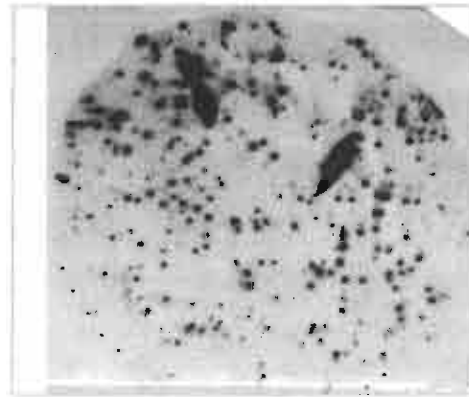
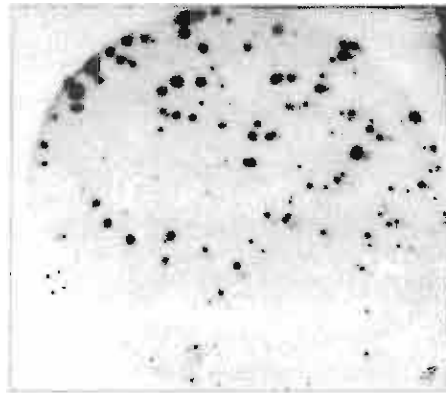




Metacercaria libray



NEJ library



Adult library

www.ncbi.nlm.nih.gov

```

LOCUS      AY227673                1008 bp    mRNA    linear    INV 30-MAR-2003
DEFINITION Fasciola gigantica cathepsin B (cat-B1) mRNA, complete cds.
ACCESSION  AY227673
VERSION    AY227673.1    GI:29374022
KEYWORDS
SOURCE     Fasciola gigantica
  ORGANISM Fasciola gigantica
            Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea;
            Echinostomida; Echinostomata; Fascioloidae; Fasciolidae; Fasciola.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1008)
  AUTHORS  Meemon, K., Grams, R., Vichasri-Grams, S., Hofmann, A., Korge, G. and
            Sobhon, P.
  TITLE    Molecular cloning and analysis of stage/tissue specific expression
            of cathepsin B encoding genes from Fasciola gigantica
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1008)
  AUTHORS  Meemon, K., Grams, R., Vichasri-Grams, S., Hofmann, A., Korge, G. and
            Sobhon, P.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (30-JAN-2003) Department of Anatomy, Faculty of Science,
            Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
FEATURES
  source    1..1008
            /organism="Fasciola gigantica"
            /mol_type="mRNA"
            /strain="Thailand"
            /db_xref="taxon:46835"
            /dev_stage="adult"
  gene      1..1008
            /gene="cat-B1"
  CDS       1..1008
            /gene="cat-B1"
            /codon_start=1
            /product="cathepsin B"
            /protein_id="AA073002.1"
            /db_xref="GI:29374023"
            /translation="MSWLLIFATIVVVQAAPNHKPKQFEPFSDLEIRYVNEESGASWKA
            ARSTRFNNIEQFKHLGALEETPEERNTRRPTVRYSVSENDLPESFDAREKWPNCSSI
            SEIPDQSSSCSWAVGTASAMTDRICHSNGEKKPRLSAVDLVSCPCYCGYGCCEGGYP
            SMAWDYWWRHGIVSGGTLENPTGCLPYFPFKCSHLEETPGLAPCPRELYATPKCEKQC
            QAGYSKTSEEDKIKGKSSYNVGDRETDIMMEIITNGPVSTIYYIFEDFTVYKSGIYQY
            TSGSLMGGHGIIGWGVENGVKYWLAAANSWNEGWGENGYFRIRRGTECGIESRINAGL
            P"
BASE COUNT      290 a      210 c      254 g      254 t
ORIGIN
    1 atgagttggt tgctcatatt tgctaccatc gtcgttggtc aagcagcacc aaaccacaaa
   61 ccgcaattcg aaccgttctc cgatgaattg attcgttatg taaatgaaga gtccggtgca
  121 agttggaag ctgccgacac cacacgattc aacaatatcg aacaattcaa aaacacattg
 181 ggagcattgg aggaacacac tgaagagcgg aacactcgac gaccaaccgt gaggtattct
 241 gtatcagaga acgacctacc cgaatctttt gatgctcgag agaaatggcc aaattgttca
 301 tcgatttctg agattcctga ccagtcacgt ttagttcgtt gttgggcagt cggcactgca
 361 tcggcaatga ccgaccgtat atgcattcat tccaatggag aaaagaaacc tcgtttgagt
 421 gcagtagatc ttgtcagttg ttgtccgtat tgtgggtatg gttgcgaagg tggctatcca
 481 tcaatggctt gggattactg gtggagacat ggtattgtga gcggcggtac tttggaaaat
 541 ccgacaggtt gtttacccta ccggttcccc aaatgttcac accttgagga aacccagga
 601 ttggctccgt gtccgagaga actctatgcg acgcctaaat gtgaaaaaca atgccaagcc
 661 ggatatagca aaacgtccga agaagataaa ataaaaggaa aatcttctta taactgtggg
 721 gaccgagaaa ccgatataat gatggagatc ataacaaacg gtccctgtcg tacgatttac
 781 tatatattcg aagacttcac tgtctacaaa agtggaaatt atcaatacac atctggctcc
 841 cttatgggtg gtcattgtat aatcggttgg ggtgttgaga acggtgtgaa atactggtg
 901 gctgccaat cgtggaacga ggggtggggg gagaacggat acttcagaat ccgacgcca
 961 accaacgaat gcggcattga atccaggatt aatgcgggat tgccttga

```

//

www.ncbi.nlm.nih.gov

```

LOCUS      AY227674                1156 bp    mRNA    linear    INV 30-MAR-2003
DEFINITION Fasciola gigantica cathepsin B (cat-B2) mRNA, complete cds.
ACCESSION  AY227674
VERSION    AY227674.1  GI:29374024
KEYWORDS   .
SOURCE     Fasciola gigantica
ORGANISM   Fasciola gigantica
            Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea;
            Echinostomida; Echinostomata; Fascioloidae; Fasciolidae; Fasciola.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1156)
AUTHORS    Meemon,K., Grams,R., Vichasri-Grams,S., Hofmann,A., Korge,G. and
            Sobhon,P.
TITLE      Molecular cloning and analysis of stage/tissue specific expression
            of cathepsin B encoding genes from Fasciola gigantica
JOURNAL     Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1156)
AUTHORS    Meemon,K., Grams,R., Vichasri-Grams,S., Hofmann,A., Korge,G. and
            Sobhon,P.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL     Submitted (30-JAN-2003) Department of Anatomy, Faculty of Science,
            Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..1156
                                /organism="Fasciola gigantica"
                                /mol_type="mRNA"
                                /strain="Thailand"
                                /db_xref="taxon:46835"
                                /dev_stage="newly excysted juvenile"
            gene            1..1156
                                /gene="cat-B2"
            CDS             29..1048
                                /gene="cat-B2"
                                /codon_start=1
                                /product="cathepsin B"
                                /protein_id="AAO73003.1"
                                /db_xref="GI:29374025"
                                /translation="MNWLIVFAIIAVVQAKPNHKPQFEAFSDELIRFVNEESGASWKA
            ARSTRFSNVDFHKLHLGALSETPEERNALRPTIKHDISKNDLPESFDARSQWPQCWTI
            SEIRDQASCGSCWATAAASAMSDRVCIHNSGQMRPRLAADPLSCCTYCGQGRGGYP
            PKAWDYWMREGIVTGGTWNRTGCPWMFTKCDHVGDSRKYSRCPHYTYTPPCARAC
            QTGYNKTYEQDKFYGNSSYNVGEHESYIMQEIIMKNGPVEVTFALFQDFGVYRSGLYHH
            VAGKFIGRHAVRMIGWGVNGVNYWLMANSWNEEWGENGYFRMVRGRNECGIESEVVA
            GMPRL"
BASE COUNT      336 a      242 c      286 g      292 t
ORIGIN
1  ttcatccta cagctgatgc tcgtcaagat gaactgggta atcgtgtttg ccattatcgc
61  cgttgtccaa gcaaaaccaa accataaacc gcaattcgag gctttctccg atgaactgat
121  tcgatttttg aacgaggaat ctgggtgccag ttggaaagct gcacggtcca ctcgattcag
181  caatgttgac cactttaaac tgcacttggg agctctgtct gaaacaccag aagaagaaaa
241  tgccctgcga ccaaccataa aacatgacat atcgaaaaac gatctgccag agtcttttga
301  tgctcgttct caatggccac aatgctggac gatttcggag attcgggacc aggccagttg
361  tggttcctgt tgggccacgg cggcagccag tgcaatgagt gaccgtgtgt gtattcattc
421  taacggtcaa atgagaccac gtttgccgcg agcagatcca ctcaattgtt gcacgtactc
481  ttggtcagggg tgcagaggtg gctatccacc gaaggcttgg gattattgga tgcgcgaggg
541  tatcgtgact ggtggtactt gggaaaatcg aaccggttgt cagccctgga tgtttaccaa
601  gtgtgatcac gttggtgact ctgaaaataa tagtcgttgt cctcactaca cctatccgac
661  acctccttgc gcaagagctt gccaaactgg atataataaa acgtacgagc aagataagtt
721  ttacggaaat tcatcttaca acgtggggga acacgagtct tatatcatgc aagagatcat
781  gaaaaatggt ccagttgaag tgactttcgc catattccag gacttcgggt tgtacagaag
841  tggaaattac catcacgtgg ccggtaaatt catcggtaga catgccgtcc gtatgatcgg
901  ttgggggtgt gagaatggcg tgaattactg gttgatggcc aattcgtgga atgaggaatg
961  gggtgagaat ggatacttcc gaatggttaag aggaagaaac gaatgcggca tcgaatcaga
1021 agttgtcggc ggaatgccac gtctttgagc aacacgaaa taaccttaaa aactccctct
1081 ttgaattgct gttatacaat ttgcaatata tttcttgcta acttacaaaa aaaaaaaaaa
1141 aaaaaaaaaa aaaaaa

```

//

www.ncbi.nlm.nih.gov

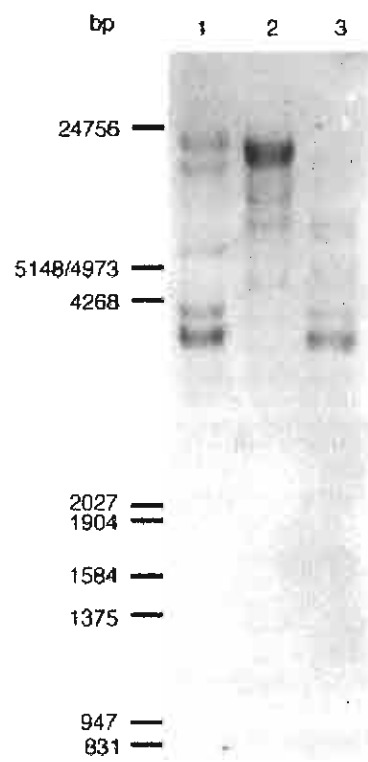
```

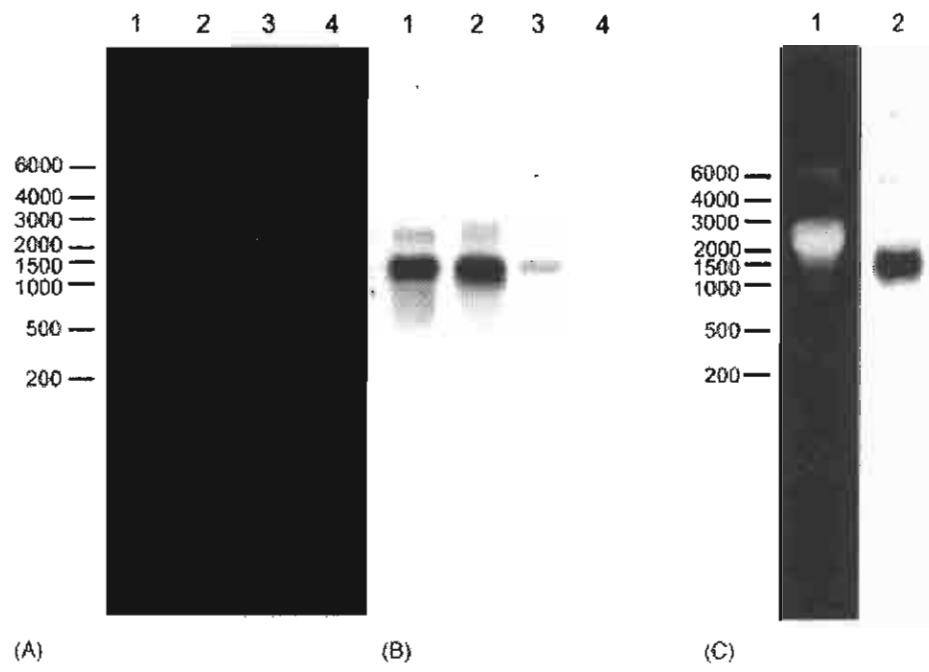
LOCUS      AY227675                1159 bp    mRNA    linear    INV 30-MAR-2003
DEFINITION Fasciola gigantica cathepsin B (cat-B3) mRNA, complete cds.
ACCESSION  AY227675
VERSION    AY227675.1   GI:29374026
KEYWORDS   .
SOURCE     Fasciola gigantica
  ORGANISM Fasciola gigantica
            Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea;
            Echinostomida; Echinostomata; Fascioloidea; Fasciolidae; Fasciola.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1159)
  AUTHORS  Meemon,K., Grams,R., Vichasri-Grams,S., Hofmann,A., Korge,G. and
            Sobhon,P.
  TITLE    Molecular cloning and analysis of stage/tissue specific expression
            of cathepsin B encoding genes from Fasciola gigantica
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1159)
  AUTHORS  Meemon,K., Grams,R., Vichasri-Grams,S., Hofmann,A., Korge,G. and
            Sobhon,P.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (30-JAN-2003) Department of Anatomy, Faculty of Science,
            Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
FEATURES   Location/Qualifiers
  source    1..1159
            /organism="Fasciola gigantica"
            /mol_type="mRNA"
            /strain="Thailand"
            /db_xref="taxon:46835"
            /dev_stage="metacercariae"
  gene      1..1159
            /gene="cat-B3"
  CDS       25..1038
            /gene="cat-B3"
            /codon_start=1
            /product="cathepsin B"
            /protein_id="AA073004.1"
            /db_xref="GI:29374027"
            /translation="MSWLLIFAAIIVVAQAKPNYKQFEPFSDLIHYINEESGASWKA
            APSTRFNNIDQVKQNLGVLEETPEDRNTORQTVRYSVSENDLPESFDARQKWANCPSI
            SEIRDQSSSCSWAVSSASAITDRICHSNGQKKPRLSAIDIVSCCAYCGYGCNGGIP
            AMSWDYWTREGVVTGGTLENPTGCLPYFPFKCSHGVTPLPCCPRDIYPTPKCEKKC
            HAGYNKTYEQDKVKGKSSYNVGEQETDFMMEIMKNGPVDGI FYMFEDFLVYKSGIYHY
            TTGRLVGGHAIRVIGWGVENGVKYWL IANSWNEGWEKGYFRMRGNNECGIEARINA
            GLP"
BASE COUNT 353 a    227 c    272 g    307 t
ORIGIN
1  tctctcataaa caaggctcgt agagatgagt tggttgctca tatttgctgc catcgctcgtt
61  gctcaagcaa agccaaacta caaacggcaa ttcgaccgt tctccgatga attgattcat
121 tatatcaatg aagagtcctg tccaagttgg aaagccgcc catccactcg attcaacaat
181 atcgatcaag tcaaacaaaa cttgggtgta ctggaggaaa cacctgaaga tcggaacact
241 caacgacaaa ccgtgaggta ttccgtatca gagaacgacc taccggaatc ttccgatgct
301 cgacagaaat gggcaaatg tccttcgatt tccgagattc gtgaccaatc cagttgtagt
361 tcgtgttggg ctgtcagctc tgcctcggca ataaccgacc gtatatgcat tcattctaata
421 ggacaaaaga aacctcgttt gagcgcaata gatattgtca gttgttgtgc gtattgtggg
481 tatggttgca acggtggcat tccagcaatg tcttgggatt actggacgag agagggtgtt
541 gtgaccgggt gtactctgga aaacccgaca ggctgtttac cctaccggtt ccccaaatgt
601 tcacatgggt tggtaacccc aggattgcct ccgtgtccaa gagatatcta tccgacacct
661 aaatgtgaga agaaatgtca tgcctggatat aacaaaacgt acgaacaaaga taaagtgaag
721 ggaatatcat cttataacgt ggggtgaacaa gaaacogatt ttatgatgga gattatgaaa
781 aacggtcctg tcgatgggat tttctatatg ttcgaggatt tccttggtta caaaagtggg
841 atttatcact acacaactgg ccgccttggt ggtggtcatg caattcogct tatcgggttg
901 ggtgttgaga acggtgtgaa atactgggtt attgccaatt catggaatga gggatgggtt
961 gaaaagggat acttcagaat gcgacgtgga aataacgaat gtggcattga agcaggattt
1021 aatgccggat taccttaatt ttcgtctacc aagatgaatc cctcaaaacg tgtgttcgca
1081 ttctgagtga attgtgtttt gatttcttaa taaatctcta cactcggtaa aaaaaaaa
1141 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

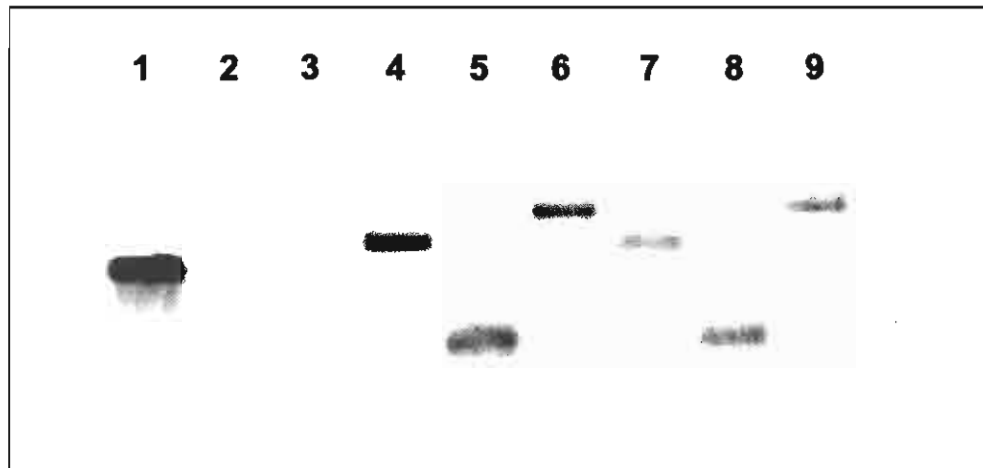
```

