody – mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol* 62, 9 – 18.
- Cesari IM, Auriault C, Capron A. (1983) Aminopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*; 69: 280-4.
- Christensen NO, Nasen P, Franden F, Bjorneboe A, Monrad J. (1978) *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*: cross resistance in mice. *Parasitol*; 46: 113-20.
- Clegg JA. (1965) Secretion of lipoprotein by Mehlis' gland in *Fasciola hepatica*. *Annals of the New York Academy of Science* 118, 969 – 986.
- Dalton JP, Heffernan M. (1989). Thiol proteases released *in vitro* by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*; 35: 161-6.
- Dalton JP, Clough KA, Jones MK, Brindley PJ. (1996) Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun.* 64(4):1328-34.
- Day SR, Dalton JP, Clough KA, Leonardo L, Tiu WU, Brindley PJ. (1995) Characterization and cloning of the cathepsin L proteinases of *Schistosoma japonicum*. *Biochem Biophys Res Commun*; 217: 1-9.
- Doolan DL, Sedegah M, Hedstrom RC, Hobart P, Charoenvit Y, Hoffman SL. (1996) Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multiple gene

- DNA immunization; CD8<sup>+</sup> cell-, interferon gamma-, and nitric oxide-dependent immunity. *J Exp Med*; 183: 1739-46.
- Dowd AJ, McGonigle S, Dalton JP. (1995) *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase cleaves fibrinogen and produces a novel type of fibrinogen clot. *Eur J Biochem*; 232: 241-246.
- Dowd A, Smith AM, McGonigle S, Dalton JP. (1994) Purification and characterization of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur J Biochem*; 223: 91-8
- Dupre L, Herr M, Schacht AM, Capron A, Riveau G. (1999) Control of Schistosomiasis pathology by combination of Sm 28GST DNA immunization and praziquantel treatment. *J Infect Disease*; 180(2): 454-463.
- Edney JM, Muchlis A. (1962) Fascioliasis in Indonesian livestock. *Commun Vet*; 6: 49-52.
- Fabiyi JP. (1987) Production losses and control of helminths in ruminants of tropical regions. *Int J Parasitol*; 17: 435-442.
- Fairweather I, Threadgold LT, Hanna REB. (1999) Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: Dalton JP, editor. *Fasciolosis*. Cambridge; CABI Publishing: . 47-103.
- Ferreira C, Terra WR. (1989) Spatial organization of digestion, secretory mechanisms and digestion properties in *Pheropsis aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae). *Insect Biochem*; 19: 383-7.
- Fripp PJ. (1967) The histochemical localization of leucine aminopeptidase in *Schistosoma rodhani*. *Comp Biochem Physiol*; 20: 307-309.
- Fujino T, Fukuda K, Hamajima F, Ishii Y. (1989) Studies on host specificity in *Paragonimus westermani*: II. Histochemical and cytochemical characterization of metacercariae and worms from rats and dogs. *J Helminthol*.63(4):315-27.
- Funk CD, Radmark O, Fu JY, Matsumoto T, Jornvall H, Shimizu T, and Samuelsson B. (1987) Molecular cloning and amino acid sequence of leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;84:6677-6681.
- Fukasawa KY, Fukasawa K, Kanai M, Fujii S, and Harada M. (1996) Molecular cloning and expression of rat liver aminopeptidase B. *J Biol Chem*;271: 30731-30735.
- Gonnert R. (1962) Histologische untersuchungen uber den feinbau der eibildungsstatte (oogenotop) von *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 21, 475 – 492.
- Hedstrom RC, Sedegah M, Hoffman SL. (1996) Prospects and strategies for development of DNA vaccines against malaria. *Res Immunol*; 145: 476-83.