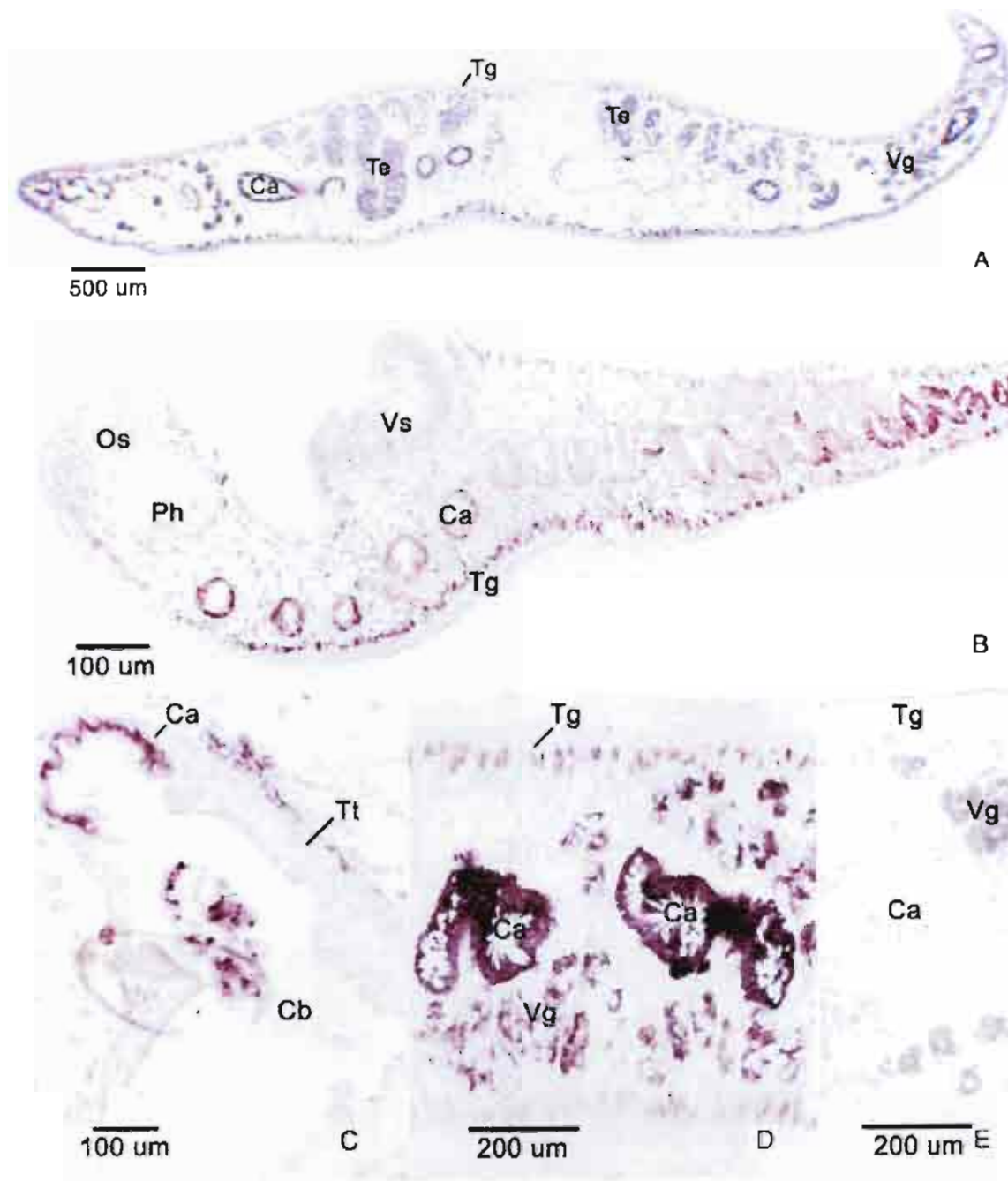
//

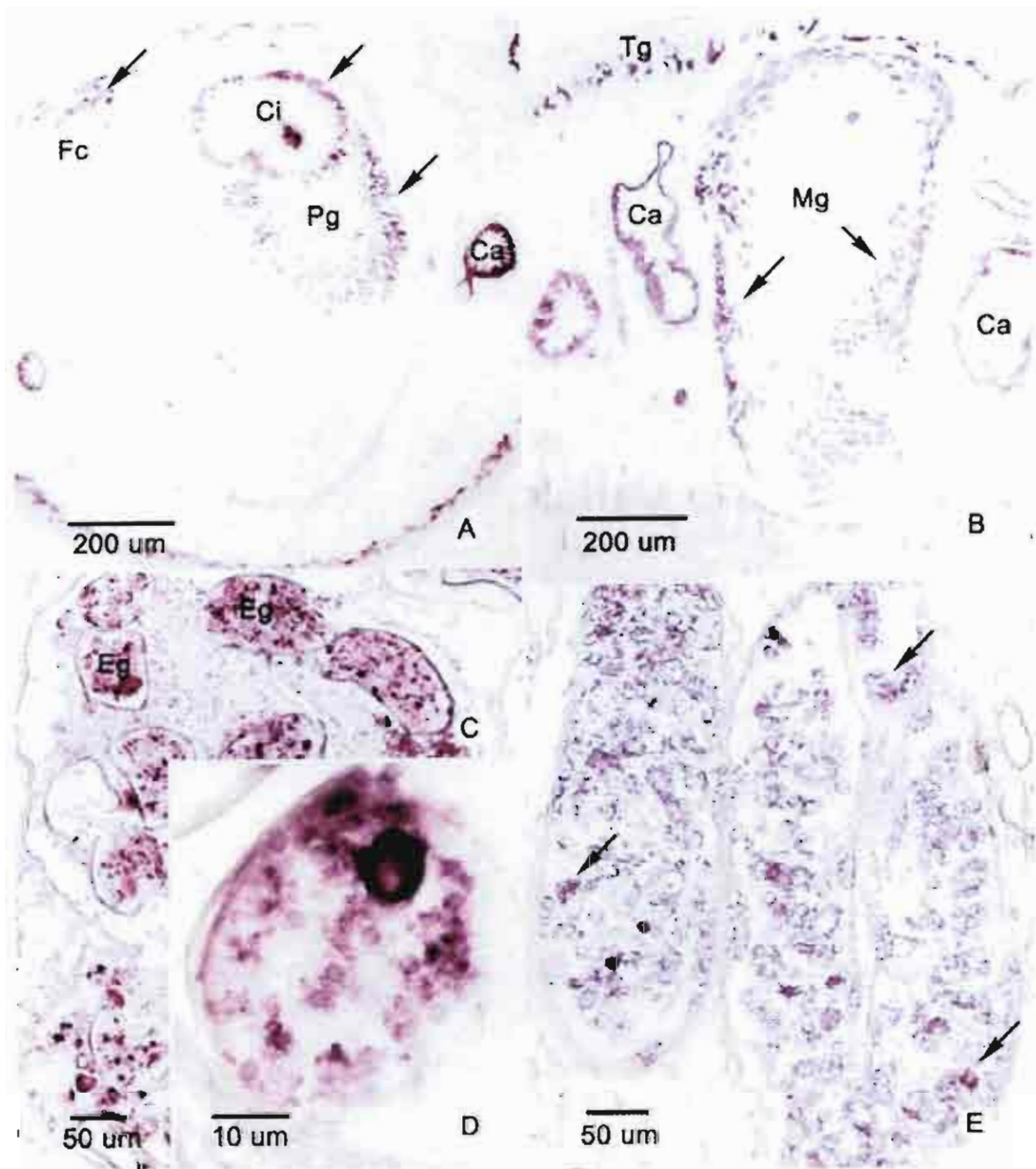
FG-cat-B1	1	--MSWLLIFATIVVQAAAPHKXP--QFPPPSDELIRYVNHESGASWKAARSTFNNIEQFKKHLGALKETPEKRMTRRPT	76
FG-cat-B2	1	...N...IV...I.A...K...A...F...S.VDH...L...S...AL...	76
FG-cat-B3	1	...A...A...K...Y.R...H.I...P...D.V.QN...V...D...Q.Q...	76
PH-U58000	1	...N...IV...I.A...K...A...F...S.VDH...L...S...AL...	76
PH-AJ488928	1	...E...H.I...K...P.S...I...H...Q...L...Q...	66
PH-Z22768	1		1
SJ-X70968	1	MLKIAVY.VSLFTPLE.HVTTRMNQRI...L...M.SFI...HPD.G...DK.D...HSLDDARILM...RK.DA.MKRN...	80
SM-M21309	1	MLT.I.C.ASL.TPLE.HISV.N.EK...L...DI.S.I...HPN.G.R.EK.N...HSLDDARIOM...RR.E.DL.RK...	79
HS-L16510	1	...WQ.WASLCCLL.L.NARSR...S.H.L...VN...KR-NTT.Q.GHNFFYNVDMSYL.RLC.TFLGG.-----KP.Q	70
FG-cat-B1	77	VRYSVSENDLPESFDAREKWPNCSSISEIPDQSSSCSCMAVGTAASAMTDRIHSHNGEKKPRLSAVDLVSCC-PYCGYGC	155
FG-cat-B2	77	IKHDI.K...SQ...Q.WT...R...A...G...TAA...S...V...QMR...A.A.PL...T...Q...	155
FG-cat-B3	77	...Q...A...P...R...SS...I...Q...I...I...A...	155
PH-U58000	77	IKHDI.K...SQ...Q.WT...R...A...G...TAA...S...V...QMR...A.A.PL...T...Q...	155
PH-AJ488928	67	...N...D...L.R...RQ...G...AGVG...S...V...NMQ.E...I...S...M...	145
PH-Z22768	1	...Q.Q.W...F...T.S...A.Q.KHT.V...ENM.D...TS...M...	47
SJ-X70968	81	.DEHDLNVEI.SQ...S.K...H.K...Q.R...R.G...F.AVE...Q.G.QQSAE...L...I...KD...D...	159
SM-M21309	80	.DHNDWNVEI.SN...S.K...G.K...AT.R...R.G...SF.AVE...S...S...Q.G.QQNV...LT...HS...L...	158
HS-L16510	71	RVMPTEBLK...A...Q...Q.PT.K...R...G...G...F.AVE.IS...T.AHVSVEV...E...LT...GSM...D...	150
FG-cat-B1	156	EGGYPSMADYMWNRHGIVSGGTLENFTGCLPYPPFKCSHLEETPGLAPCPRELYATPKCEKQCQAGYSKTBSEEDKIKOKS	235
FG-cat-B2	156	R...PK...M.E...T...M...R...Q.WM.T...D.VGDSRKYSR...HYT.P...P.ARA...T...N...Y.Q...FY.N...	235
FG-cat-B3	156	M...I.A.S...T.E.V.T...GVV...P...DI.P...K.E...N...Y.Q...V...	235
PH-U58000	156	R...PK...M.E...T...M...R...Q.WM.T...D.VGDSRKYSR...HYT.P...P.ARA...T...N...Y.Q...FY.N...	235
PH-AJ488928	146	Q...S.PA...H...T...Q.R.PGSRSQ.N...YT.P...S.YPY...D...Y.K...VY...T	225
PH-Z22768	48	N...GFPLKLSIGKKTSCRMFVRIERMM.TILVPSLRISRDWTET...NQDV-T...A.EHT.RP...NM.YOK...WYART	126
SJ-X70968	160	Q...F.GV...VKR...T.SK...H...Q...E.HTKG-KYPA.GTKI.K...Q.KQT...K...KTPY.Q...HY.DE	238
SM-M21309	159	...ILGP...VKE...TASSK...H...E...E.HTKG-KYP...GSKI.N...R.KQT...RK.KTPYTQ...HR...	237
HS-L16510	151	N...AE...NF.T.K.L...LY.SHV...R...SI.P.E.HVNG-SRP...TG.G-D...S.I.EP...P.YKQ...HY.YN	228
FG-cat-B1	236	SYNVQDRETDIMMEIITNGPVSTIYYIFEDFTVYKSGIYQYTSGLMGGHGI--IQWGVENGVKYMLAANSWNEQWGENG	313
FG-cat-B2	236	...EH.SY...Q...MK...EVTFA...Q...G...R...HHVA.KFI.R.AVRM...M...M...E...	315
FG-cat-B3	236	...EQ...F...MK...DG.F.M...L...H...T.R.V...A.RV...I...I...K...	315
PH-U58000	236	...EH.SY...Q...MK...EVTFA...Q...G...R...HHVA.KFI.R.AVRM...M...M...E...	315
PH-AJ488928	226	...DRH.YT...E...MK...EAGPIVYT...A...HHV...RYA.K.A.RI...T...V...	305
PH-Z22768	127	V.K.PAD.HR...R.LL...MEVSFEVYG...PS...V...	166
SJ-X70968	239	...QNN.KV.QRD.MMY...EAPDVY...LN...RHVT...IV...A.RI...KRTP...I...D...K...	318
SM-M21309	238	...KND.KA.QK...MKY...EASPTVY...LN...KHIT.EAL...A.RI...KTP...I...D...	317
HS-L16510	229	...S.SNS.K...A...YK...EGAPSVYS...LL...V...HVT.EM...A.RIL...TP...V...TD...D...	308
FG-cat-B1	314	YPRIRRGTECGIESRINAGLP-----	335
FG-cat-B2	316	...MV...R...EVV...M.RL...	319
FG-cat-B3	316	...M...N...A...	337
PH-U58000	316	...MV...R...EVV...M.RL...	339
PH-AJ488928	306	...L...D...R...IVV...M.RLQENITNHH	337
PH-Z22768	166		166
SJ-X70968	319	L...MV...RD...S...DVV...IKT...	342
SM-M21309	318	...V...RD...S...EVI...RIM...	340
HS-L16510	309	F.K.L...QDH...EVV...I.RTDQYWEKI,	339

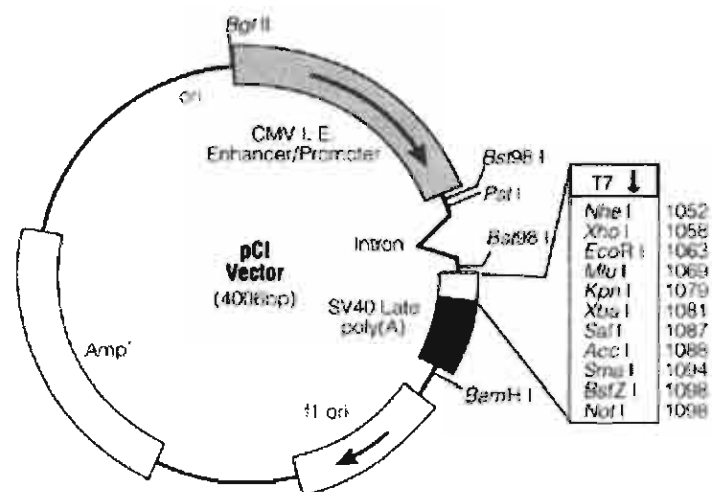


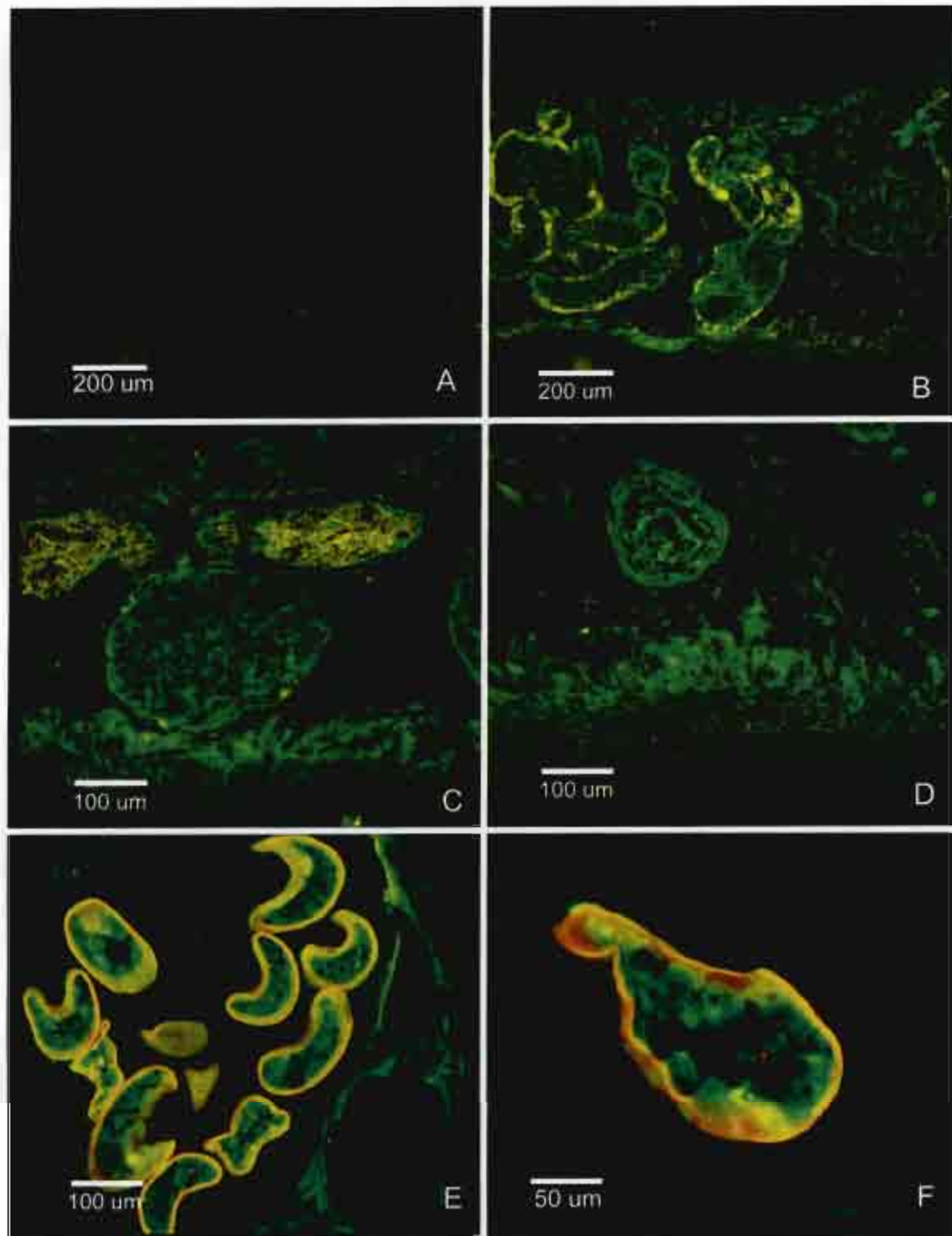


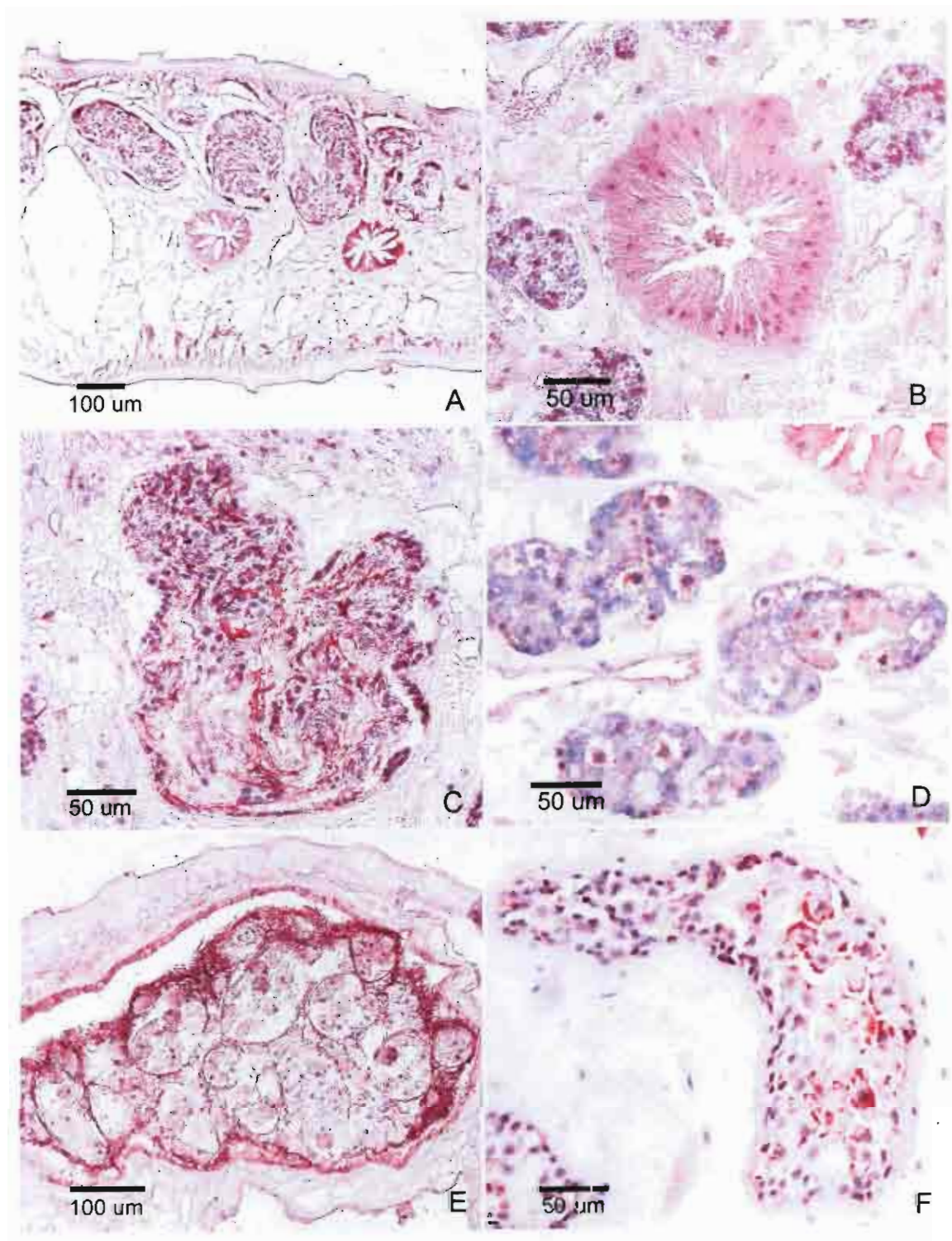


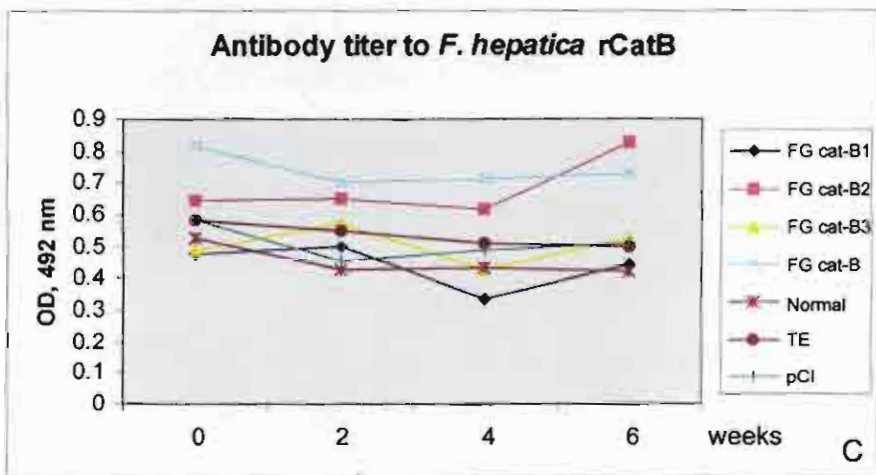
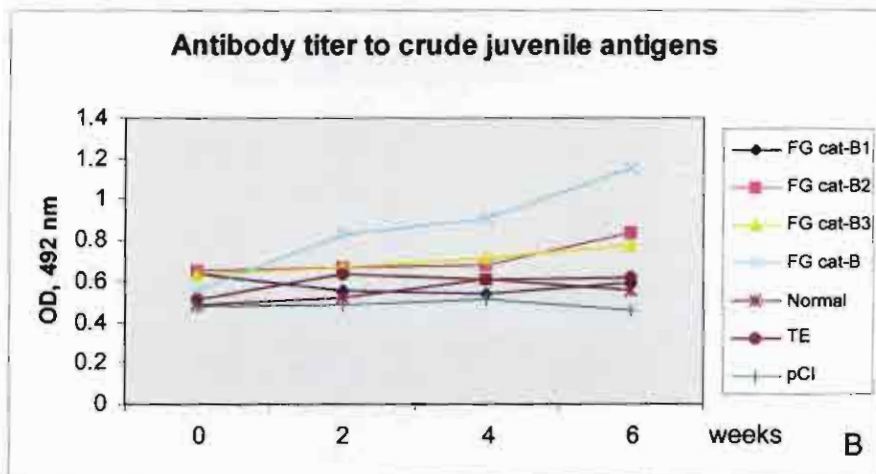
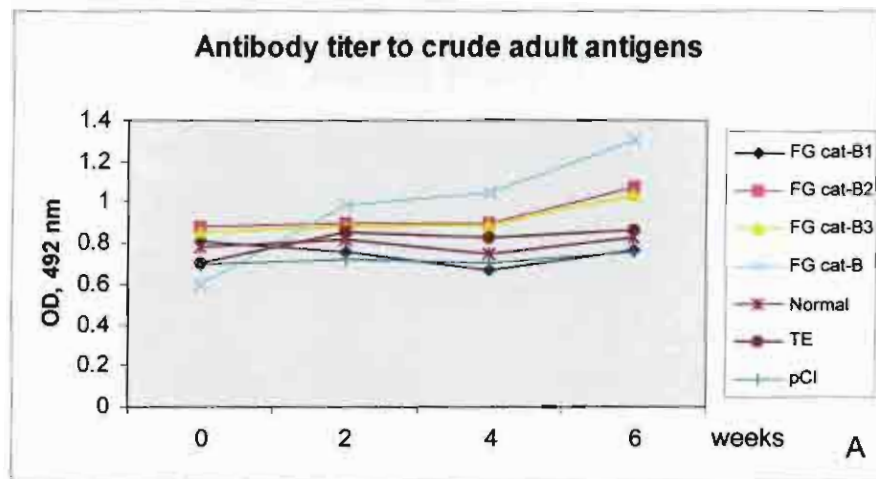












1.4. การสังเคราะห์ คุณลักษณะ การกระจายและประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathepsin L

1.4.1. การสังเคราะห์ยีน cathepsin L

เอนไซม์ cathepsin L เป็นเอนไซม์อีกตัวหนึ่งที่ย่อยสารโปรตีนต่างๆ เพื่อเป็นอาหารของพยาธิ ใน การศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า เอนไซม์ cathepsin L เป็นเอนไซม์หลักที่พยาธิตัวเต็มวัยใช้ย่อยสลาย สารอาหารเพื่อการดูดซึมเข้าสู่ตัวพยาธิ ถ้าหากสามารถสังเคราะห์ และ พัฒนาวัคซีนต่อเอนไซม์ cathepsin L และ cathepsin B ได้ ประสิทธิภาพของวัคซีนที่ได้ก็จะสูงขึ้น โดยจะสามารถหยุดการไชและ เคลื่อนที่ของพยาธิตัวอ่อนเข้าไปในเนื้อเยื่อของโฮสต์ รวมทั้งอาจห้ามหรือรบกวนการย่อยสลายสารอาหาร ในพยาธิตัวเต็มวัยและทำให้พยาธิตายได้ในที่สุด ดังนั้นเราจึงได้ทำการค้นหายีนของเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อ จะได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนสำหรับทดสอบวัคซีนต่อไป

การสร้าง probe จากชิ้นส่วนของ cathepsin L ซึ่งได้เคยสังเคราะห์ขึ้นโดยกลุ่มวิจัยของเรา (Grams *et. al*, 2001) แล้วจึงนำ probes ที่ได้มาทำการ screen หาใน cDNA libraries ดังที่ได้กล่าว มาแล้วในหัวข้อ 1.3.1.

ผลจากการ sequencing พบว่ายีน cathepsin L พบอยู่ในทั้ง 3 ระยะของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยยีน cathepsin L ของพยาธิตัวเต็มวัยที่พบจากการค้นหามีลำดับ nucleotides เหมือนกับที่เคยสังเคราะห์ขึ้นและที่ถูกลำดับมาใช้เป็น probe ขณะที่ยีน cathepsin L ของ พยาธิระยะ NEJ และ Metacercariae แสดงค่า identity กับ cathepsin L ของระยะตัวเต็มวัยประมาณ 70% และ 75% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1.4-1 ยีน cathepsin L นี้ได้ถูกส่งเข้า GenBank database ภายใต้รหัสดังนี้ ยีน cathepsin L จากพยาธิระยะตัวอ่อน NEJ ชื่อ FG cat-L1G และได้รับรหัสเป็น AF419329 (รูปที่ 1.4-2) ยีน cathepsin L จากพยาธิระยะ metacercariae ชื่อ FG cat-L1H และได้รับรหัสเป็น AY428949 (รูปที่ 1.4-3) ยีนทั้งสามของ cathepsin L แสดง open reading frame ที่ 981 bp ซึ่งกำหนดรหัสโปรตีน เท่ากับ 326 amino acids การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SignalP พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1-15 เป็น ตำแหน่งของ preregion (preprotein) ขณะที่ในตำแหน่ง 16-106 เป็นตำแหน่งของ proregion (preprotein) ดังนั้นกรดอะมิโนจำนวน 219 ตัวจากตำแหน่งนี้ไปเป็น mature enzyme รูปที่ 4 เราได้แสดง การเรียงลำดับเพื่อเปรียบเทียบ (alignment) ยีน cathepsin L จากพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* กับยีน cathepsin L จากพยาธิใบไม้ในตับของมนุษย์ด้วย ซึ่งพบว่าตำแหน่ง thiol cathepsin consensus pattern Gln-Xaa(3)-(Gly-Glu)-Xaa-Cys-Trp-Xaa(2)-(Ser-Thr-Ala-Gly) ตำแหน่ง catalytic sites (Cys, His, Asn) และตำแหน่ง disulphide bridges มีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserve) ไว้ในยีนทั้งหมด

1.4.2. การศึกษาการกระจายของยีน cathepsin L ในเนื้อเยื่อพยาธิ โดยวิธี *in situ* hybridization

เนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* ถูกตรึงด้วย 4% paraformaldehyde แล้วนำไปฝังใน paraffin จากนั้นจึงนำก้อนเนื้อเยื่อไปตัดที่ความหนา 10 ไมโครเมตร RNA probe ของยีน cathepsin L ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธี *in vivo* transcription โดยใช้ DIG RNA labeling kit (Roche) ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพยาธิที่ถูกตัดแล้วได้นำมายืดเกาะกับ RNA probe ที่อุณหภูมิ 42°C ในสารละลาย hybridization buffer จากนั้นจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ anti-DIG alkaline phosphatase และตามด้วยสารละลาย NBT/BCIP เพื่อทำให้เกิดสี

ผลจากการทำ *in situ* hybridization ด้วย RNA probe ของ cathepsin L พบว่า cathepsin L mRNA transcripts สามารถตรวจพบได้ที่เฉพาะเยื่อบุผิวส่วนท้ายที่เป็น caecum ของทางเดินอาหารของพยาธิ *F. gigantica* ตั้งแต่ระดับ bifurcation จนถึงปลายสุด ขณะที่เนื้อเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนหน้าซึ่งเป็นชนิดเดียวกับเนื้อเยื่อชั้นผิว (tegument) รวมทั้งเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ของพยาธิไม่ถูกจับด้วย cathepsin L probe (รูปที่ 1.4-4) การเกิดสีภายหลังจากการเติม substrate ใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที แสดงให้เห็นว่า cathepsin L มีการแสดงออกที่ปริมาณสูงในพยาธิระยะตัวเต็มวัย และน่าจะมีบทบาทสำคัญในการอยู่รอดของพยาธิชนิดนี้ โดยหน้าที่ของ cathepsin L ได้ถูกศึกษาและวิเคราะห์ในพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* และพยาธิใบไม้เลือด คือการช่วยย่อยอาหารของพยาธิตัวเต็มวัย ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาโดย *in situ* hybridization ครั้งนี้ นอกจากนั้นแล้ว cathepsin L ยังถูกหลั่งออกไปเคลือบผิวของพยาธิซึ่งมีส่วนช่วยในการป้องกันการทำลายจากภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะแอนติบอดีจาก host อีกด้วย

1.4.3. การทดสอบประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ CatL-cDNA ในหนูทดลอง

ขั้นแรกทำการสังเคราะห์ recombinant pCI vector ที่มีชิ้นส่วนของยีน cathepsin L แทรกอยู่ภายใน โดยการขยายชิ้นส่วน open reading frame ของยีนนี้ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ primer ที่จำเพาะต่อส่วนปลาย 5' และปลาย 3' ของยีนซึ่งมี restriction site ของเอนไซม์ *EcoRI* และ *XbaI* อยู่ จากนั้นทำการตัดชิ้นส่วน open reading frame นี้และ pCI vector ด้วยเอนไซม์ทั้งสอง และทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดังกล่าวกับ plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase

ก่อนการฉีดวัคซีน CatL-cDNA pCI vector ในหนูทดลอง เราได้ทำการสกัด plasmid DNA เพื่อทำการกำจัด endotoxin โดยใช้ Endofree plasmid Maxi preps kits (QIAGEN) สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองคือ หนูเมาส์ (ICR Mouse) เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์

หนูทดลอง 6 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย DNA ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นหนูปกติที่ไม่ได้รับการฉีดใดๆ (NT)

กลุ่มที่ 2 หนูได้รับการฉีดด้วยสารละลาย TE (TE)

กลุ่มที่ 3 หนูได้รับการฉีดด้วยพลาสมิด pCI (pCI)

กลุ่มที่ 4 หนูได้รับการฉีดด้วยยีน cathepsin L (CatL)

กลุ่มที่ 5 หนูได้รับการฉีดด้วยยีน fatty acid binding protein (FABP)

กลุ่มที่ 6 หนูได้รับการฉีดด้วยยีน glutathione S-transferase (GST)

หนูเหล่านี้ได้รับการฉีดกระตุ้นทาง intramuscular ในปริมาณ 25 ไมโครกรัม ต่อสารละลาย TE 100 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการฉีด metacercariae ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* จำนวน 10 ตัว ทาง intraperitoneal ในสัปดาห์ที่ 5 หลังจากการติดเชื้อ ทำการฆ่าหนู และเก็บพยาธิที่ติดเชื้อในหนูทดลอง เพื่อหาจำนวนพยาธิที่เหลือรอดจากการทำวัคซีน ผลการทดลองพบว่า การฉีดวัคซีนด้วยยีน Cat L สามารถลดจำนวนการติดเชื้อของพยาธิได้สูงสุด ประมาณ 40% ดังแสดงในรูปที่ 1.4-5

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.4

- รูปที่ 1.4-1 homology (ส่วนบนขวา) และ identity (ส่วนล่างซ้าย) ระหว่างยีน cathepsin L ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย (FgCathL) ระยะตัวอ่อน newly excysted juvenile (FgCL-NEJ) ระยะ Metacercariae (FgCL-Meta) และยีน cathepsin B ของพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* ระยะตัวอ่อน newly excysted juvenile (FgCB-NEJ) ระยะ Metacercariae (FgCB-Meta) กับยีน cathepsin L และ B จากพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* (FhCathL, FhCathB) พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mansoni* (SmCathL, SmCathB) *Schistosoma japonicum* (SjCathL, SjCathB) และมนุษย์ (HumCathL, HumCathB)
- รูปที่ 1.4-2 ผลการ submit ยีน FG cat-L1G ใน Data Base ซึ่งสามารถสืบค้นได้ในเว็บไซต์ NCBI
- รูปที่ 1.4-3 ผลการ submit ยีน FG cat-L1H ใน Data Base ซึ่งสามารถสืบค้นได้ในเว็บไซต์ NCBI
- รูปที่ 1.4-4 A-F) แสดงผลการย้อม *in situ* hybridization ในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัยด้วย cathepsin L RNA probe ที่เฉพาะตำแหน่งเนื้อเยื่อบุผิวส่วน caecum (Ca) ของทางเดินอาหารตั้งแต่ระดับ bifurcation (bi) จนถึงปลายสุด Os = oral sucker, U = Uterus
- รูปที่ 1.4-5 แสดงจำนวนพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ที่มีชีวิตรอดในหนูทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนที่ประกอบด้วยยีนชนิดต่างๆ

FgCL-Meta	----	79.5	80.7	58.1	74.6	60.4	44.8	35.3	46.6	46.2	43.6	24.9	47.1
FhCathL	74.1	----	85.4	61.2	89.5	59.8	46.2	36.9	46.0	47.1	45.1	25.2	46.6
FgCL-NEJ	74.2	80.5	----	60.6	79.0	60.1	46.6	37.0	46.4	47.2	45.6	25.0	47.8
SmCathL	48.5	51.5	52.9	----	61.3	66.5	42.8	34.5	43.7	43.8	40.5	21.8	43.3
FgCathL	69.4	88.3	75.2	52.3	----	56.9	42.7	36.6	43.8	44.5	42.9	23.3	43.2
SjCathL	51.0	50.9	51.4	60.5	48.7	----	44.8	33.9	46.5	47.0	42.9	25.7	45.7
FgCB-Meta	32.9	34.2	34.8	32.2	32.0	33.3	----	53.7	63.0	62.0	76.5	34.3	38.5
FhCathB	26.2	27.6	27.7	25.8	27.5	25.6	48.7	----	48.6	48.3	71.3	26.7	28.1
SjCathB	34.8	33.9	35.1	32.4	32.5	33.5	53.6	42.5	----	78.7	62.3	34.6	36.9
SmCathB	33.6	34.7	35.4	32.5	33.3	34.7	52.6	40.8	72.3	----	61.2	33.9	35.7
FgCB-NEJ	32.0	33.6	33.8	29.6	32.3	31.7	68.8	71.2	53.2	50.7	----	34.7	37.6
HumCathB	17.8	18.6	18.4	15.4	17.5	18.1	28.9	23.0	29.3	28.5	28.7	----	29.0
HumCathL	37.9	38.0	38.7	35.1	35.8	37.5	27.2	21.2	25.8	25.2	27.1	20.5	----

www.ncbi.nlm.nih.gov

LOCUS AF419329 1091 bp mRNA linear INV 28-OCT-2001
 DEFINITION Fasciola gigantica cathepsin L mRNA, complete cds.
 ACCESSION AF419329
 VERSION AF419329.1 GI:16506722
 KEYWORDS .
 SOURCE Fasciola gigantica
 ORGANISM Fasciola gigantica
 Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea;
 Echinostomida; Echinostomata; Fasciolioidea; Fasciolidae; Fasciola.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1091)
 AUTHORS Sobhon,P., Meemon,K., Grams,R., Grams,S.V., Korge,G. and Hofmann,A.
 TITLE Molecular cloning of cathepsin L encoding genes from Fasciola
 gigantica
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1091)
 AUTHORS Sobhon,P., Meemon,K., Grams,R., Grams,S.V., Korge,G. and Hofmann,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-SEP-2001) Department of Anatomy, Mahidol University,
 Faculty of Science, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 .source 1..1091
 /organism="Fasciola gigantica"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:46835"
 /dev_stage="metacercaria"
 /country="Thailand"
 .gene <1..1091
 /gene="cat-L1G"
 .cds 30..1010
 /gene="cat-L1G"
 /codon_start=1
 /product="cathepsin L"
 /protein_id="AAL23917.1"
 /db_xref="GI:16506723"
 /translation="MRLFILTVLLAGAFASNDLWHEWKRKYKEYNGADNEHRRNVW
 EKNVKHIQEHNLRHDLGLVYTYTLGLNQFTDLTFEEFKAKYLIEMSPESLSLDGISYE
 AEGNDVPASIDWRQYGYVTEVKNQGCSCWAFSAVGAIEGQYVKKFRNRLFSEQQL
 VDCTKRFGNHGCSGGMENAYRYLKDSGLETASYYPYQAWYQCQYRRELGVAEVTGA
 YTVHSGDEMRLMQVGREGPAAVAVDAQSDFYMYKSGIFMSQVCTTORVTHAVLAVGY
 GTESGTDYWI SKNSWCKWGWGEDGYMRFRNRNNMCAIASVASVPMVERFP"

ORIGIN

```

1 acacagaaca atctacacca agtggaaaca tgcgattgtt catattaacc gttctcctcg
61 ctggagcggtt cgttcgaat gacgatttgt ggcattgastg gaagcgaaaa tacaataaag
121 aatacaacgg agctgacnat gaacacaggc gaattgtttg ggaaaagaat gtgaaacata
181 tcaagaacaa caacctgcgt caccgatctcg gtctcgtcac ttacacgttg ggattgaacc
241 aatttactga cctgaagttt gaggaattca aggccaaata tctaataaaa atgtcacccg
301 agtccgaatc actctcagac ggcatttcat atgaggccga aggcattgac gtaccggcca
361 gtatagattg gcgtcaatat ggttatgtga cggaggtgaa aaatcaggga caatgtgggt
421 cctgttgggc ttttcagcc gtccgtgcaa tagagggaac gtatgtcaaa aagtttcgaa
481 accgaatgtt attctcagag caacagtttg tccgattgtac caaacgattt ggcaaccacg
541 gatgtagcgg tggttggatg gagaacgctt atagatatat gaaagacagc ggatttggaa
601 cggcatccta ttaccggtat caggtttggg aatatcaatg tcaatacagg agagagcttg
661 gactagcaga agtgactggt gactatacgg tgcattcttg tgatgagatg aggttgatgc
721 aaatgggtcgg tagagaagga cctgctgcgg tccgtgttga tgcctaatct gacttctata
781 tgtataaagg tggatatttc atgagccaaag ttgtgtacaa gcaacgtgtg actcatgcag
841 tgttggctgt tggttatgga acagagagtg gtactgacta ttggatttcg aaaaacagtc
901 ggggaaagtg gtgggttgag gacggttaca tgcggtttgc caggaaacga aacaatatgt
961 gtgcaattgc ttgggtggcc agtggtccca tgggtgaaac atttcctgtg tatttctgtg
1021 tcatcacaaa aatgaataaa ataataaatg tcaacttgcc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1081 aaaaaaaaaa a