- Houseman JG, Downe AER. (1981) Identification and partial characterization of digestive proteinases from *Triatoma phyllsoma pallidipennis* Stal (Hemiptera: Reduviidae), Comp Biochem Physiol; 70:713-717.
- Ito N, Nomura S, Iwase A, Ito T, Ino K, Nagasaka T, Tsujimoto M, Kobayashi M and Mizutani S. (2003) Ultrastructural localization of aminopeptidase A/angiotensinase and placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in chorionic villi of human placenta. Early Hum Develop; 71: 29-37.
- Irwin SWB and Threadgold LT. (1970) Electron – Microscope studies on *Fasciola hepatica* VIII. The development of the vitelline cells. Exp Parasitol 28, 399 – 411.
- Jeong KH, Rim HJ, Yang HY, Kim WK, Kim CW. (1976) A Morphological Study On Spermatogenesis In The Liver Fluke, *Clonorchis sinensis*. Kisaengchunghak Chapchi.14(2):123-132.
- Joshua GWP. (2001) Functional analysis of leucine aminopeptidase in *Caenorhabditis elegans*. Mol Biochem Parasitol; 113: 223-32.
- Kachintorn, V, Atisook K, Tesjaroen S, Lertakyamanee N, Plengvanit U. (1988) *Fasciola gigantica*: the second case of human infection in Thailand. J Med Assoc Thailand; 71(8): 451-455.
- Hillyer GV. (1979) *Schistosoma mansoni*: reduced worm burdens in mice immunized with isolated *Fasciola hepatica* antigen. Exp Parasitol; 48: 287-95.
- Kayes SG, Shaneyfelt RC, Monteiro C, O'Brien JJ. (1998) Overproduction of Sm 28GST in a baculovirus expression vector and its use to evaluate the *in vivo* immune responses of mice vaccinated against *Schistosoma mansoni* with naked-DNA encoding the SM28GST gene. J Parasitol; 84(4): 764-770.
- Kofta W, Mieszczanek J, Plucienniczak G, Wedrychowicz H. (2000) Successful DNA immunization of rats against fasciolosis. Vaccine ; 18: 2985-90.
- Langley RJ, Hillyer GV. (1989) Detection of circulating parasite antigen in murine fascioliasis by two-site enzyme-linked immunosorbent assays. Am J Trop Med Hyg; 41(4): 472-478.
- Ledeme N, Hennon G, Vincent-Fiquet O and Plaquet R. (1981) Purification and enzymatic properties of an L-leucine aminopeptidase from swine liver. Biochim Biophys Acta; 660: 262-270.
- Lenz CJ, Riu WC, McKintosh AH, Chippendale GM, Schubert KR. (1991) Proteinases of larvae of the corn earworm *Heliothis zea*: characterization, distribution and dietary relationships. Arch Insect Biochem Physiol; 16: 201-12.

- Levine DM, Hillyer GV, Flores SI. (1980) Comparison of counterelectrophoresis, the enzyme-link immunosorbent assay, and Kato fecal examination for the diagnosis of fasciolosis in infected mice and rabbits. *Am J Trop Md Hyg.*; 29(4): 602-608.
- Lipps G, Fullkrag R, Beck E. (1996) Cathepsin B of *Schistosoma mansoni* purification and activation of the recombinant proenzyme secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*; 271: 1717-25.
- Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, and Peiper SC. (1989) Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase. *N J Clin. Invest*; 83: 1299-1307.
- Lutz PL and Siddiqi AH. (1971) Nonprotein nitrogenous composition of the protonepridail fluid of the trematode *Fasciola hepatica*. *Comp Biochem and Physiol* 40A, 453 – 493.
- Mansour NS, Youssef FG, Mikhail EM, Bector FN. (1983) Use of a partially purified *Fasciola gigantica* worm antigen in the serological diagnosis of human fascioliasis in Egypt. *Am J Trop Med Hyg*, 32(3): 550-554
- McCarthy E, Stack C, Donnelly SM, Doyle S, Mann VH, Brindley PJ, Stewart M, Day TA, Maule AG, Dalton JP. (2004) Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol.* 34 (6):703-14.
- McGinty A, Moore M, Halton DW, Walker B. (1993) Characterization of the cysteine proteinases of the common liver fluke *Fasciola hepatica* using novel, active-site directed affinity labels. *Parasitology*.106 :487-93.
- Meemon K, Grams R, Vichasri-Grams S, Hofmann A, Korge G, Viyanant V, Upatham ES, Habe S, Sobhon P. (2004). Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Mol Biochem Parasitol*; 136:1-10.
- Nakanishi Y, Nomura S, Okada M, Ito T, Katsumata Y, Kikkawa F, hattori A, Tsujimoto M and Mizutani S. (2000). Immunoaffinity purification and characterization of native placental leucine aminopeptidase/oxytocinase from human placenta. *Placenta*; 21: 628-634.
- Nyberg F, Thornwall M, Hetta J. (1990) Aminopeptidase in human CSF which degrades delta-sleep inducing peptide (DSIP). *Biochem Biophys Res Commun*; 67: 1256-62.