```

//

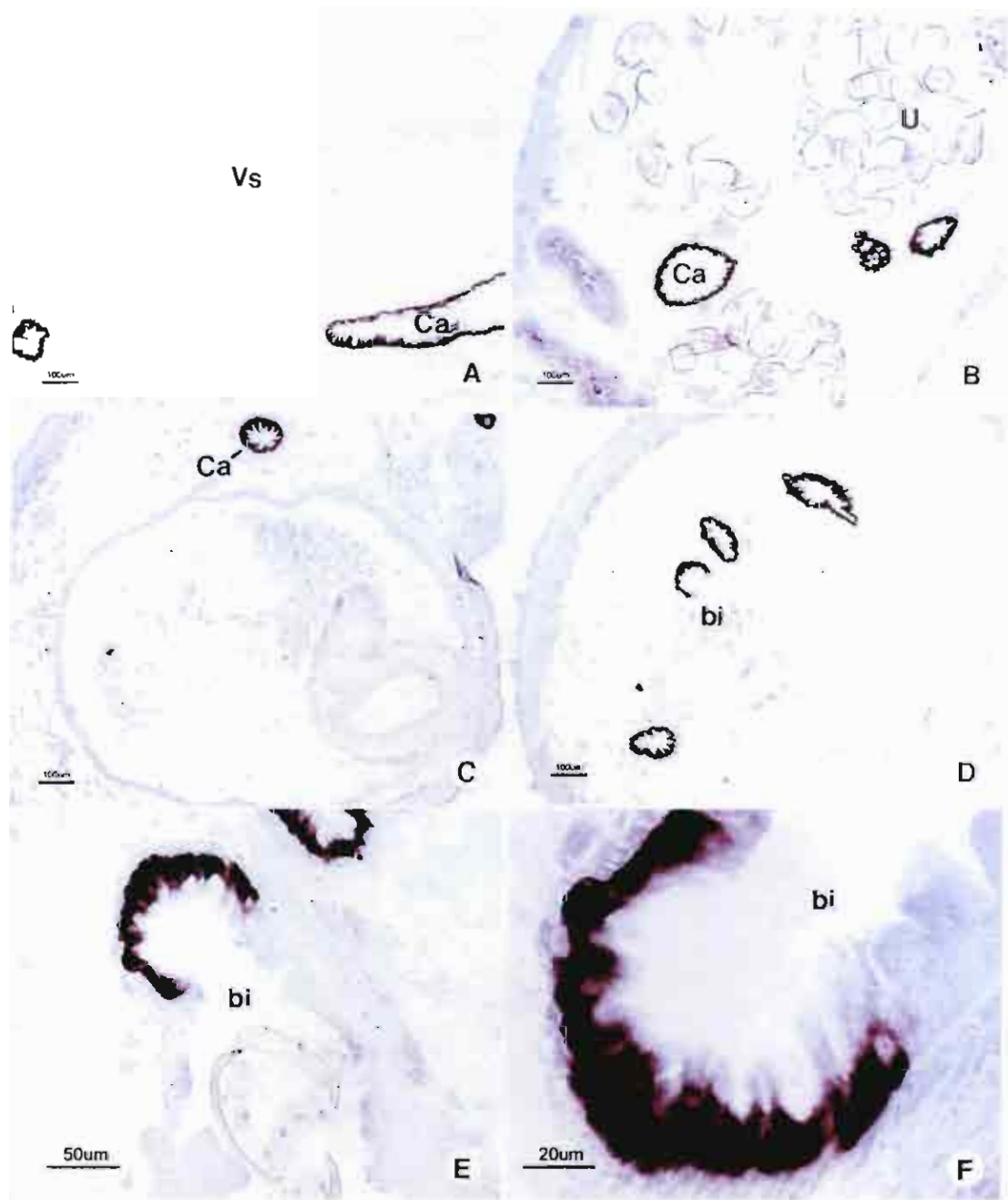
www.ncbi.nlm.nih.gov

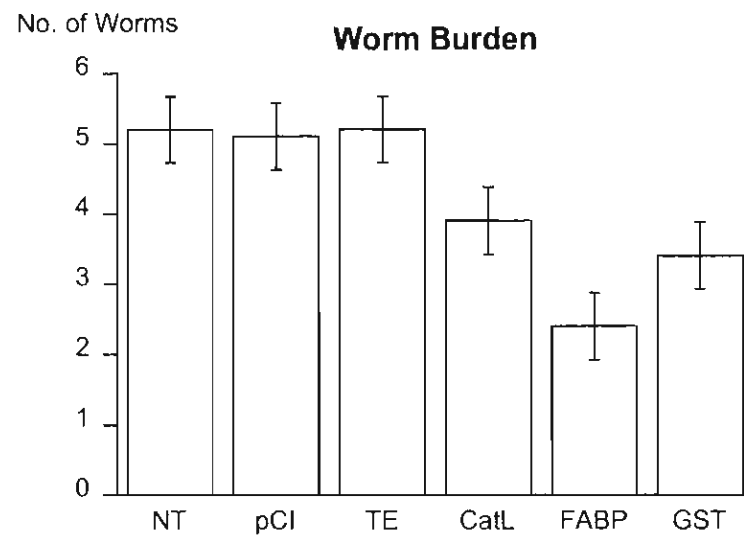
```

LOCUS       AY428949                1097 bp    mRNA    linear    INV 04-NOV-2003
DEFINITION   Fasciola gigantica cathepsin L (cat-L1H) mRNA, complete cds.
ACCESSION    AY428949
VERSION      AY428949.1   GI:38045863
KEYWORDS     .
SOURCE       Fasciola gigantica
  ORGANISM   Fasciola gigantica
              Eukaryota; Metazoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea;
              Echinostomida; Echinostomata; Fascioloides; Fasciolidae; Fasciola.
REFERENCE    1 (bases 1 to 1097)
  AUTHORS    Meemon,K., Grams,R., Vichasri-Grams,S., Hofmann,A., Korge,G.,
              Viyanant,V., Upatham,E.S. and Sobhon,P.
  TITLE      Molecular cloning of cathepsin L encoding genes from Fasciola
              gigantica
  JOURNAL     Unpublished
REFERENCE    2 (bases 1 to 1097)
  AUTHORS    Meemon,K., Grams,R., Vichasri-Grams,S., Hofmann,A., Korge,G.,
              Viyanant,V., Upatham,E.S. and Sobhon,P.
  TITLE      Direct Submission
  JOURNAL     Submitted (07-OCT-2003) Department of Anatomy, Faculty of Science,
              Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..1097
                     /organism="Fasciola gigantica"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:46835"
                     /dev_stage="newly excysted juvenile"
                     /country="Thailand"
     gene             1..1097
                     /gene="cat-L1H"
     CDS              32..1012
                     /gene="cat-L1H"
                     /codon_start=1
                     /product="cathepsin L"
                     /protein_id="AA08900.1"
                     /db_xref="GI:38045864"
                     /translation="MRLFILAILTFGVFASNDLWHEWKRMYNKEYNGVDDAHRNIIW
                     EENVKHIQHNIRHDLGLVTYTLGLNQFTDMTFEFKAKYLREIPRASDIHSHGIPYE
                     ANDRAVPESIDWREFGYVTEVKDQDQCGSCWAFSATGAMEGQYMKNQKANISFSEQQL
                     VDCSGDYGNRGCSGGFMEHAYEYLYEVGLETESSYPYKAERGPKCYDSRLGVAKVNGF
                     YDFHFGVESKLAHLVGDKGPAAVAVDVE SDFLMYRGGIYASRNCSSSEKLNHAMLVVGY
                     GTQDGTQDYWIVKNSWGSGLWGDHGYIKMARNRDNMCGIASFASLFPVVEFPF"
ORIGIN
1  attagacaga acaaccagta ataatcacac aatgcgattg ttcatatagg ccattctcac
61  tttcggagta ttgcgcctcga atgacgattt gtggcacgaa tggaaagcga tgtatacaaa
121 agaatacaat ggagttgacg atgcacacag acggaatatt tgggaagaga atgtgaaaca
181 tatccaagaa cacaacatac gtcacgatch cggactcgtc anatacacgt tgggattgaa
241 tcaattcact gatattgacat tcgaggaatt caaggccaaa tatctaagag aaataccacg
301 cgcgtccgat atacactcac acggcatccc gtatgaggca aacgatcgtg cgtaccoga
361 gagtattgat tggcgtgaat ttggttatgt gaccgaggtg aaagatcagg gagactgttg
421 atcctgttgg gcattctcag caaccggtgc aatggaggga caatatatga aaaacaaaaa
481 agctaacatt tctttttctg aacaacaatt ggtcgattgt agtggtgatt atggcaatcg
541 tggttgcagt ggtggattta tggagcatgc ctacgaatat ctgtatgaag tgggattaga
601 aaccgaatct tcttatccgt acaaggctga ggaaggctct tgcgaatacg atagccggtt
661 gggagttgoc aaagtgaatg gcttctattt cgaccatttt ggtgttgagt caaaatttagc
721 gcatttagtt ggtgacaaa gacctgtgtc ggtcgcgtgt gatgtggagt ctgacttttt
781 gatgtacagg ggtggcattt atgcaagccg aattgtttcg tcggagaaat tgaatcacgc
841 aatgtttggt gtgggttatg gaacacagga tggtagtgac tattggattg tgaataatag
901 ctggggatcg ttgtgggtgt accatggtta cattcggtat gctaggaaac gagataatat
961 gtgtggaatt gcttcttttt ccagtcctcc ggtgggtgga cctttcccgf gatattgtac
1021 cctcaatatg aaaacacacc gaataataaa tttcattcag ctltgccaaa aaaaaaaaaa
1081 aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

//





1.5. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การแสดงออกของยีน Glutathione S-transferases (GST) และการทดสอบศักยภาพวัคซีนของโปรตีนสังเคราะห์ GST

1.5.1. การสังเคราะห์ cDNA ของ Glutathione-S-transferase proteins ด้วยวิธี RT-PCR

คณะวิจัยของเราได้สังเคราะห์ cDNA ของ GST โดยเตรียม Primer สำหรับทำ RT-PCR ซึ่งออกแบบจาก mRNA sequence ของ Glutathione-S-transferase ของพยาธิ *Fasciola hepatica* โดยจัดเรียงและเปรียบเทียบลำดับเบสด้วย Clustal W จากการเปรียบเทียบและจัดเรียงลำดับเบสดังกล่าวทำให้สามารถเลือกลำดับเบสที่ใช้เป็น RT-PCR primer ได้ดังนี้

Forward primer 5' TCA AGC CGC TGC AGC GTC TC 3' = 20 BASES

Reverse primer 5' ATG CCA GCC AAA CTC GGA TA 3' = 20 BASES

นำ primer มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ RNA ที่สกัดจากพยาธิใบไม้ตัวเต็มวัยเป็นต้นแบบ จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของยีน Fg GST โดยวิธี agarose gel electrophoresis แล้ว ย้อมด้วย ethidium bromide เพื่อสังเกตแถบของ cDNA ที่เป็น PCR product ภายใต้อัลตราไวโอเลต พบว่า มีแถบของ cDNA จำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 650 bp (รูปที่ 1.5-1)

จากนั้นนำ PCR product ไปทำให้บริสุทธิ์และต่อเข้ากับ pGEM T-easy vector (Promega) และ transformed เข้าสู่แบคทีเรีย XL1-blue competent cells แล้วจึงคัดเลือก clones ของแบคทีเรียด้วยการเพาะเลี้ยงใน LB-ampicillin-Agar plates เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และสุ่มเลือก colonies ของแบคทีเรียที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ไปเพาะเลี้ยงใน LB-ampicillin medium เพื่อเพิ่มปริมาณก่อนที่จะนำไปสกัดเอา plasmid vector ที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรียออกมาทดสอบโดยการตัดด้วย restriction enzyme เพื่อตรวจสอบว่ามี PCR product ถูกต่อเข้าไปใน vector หรือไม่ แล้วจึงนำ plasmid vector ที่มียีน Fg GST ส่งไปตรวจหาลำดับเบสที่ Bioservice Unit, BIOTEC, NSTDA

ผลการตรวจหาลำดับเบสพบว่า inserted cDNA มีความยาว 657 bases โดยมีลำดับเบสและกรดอะมิโน ดังแสดงในรูปที่ 1.5-2 ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ mRNA sequence ของ GST 26 kDa ของ *F. hepatica*, *S. mansoni*, *S. mekongi* ด้วย program Clustal W1.81 และ BLAST จากฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงที่ระดับ 81.0%, 60.6% และ 50.3% ตามลำดับ และมีความคล้ายคลึงในลำดับ amino acid sequence ที่ระดับ 94.9%, 56.8% และ 55.9% ตามลำดับ (ตารางที่ 1.5-1 และ 1.5-2)

ตารางที่ 1.5-1 ค่าเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับ Nucleic Acid ของ GST จาก *Fasciola gigantica* เปรียบเทียบกับ species ต่างๆ

Sequence	Fg	Fh M	Fh1	Fh7	Fh42	Fh47	Fh50	Smek26	Sj26	Sman26	Sj28	Sman28	Sbovi28	Shae28	SmanO	Mus	Bos	Homo
Fg AF	1.000	0.810	0.549	0.743	0.540	0.598	0.360	0.503	0.533	0.606	0.299	0.321	0.319	0.316	0.242	0.383	0.319	0.230
Fh M7	---	1.000	0.612	0.835	0.668	0.697	0.312	0.521	0.520	0.501	0.349	0.381	0.385	0.381	0.288	0.418	0.352	0.250
Fh1 A	---	---	1.000	0.652	0.530	0.570	0.251	0.445	0.464	0.450	0.312	0.320	0.334	0.329	0.268	0.378	0.314	0.220
Fh7 A	---	---	---	1.000	0.624	0.731	0.255	0.493	0.488	0.489	0.343	0.353	0.355	0.349	0.292	0.401	0.325	0.236
Fh42	---	---	---	---	1.000	0.486	0.430	0.326	0.327	0.334	0.250	0.268	0.274	0.271	0.208	0.291	0.237	0.168
Fh47	---	---	---	---	---	1.000	0.159	0.410	0.413	0.408	0.315	0.318	0.325	0.317	0.253	0.348	0.290	0.211
Fh50	---	---	---	---	---	---	1.000	0.174	0.188	0.221	0.117	0.126	0.127	0.127	0.098	0.145	0.123	0.086
Smek26	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.850	0.674	0.341	0.324	0.324	0.332	0.289	0.380	0.330	0.227
Sj26	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.715	0.341	0.326	0.332	0.330	0.274	0.375	0.327	0.227
Sman26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.305	0.281	0.300	0.298	0.249	0.341	0.293	0.207
Sj28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.699	0.705	0.687	0.317	0.347	0.246	0.191
Sman28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.887	0.887	0.313	0.330	0.269	0.201
Sbovi28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.967	0.295	0.315	0.260	0.194
Shae28	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.297	0.312	0.260	0.195
SmanO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.321	0.221	0.175
Mus	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.477	0.359
Bos	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.524
Homo	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000

Fg (AF112567), Fh M7 (M77682.1), Fh1 (A00993), Fh7 (A00994), Fh42 (A00995), Fh47 (A00996), Fh50 (A00997), Smek 26Kd (Y07663), Sj 26Kd (M14654), Sman 26Kd (A27852), Sj 28Kd (U58012), Sman 28Kd (S71584), Sbovis 28Kd (M87800), Shae 28Kd (M87799), Sman Omega (AF484940), Mus musculus (BC008206), Bos taurus (AF249588), Homo sapiens (U02321)

ตารางที่ 1.5-2 ค่าเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับ Amino Acid ของ GST จาก *Fasciola gigantica* เปรียบเทียบกับ species ต่างๆ

Sequence	Fg AA	Fh AA	Fh1 C	Fh7 C	Fh42	Fh47	Fh50	Smek26	Sj26	Sman26	Sj28	Sman28	Sbovi28	Shae28	SmanO	Mus	Bos	Homo
Fg AA	1.000	0.949	0.630	0.811	0.623	0.403	0.353	0.559	0.577	0.568	0.197	0.197	0.184	0.192	0.166	0.460	0.488	0.475
Fh AA	—	1.000	0.630	0.907	0.651	0.417	0.371	0.564	0.577	0.564	0.206	0.197	0.184	0.192	0.173	0.442	0.475	0.461
Fh1 C	—	—	1.000	0.826	0.512	0.302	0.281	0.472	0.509	0.475	0.160	0.177	0.164	0.168	0.147	0.391	0.409	0.378
Fh7 C	—	—	—	1.000	0.571	0.406	0.346	0.532	0.536	0.529	0.186	0.136	0.177	0.181	0.150	0.376	0.403	0.381
Fh42	—	—	—	—	1.000	0.156	0.547	0.344	0.353	0.368	0.127	0.132	0.118	0.122	0.116	0.269	0.278	0.278
Fh47	—	—	—	—	—	1.000	0.065	0.288	0.298	0.271	0.137	0.132	0.127	0.132	0.093	0.214	0.243	0.233
Fh50	—	—	—	—	—	—	1.000	0.183	0.183	0.188	0.075	0.075	0.071	0.070	0.065	0.160	0.165	0.169
Smek26	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.894	0.798	0.214	0.188	0.184	0.188	0.158	0.384	0.457	0.426
Sj26	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.788	0.206	0.188	0.184	0.188	0.158	0.384	0.452	0.421
Sman26	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.193	0.193	0.189	0.184	0.154	0.384	0.408	0.381
Sj28	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.772	0.777	0.759	0.122	0.199	0.188	0.188
Sman28	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.919	0.896	0.134	0.207	0.210	0.201
Sbovi28	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.966	0.134	0.194	0.206	0.197
Shae28	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.130	0.203	0.206	0.197
SmanO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.117	0.136	0.121
Mus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.665	0.678
Bos	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.825
Homo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000

Fg (AA023957), Fh (AA29141), Fh1 (CAA00119.1), Fh7 (CAA00119.1), Fh42 (CAA00120.1), Fh47 (CAA00121.1), Fh50 (CAA00122), Smek 26 kD (CAA68944.1), Sj 26 kD (AAB 59203.1), Sman 26 kD (CAA01894.1), Sj 26 kD (AAB03573.1), Sman 26 kD (AAC00506.1), Sbovis 26 kD (AA029993.1), Shae 28 kD (AA029993.1), Sman Omega (AA049385.1), Mus musculus (AA049385.1), Bos taurus (AA754306.1), Homo sapiens (AAA20040.1)

1.5.2. การสังเคราะห์โปรตีน rGST และโพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อ GST

สัตว์ทดลอง

ใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand White เพศผู้ อายุ 1 ปี ในการผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดี ต่อ GST เพื่อนำไปทดสอบความจำเพาะต่อ โปรตีน rGST

ยีน GST

ยีน GST ถูกตัดต่อใส่ในพลาสมิด pET 21 b(+) เก็บอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1 BLUE พลาสมิดดังกล่าวถูกย้ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 DE ซึ่งถูกกระตุ้นให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG (1 มิลลิโมลาร์) โปรตีน GST ที่ได้ถูกแยกด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และย้อมด้วยสี Coomassie blue

การแยกพลาสมิด pET 21 b(+) จาก *E. coli* สายพันธุ์ XL1 BLUE

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1 BLUE ที่มีพลาสมิด pET 21 b(+) ในอาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย LB 5 มิลลิลิตร ที่ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 280 รอบต่อนาที บั่นให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอนและล้างด้วยสารละลายที่มีคุณสมบัติ isotonic จากนั้นทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแตกด้วยสารละลาย SDS/NaOH เพื่อให้พลาสมิดหลุดออกจากเซลล์ ทำการตกตะกอน DNA และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย potassium acetate บั่นด้วยความเร็วรอบ 12,000 g ที่ 37 °C แล้วแยกเก็บส่วนของ supernatant หลังจากนั้นเติมสารละลาย isopropanol บั่นด้วยความเร็วรอบ 12,000 xg ที่ 37 °C เพื่อให้ได้พลาสมิด pET 21 b(+)

การย้ายพลาสมิด pET 21 b(+) เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 DE

เตรียมเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 DE (competent cells) ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C มาปรับอุณหภูมิเป็น 0 °C แล้วนำ competent cells 100 ไมโครลิตร ใส่ใน Falcon tube ขนาด 15 มิลลิลิตรที่มี พลาสมิด pET 21 b(+) 0.1-0.5 นาโนกรัม ทำการผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 0°C นาน 20 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวมาผ่านความร้อน (Heat shock) ที่ 42°C นาน 45 วินาทีแล้วนำมาใส่ในภาชนะที่มีน้ำแข็งนาน 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย LB 0.9 มิลลิลิตร ที่ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีนาน 30 นาที แล้วนำเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 100-200 ไมโครลิตรไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด LB-Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12 ชั่วโมง

ตัดพลาสมิด pET 21 b(+) ด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Bam*HI (Double digestion)

ทำการแยกพลาสมิด pET 21 b(+) จาก *E. coli* สายพันธุ์ XL1 BLUE และสายพันธุ์ BL 21 DE แล้วจึงตัดพลาสมิด pET 21 b(+) ด้วยเอนไซม์ *Nde*I และ *Bam*HI (Double digestion) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของยีน Fg GST โดยวิธี agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide เพื่อสังเกตแถบของ cDNA ที่เป็น PCR product ภายใต้ UV light พบว่า มีแถบของ cDNA จำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 657 bp ดังแสดงในรูปที่ 1.5-3

การสังเคราะห์โปรตีน

นำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 DE ที่มีพลาสมิด pET 21 b(+) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย LB-Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ 37 °C นาน 2 ชั่วโมง ทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ LB-Ampicillin ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียต่อที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกระตุ้นให้เซลล์แบคทีเรียสร้างโปรตีนด้วย IPTG (1 มิลลิโมลาร์) เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียต่อที่ 37°C นาน 3-7 ชั่วโมง แล้วจึงหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 0°C นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาปั่นในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 8-10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน รวบรวมเซลล์ที่ได้ แล้วเติมสารละลาย PBS ในสัดส่วน 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonicator เติม 10% triton X-100 จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1% ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่น ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4°C เก็บส่วน supernatant แล้วเติม 50% slurry of Glutathione Sepharose 4B ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อ supernatant 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ตกตะกอนส่วนของ Glutathione Sepharose 4B-fusion protein จากการปั่น ที่ 2000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เทส่วน supernatantทิ้ง แล้วล้างส่วนของตะกอนจากการปั่นด้วยสารละลาย PBS

การแยกโปรตีน

เติม Glutathione Elution Buffer อัตราส่วนโดยปริมาตร 1:1 ลงในตะกอนที่ผ่านการล้างด้วยสารละลาย PBS ข้างต้น เขย่าให้เข้ากันนาน 10 นาที แล้วปั่นแยกเก็บโปรตีนที่มีอยู่ในส่วน supernatant โดยทำการแยกเก็บโปรตีนเช่นนี้ 3 ครั้ง ส่วนของโปรตีนที่ได้นำมาแยกด้วย SDS-PAGE และตรวจโดยการย้อมด้วยสี Coomassie blue ซึ่งจากผลการศึกษาพบ recombinant protein GST มีขนาดประมาณ 26 kDa ดังแสดงใน รูปที่ 1.5-4

การผลิตแอนติบอดีต่อ rGST

ฉีดกระตุ้นด้วย 250 ไมโครกรัม rGST ซึ่งผสมกับ Complete Freund Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ทางใต้ผิวหนัง แล้วฉีดซ้ำด้วย 250 ไมโครกรัม rGST ซึ่งผสมกับ Incomplete Freund Adjuvant ในสัปดาห์ที่ 3 และ 5 หลังจากการฉีดครั้งแรก หนึ่งสัปดาห์หลังจากฉีดครั้งสุดท้าย เก็บเลือดจากกระต่ายเพื่อรวบรวมเซรัมไว้ใช้ในการทดลอง

Immunoblotting

นำ rGST ที่ได้มาแยกด้วย 12.5 % SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนลงบน nitrocellulose membranes นำเซรัมที่ได้จากกระต่ายมาจับกับ rGST บน membranes ตรวจหา Ag-Ab complex บน membrane โดยใช้ peroxidase -conjugated goat anti- rabbit IgG ซึ่งจะให้สีเมื่อทำปฏิกิริยากับ 3,3' diaminobenzidine (DAB) และ H_2O_2 ซึ่งจากผลการศึกษาพบ rGST บน nitrocellulose membranes มีความจำเพาะต่อการถูกจับด้วยแอนติบอดี ซึ่งปรากฏแถบสีที่ประมาณ 26 kDa ดังแสดงใน รูปที่ 1.5-5

โปรตีน rGST ที่ได้จากการสังเคราะห์

สรุปได้ว่า เมื่อย้ายพลาสมิด pET 21 b(+) จาก *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1 BLUE เข้าสู่สายพันธุ์ที่สร้างโปรตีนคือ BL 21 DE แล้วได้ตรวจหาโปรตีน GST ในพลาสมิด pET 21 b(+) ดังกล่าว โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Nde* I และ *Bam*HI (Double digestion) ผลพบว่ามีโปรตีนของ GST 657 base pairs ปรากฏ (รูปที่ 1.5-3) เมื่อนำโปรตีนมาสังเคราะห์ rGST ตามวิธีข้างต้นพบว่า rGST ที่ได้จากการแยกด้วย SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie blue มีขนาดประมาณ 28 kDa โดยมีความบริสุทธิ์ประมาณ 95% (รูปที่ 1.5-4) การตรวจด้วยวิธี immunoblotting พบว่า rGST บน membranes มีความจำเพาะต่อการถูกจับด้วยแอนติบอดี ซึ่งปรากฏแถบที่ประมาณ 28 kDa (รูปที่ 1.5-5)

1.5.3. การวิเคราะห์หาตำแหน่งการกระจายของ Glutathione S-Transferase โดยใช้โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อ recombinant Glutathione S-Transferase จาก *Fasciola gigantica* ในพยาธิระยะตัวอ่อนกำลังพัฒนาอายุ 7 วัน 21 วัน 35 วัน 49 วัน และ พยาธิตัวเต็มวัย

Glutathione S-Transferase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญตัวหนึ่งที่พยาธิใช้ในการป้องกันตัว จากการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ (Free radical) ที่สร้างจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้นเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้พัฒนาเป็นวัคซีนตัวเลือก เราจึงได้เตรียมโพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อ recombinant Glutathione S-Transferase (rGST) จาก *Fasciola gigantica* ในหนูทดลอง (ICR mice) และให้นำมาวิเคราะห์หาตำแหน่งและลักษณะการกระจายของแอนติเจนดังกล่าวโดยวิธี immunoperoxidase (VECTASTAIN[®] Universal Quick kit; Vector) การศึกษาครั้งนี้จึงได้กระทำในพยาธิระยะต่างๆ วิธีทำโดยย่อคือ นำพยาธิอายุ 7 วัน , 21 วัน, 35 วัน 49 วัน และ พยาธิตัวเต็มวัย จากการติดเชื้อด้วย metacercariae ในหนูทดลอง (ICR mice) มาล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% หลายๆ ครั้ง แล้วตรึงเนื้อเยื่อพยาธิด้วย 10% formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 70% อัลกอฮอล์หลายๆ ครั้ง เตรียมชิ้นเนื้อพยาธิด้วย paraffin technique แล้วตัดตัวพยาธิที่ระดับต่างๆ ให้ sections มีความหนาประมาณ 5 ไมครอน ติด sections บนสไลด์ที่เคลือบด้วย xylene ล้างพาราฟินออกด้วย xylene แล้วให้น้ำซึมเข้าเนื้อเยื่อ (rehydrate) โดยแช่ใน 100%, 95%, 80%, 70% อัลกอฮอล์ แล้วนำไปอบในไมโครเวฟโดยแช่ใน 10mM citrate buffer pH 6.0 เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้งแล้วทิ้งไว้ให้เย็น ล้างด้วยน้ำประปาหลังจากนั้นป้องกัน endogeneous peroxidase โดยแช่ใน 3% H₂O₂ ใน tap water และ blocking serum (normal horse serum) หลังจากนั้นแช่ใน primary antibodies คือ โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อ (PoAb) recombinant Glutathione S-Transferase (rGST) ในกลุ่ม negative control เราใช้ซีรัมจากหนูปกติ (normal mice serum) แทนโพลีโคลนัลแอนติบอดี เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างแอนติบอดีด้วย 0.01M PBS buffer pH 7.5, 0.1% Tween 20 ติดฉลากด้วย Biotinylated secondary antibody และ streptavidin/ peroxidase complex ล้างแอนติบอดีออกแล้วใส่ substrate คือ 3-amino-

9-ethyl carbazole (AEC substrate kit; Zymed) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืด ผลจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเห็นเป็นสีแดงซึ่งแสดงการกระจายของ GST ในเซลล์ชนิดต่างๆ หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบถ่ายภาพแบบดิจิทัล

พยาธิตัวอ่อนอายุ 7 วัน

จากการศึกษาพบว่า ในกลุ่ม Negative control ไม่ปรากฏการติดสีแดงจาก AEC ด้วยวิธี immunoperoxidase ในเนื้อเยื่อพยาธิตัวอ่อนเลย ส่วนในกลุ่มที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST ผลปรากฏว่าส่วนที่ติดสีเข้มได้แก่ เซลล์ parenchyma โดยจะพบติดสีเข้มทั่วไปที่บริเวณลำตัวซึ่งมีเนื้อเยื่อ parenchyma อยู่อย่างหนาแน่น นอกจากนั้นยังพบว่า มีการติดสีจางที่บริเวณชั้นนอกของ tegumental syncytium ส่วนเนื้อเยื่อของทางเดินอาหาร (caecum) ไม่พบการติดสีเลย (รูปที่ 1.5-6)

พยาธิตัวอ่อนอายุ 21 วัน

ในกลุ่มที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST พบว่าส่วนที่ติดเข้มคือ เนื้อเยื่อ parenchyma นอกจากนี้ยังพบการติดสีปานกลางที่ tegumental syncytium แต่จะไม่พบการติดสีในไซโตพลาสซึมของ tegumental cells ที่เรียงตัวกันได้ชั้นกล้ำเนื้อ ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่พบการติดสีเลยคือ เซลล์ของ caecum (รูปที่ 1.5-7)

พยาธิตัวอ่อนอายุ 35 วัน

กลุ่มที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST ผลปรากฏว่ามีการติดสีแดงเข้มที่เนื้อเยื่อ parenchyma และติดสีจางที่ชั้น tegumental syncytium และไม่พบการติดสีในไซโตพลาสซึมของ tegumental cells ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่พบการติดสีเลยคือ เซลล์ของ caecum (รูปที่ 1.5-8)

พยาธิตัวอ่อนอายุ 49 วัน

กลุ่มที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST ผลปรากฏว่ามีการติดสีแดงเข้มที่เนื้อเยื่อ parenchyma และติดสีจางที่ชั้น tegumental syncytium และไม่พบการติดสีในไซโตพลาสซึมของ tegumental cells ซึ่งการติดสีมีลักษณะเช่นเดียวกันกับที่พบในพยาธิตัวอ่อนอายุ 7 วันและ 35 วัน ดังที่กล่าวเบื้องต้น (รูปที่ 1.5-9)

พยาธิตัวเต็มวัย

กลุ่มที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST ผลปรากฏว่ามีการติดสีแดงเข้มที่เนื้อเยื่อ parenchyma โดยเซลล์ parenchyma มีการติดสีแตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ เข้ม ปานกลางและจาง ซึ่งอาจเป็นจุดบ่งชี้ว่าเซลล์ parenchyma มีสามชนิด และมีการติดสีจางบริเวณเนื้อเยื่อของ ovary และ testis ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่พบการติดสีเลยคือ เซลล์ของ caecum, tegumental syncytium และไซโตพลาสซึมของ tegumental cells (รูปที่ 1.5-10 และ 1.5-11)

สรุปได้ว่า GST มีการแสดงออกและมีความเข้มสูงที่สุดในเนื้อเยื่อ parenchyma ของทุกระยะ ส่วนบริเวณ tegumental syncytium มีการติดสีระดับปานกลางที่พยาธิตัวอ่อนอายุ 21 วัน และติดสีจางที่พยาธิตัวอ่อนอายุ 7 วัน 35 วันและ 49 วัน แต่ไม่มีการติดสีที่ชั้นนี้ในพยาธิตัวเต็มวัย สำหรับเนื้อเยื่อใน

ระบบสืบพันธุ์ มีการติดสีระดับจางที่ testis และ ovary เฉพาะในพยาธิตัวเต็มวัยเท่านั้น ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่พบการติดสีในทุกระยะ คือ เซลล์ของ caecum

สำหรับเนื้อเยื่อของพยาธิตัวเต็มวัยมีการติดสีที่เซลล์ parenchyma แตกต่างกัน 3 ระดับ ซึ่งอาจเป็นจุดบ่งชี้ว่าเซลล์ parenchyma ในพยาธิตัวเต็มวัยมีสามชนิด แต่ในพยาธิตัวอ่อนนั้นพบว่าความเข้มในการติดสีของเซลล์ parenchyma มีระดับเดียวกันซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ parenchyma ในระยะพยาธิตัวอ่อน ยังไม่แยกหน้าที่ (differentiate) อย่างได้ชัด ดังเช่นที่พบในพยาธิตัวเต็มวัย ซึ่งสมมติฐานนี้จะทำการพิสูจน์โดยดูลักษณะของเซลล์ parenchyma ของพยาธิแต่ละระยะ และการกระจายของแอนติเจน GST ในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนต่อไป

1.5.4. การทดสอบศักยภาพวัคซีน recombinant Glutathione-S-transferase (rGST) ต่อการติดเชื้อพยาธิ *Fasciola gigantica* และ *Schistosoma mansoni* ในหนู mice

ยีน Glutathione S-Transferase (GST) จากพยาธิ *F. gigantica* ได้ถูกนำมาใช้สังเคราะห์โปรตีน (recombinant protein) ในเซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL 21 DE เมื่อแยก recombinant Glutathione S-Transferase (rGST) ที่ได้ด้วย SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie มีความบริสุทธิ์ 95% นำ rGST มาทดสอบศักยภาพวัคซีนด้วยการ immunization หนู mice โดยฉีดร่วมกับ Freund's adjuvant ทางผิวหนัง (Intradermal route) และทางกล้ามเนื้อ (Intramuscular route) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มการทดลองที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพโปรตีนวัคซีน rGST ต่อการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ส่วนกลุ่มการทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนต่อการติดเชื้อพยาธิ *S. mansoni* จากผลการทดลอง พบว่า rGST มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ทั้งสองชนิด โดยหนูทดลองที่ได้รับการฉีดวัคซีนทางผิวหนังจะมีจำนวน worm burden ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญต่อการติดเชื้อทั้งสองชนิด ในขณะที่การฉีดวัคซีนทางกล้ามเนื้อ ให้ผลปกป้องต่อการติดเชื้อเฉพาะ *F. gigantica* เท่านั้น

การเก็บพยาธิระยะติดต่อของ *F. gigantica* (metacercariae)

เก็บไข่พยาธิ *F. gigantica* จากตับและถุงน้ำดีของวัวติดเชื้อซึ่งถูกฆ่าที่โรงฆ่าสัตว์ จ.ปทุมธานี นำไข่พยาธิมาส่องด้วยไมโครไฟขนาด 40 วัตต์ เป็นเวลานานประมาณ 7-14 วัน ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercariae จะไข่ออกมาจากไข่ แล้วนำ cercariae ที่ได้ไปติดเชื้อในหอย *Lymnea ollula* หลังจากนั้น 8 สัปดาห์หอยจะให้พยาธิระยะติดต่อ metacercariae ซึ่งนำไปใช้ทดสอบในสัตว์ทดลองต่อไป ซึ่งการทดลองนี้ใช้พยาธิระยะ metacercariae จำนวน 30 อันต่อหนู 1 ตัว

การเก็บพยาธิระยะติดต่อของ *S. mansoni* (cercariae)

ได้เก็บส่วนวงจรชีวิตของพยาธิระยะที่เป็นสปอโรซิสต์ ไว้ในหอย *Biomphalaria glabrata* เมื่อต้องการพยาธิระยะ cercariae นำหอยดังกล่าวมาส่องด้วยไมโครไฟขนาด 40 วัตต์ เป็นเวลานานประมาณ 4 ชั่วโมง แล้วเก็บนับจำนวนพยาธิสำหรับการติดเชื้อ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ cercaria 200 ตัวต่อหนู 1 ตัว

การฉีดกระตุ้น (immunization) ด้วย rGST และการติดเชื้อพยาธิ

นำหนู mice สายพันธุ์ ICR อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 120 ตัว ที่ได้รับจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ แบ่งหนูทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพโปรตีนวัคซีน rGST ต่อการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ส่วนกลุ่มการทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนต่อการติดเชื้อพยาธิ *S. mansoni* แต่ละกลุ่มการทดลองจะแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มย่อย โดยมีหนูกลุ่มละ 12 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (Control infected group) ที่ไม่มีการฉีดสารใดๆ แต่มีการติดเชื้อพยาธิ กลุ่มที่ 2 และ 3 เป็นกลุ่มควบคุมที่ฉีดเฉพาะ Freund's adjuvant (Sham control group) ทาง Intramuscular route (IM) และ Intradermal route (ID) ตามลำดับและติดเชื้อด้วยพยาธิ กลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นกลุ่มทดลองที่ฉีด Antigen (rGST) ร่วมกับ Freund's adjuvant ทาง Intramuscular route (IM) และ Intradermal route (ID) ตามลำดับ โดยฉีด antigen ดังกล่าว 3 ครั้ง ครั้งแรกหนูหนึ่งตัวได้รับ antigen 50 µg ร่วมกับ Complete Freund's adjuvant ครั้งที่สองและสาม ฉีดแอนติเจนในปริมาณเท่ากันร่วมกับ Incomplete Freund's adjuvant โดยห่างกันสองสัปดาห์ แล้วหนึ่งสัปดาห์หลังจากนั้นจึงให้หนูทดลองติดเชื้อพยาธิ โดยกลุ่มการทดลองที่ 1 หนูทดลองได้รับพยาธิระยะติดต่อ metacercariae ของ *F. gigantica* เป็นจำนวน 30 metacercariae ต่อหนู 1 ตัว หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ จึงนำหนูมาสลบด้วย diethyl ether เพื่อเปิดช่องท้องนำตับหนูมาหาจำนวนพยาธิหลังการติดเชื้อ (Worm burden) สำหรับกลุ่มการทดลองที่ 2 หนูทดลองได้รับพยาธิระยะติดต่อ cercariae ของ *S. mansoni* เป็นจำนวน 200 cercaria ต่อหนู 1 ตัว หลังการติดเชื้อ 8 สัปดาห์ หนูทุกกลุ่มทดลอง ถูกสลบด้วย diethyl ether แล้วใช้แรงดันน้ำเกลือไล่พยาธิตัวเต็มวัยออกจากระบบไหลเวียนโลหิต จำนวนพยาธิที่ได้ ทั้งจากการ perfusion และที่ได้จากการผ่าตัดเส้นเลือด mesenteric artery นำมานับรวมกัน เป็นจำนวนพยาธิที่เก็บได้หลังการติดเชื้อ (worm burden) ซึ่งนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การป้องกันการติดเชื้อ

ผลการทดลอง: จำนวนพยาธิหลังการติดเชื้อ (Worm burden)

การทดลองที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน rGST ต่อการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica*

จำนวนพยาธิในหนูทุกกลุ่มหลังการติดเชื้อที่ 4 สัปดาห์ แสดงไว้ในตารางที่ 1.5-3 พบว่ากลุ่มทดลองที่ 4 ซึ่งเป็นหนูทดลองที่ได้รับการฉีดวัคซีนทางกล้ามเนื้อ (GST-IM) และกลุ่มทดลองที่ 5 ซึ่งเป็นหนูทดลองได้รับการฉีดวัคซีนทางผิวหนัง (GST-ID) มีการติดเชื้อพยาธิจำนวนลดลง 78.80% และ 84.16% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$, t test) ตามลำดับ (ตารางที่ 1.5-3)

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน rGST ต่อการติดเชื้อพยาธิ *S. mansoni*

จำนวนพยาธิของหนูทุกกลุ่มหลังการติดเชื้อที่ 8 สัปดาห์ (worm burden) แสดงไว้ในตารางที่ 1.5-4 พบว่ากลุ่มทดลองที่ 5 ซึ่งเป็นหนูทดลองได้รับการฉีดวัคซีนทางผิวหนัง (GST-ID) มีการติดเชื้อพยาธิจำนวนลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (58.08%: $P < 0.05$, t test) ขณะที่กลุ่มทดลองที่

4 เป็น หนูทดลองได้รับการฉีดวัคซีนทางกล้ามเนื้อ (GST-IM) มีจำนวนการติดพยาธิลดลงแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (21.64%: $P < 0.05$, t test) (ตารางที่ 1.5-4)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า rGST มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ทั้งสองชนิด โดยหนูทดลองที่ได้รับการฉีดวัคซีนทางผิวหนัง (GST-ID) จะมีจำนวน worm burden ลดลงอย่างมีนัยสำคัญต่อการติดพยาธิทั้งสองชนิด ในขณะที่การฉีดวัคซีนทางกล้ามเนื้อ (GST-IM) ให้ผลการป้องกันต่อการติดพยาธิเฉพาะ *F. gigantica* เท่านั้น ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการให้วัคซีนด้วยการฉีดวัคซีนทางผิวหนัง (GST-ID) ก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันที่สามารถทำลายพยาธิทั้งสองชนิด ต่างจากการฉีดวัคซีนทางกล้ามเนื้อ (GST-IM) ทำลายพยาธิเพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจจะเป็นเพราะการฉีดแอนติเจนที่ผิวหนังมีการกระตุ้น antigen presenting cells โดยเฉพาะ Langerhan cell ที่มีอยู่ผิวหนังจำนวนมาก ได้ดีกว่าการฉีดแอนติเจนเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งมี antigen presenting cells อยู่จำนวนน้อย

ตารางที่ 1.5-3 จำนวนพยาธิที่พบในหนูแต่ละตัวและค่าเฉลี่ยจำนวนพยาธิของหนูแต่ละกลุ่ม ภายหลังจากการติดเชื้อ *F. gigantica* ที่ 4 สัปดาห์ หลังการ immunization ด้วย rGST แอนติเจน

Group	Numbers of mice	Numbers of flukes	Mean	% Reduction ^d
1. Control	11	16,4,4,9,9,2,19,11,12,11,1	8.72	-
2. Sham control (IM)	8	10,14,7,16,9,13,2,0	8.87	-
3. Sham control (ID)	9	9,13,7,16,11,11,18,11,12	12	-
4. rGST (IM)	9	3,1,1,2,1,0,4,3,2	1.88 [*]	78.44 ^a , 78.80 ^b
5. rGST (ID)	10	4,1,5,2,5,2,0,0,0,0	1.90 [*]	78.21 ^a , 84.16 ^c

^a เปอร์เซ็นต์การลดลงของพยาธิเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (group 1)

^b เปอร์เซ็นต์การลดลงของพยาธิเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (group 2)

^c เปอร์เซ็นต์การลดลงของพยาธิเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (group 3)