- Oda MN, Scott SV, Hefner-Gravink A, Caffarelli AD, Klionsky DJ. (1996) Identification of a cytoplasm to vacuole targeting determinant in aminopeptidase I. *J Cell Biol*; 132: 999-1010.
- Olsen J, Cowell GM, Konigsofer E, Danielsen M, Moller J, Laustsen L, Hansen OC, Welinder K, Engberg J, Hunziker W, Spiess M, Sjoström H, and Noren O. (1998) Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett.*; 238:307-314.
- Pfister K, Davern CH, Ambroise-Thomas P. (1984) Partial purification of somatic and excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* and their application for the serodiagnosis of experimental and natural fasciolosis using an ELISA. *Res Vet Science*; 37: 39-43
- Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induce high levels of protection against fasciolosis in sheep. *Infect Immunol* ; 67: 1954-61.
- Rao KH. (1953) Observation of on the Mehlis' gland complex in liver fluke *Fasciola hepatica* L. *J Parasitol* 45, 347 – 351.
- Rege AA, Herera PR, Lopez M and Dresden MH. (1989) Isolation and characterisation of cysteine protease from *Fasciola hepatica* adult worms. *Mol Biochem Parasitol* 35, 89 – 96.
- Robinson G, Threadgold LT. (1975) Electron microscope studies of *Fasciola hepatica* XII. The fine structure of the gastrodermis. *Exp Parasitol* ; 37: 20-36.
- Roman LM and Hubbard AL. (1984) A domain-specific marker for the hepatocyte plasma membrane II ultrastructural localization of leucine aminopeptidase to the bile canalicular domain of isolated rat liver plasma membranes. *J Cell Biol*; 98: 1488-1496.
- Sampaio-Silva ML, Santoro F, Capron A. (1981) Circulating immune complexes in human fascioliasis. Relationship with *Fasciola hepatica* egg output. *Acta Tropica*; 38: 39-44.
- Schauder B, Schomburg L, Kohler J, and Bauer K. (1994) Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:9534-9538.
- Schillhorn Van Veen TW, Buys J. (1979) The serodiagnosis of chronic fascioliasis (*Fasciola gigantica*) using a fluorescence antibody technique with single and multiple whole-fluke antigen. *Tropenmed Parasit*; 30: 194-197.

- Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P, Hoffman SL. (1994) Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 9866-70.
- Sinclair IJ, Wassall DA. (1988) Sero-diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Vet Parasitol*; 27: 283-290.
- Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A and Dalton JP. (1993) Purification of cathepsin – L like protease secret by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*; 62, 1 – 8.
- Smith EL and Hill RL. *Enzymes*, 2 ed. 4A 37-62.
- Smith AM, Carmona C, Dowd AJ, McGonigle S, Acosta D, Dalton JP. (1994) Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite Immunol*. 16(6):325-8.
- Smooker PM, Steeper KR, Drew DR, Strugnell RA, Spithill TW. (1999) Humeral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione-s-transferase of *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. *Parasit Immunol*; 21(7): 357-64.
- Soesetya RBH. (1975) The prevalence of *Fasciola gigantica* infection in cattle in East Java, Indonesia. *Malaysian Vet J*; 6: 5-8.
- Squire CR, Talebian M, Menon JG, Dekryff S, Lee TD, Shively JE, et al. (1991) Leucine aminopeptidase-like activity in *Aplysia* hemolymph rapidly degrades biologically active  $\alpha$ -bag cell peptide fragment. *J Biol Chem*; 266: 22355-62.
- Srihakim S, Pholpark M. (1991) Problem in fascioliasis in animal husbandary in Thailand (review). *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* ; 22 suppl: 352-355.
- Stirling CJ, Colloms SD, Collin JF, Szatmari G, Sherrat DJ and Xer B. (1989) an *Escherichia coli* gene required for plasmid ColE1 site-specific recombination, is identical to pep A, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens leucine aminopeptidase. *EMBO J*; 8: 1623-7
- Stitt AW, Fairweather I. (1993) *Fasciola hepatica*: the effect of the microtubule inhibitors colchicine and tubulazole-C on the ultrastructure of the adult fluke. *Parasitology*, 107:297-309.
- Stitt AW, Fairweather I. (1994) The effect of the sulfoxide metabolite of triclabendazole ('Fasinex') on the tegument of mature and immature stages of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 108:555-67.

- Stitt AW, Fairweather I, Mackender RO. (1995) The effect of triclabendazole ("Fasinex") on protein synthesis by the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Int J, Parasitol.*;25(4):421-9.
- Stitt AW and Fairweather I. (1996) *Fasciola hepatica*: disruption of the vitelline cells in vitro by the sulphoxide metabolite of triclabendazole. *Parasitol Res.*;82(4):333-9.
- Sukhapesna V, Tantasuvan D, Sarataphan N, Imsup K. (1989) A study on the prevalence of liver fluke infection in cattle and buffaloes in Thailand. *J Thai Vet Med Assoc*; 40(1-2): 13-19 (in Thai).
- Sukhapesna V, Tantasuvan D, Sarataphan N, Imsup K. (1994) Economic impact of fascioliasis in buffalo production. *J Thai Vet Med Assoc*; 45: 45-52.
- Swarup D, Pachauri SP, Sharma B. (1968) Serodiagnosis of fascioliasis in buffaloes by immunoprecipitation using adult *Fasciola gigantica* antigens. *Res Vet Sci*; 42: 130.
- Swarup D, Pachauri SP, Sharma B, Bandhopadgay SK. (1987) Serodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in buffaloes. *Vet Parasitol.*; 24: 67-74.
- Taylor WL, Dixon JE. (1978) Characterization of pyro glutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem*; 253: 6934-40.
- Threadgold LT. (1968) Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. VI. the ultrastructural localization of phosphatases. *Exp Parasitol*; 23: 264-76.
- Threadgold LT. (1975a) *Fasciola hepatica*: the ultrastructure of epithelium of the seminal vesicle, the ejaculatory duct and the cirrus. *Parasitol* 71, 437 – 443.
- Threadgold LT. (1975b) Electron microscope studies of *Fasciola hepatica* III. Fine structure of the prostate gland. *Exp Parasitol* 37, 117 – 124.
- Threadgold LT. (1982) *Fasciola hepatica*: stereological analysis of vitelline cell development. *Exp Parasitol.* 54(3) :352-65
- Togerson P, Clexton J. (1998). Epidemiology and control. In: Dalton JP editor. Fasciolosis. Cambridge: CABI Publishing; 113-139.
- Viyanant V, Krailas D, Sobhon P, Upatham ES, Kusamran T, Chompoochan T, et al. (1998) Diagnosis of cattle fasciolosis by the detection of a circulating antigen using a monoclonal antibody. *Asia Pacific J Allerg Immunol*; 15: 153-159.
- Waine GJ, Yang W, Scott JC, Mcmanus DP, Kalinna BH. (1997) DNA based vaccination using *Schistosoma japonicum* (Asian blood fluke) genes. *Vaccine*; 15: 846-8.
- Waine GJ, Alarcon JB, Qiu C, Mcmanus DP. (1999a) Genetic immunization of mice with DNA encoding the 23 kDa transmembrane surface protein of *Schistosoma*