^d เปอร์เซ็นต์การลดลงของพยาธิคำนวณได้จาก $[(A - B)/A] \times 100$

เมื่อ A = ค่าเฉลี่ยของจำนวนพยาธิจากหนูในกลุ่มควบคุม

B = ค่าเฉลี่ยของจำนวนพยาธิจากหนูในกลุ่มที่ได้รับวัคซีน

^{*} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$, t test)

IM = การฉีดแอนติเจนเข้ากล้ามเนื้อ

ID = การฉีดแอนติเจนเข้าชั้นผิวหนัง

ตารางที่ 1.5-4 จำนวนพยาธิที่พบในหนูแต่ละตัวและค่าเฉลี่ยจำนวนพยาธิของหนูแต่ละกลุ่ม ภายหลังจากการติดเชื้อ *S. mansoni* ที่ 8 สัปดาห์หลังการ immunized ด้วย rGST แอนติเจน

Group	Numbers of mice	Numbers of flukes	Mean	% Reduction ^d
1. Control	9	155, 77, 60, 88, 67, 26, 64, 43, 49	58.77	-
2. Sham control (IM)	8	85, 62, 38, 84, 47, 39, 57, 50	57.75	-
3. Sham control (ID)	7	65, 58, 86, 74, 68, 30, 70	64.42	-
4. rGST (IM)	8	55, 53, 61, 69, 26, 26, 35, 37	45.25	22.93 ^a , 21.64 ^b
5. rGST (ID)	8	37, 41, 13, 29, 33, 17, 24, 22	27.00 [*]	54.01 ^a , 58.08 ^c

^a เปอร์เซ็นต์การลดลงของพยาธิเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (group 1)

^b เปอร์เซ็นต์การลดลงของพยาธิเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (group 2)

^c เปอร์เซ็นต์การลดลงของพยาธิเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (group 3)

^d เปอร์เซ็นต์การลดลงของพยาธิคำนวณได้จาก $[(A - B)/A] \times 100$

เมื่อ A = ค่าเฉลี่ยของจำนวนพยาธิจากหนูในกลุ่มควบคุม

B = ค่าเฉลี่ยของจำนวนพยาธิจากหนูในกลุ่มที่ได้รับวัคซีน

^{*} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$, *t* test)

IM = การฉีดแอนติเจนเข้ากล้ามเนื้อ

ID = การฉีดแอนติเจนเข้าชั้นผิวหนัง

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.5

- รูปที่ 1.5-1 แสดง GST cDNA ที่ 657 basepairs
- รูปที่ 1.5-2 แสดงลำดับเบสและกรดอะมิโนของ GST ยีนและโปรตีน
- รูปที่ 1.5-3 ผลจากการตัดพลาสมิด pET 21 b(+) ที่แยกจาก XL1 BLUE และ BL 21 DE ด้วย เอนไซม์ *Nde* I และ *Bam*HI ปรากฏยีนของ GST ที่ 657 base pairs
- รูปที่ 1.5-4 rGST ที่ได้จากการแยกด้วย SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie ปรากฏแถบ rGST มีขนาดประมาณ 26 kDa
- รูปที่ 1.5-5 rGST บน nitrocellulose membranes มีความจำเพาะต่อการถูกจับด้วยแอนติบอดี ซึ่ง ปรากฏแถบสีที่ประมาณ 26 kDa
- รูปที่ 1.5-6 ภาพ Paraffin sections ของพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาอายุ 7 วัน ที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST ของ *F. gigantea* ด้วยวิธี Immunoperoxidase
- A) กลุ่ม Negative control
- B) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงตำแหน่งการสะสมแอนติเจน (rGST) ในพยาธิตัวอ่อนอายุ 7 วัน
- C-F) ภาพกำลังขยายสูงแสดงการติดสีเข้มที่เซลล์ parenchyma (Pc) โดยจะพบติดสีเข้มทั่วไปที่บริเวณลำตัวซึ่งมีเนื้อเยื่อ parenchyma อยู่อย่างหนาแน่น นอกจากนั้นยังพบว่า มีการติดสีจางที่บริเวณชั้นนอกของ tegumental syncytium (Te) ส่วนเนื้อเยื่อของอวัยวะ caecum ไม่พบการติดสีเลย (Ca)
- รูปที่ 1.5-7 ภาพ Paraffin sections ของพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาอายุ 21 วัน ที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST ของ *F. gigantea* ด้วยวิธี Immunoperoxidase
- A) กลุ่ม Negative control
- B) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงตำแหน่งการสะสมแอนติเจน (rGST) ในพยาธิตัวอ่อนอายุ 21 วัน

C-F) ภาพแสดงการติดสีแดงเข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) ในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์ และแสดงการติดสีปานกลางที่ส่วนบนของ tegumental syncytium (Te) ส่วนเนื้อเยื่อของอวัยวะ caecum ไม่พบการติดสี (Ca-ภาพ E-F)

รูปที่ 1.5-8

ภาพ Paraffin sections ของพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาอายุ 35 วัน ที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST ของ *F. gigantea* ด้วยวิธี Immunoperoxidase

A) กลุ่ม Negative control

B) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงตำแหน่งการสะสมแอนติเจน (rGST) ในพยาธิตัวอ่อนอายุ 35 วัน

C-F) ภาพแสดงการติดสีแดงเข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) ในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์ โดยจะพบติดสีเข้มทั่วไปที่บริเวณลำตัวซึ่งมีเนื้อเยื่อ parenchyma อยู่อย่างหนาแน่น นอกจากนั้นยังพบว่า มีการติดสีจางที่บริเวณชั้นนอกของ tegumental syncytium (Te) ส่วนเนื้อเยื่อของอวัยวะ caecum (Ca) ไม่พบการติดสี

รูปที่ 1.5-9

ภาพ Paraffin sections ของพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาอายุ 49 วัน ที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST ของ *F. gigantea* ด้วยวิธี Immunoperoxidase

A) กลุ่ม Negative control

B-C) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงตำแหน่งการสะสมแอนติเจน (rGST) ในพยาธิตัวอ่อนอายุ 49 วัน

D) ภาพแสดงการติดสีแดงเข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) ส่วนเนื้อเยื่อของอวัยวะ caecum (Ca) ไม่พบการติดสี

E-F) ภาพแสดงการติดสีแดงเข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) ซึ่งระดับความเข้มของการติดสีบริเวณส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์ parenchyma มีระดับที่เท่ากัน (ภาพ E) และพบว่าที่บริเวณ tegumental syncytium (Te) มีการติดสีในระดับจาง (ภาพ F)

รูปที่ 1.5-10

ภาพ Paraffin sections ของพยาธิตัวเต็มวัย (Adult) ที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST ของ *F. gigantea* ด้วยวิธี Immunoperoxidase

A) กลุ่ม Negative control

B-D) ภาพกำลังขยายต่ำและกลางแสดงตำแหน่งการสะสมแอนติเจน (rGST) ในพยาธิตัวเต็มวัย ภาพแสดงการติดสีแดงเข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) ในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์ โดยจะไม่พบการติดสีในไซโตพลาสซึมของ tegumental cells (Tc) ที่เรียง

ตัวกันใต้ชั้นกล้ามเนื้อ รวมทั้ง tegumental syncytium (Te) caecum (Ca) และ vitelline gland (Vi)

E-F) ภาพแสดงการติดสีแดงเข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) ซึ่งระดับความเข้มของการติดสีบริเวณส่วนไฮโดพลาสซึมของเซลล์ parenchyma มีระดับที่แตกต่างกัน (ภาพ E) แบ่งได้เป็น 3 ระดับ ได้แก่ เซลล์ parenchyma ที่ติดสีแดงระดับเข้ม (Pc-Hi) ติดสีแดงระดับปานกลาง (Pc-Me) และติดสีแดงระดับจาง (Pc-Lo) โดยจะไม่พบการติดสีในไฮโดพลาสซึมของ tegumental cells (Tc) muscle (Mu) และ vitelline gland (Vi) (ภาพ F)

รูปที่ 1.5-11 Paraffin sections ของพยาธิตัวเต็มวัย (Adult) ที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ rGST ของ *F. gigantea* ด้วยวิธี Immunoperoxidase

A) ภาพแสดงการติดสีแดงเข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) ส่วนบริเวณ tegumental syncytium (Te) muscle (Mu) และ spine (Sp) ไม่พบการติดสี

B-D) ภาพแสดงการติดสีแดงเข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อที่ไม่พบการติดสี ได้แก่ caecum (Ca-ภาพ B) vitelline gland (Vi-ภาพ C) และ neuron (Neu-ภาพ D)

E-F) ภาพแสดงการติดสีแดงระดับจางในเนื้อเยื่อ ovary (Ov-ภาพ E) และ sperm (S-ภาพ F)

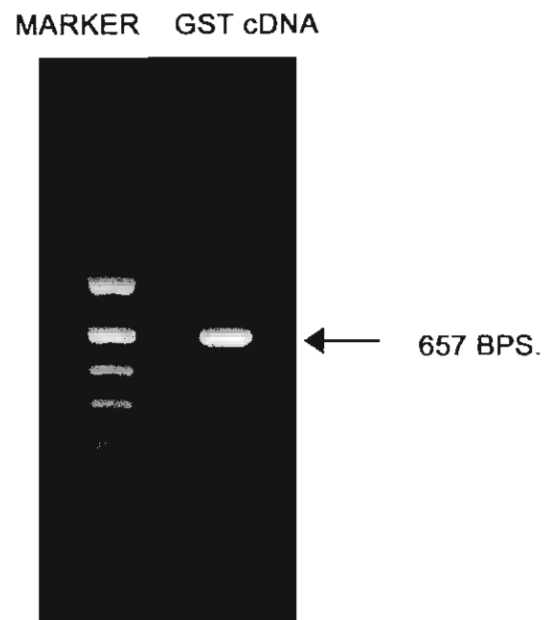
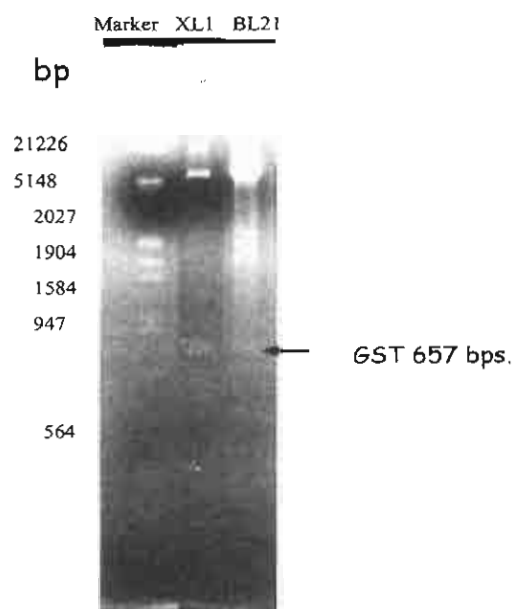
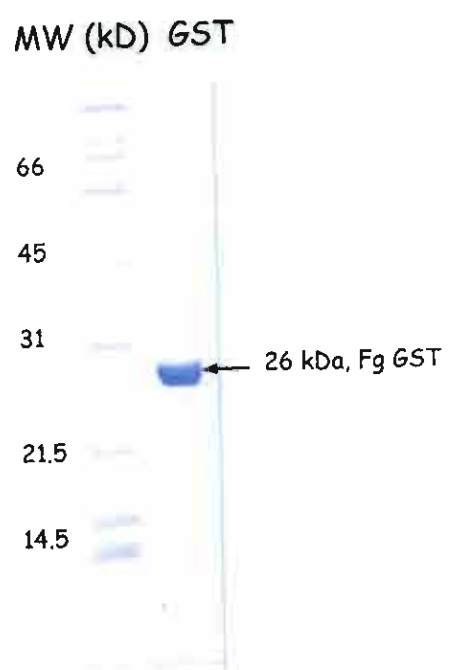


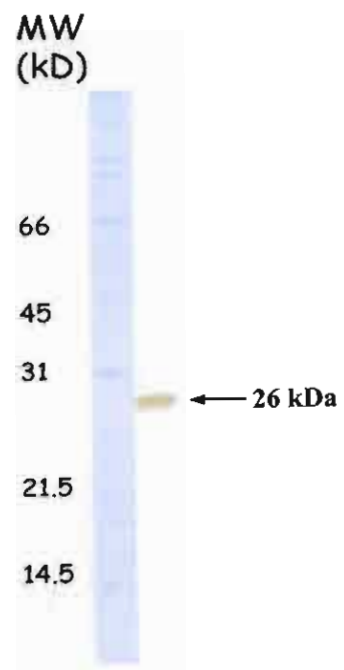
Fig AF112567

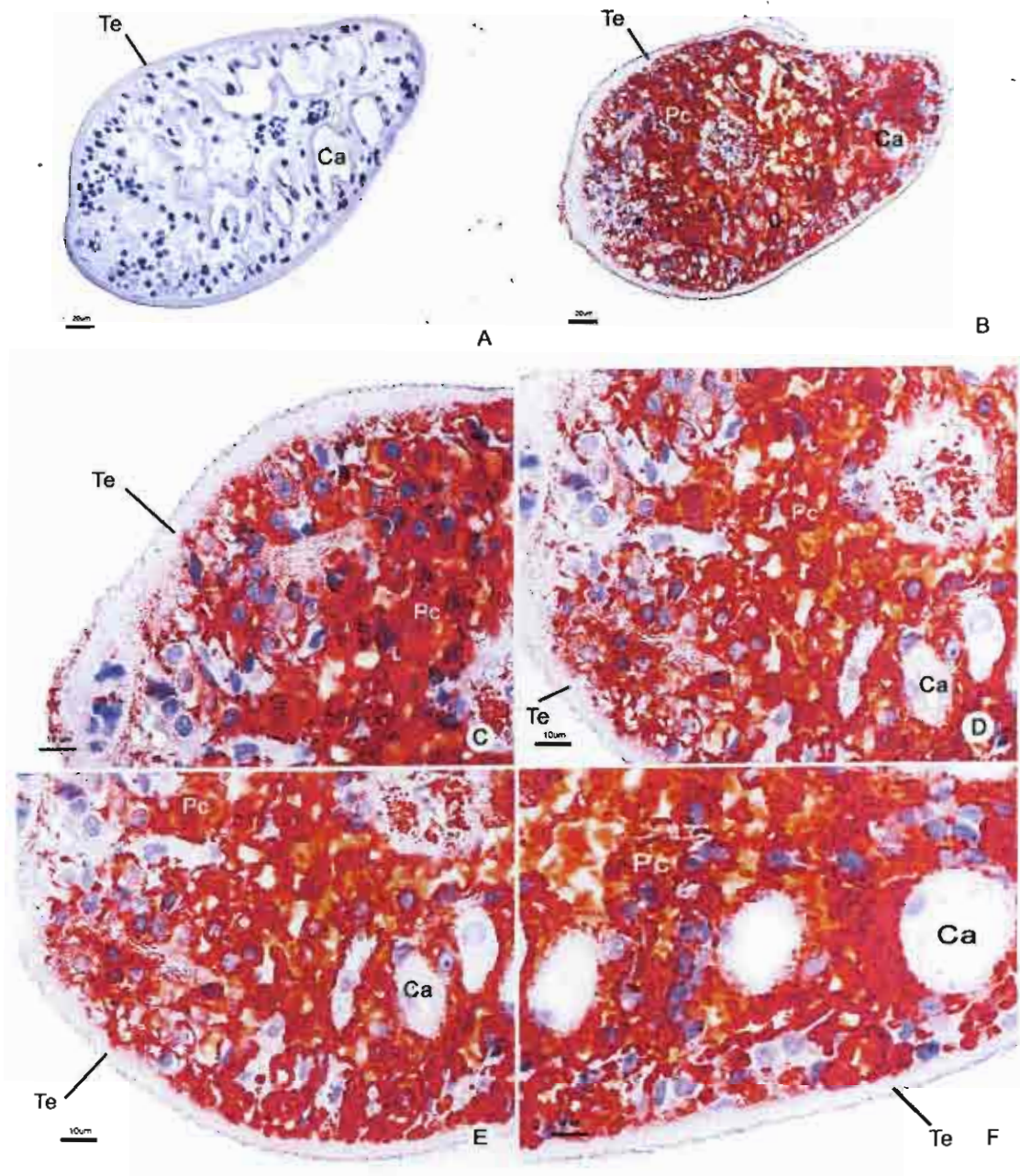
1	atg cca gcc aaa ctc gga tac tgg aaa ata aga ggg ctc caa caa	45
1	M P A K L G Y W K I R G L Q Q	15
46	ccc gtt cga ctc ttg ctc gaa tac ctg gat gaa gag tat gaa gaa	90
16	P V R L L L E Y L D E E Y E E	30
91	cat ctg tac ggt cgt gat gat agg gag aaa tgg ttg ggc gat aaa	135
31	H L Y G R D D R E K W L G D K	45
136	ttc aac atg gga ttg gat ttg cca aat tta cca tac tac att gac	180
46	F N M G L D L P N L P Y Y I D	60
181	gat aag tgc aaa ctg act cag tcg gtg gcc ata atg cgg tac att	225
61	D K C K L T Q S V A I M R Y I	75
226	gog gat aag cat gga atg ctt ggt tcc aca ccc gag gaa cga gct	270
76	A D K H G M L G S T P E E R A	90
271	oga gtt tcg atg atc gaa gga gct gca atg gat ctt cgg atg ggt	315
91	R V S M I E G A A M D L R M G	105
316	ttt gtt cgt gtt tgt tac aat cca aat ttt gaa gaa gtg aaa gga	360
106	F V R V C Y N P N F E E V K G	120
361	gat tat ctg aaa gaa ctg ccc aaa aca ttg aag atg tgg tcc gat	405
121	D Y L K E L P K T L K M W S D	135
406	ttt ctc gga gat cgt cag tat ttg aca ggt tcc tca gtt agc cat	450
136	F L G D R Q Y L T G S S V S H	150
451	gtg gac ttt atg gtt tac gaa gca ttg gac tgt att cgt tat ttg	495
151	V D F M V Y E A L D C I R Y L	165
496	gca cca cag tgt ctg aac gac ttc ccc aaa ttg aag gaa ttc aag	540
166	A P Q C L N D F P K L K E F K	180
541	agt cgt att gaa gat ctt cca aaa atc aag gca tac atg gaa tca	585
181	S R I E D L P K I K A Y M E S	195
586	gag aag ttc atc aag tgg cct ttg aac tcg tgg act gct tct ttc	630
196	E K F I K W P L N S W T A S F	210
631	ggt ggt gga gac gct gca ccg gct tga	657
211	G G G D A A P A *	

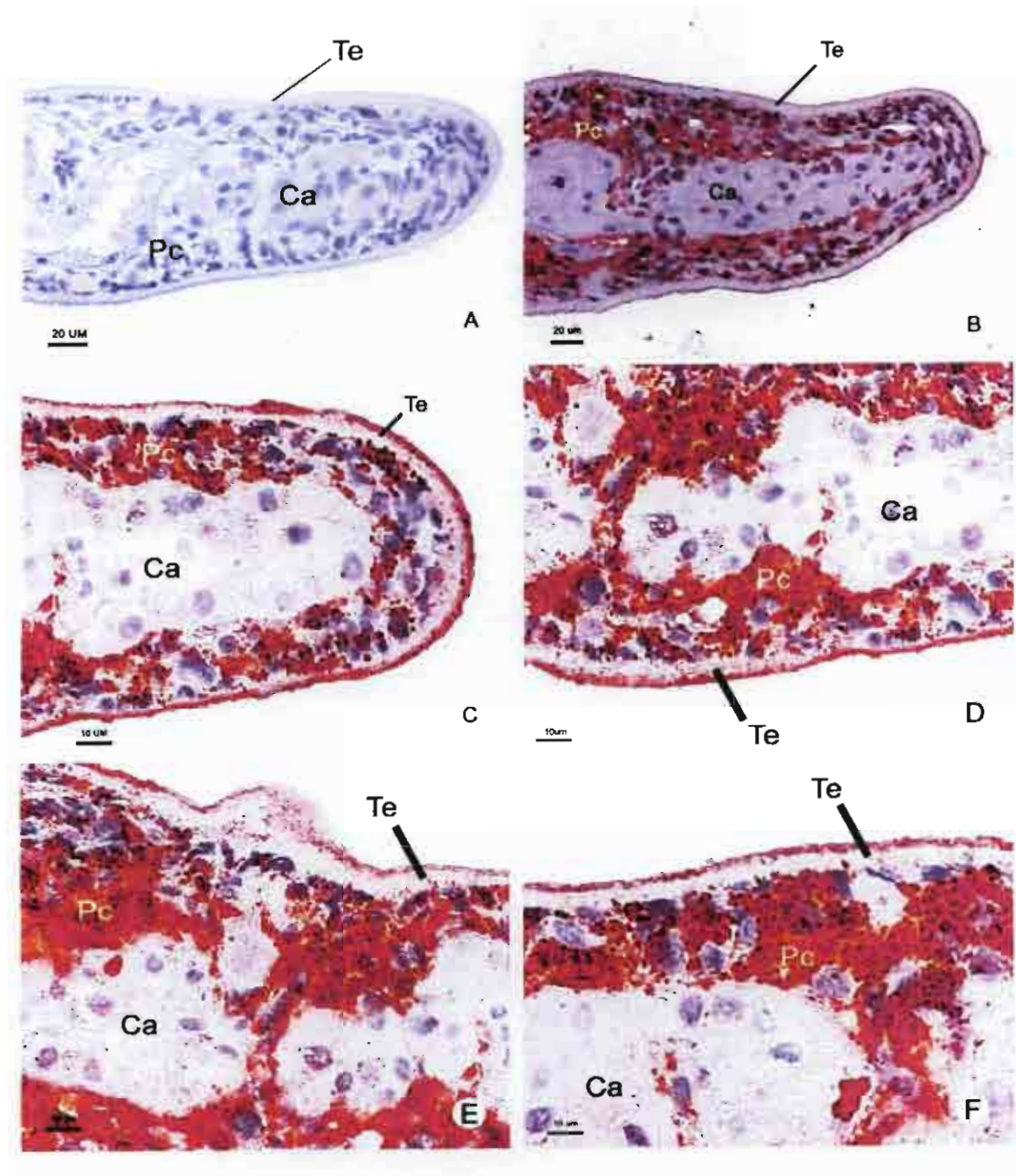


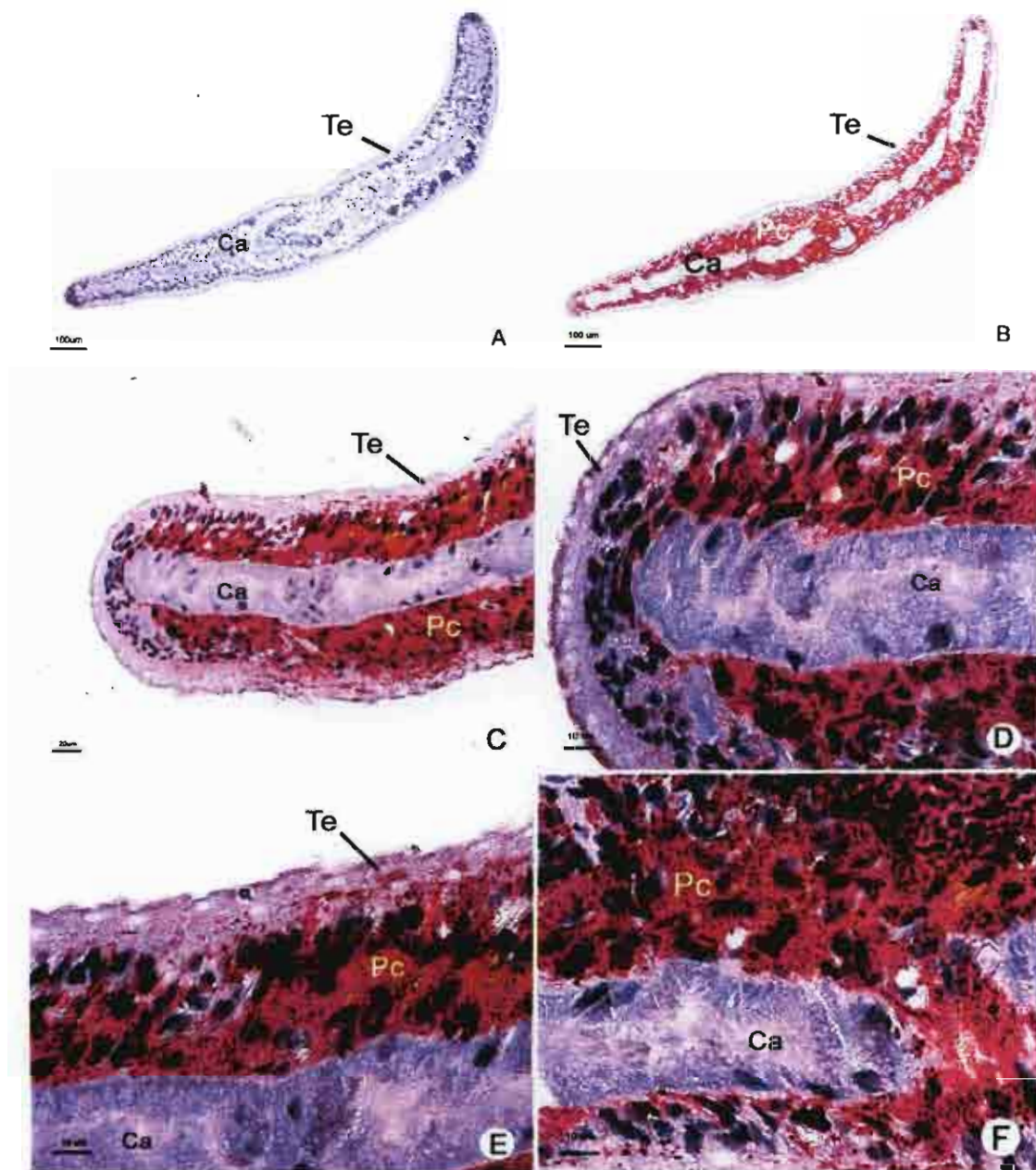
รูปที่ 1.5-4

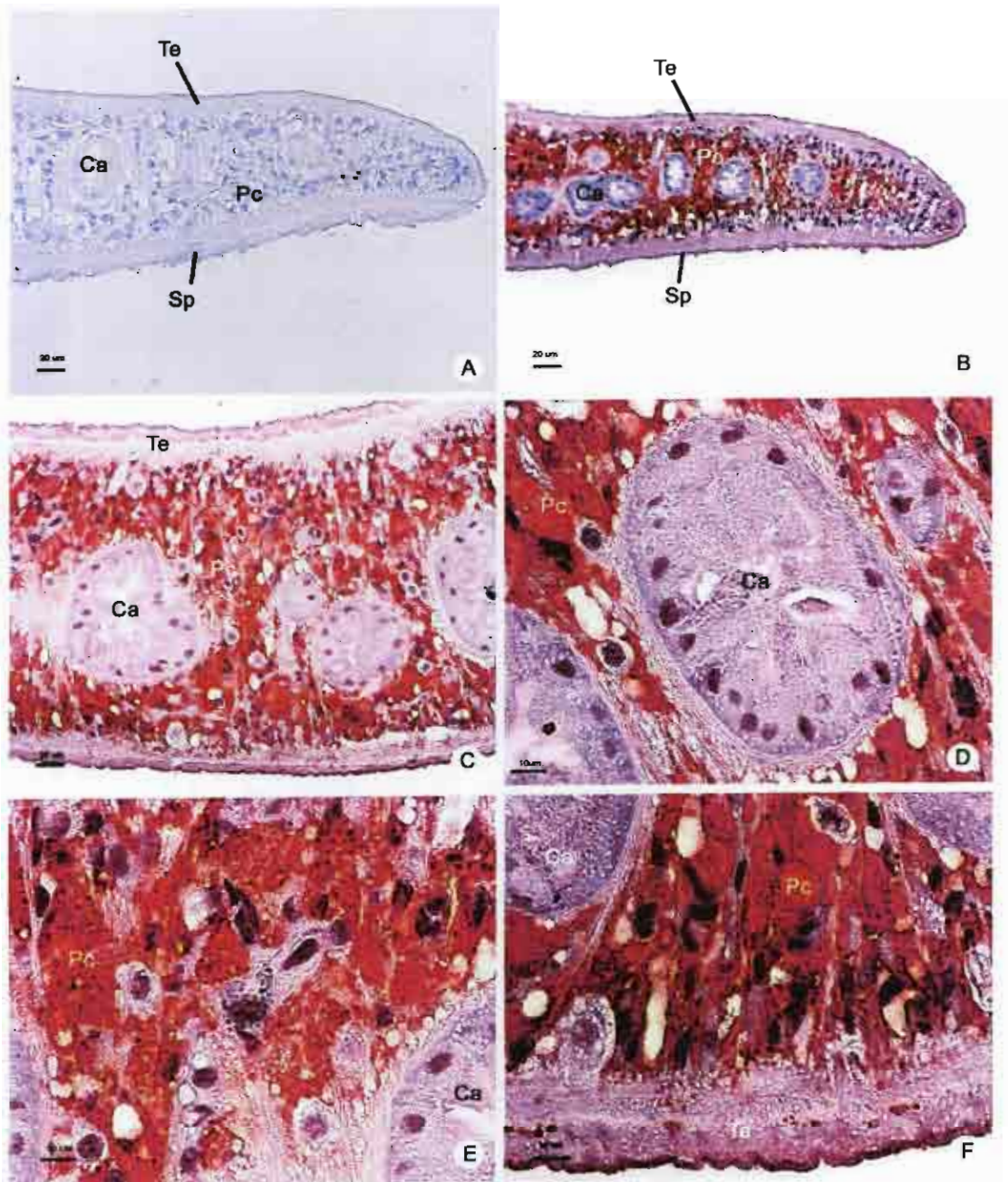


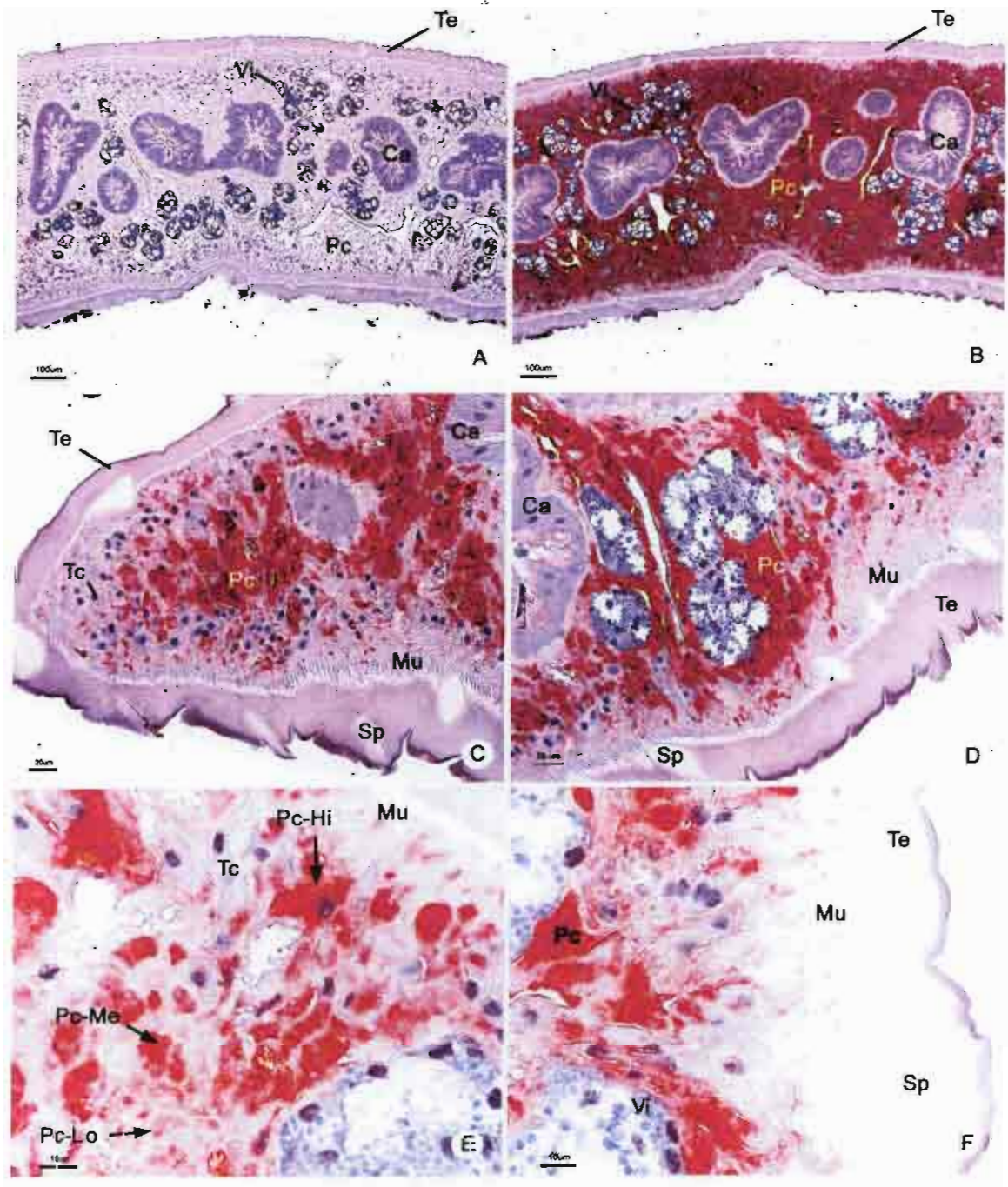


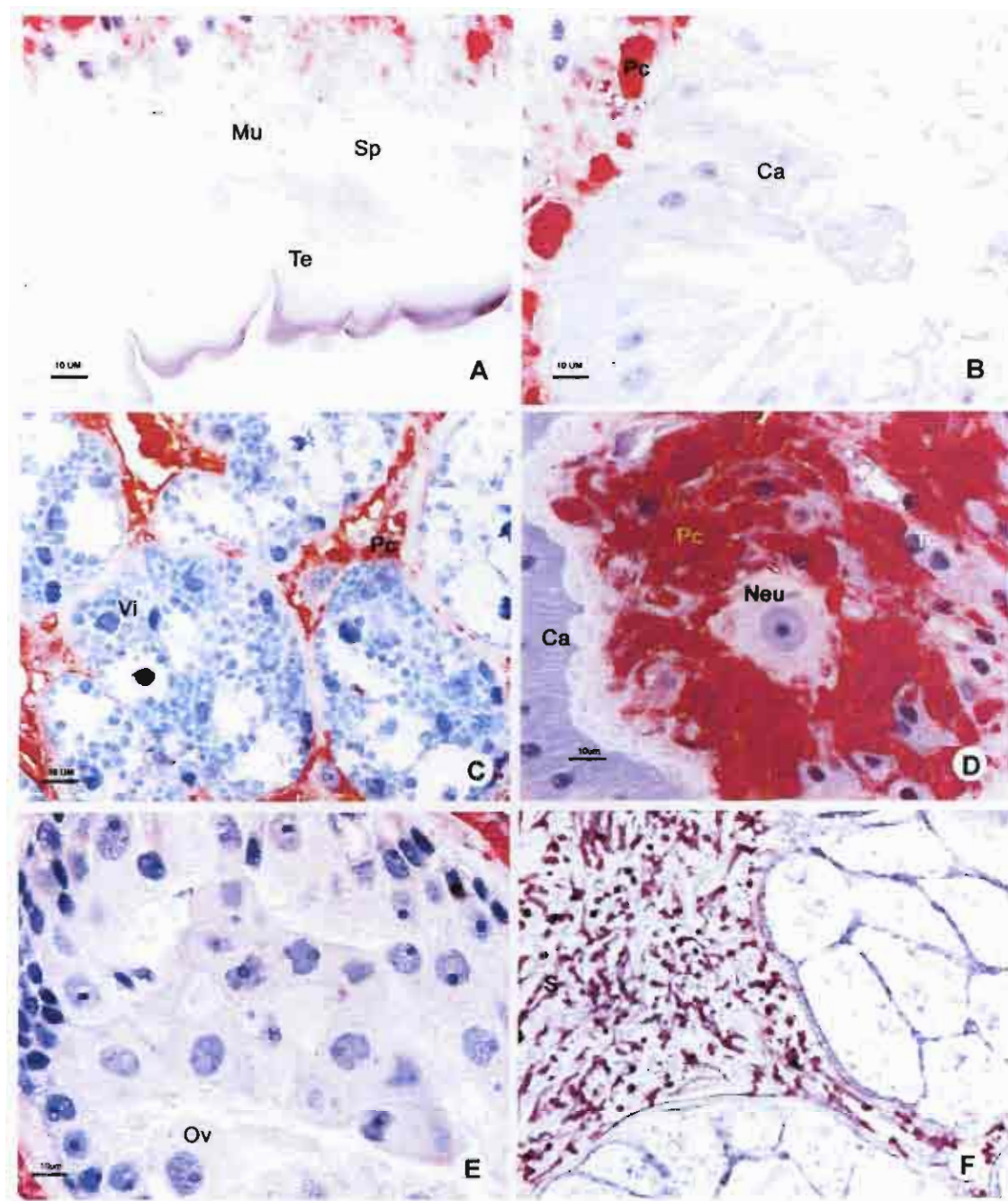












1.6. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การกระจายและการทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของ Fatty acid binding protein (FABP)

Fatty acid binding protein (FABPs) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งมีหน้าที่เป็น carrier protein ที่ช่วยในการขนส่งกรดไขมัน (fatty acids) และ คอเลสเตอรอล (cholesterol) เข้าไปในตัวพยาธิเพื่อใช้ในการกระบวนการสร้างไขมัน (lipid metabolism) พยาธิอาจมี FABPs 2 isoforms เช่นเดียวกับที่พบใน mammals คือ 1) plasmalemmal FABP (FABP_{PM}) 2) cytoplasm FABP (FABP_C) ทั้งนี้ FABP_{PM} อาจเป็นตัวนำพาสารไขมัน (lipid carrier) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์พยาธิในขณะที่ FABP_C อาจทำหน้าที่เก็บสารไขมันไว้ในไซโตพลาสซึม (lipid storage) เนื่องจากพยาธิใบไม้ดัก (*Fasciola gigantica*) ไม่สามารถสังเคราะห์ไขมันและได้เอง จึงต้องอาศัยกรดไขมันซึ่งเป็น precursor มาจาก hosts ที่พยาธิอาศัยอยู่ จึงเป็นไปได้ว่า FABP เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีพของพยาธิในระหว่างที่มันอาศัยอยู่ใน definitive hosts เช่น วัว ควาย หรือแม้แต่มนุษย์

1.6.1. การสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของ cDNA-FABP จาก *F. gigantica*

FABP-cDNA ได้ถูกสังเคราะห์โดยใช้ RT-PCR (Gram *et al.* 2000) ตามวิธีโดยย่อดังนี้ ทำการสกัด total RNA จากพยาธิใบไม้ดัก (*F. gigantica*) ระยะตัวเต็มวัยโดยใช้ TRIZOL method (Life technology) เพื่อนำมาใช้เป็น template สำหรับทำ reverse transcription เพื่อสร้าง cDNA พร้อมกับใส่ gene specific primers คือ FABP-R: 5'-ACG CTT TGA GCA GAG TGG TC-3' หลังจากได้ RT-product ก็ทำการเพิ่มปริมาณ DNA fragments โดยวิธี PCR (ใช้ทั้งหมด 30 cycles ที่ 55°C สำหรับ denaturation, 72°C สำหรับ annealing และ 92°C สำหรับ polymerization โดยใช้ขั้นตอนละ 1 นาที) พร้อมกับเพิ่ม forward primer คือ FABP-F: 5'-ATG GCT GAC TTT GTG GGT TC-3' จากนั้นจึงนำ RT-PCR product ที่ได้มาทดสอบใน agarose gel พบ band ของ cDNA-FABP ที่ตำแหน่ง 397 bp (ดังแสดงในรูปที่ 1.6-1) แล้วทำการตัด band ที่ได้มาสกัด DNA จาก gel (Gel Extraction kit; QIAGEN) เพื่อ subcloned เข้า plasmid ทั้ง pGEMT-Easy plasmid vector (Promega) และ the pBluescript SK(-) plasmid (Stratagene) และ transformed เข้า *E. coli* เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA หลังจากนั้นทำการ purified plasmid DNA โดยใช้ plasmid miniprep kit (QIAGEN) แล้วนำส่งวิเคราะห์ ลำดับเบสของ DNA (DNA sequence) ที่ NSTDA Bioservice unit, Thailand

การวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน FABP ทำโดยนำ deduced amino acid sequences ของ FABP ที่สังเคราะห์ได้โดยกลุ่มวิจัยของเรา (Accession no.: Q9UAS2, Gram *et al.*, 2000) มาเรียงโดยใช้ BioEdit program เพื่อทำ sequence identity matrix เปรียบเทียบกับ deduce amino acid sequences ของ FABP จาก species อื่นๆ ดังนี้ *F. gigantica* (AAB06772, Smooker *et al.*, 1997), *F. hepatica* (Q7M4G0, Rodriguez Perez *et al.*, 1992), *F. hepatica*

(Q7M4G1, Chicz *et al.*, 1994), *F. hepatica* (Q9U1G6, Diaz Ruiz de Equino *et al.*, 1999), *S. mansoni* (P29498, Moser *et al.*, 1991), *S. japonicum* (AAA64426, Becker *et al.*, 1994), *E. granulosus* (X65947, Esteves *et al.*, 1993), *Rattus norvegicus* (H-FABP; NP077076, Zhang *et al.* และ I-FABP; P02693, Alpers *et al.*, 1984), *H. sapiens* (L-FABP; NP001434, Chan *et al.*, 1985 และ I-FABP; P12104, Sweetser *et al.*, 1987)

ผลที่ได้พบว่า FgFABP ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ FABP (Smooker *et al.*, 1997) ถึง 95% โดยแตกต่างกันในช่วงแรก (start codon) ดังแสดงในรูปที่ 1.6-2 และ 1.6-3 เมื่อเปรียบเทียบกับพยาธิใบไม้ตับ (*F. hepatica*), พยาธิในเลือด (*Schistosoma* spp.) และ พยาธิตัวตืด (*E. granulosus*) พบว่าความเหมือน (identity) อยู่ในช่วงประมาณ 66-89 %, 42% และ 27% ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันพบว่ามี ความเหมือนน้อยมาก (ประมาณ 23-32%) เมื่อเปรียบเทียบกับ FABP ของสัตว์ชั้นสูง คือ หนูแรท และ คน การที่มีความเหมือนน้อยระหว่าง FABP ของพยาธิใบไม้ตับ กับ FABP ของ hosts นี้ แสดงว่าโปรตีน FABP มีความจำเพาะต่อพยาธิและวัคซีนที่พัฒนามาจาก FABP ของพยาธิไม่น่าจะมีผลข้างเคียงต่อ hosts

1.6.2. การวิเคราะห์หาตำแหน่งการกระจายของแอนติเจน Fatty acid binding protein (FABP) โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb จาก clone 6F3-2) ในพยาธิระยะตัวอ่อน อายุ 7, 21, 35 และ 49 วัน และ พยาธิตัวเต็มวัย

ในการทดลองศึกษาเราใช้ตัวโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ against ต่อโปรตีน FABP (MoAb 6F3-2) ซึ่งได้เริ่มต้นโดยการผลิตยีน FgFABP เพื่อสกัด recombinant FABP protein ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ rFABP

การผลิต recombinant protein (FABP) ในระบบ bacteria (*E. coli*)

ในขั้นแรกเราได้ทำการเตรียมโปรตีน FABP โดยการตัด FgFABP fragment จาก pBluescript SK(-) (Stratagene) ด้วย restriction enzymes (*Bam* HI และ *Sal* I) แล้ว subcloned เข้า bacterial expression vector (pQE30; QIAGEN) ผลจากการ clone ทำให้มีการเพิ่มกรดอะมิโนที่ N-terminus จำนวน 19 ตัวโดยรวม 6xhistidine tag และที่ C-terminus อีกจำนวน 14 ตัว (ผลจากการคำนวณ molecular weight ได้ประมาณ 18.5 kDa) หลังจากนั้นนำ single colony มาเพาะเลี้ยงใน LB medium ที่มี antibiotics (25 µl/ml Kanamycin, 100 µl/ml ampicillin) ใน shaking incubator (250 rpm) ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ culture cells มา centrifuge ที่ 3000xg, 5 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง แล้วนำเซลล์ที่ได้มาละลายใน LB medium ซึ่งมี 1mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) เพื่อเป็นตัว induced expression และปรับค่า O.D.₆₀₀ = 1.0 แล้วเพาะเลี้ยง ต่ออีก 4 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงมา centrifuge ที่ความเร็ว 13,000xg, 5 นาที เพื่อเก็บ cell pellet

มาวิเคราะห์ใน 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ purified โปรตีนในรูป insoluble fraction โดย Ni-NTA resin (Novagen) ผลที่ได้จากการทดสอบด้วย SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี coomassie blue แสดง band ที่ประมาณ 20 kDa (รูปที่ 1.6-4)

การผลิตและวิเคราะห์โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ rFABP

โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ rFABP ได้เตรียมโดยวิธี hybridoma technique (Sirisriro *et al.*, 2001) เริ่มจากได้นำโปรตีนที่เตรียมมาฉีดในหนู BALB/c โดยฉีด subcutaneous injection กระตุ้น 2 ครั้ง และสามวันหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายได้ทำการนำ B cells จากม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นมา fused กับ myeloma cell line (P3-X63-Ag8.653) หลังจากนั้นนำ hybridoma cells (fused cells) มา screen ด้วยวิธี limiting dilution method แล้วนำ culture fluid ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์มาทดสอบ sensitivity ด้วยวิธี ELISA, ทดสอบ specificity และ cross-reactivity ด้วยวิธี immunoblotting

จากผลการทดลอง เราได้เตรียมแอนติเจนต่างๆ แล้ว probe ด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี พบว่า โมโนโคลนัลแอนติบอดี react กับ recombinant protein (FABP) แสดง specific band ที่ประมาณ 20 kDa และ react กับ native protein (whole worm antigen) ที่ประมาณ 14.5 kDa (รูปที่ 1.6-5) เมื่อทดสอบ cross reaction กับ species อื่นๆ พบว่า มี cross reactivity กับ *S. mansoni* (crude antigen) โดยแสดง specific band ดังรูปที่ 1.6-6 แต่ไม่พบ positive bands กับในพยาธิ *Eurythrema* และ *Paramphistomum* spp.

การวิเคราะห์หาตำแหน่งการกระจายของแอนติเจน Fatty acid binding protein (FABP)

ในพยาธิระยะตัวอ่อนที่กำลังพัฒนาอายุ 7, 21, 35 และ 49 วัน และ พยาธิตัวเต็มวัย

ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบการกระจายของแอนติเจนในพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาและพยาธิตัวเต็มวัย วิธีทำโดยย่อคือ นำพยาธิอายุ 7 วัน, 21 วัน, และ 35 วัน จากการติดเชื้อด้วย metacercariae ในหนูทดลอง (ICR mice) มาล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% หลายๆ ครั้ง ส่วนเนื้อเยื่อของพยาธิตัวเต็มวัยนั้น เราได้ทำการเก็บตัวอย่างที่โรงฆ่าสัตว์ โดยรีดพยาธิจากตับวัวหรือควายที่ติดเชื้อ แล้วล้างด้วยน้ำเกลือ เช่นเดียวกันหลายๆ ครั้ง แล้วทำการตรึงเนื้อเยื่อพยาธิที่เตรียมด้วย 10% formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 70% อัลกอฮอล์ หลายๆ ครั้ง เตรียมชิ้นเนื้อพยาธิด้วย paraffin technique แล้วตัดตัวพยาธิที่ระดับต่างๆ ให้ sections มีความหนาประมาณ 5 ไมครอน ติด sections บนสไลด์ที่เคลือบด้วย xylene ล้างพาราฟินออกด้วย xylene แล้วให้น้ำซึมเข้าเนื้อเยื่อ (rehydrate) โดยแช่ใน 100%, 95%, 80%, 70% อัลกอฮอล์ แล้วนำไปอบในไมโครเวฟโดยแช่ใน 10mM citrate buffer pH 6.0 เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้งแล้วทิ้งไว้ให้เย็น ล้างด้วยน้ำประปาหลังจากนั้นป้องกัน endogeneous peroxidase โดยแช่ใน 3% H₂O₂ ใน tap water และ blocking serum (normal horse serum) หลังจากนั้น แช่ใน primary antibodies คือ MoAb 6F3-2 และในกลุ่ม negative control เราใช้ myeloma fluid แทน MoAb เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างแอนติบอดีด้วย 0.01M PBS buffer pH 7.5, 0.1% Tween 20

ติดฉลากด้วย Biotinylated universal secondary antibody และ streptavidin/ peroxidase complex ล้างแอนติบอดีออกแล้วใส่ substrate คือ 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC substrate kit; Zymed) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืด ผลจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเห็นเป็นสีแดงซึ่งแสดงการกระจายของ FABP ในเซลล์ชนิดต่างๆ หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบถ่ายภาพแบบดิจิทัล

พยาธิตัวอ่อนอายุ 7 วัน

จากการศึกษาพบว่า ในกลุ่ม Negative control ไม่ปรากฏการติดสีแดงจาก AEC ด้วยวิธี immunoperoxidase ในเนื้อเยื่อพยาธิตัวอ่อนเลย ส่วนในกลุ่มที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ FABP ผลปรากฏว่า ส่วนที่ติดสีแดงได้แก่ เซลล์ในเนื้อเยื่อพาราเมโซไคมา (parenchyma) โดยจะพบติดสีแดงที่บริเวณส่วนบนของลำตัวซึ่งมีเนื้อเยื่อ parenchyma อยู่อย่างหนาแน่น และการติดสีค่อนข้างจางที่บริเวณส่วนกลางและส่วนปลายลำตัวของพยาธิตัวอ่อนซึ่งมีเซลล์ parenchyma จำนวนน้อย นอกจากนั้นยังพบว่า มีการติดสีค่อนข้างเข้มที่เซลล์ผิวและเยื่อบุผิวของ oral และ ventral suckers ส่วนเนื้อเยื่อของอวัยวะ caecum, bladder, nervous system และ germ ball ไม่พบการติดสีเลย (รูปที่ 1.6-7)

พยาธิตัวอ่อนอายุ 21 วัน

ในกลุ่มที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ rFABP ผลปรากฏว่าส่วนที่ติดเข้มคือ เนื้อเยื่อ parenchyma โดยเฉพาะที่บริเวณไฮโดพลาสซึมของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบการติดสีที่บริเวณชั้นผิวของตัวอ่อนแต่จะไม่พบในไฮโดพลาสซึมของเซลล์ผิว ที่เรียงตัวกันได้ชั้นกล้ำเนื้อ ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่พบการติดสีเลยคือ เซลล์ของระบบสืบพันธุ์ (testis), เนื้อเยื่อของอวัยวะ caecum และ bladder (รูปที่ 1.6-8)

พยาธิตัวอ่อนอายุ 35 วัน

เมื่อย้อมด้วย MoAb ต่อ rFABP ผลปรากฏว่ามีการติดสีแดงเข้มที่เนื้อเยื่อ parenchyma และติดสีค่อนข้างจางที่ชั้นผิว เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Negative control ซึ่งไม่พบการติดสีเลย ซึ่งการติดสีที่พบจะมีลักษณะเช่นเดียวกันกับที่พบในพยาธิตัวอ่อนอายุ 21 วัน ดังที่กล่าวเบื้องต้น (รูปที่ 1.6-9)

พยาธิตัวอ่อนอายุ 49 วัน

ลักษณะที่พบเมื่อย้อมด้วย MoAb ต่อ rFABP ปรากฏว่ามีการติดสีแดงเข้มที่เนื้อเยื่อ parenchyma โดยเฉพาะบริเวณไฮโดพลาสซึมเช่นเดียวกันกับในระยะต้นที่กล่าวมา และพบการติดสีจางที่ชั้นผิวเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control (รูปที่ 1.6-10)

พยาธิตัวเต็มวัย

ในกลุ่มที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ rFABP ผลปรากฏว่าลักษณะการติดสีคล้ายคลึงกันกับในระยะตัวอ่อนกำลังพัฒนา นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์ parenchyma ติดสีเข้มอีกด้วยโดยสามารถแยกเซลล์ตามลำดับความเข้มของการติดสีได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ไม่ติดสีหรือติดสีจางมากอยู่ตามขอบของลำตัว

พยาธิโดยเฉพาะได้ชั้นผิว (Tegument) กลุ่มที่ติดสีเข้มและปานกลางเป็นกลุ่มใหญ่มักพบอยู่กลางลำตัวพยาธิซึ่งเป็นเนื้อที่อัดกันแน่นแทรกอยู่ตามอวัยวะต่างๆ (รูปที่ 1.6-11)

สรุปได้ว่า FABP มีการแสดงออก และมีความเข้มสูงในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาอายุ 7, 21, 35 และ 49 วัน โดยพบที่มีความเข้มสูงที่สุดในเนื้อเยื่อ parenchyma ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกันกับในระยะพยาธิตัวเต็มวัย และเมื่อเปรียบเทียบกันในกลุ่มพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาช่วงอายุ 7, 21, 35 และ 49 วัน พบว่าระดับความเข้มของการติดสีแดงจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น เป็นไปได้ว่าอาจขึ้นอยู่กับและระดับการพัฒนาของปริมาณเซลล์ parenchyma ซึ่งมีมากขึ้นตามลำดับ แต่ในพยาธิตัวอ่อนนั้นพบว่าความเข้มในเซลล์ parenchyma ชนิดต่างๆ มีระดับเดียวกันซึ่งต่างจากระดับการติดสี 3 ระดับในเซลล์ parenchyma ของพยาธิตัวเต็มวัย คือ การติดสีเข้ม ปานกลาง และติดสีจางหรือไม่ติดสีเลย อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ parenchyma ในระยะพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาอาจยังไม่แยกหน้าที่ (differentiate) อย่างเห็นได้ชัด ดังเช่นที่พบในพยาธิตัวเต็มวัย

นอกจากการวิเคราะห์ตำแหน่งการกระจายของแอนติเจน (FABP) ในเนื้อเยื่อต่างๆโดยวิธี Immunoperoxidase technique ซึ่งเป็นการทดลองในระดับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแล้ว ยังได้ทำการวิเคราะห์การกระจายของ FABP ในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งทำให้เห็นรายละเอียดและบอกตำแหน่ง การกระจายตลอดจนการเคลื่อนที่ของแอนติเจนได้ดีขึ้น

ซึ่งในขั้นตอนการทดลองได้ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ recombinant FABP โดยวิธี hybridoma มาวิเคราะห์หาลักษณะการกระจายของ FABP ด้วยวิธี Immunogold technique โดยการย้อม thin sections ของพยาธิที่ fix ด้วย 0.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde in 0.1M PBS pH7.4 และฝังในพลาสติกแบบ Aradite CY ตามด้วย biotinylated rabbit anti-mouse IgG เป็น secondary antibody และติดฉลาก immune complex ด้วย Streptavidin gold โดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม Negative control ซึ่งใช้ non-immune mouse serum (NIS)

จากผลการทดลองพบว่า ในกลุ่ม Negative control (NIS) ไม่ปรากฏ การติด gold particles เลยในเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัย เช่น ที่ผิว (tegument), เนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ (testis, ovary, uterine epithelium และ seminal vesicles) และที่เยื่อ buccum (ไม่ได้แสดงภาพ)

ในกลุ่มที่ย้อมด้วย monoclonal antibody ต่อ rFABP (MoAb) ที่ใช้ในกลุ่มนี้คือ clone 6F3-2 ผลปรากฏว่าพบการกระจายของ gold particles ทั่วทั้งเซลล์ parenchyma ชนิดที่ 2 (Pc_2) โดยไม่พบในเซลล์ parenchyma ชนิดที่ 1 (Pc_1) และ ชนิดที่ 3 (Pc_3) และเมื่อใช้กำลังขยายสูงพบว่า gold particles กระจายอยู่ทั่วไปใน cytoplasm ของเซลล์ parenchyma type 2 (Pc_2) ดังแสดงในรูปที่ 1.6-12A-F นอกจากนั้นยังพบว่ามี gold particles กระจายในบริเวณ cytoplasm ของ Pc_2 ที่ยื่น processes ไปล้อมรอบบริเวณเซลล์ข้างเคียง เช่น flame cell และ bladder epithelium ซึ่งแสดงถึงปริมาณการสะสมของ FABP ในเซลล์ชนิดนี้ และในบริเวณที่เซลล์เชื่อมต่อกับเซลล์ข้างเคียง โดยสันนิษฐานว่าอาจมีการ

ขนส่ง fatty acids จากเซลล์นี้ไปยังเซลล์ข้างเคียงด้วย เมื่อสังเกตจาก gold particles พบว่ามีการกระจายของโปรตีน FABP ในเนื้อเยื่อข้างเคียงเช่นกัน ได้แก่ bladder epithelium ซึ่งพบบนบริเวณ stereocilia (รูปที่ 1.6-12A, B)

จากผลการทดลองเบื้องต้นแสดงถึงการกระจายของ FABP ในพยาธิตัวเต็มวัย พบว่า ในเซลล์ parenchyma อาจจะเป็นแหล่งสะสม FABP ในปริมาณสูง และอาจจะเป็นแหล่งผลิตและปลดปล่อยแอนติเจนจากตัวพยาธิด้วย ดังนั้นการศึกษาลักษณะโครงสร้าง และบทบาทของ parenchyma แต่ละชนิดจึงเป็นปัญหาที่จะนำมาศึกษาต่อ

1.6.3. การศึกษาโครงสร้างละเอียด และบทบาทของเซลล์พาราเรโนไมมา (parenchymal cell) ในพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัย

ได้ศึกษาลักษณะโครงสร้างและบทบาทของเนื้อเยื่อ parenchyma ซึ่งคาดว่าเป็นเซลล์ตัวกลางเนื่องจาก parenchyma เป็นกลุ่มเซลล์ที่สัมผัสกับอวัยวะทุกอันในตัวพยาธิ เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานและเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับการสังเคราะห์ และการกระจายของโมเลกุล FABP ในขั้นตอนการทดลองแบบวิธี Transmission electron microscopy (TEM) ได้ใช้พยาธิใบไม้ตับตัวเต็มวัยที่ fixed ด้วย 4% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde ใน 0.1M phosphate buffer saline pH 7.4 และฝังในพลาสติก Aradite 502 จากการศึกษาพบว่า เนื้อเยื่อพาราเรโนไมมาสามารถจำแนกเซลล์ได้เป็น 3 ชนิด คือ parenchymal cell type 1 (Pc_1), type 2 (Pc_2) และ type 3 (Pc_3) โดยจำแนกตามลักษณะโครงสร้างในระดับเซลล์และส่วนประกอบภายในไซโตพลาสซึม ซึ่งอาจสัมพันธ์กับหน้าที่หลักของแต่ละเซลล์

Parenchymal cell type 1 (Pc_1)

Pc_1 เป็นเซลล์รูปแท่งที่มีขนาดใหญ่ที่มีความยาว 50-100 μm ความกว้าง 10-25 μm เรียงตัวชิดกันโดยเซลล์พาราเรโนไมมา (parenchymal cell) เมื่อดูในระดับ LM เซลล์ Pc_1 มีลักษณะเนื้อใส ติดสีจางของ methylene blue เซลล์ Pc_1 จะมีการติดต่อสัมผัสกับอวัยวะต่างๆ เช่น อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (testis), กระเพาะปัสสาวะ (bladder), ท่อทางเดินอาหาร (caecum) (รูปที่ 1.6-13A-C) และเมื่อย้อมสีด้วย PAS พบ positive staining ที่บริเวณเซลล์ parenchyma (รูปที่ 1.6-13D) เมื่อดูในระดับ TEM พบว่า เซลล์ Pc_1 แต่ละเซลล์ถูกหุ้มด้วยเยื่อที่ประกอบด้วยเส้นใย reticular fibers ที่แทรกอยู่ในช่องระหว่างเซลล์ แต่เยื่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบๆ เซลล์ Pc_1 นี้จะหายไปตรงบริเวณที่เยื่อหุ้มเซลล์สองเซลล์มาต่อกันเป็น gap junctions (รูปที่ 1.6-14C) ซึ่งพบเป็นจำนวนมากและคาดว่าจะเป็นที่ส่งสัญญาณติดต่อประสานกันระหว่างเซลล์ Pc_1 ทั้งหมด นิวเคลียสของเซลล์ Pc_1 มีลักษณะกลมใหญ่ ใส ภายในประกอบด้วย euchromatin เกือบทั้งหมด มี heterochromatin จำนวนน้อย เนื้อไซโตพลาสซึมมีลักษณะโปร่งแสง อิเล็กตรอน ดังแสดงในภาพ (รูปที่ 1.6-14A, B) ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสายใยที่สานกันอยู่หลวมๆ ซึ่งสายใยเหล่านี้สามารถเกาะกับ monoclonal antibody ต่อ cytokeratin เมื่อย้อมด้วย immunogold

labeling technique (ไม่ได้แสดงภาพ) ภายในไซโตพลาสซึม มี organelles อยู่จำนวนน้อยมาก โดยจะพบไมโทคอนเดรียประปราย แต่พบว่าใน Pc_1 ของเซลล์มีก้อนไกลโคเจนเป็นจำนวนมากบรรจุอยู่ (รูปที่ 1.6-14D-F) จึงเป็นไปได้ว่าหน้าที่หลักของ Pc_1 คือ การสะสม glycogen และควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสภายในตัวพยาธิ

Parenchymal cell type 2 (Pc_2)

Pc_2 เป็นเซลล์รูปแท่งแต่มีขนาดเล็กและจำนวนน้อยกว่า จะเห็นเป็นเซลล์เนื้อที่บดสี methylene blue เข้มขึ้น มี cytoplasmic process แทรกอยู่ระหว่าง Pc_1 และสัมผัสกับเยื่อหุ้มอวัยวะต่างๆ เช่นเดียวกับ Pc_1 (รูปที่ 1.6-13C) เมื่อสังเกตในระดับ TEM พบว่า Pc_2 ถูกหุ้มด้วยเยื่อเกี่ยวพัน เช่นเดียวกับ Pc_1 และมี gap junctions ที่เชื่อมกับเยื่อหุ้มเซลล์ของ Pc_1 และ Pc_2 แต่ละเซลล์ นิวเคลียสมีลักษณะกลมใหญ่ มักอยู่ที่ขอบของเซลล์ ภายในประกอบด้วย euchromatin เกือบทั้งหมด นิวคลีโอลัสมีขนาดใหญ่ (รูปที่ 1.6-15A) ไซโตพลาสซึมของเซลล์ Pc_2 มีลักษณะใสคล้ายกับ Pc_1 แต่มีไมโทคอนเดรียสะสมอยู่เป็นจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วทั้งเซลล์ (รูปที่ 1.6-15B-F) และจากการศึกษาเบื้องต้นโดยวิธี immunoperoxidase และ immunogold ดังแสดงในรูปที่ 1.6-11, 1.6-12 พบว่า Pc_2 มี FABP สะสมอยู่มากเมื่อเทียบกับเซลล์อื่นๆ นอกจากนั้นยังพบว่าภายในเซลล์มีก้อนไขมันสะสมอยู่มากใน Pc_2 บางเซลล์ เป็นไปได้ว่าเซลล์ Pc_2 อาจเป็นเซลล์ที่สะสม และควบคุมการส่งต่อ fatty acids และไขมันไปยังเซลล์ parenchyma ข้างเคียงและเซลล์ของอวัยวะชนิดอื่นๆ ด้วย

Parenchymal cell type 3 (Pc_3)

เซลล์ Pc_3 มีลักษณะเป็นเซลล์เนื้อที่บด สีเข้ม ส่วนใหญ่เป็นเซลล์รูปทรงรี (ovoid shape) มักแทรกตัวอยู่ระหว่างเซลล์ Pc_1 และ Pc_2 โดยจะพบน้อยกว่า Pc_1 และ Pc_2 (รูปที่ 1.6-13C) ที่ระดับ TEM พบว่านิวเคลียสมีรูปร่างกลม บรรจุ euchromatin เป็นส่วนใหญ่และมีก้อน heterochromatin ขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 1.6-16C, D) ไซโตพลาสซึมมีลักษณะเนื้อที่บดแสงอิเล็กตรอนมากกว่าเซลล์ทั้งสองชนิดที่กล่าวมา มีไมโทคอนเดรียอัดอยู่หนาแน่นมาก, มี Golgi complexes และ granules ขนาดเล็กกระจายอยู่เป็นหย่อมๆ จะพบไรโบโซมอิสระและร่างแหเอ็นโดพลาสมิก (rough endoplasmic reticulum) กระจายอยู่ทั่วไปทั่วทั้งเซลล์ (รูปที่ 1.6-16C, D) นอกจากนั้นที่บริเวณขอบของเซลล์มีเยื่อเกี่ยวพันละเอียดและ granules เล็กๆ กระจายอยู่ดังแสดงในภาพ (รูปที่ 1.6-16D) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า เซลล์ Pc_3 เป็นเซลล์ที่มีบทบาทในการสร้างและหลั่งสารโดยระบบ RER-Golgi system สูง โดยสร้างโปรตีนที่จะประกอบเป็นเส้นใย (reticular fibers) ที่รวมเป็นกรอบหรือโครงรอบๆ เซลล์พาเรนไคมา

ดังนั้นจะเห็นว่าเซลล์พาเรนไคมามีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณ FABP ซึ่งเป็นโมเลกุลที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของพยาธิ ซึ่งจะนำไปศึกษาต่อไปว่าควรใช้ FABP เป็นวัดขึ้นและทดสอบว่า FABP จะมีผลกระทบอย่างไรต่อโครงสร้างของเซลล์ parenchyma ในพยาธิ

1.6.4. การทดสอบศักยภาพความเป็นวัคซีนของทั้ง FABPcDNA ในสัตว์ทดลอง การเตรียม FABPcDNA วัคซีนเข้าไปในพลาสมิด pCI (mammalian expression vector) สำหรับฉีดในสัตว์ทดลอง

ในขั้นตอนนี้เราได้นำ FABP cDNA จากพลาสมิด pQE30 มาเตรียมโดยวิธี PCR และได้ออกแบบ primers ที่เหมาะสมกับ restriction enzymes ใน vector คือ Forward primer: 5'-CTC GAG ATG GCT GAC TTT GTG GGT TCG-3' Reverse primer: 5'-TCT AGA TCA CGC TTT GAG CAG AGT GGT CAC-3' และ ใช้เอนไซม์ Taq polymerase ผล PCR product ที่ได้นำมาตรวจสอบโดย 0.8% Agarose gel ดังแสดงในรูปที่ 1.6-17A ซึ่งได้ band ที่มีขนาดประมาณ 450 bp หลังจากนั้นทำการตัด band ที่ได้จาก PCR product และทำการสกัด DNA จาก gel โดยใช้ QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) และ ligate เข้า pGEM[®] T Easy vector โดยใช้ T4 DNA ligase enzyme ในปฏิกิริยาแล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 4°C, overnight ซึ่งปฏิกิริยา ligation ที่ได้จะถูกนำมา transformed เข้า XL-1 blue competent cells ที่เตรียมไว้ โดยวิธี heat shock cells ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที และ plate ลงจานเพาะเชื้อ (LB plates + 50 µg Ampicillin) แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37°C, overnight นำ transformant cells ที่ได้มาตรวจสอบโดยทำการสกัดพลาสมิดและตัด double digest ด้วย restriction enzymes (*Xho* I, *Sal* I) และส่ง DNA sequence analysis (รูปที่ 1.6-17B)

เมื่อได้ผล DNA sequence แล้วนำ band ของ FABP ที่ตัดด้วย restriction enzymes (*Xho* I, *Sal* I) มาสกัด DNA จาก gel (QIA quick gel extraction kit) มา ligate เข้าพลาสมิด pCI (Promega) ที่ตัดด้วย restriction enzymes ตัวเดียวกัน โดยใช้ T4 DNA ligase enzyme ที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วจึง transformed เข้า bacterial competent cell (XL-1 blue) และ plate ลงบนจานเพาะเชื้อ (LB plates + 50 µg/ml) อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ transformant cells มาตรวจสอบโดยทำการสกัดพลาสมิดที่มี insert DNA โดยใช้ miniprep spin kit (QIAGEN), ตัดด้วย restriction enzymes (*Xho* I, *Sal* I) ดังแสดงผลในรูปที่ 1.6-17C แล้วจึงนำส่ง DNA sequenced analysis ที่ BioService Unit (BSU), Thailand