- japonicum* (Sj23) induces antigen-specific immunoglobulin G antibodies. *Parasit Immunol*; 21(7): 377-81.
- Waine GJ, Mazzer DR, Mcmanus DP. (1999b) DNA immunization by intramuscular injection or gene induces specific IgG antibodies against a *Schistosoma japonicum* 22 kDa antigen, Sj22, when fused to the murine Ig K-chain secretory leader sequence. *Parasit Immunol*; 21(1): 53-6
- Wallner BP, Hession C, Tizard R, Frey AX, Zuliani A, Mura C, Jahngen-Hodge J and Taylor A. (1993) Isolation of bovine kidney leucine aminopeptidase cDNA: comparative with the lens enzyme and tissue-specific expression of two mRNA. *Biochem*; 32: 9296-9031.
- Watt VM, Yip CC. (1989) Amino acid sequence deduced from a rat kidney cDNA suggests it encodes the Zn-peptidase aminopeptidase N. *J Biol Chem*; 264: 5480-7.
- Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, et al. (1994) Vaccination of sheep with purified cystein proteinases of *Fasciola hepatica* decrease worm fecundity. *Exp Parasitol*; 78: 132-48.
- Wilson RA, Coulson PS. (1998) Why don't we have a schistosomiasis vaccine? *Parasitol Today* ; 4(3): 97-99.
- Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW. (1998) *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol*. 88(2):85-94.
- Xu YZ, Dresden MH. (1986) Leucine aminopeptidase and hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *J Parasitol* ; 72: 507-11.
- Xu YZ, Shawar SM, Dresden MH. (1990) *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of a membrane-associated leucine aminopeptidase. *Exp Parasitol*; 70: 124-33.
- Xu D, Liew FY. (1995) Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania major*. *Immunol*; 84: 173-6.
- Yamasaki H, Kominami E and Aoki T. (1992) Immunocytochemical localisation of a cysteine protease in adult worms of the liver fluke *Fasciola* sp. *Parasitol Res*; 78, 574 – 580.
- Yang W, Waine GJ, Mcmanus DP. (1995) Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian blood fluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem Biophys Res Commun*; 212: 1029-1039.

Youssef FG, Mansour NS. (1991) A purified *Fasciola gigantica* worm antigen for the serodiagnosis of human fascioliasis. Trans Roy Soc Trop Med Hyg; 85: 535-537.

## Output จากโครงการ

### 1. ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ

1. Immunolocalization of leucine aminopeptidase in *Fasciola gigantica* (อยู่ระหว่างดำเนินการ)

### 2. การนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

1. **Khawsuk W.**, Sobhon P. Identification and immunolocalization of leucine aminopeptidase in *Fasciola gigantica*. นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โรงแรมรีเจนท์ ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (13-15 ตุลาคม 2548).
2. **Khawsuk W.**, Duriyanon P., Praengam M., Sobhon P. Identification and immunolocalization of leucine aminopeptidase enzyme in *Fasciola gigantica* (oral presentation) การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 12-14 ตุลาคม 2549 ณ โรงแรม รีเจนท์ ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

### 3. โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ หลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1. ปิยวัฒน์ ดุริยานนท์ (2548) การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ leucine aminopeptidase ในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์
2. มนทิรา แพรงงาม (2548) การศึกษาคุณลักษณะของ leucine aminopeptidase ในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์