การฉีดวัคซีน FABPcDNA ในสัตว์ทดลอง

ก่อนที่จะฉีดวัคซีนด้วยยีน FABP (FABPcDNA in pCI) ในหนูทดลอง เราได้ทำการ purified ตัว plasmid DNA เพื่อทำการกำจัด endotoxin โดยใช้ Endofree plasmid Maxi preps kits (QIAGEN) สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองคือ หนูเมาส์ (ICR Mouse) เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ (เลี้ยงในกรงพลาสติก มีวัสดุรองนอน) ซึ่งถูกเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปและมีน้ำดื่มตลอดเวลา ในขั้นตอนการทดลองเราได้แบ่งหนูทดลองออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดวัคซีนและไม่ติดเชื้อมา, กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนแต่ติดเชื้อมา, กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับการฉีดพลาสมิด pCI โดยฉีดแบบ intradermal), กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับการฉีด

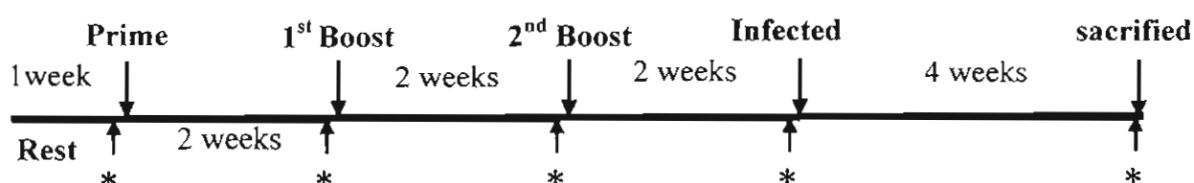
ด้วยพลาสมิด pCI โดยฉีดแบบ intramuscular, กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับการฉีดด้วยสารละลาย TE (TE buffer) โดยฉีดแบบ intradermal, กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับการฉีดด้วยสารละลาย TE (TE buffer) โดยฉีดแบบ intramuscular, กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มทดสอบที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยยีน FABP โดยฉีดแบบ intradermal และ กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มทดสอบที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยยีน FABP โดยฉีดแบบ intramuscular หนูในแต่ละกลุ่มยกเว้นกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1 และ 2) จะได้รับสารในปริมาณ 100 ไมโครกรัม ต่อหนู 1 ตัว (ตารางที่ 1) โดยการฉีดสารครั้งแรก (Prime) จะเริ่มหลังจากที่ให้นุพัก 7 วัน และฉีดครั้งที่ 2 (First boost) และครั้งที่ 3 (Second boost) โดยเว้นระยะห่างเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ตารางที่ 2) และหลังจากการฉีดครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 2 สัปดาห์หนูทั้งหมด ยกเว้นกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) จะถูกนำมาติดเชื้อพยาธิ (metacercaria) โดยวิธีป้อนเชื้อพยาธิเข้าทางช่องปาก (oral infection) เป็นจำนวน 30 metacercaria ต่อหนู 1 ตัว หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ หนูทั้งหมดจะถูกนำมาฆ่าโดยวิธีสลบด้วย ether เพื่อตรวจหาจำนวนพยาธิที่ติดเชื้อ (worm recovery), คำนวณค่า % protection, ตรวจสอพบพยาธิสภาพที่ตับ (liver pathology)

ตารางที่ 1.6-1 ตารางออกแบบการทดลองแสดงการฉีดวัคซีน FABP cDNA ในกลุ่มหนูทดลอง

Antigens	FABP cDNA
Dose	100 µg DNA
Adjuvants	TE buffer
Animals	8 week-old out bred ICR mice (M)
Number of animals	96 mice (M); 8 groups (10 mice per group)

CFA: Complete Freund's adjuvant, IFA: Incomplete Freund's adjuvant, M: Male

ตารางที่ 1.6-2 ตารางแสดงช่วงเวลาในการฉีดวัคซีนสัตว์ทดลอง



* Collect sera of mice

ผลการทดลอง

หนูทดลอง 8 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย DNA ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 หนูปกติที่ไม่ได้รับการฉีดใดๆ และไม่ติดเชื้อพยาธิ

กลุ่มที่ 2 หนูที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนแต่ติดเชื้อพยาธิ

กลุ่มที่ 3 หนูได้รับการฉีดด้วยพลาสมิด pCI (pCI) โดยฉีดแบบ intradermal (ID)

กลุ่มที่ 4 หนูได้รับการฉีดด้วยพลาสมิด pCI (pCI) โดยฉีดแบบ intramuscular (IM)

กลุ่มที่ 5 หนูได้รับการฉีดด้วยสารละลาย TE (TE) โดยฉีดแบบ intradermal (ID)

กลุ่มที่ 6 หนูได้รับการฉีดด้วยสารละลาย TE (TE) โดยฉีดแบบ intramuscular (IM)

กลุ่มที่ 7 หนูได้รับการฉีดด้วยยีน fatty acid binding protein (FABP) โดยฉีดแบบ intradermal (ID)

กลุ่มที่ 8 หนูได้รับการฉีดด้วยยีน fatty acid binding protein (FABP) โดยฉีดแบบ intramuscular (IM)

หนูเหล่านี้ได้รับการฉีดกระตุ้นทาง ID และทาง IM ในปริมาณ 100 ไมโครกรัม ต่อสารละลาย TE 100 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการป้อน *metacercaria* ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* จำนวน 30 ตัว เข้าทางช่องปาก หลังจากการติดเชื้อ 4 สัปดาห์ ทำการฆ่าหนู และทำการตรวจนับจำนวนพยาธิที่ติดเชื้อในตับหนูทดลอง ผลการทดลอง พบว่า การฉีดวัคซีนด้วยยีน FABP สามารถลดจำนวนการติดเชื้อของพยาธิได้สูงสุด (% protection) เมื่อคำนวณทางสถิติเท่ากับ 55.88% ในกลุ่มหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นแบบ intradermal และได้เท่ากับ 43.14% ในกลุ่มหนูที่ได้รับการฉีดแบบ intramuscular (รูปที่ 1.6-18) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดสารใดๆ (กลุ่มที่ 2) และในส่วนของภาวะระดับพยาธิสภาพที่ตับของหนู พบว่าหนูในกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 มีการเกิดพยาธิสภาพเฉลี่ยในระดับ 3 (รูปที่ 1.6-19D) ซึ่งเป็นระดับที่รุนแรงที่สุด ซึ่งจะพบ migratory tract ในทุกพูของตับ มีแผ่นหนองปกคลุมบนผิวตับ พบการเชื่อมติดกันของตับและกระบังลม นอกจากนั้นอาจพบมีเลือดออกในช่องท้อง ส่วนในหนูในกลุ่มทดสอบที่ได้รับการฉีดด้วยยีน FABP ทั้งที่ฉีดกระตุ้นแบบ ID และ IM พบการเกิดพยาธิสภาพที่ตับเฉลี่ยแล้วอยู่แค่ในระดับ 2 ซึ่งพบรอยโรคน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยจะพบ migratory tract ที่มีขนาดใหญ่และ กระจายมากประปรายบนตับและอาจพบมีเลือดออกจากตับเนื่องจากการไชของพยาธิ ดังแสดงในตารางที่ 1.6-3 และรูปที่ 1.6-19C

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าวัคซีนจากยีน FABP มีศักยภาพสามารถลดจำนวนการติดเชื้อพยาธิได้สูงสุดถึงประมาณ 56% โดยคาดว่าวัคซีนชนิดนี้อาจไม่มีผลยับยั้งการทำงานของโปรตีน FABP ซึ่งทำให้เกิดผลกระทบต่อระบบการขนส่งกรดไขมัน (fatty acids) จากโฮสต์มาสู่ตัวพยาธิ มีผลทำลายในส่วนของชั้นผิว (tegument) และทำลายเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะเนื้อเยื่อพาราเนโคมาซึ่งเป็นเป้าหมายหลัก

ตารางที่ 1.6-3 ตารางแสดงผลค่าเฉลี่ยทางสถิติของจำนวนพยาธิใบไม้ตับที่มีชีวิตรอดในหนูทดลองแต่ละกลุ่มที่ได้รับการฉีดตัวพยาธิของยีน FABP และสารชนิดต่างๆ

Group	number of mice in group	average worm no.	% recovery	% protection compare with			patho. level (0,1,2,3)
				control +ve	pCl	TE Buffer	
1 (-ve cont.)	10	0	0	100	/	/	0
2 (+ve cont.)	10	10.20	34	0	/	/	3
3 (pCl_ID)	10	10.70	35.67	-4.90	/	/	3
4 (pCl_IM)	10	9.70	32.33	4.90	/	/	3
5 (TE_ID)	10	9.80	32.67	3.92	/	/	3
6 (TE_IM)	10	9.30	31	8.82	/	/	3
7 (FABP_ID)	10	4.50	15	55.88	57.94	54.08	2
8 (FABP_IM)	10	5.80	19.33	43.14	40.21	37.63	2

หมายเหตุ Pathology level

ระดับที่ 0: ไม่พบความผิดปกติใดๆที่ตับ

ระดับที่ 1: พบพยาธิสภาพเห็น migratory tract

ระดับที่ 2: พบ migratory tract ใหญ่ขึ้นและ กระจายมากขึ้น

ระดับที่ 3: พบ migratory tract ในทุกพูของตับ มีแผ่นหนองปกคลุมผิวตับ และพบการเชื่อมติดกันของตับและกระบังลม

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.6

- รูปที่ 1.6-1 ภาพ Agarose gel แสดงแถบ cDNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR ที่ตำแหน่ง 397 bp
- รูปที่ 1.6-2 ภาพ Alignment of deduced amino acid sequences แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน FABP ของพยาธิตัวโต F. gigantica: Q9UAS2 (Gram *et al.*, 2000) กับ พยาธิใบไม้ตับ (F. gigantica: AAB06722, F. hepatica: Fh15, CAB65015, Q7M4G1, Q9U1G6), พยาธิในเลือด (Schistosoma spp.: P29498, 045035), พยาธิตัวตืด (E. granulosus: Q02970), และใน mammalian spp. (Rat I-FABP: P02693, Rat L-FABP: NP077076 และ human I-FABP: P12104, L-FABP: NP001434) (สีดำ: แสดงกรดอะมิโนที่เหมือนกัน; สีเทา: แสดงกรดอะมิโนที่คล้ายกันโดยอยู่ในหมู่อะมิโน (amino group) เดียวกัน)
- รูปที่ 1.6-3 ภาพผล Sequence Identity Matrix แสดงการเปรียบเทียบ FABP amino acid sequences ของพยาธิตัวโต F. gigantica: Q9UAS2 (Gram *et al.*, 2000) กับ พยาธิใบไม้ตับ (F. gigantica: AAB06722, F. hepatica: Fh15, CAB65015, Q7M4G1, Q9U1G6), พยาธิในเลือด (Schistosoma spp.: P29498, 045035), พยาธิตัวตืด (E. granulosus: Q02970), และใน mammalian spp. (Rat I-FABP: P02693, Rat L-FABP: NP077076 และ human I-FABP: P12104, L-FABP: NP001434) (สีดำ: แสดง amino acid ที่เหมือนกัน; สีเทา: แสดงกรดอะมิโนที่คล้ายกันโดยอยู่ในหมู่อะมิโน (amino groups) เดียวกัน)
- รูปที่ 1.6-4 ภาพ SDS-PAGE gel แสดงแถบโปรตีนของ recombinant FABP protein ที่ได้จากการ express ใน bacterial system และ purified โดยใช้ Ni-NTA resin (lane 1: Standard molecular weight; lane 2: แสดง cell lysate ที่ได้หลังจากสกัดด้วย lysis buffer; lane 3, 4: ขั้นตอนการ purified หลังจากล้างด้วยบัฟเฟอร์; lane 5: แสดงตำแหน่งของ recombinant FABP protein ที่ 20 kDa)
- รูปที่ 1.6-5 ภาพ immunoblot ของแอนติเจน recombinant FABP (rFABP) และพยาธิตัวเต็มวัย (FG) ที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ rFABP โดยเปรียบเทียบกับ Standard molecular weight (SD)

- รูปที่ 1.6-6** ภาพ immunoblot ของแอนติเจนพยาธิตัวเต็มวัย (FG) ที่ย้อมด้วย myeloma culture fluid (CF)-lane 1, normal mouse serum (NMS)-lane 2, cow infected serum (CIS)-lane 3, MoAb ต่อโปรตีน rFABP (clone 6F3-2)-lane 4 และนอกจากนั้นในภาพแสดงปฏิกิริยาข้าม (cross reactions) ของ MoAb ต่อ rFABP กับแอนติเจนจากพยาธิอื่นๆ เช่น *Schistosoma mansoni* (SM), *Eurythema pancreaticum* (EP), *Paramphistomun* spp. (PA)
- รูปที่ 1.6-7** ภาพ Paraffin sections ของพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาอายุ 7 วัน ที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ rFABP ของ *F. gigantica* clone 6F3-2 ด้วย วิธี Immunoperoxidase
- A) กลุ่ม Negative control
- B) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงตำแหน่งการสะสมแอนติเจน FABP ในพยาธิตัวอ่อนอายุ 7 วัน
- C) ภาพกำลังขยายสูงแสดงการติดสีเข้มที่เซลล์ parenchyma (Pc) ที่อยู่กันอย่างหนาแน่นบริเวณส่วนหน้าของลำตัว และแสดงส่วนของ oral sucker (Os) ติดสีแดงปานกลางที่บริเวณไฮโดพลาซึมของเซลล์บุผิว และส่วนของ pharynx (Ph) ที่ไม่ติดสีเลย
- D-F) ภาพแสดงกิ่งของ parenchyma ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ผิวเข้าไปในชั้นผิว (ภาพ D), และเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ เช่น caecum (Ca-ภาพ E และ F)
- รูปที่ 1.6-8** ภาพ Paraffin sections ของพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาอายุ 21 วัน ที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ rFABP ของ *F. gigantica* clone 6F3-2 ด้วย วิธี Immunoperoxidase
- A) กลุ่ม Negative control
- B, C) ภาพแสดงการติดสีแดงเข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) ในส่วนไฮโดพลาซึมของเซลล์ที่ยื่นกิ่งแทรกเข้าไปภายในชั้นผิว (arrow heads) และแสดงการติดสีจางในส่วนของชั้นผิว (Te) โดยจะไม่พบการติดสีในไฮโดพลาซึมของเซลล์ผิว (Tc)
- D-F) ภาพแสดงการติดสีแดงเข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ (Ti- ภาพ D), caecum (Ca) และ Bladder (Bl- ภาพ E) (Sp-spine)
- รูปที่ 1.6-9** ภาพ Paraffin sections ของพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาอายุ 35 วัน ที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ rFABP ของ *F. gigantica* clone 6F3-2 ด้วย วิธี Immunoperoxidase
- A) กลุ่ม Negative control

B-F) ภาพแสดงการติดสีเข้มในเซลล์ของเนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) และชั้นผิว (Te) ยกเว้นในไซโตพลาสซึมของเซลล์ผิว (Tc-ภาพ E, F) และชั้นกล้ามเนื้อ (Mu-ภาพ D) ส่วนเนื้อเยื่อของอวัยวะอื่นๆ เช่น caecum (Ca), testis (Ti) และ Bladder (BI) ไม่พบการติดสีเลย (arrowheads-cytoplasmic processes of parenchymal cells)

รูปที่ 1.6-10 ภาพ Paraffin sections ของพยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนาอายุ 49 วัน ที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ rFABP ของ *F. gigantica* clone 6F3-2 ด้วย วิธี Immunoperoxidase

A) กลุ่ม Negative control ซึ่งไม่พบการติดสีเลย

B, C, D) ภาพกำลังขยายปานกลางแสดงการติดสีแดงเข้มที่เนื้อเยื่อ parenchyma (Pc) ส่วนเนื้อเยื่ออวัยวะอื่นๆ เช่น เซลล์ประสาท (Nerve cell-Ne), อวัยวะสืบพันธุ์ (testis-Ti), caecum (Ca) ไม่พบการติดสีเลย

E, F) ภาพกำลังขยายสูงแสดงการติดสีเข้มที่เซลล์ parenchyma (Pc) บริเวณใต้ชั้นผิว (tegument-Te) โดยไม่พบการติดสีที่ไซโตพลาสซึมของเซลล์ชั้นผิว (tegumental cell-Tc) และชั้นกล้ามเนื้อ (Mu) (Sp-spine; Vg-vitelline gland)

รูปที่ 1.6-11 ภาพ Paraffin sections ของพยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ rFABP ของ *F. gigantica* clone 6F3-2 ด้วย วิธี Immunoperoxidase

A) Negative control

B-F) ภาพแสดงตำแหน่งการสะสมของแอนติเจน (FABP) clone 6F3-2 ในเซลล์ parenchyma ใต้ชั้นผิว (tegument-Te) แยกได้ 3 ชนิด (Pc_1 , Pc_2 และ Pc_3) ที่มีความเข้มต่างกันและกิ่งของเซลล์ (white arrows) ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ (muscle-Mu), อวัยวะสืบพันธุ์ (รูป E, F) ส่วนอวัยวะอื่นๆ เช่น bladder (BI), caecum (Ca) ไม่พบการติดสียกเว้นบริเวณ caecal epithelium และเศษอาหารภายใน จะพบการติดสีค่อนข้างเข้ม นอกจากนั้นที่บริเวณขอบของชั้นผิว (black arrows) จะพบการติดสีค่อนข้างจาง (Sp-spine; Vg-vitelline gland)

รูปที่ 1.6-12 ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM แสดงการย้อมใน thin sections ของเนื้อเยื่อพยาธิที่ฝังในพลาสติก Aradite CY โดย MoAb ต่อ FABP ตามด้วย biotinylated rabbit anti mouse IgG และ streptavidin gold แสดงการกระจายของ gold particles

A-D) Thin sections ของเนื้อเยื่อ parenchyma ในพยาธิตัวเต็มวัย แสดงการกระจายของ gold particles (ลูกศร) ใน cytoplasm ของเซลล์ parenchymal ชนิดที่ 2 (Pc_2) แต่

ไม่ปรากฏในเซลล์ parenchymal ชนิดที่ 1 (Pc_1) และชนิดที่ 3 (Pc_3) (Nu-nucleus, mi-mitochondria, Bl-bladder)

E) Thin section แสดง gold particles สะสมที่ cytoplasmic processes ของเซลล์ Pc_2 โดยเฉพาะตรงบริเวณที่ล้อมรอบ frame cell (ci-cilia of frame cell)

F) ภาพ TEM กำลังขยายสูงแสดง การกระจายของ gold particles ทั่วทั้ง cytoplasm ของเซลล์ Pc_2 ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ (mu-muscle cells) ที่ต่อมาจากชั้นผิวของพยาธิ

- รูปที่ 1.6-13 A-C) ภาพ semithin section ของส่วนตัดลำตัวพยาธิตัวเต็มวัยย้อมด้วย methylene blue แสดงการเรียงตัวตามลำดับจากด้านนอกเข้าไปด้านใน คือ ชั้นผิว (Te), ชั้นกล้ามเนื้อ (muscle) และ parenchyma ทั้ง 3 ชนิด (Pc_1 , Pc_2 และ Pc_3)
- D) ภาพ semithin section ของส่วนตัดลำตัวพยาธิตัวเต็มวัยย้อมด้วยสี PAS แสดง positive staining ที่ เซลล์ parenchyma (Pc) และแสดงการเรียงตัวของเซลล์ parenchyma ที่มี cytoplasmic process แทรกอยู่ระหว่างอวัยวะต่างๆ ของพยาธิ เช่น testis (Ti), caecum (Ce) และ Bladder (Bl)

- รูปที่ 1.6-14 A) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำ เซลล์ Pc_1 แสดงนิวเคลียสกลมใหญ่ ประกอบด้วย euchromatin เกือบทั้งหมด มี heterochromatin ขนาดเล็ก กระจายทั่วไป ไซโตพลาสซึมโปร่งแสงอิลเลคตรอน organelles มีอยู่น้อยมาก
- B) ภาพ TEM กำลังขยายปานกลางของเซลล์ Pc_1 แสดงไซโตพลาสซึมโปร่งแสงอิลเลคตรอน มีเซลล์ Pc_2 ซึ่งภายในบรรจุไมโทคอนเดรียจำนวนมากกระจายทั่วทั้งเซลล์
- C) ภาพเซลล์ Pc_1 ในกำลังขยายสูงแสดงบริเวณกรอบเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ls) ที่หุ้มรอบเซลล์และต่อกับบริเวณของ gap junction (gj) ที่เชื่อมระหว่างเซลล์ Pc_1 กับเซลล์ข้างเคียง
- D) ภาพเซลล์ Pc_1 และ Pc_2 ในกำลังขยายสูง แสดงภายในไซโตพลาสซึมของ Pc_1 ซึ่งมีไกลโคเจน (glycogen-gly) สะสมอยู่เป็นจำนวนมากในบางเซลล์ ส่วนเซลล์ Pc_2 มีไมโทคอนเดรีย (mi) และก้อนไกลโคเจนกระจายอยู่ประปราย

- รูปที่ 1.6-15 A) ภาพเซลล์ Pc_2 แสดง นิวเคลียส (Nu) มีขอบหยัก ประกอบด้วย นิวคลีโอลัสเด่น มี euchromatin เกือบทั้งหมด ไซโตพลาสซึมมีลักษณะเนื้อโปร่งใส มีไมโทคอนเดรียจำนวนมาก

B) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำแสดงเซลล์ Pc_2 แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ (μ) ที่ต่อมาจากชั้นผิว

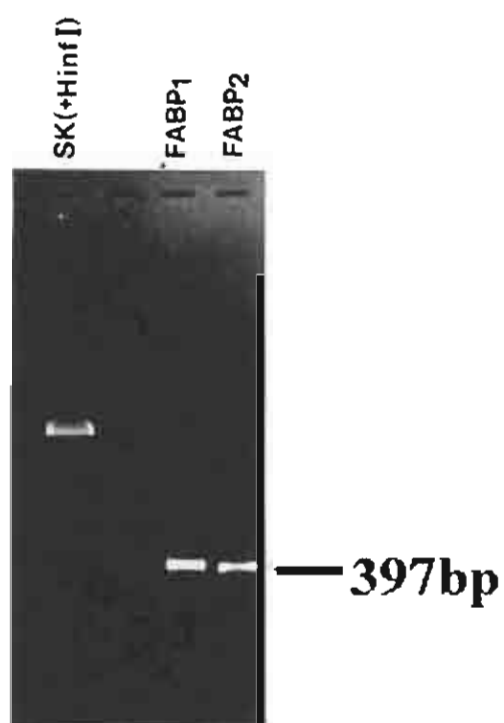
C-E) ภาพ TEM กำลังขยายใหญ่ เซลล์ Pc_2 แสดงส่วนประกอบภายในไซโตพลาสซึม มีไมโทคอนเดรีย (mi) บรรจุอยู่หนาแน่น โดยระหว่างไมโทคอนเดรียจะมี autophagic vacuoles (Av) กระจายอยู่ทั่วไป และภาพ

F) ภาพ TEM กำลังขยายใหญ่แสดงก้อน lipid droplets (Lp) ขนาดใหญ่บรรจุอยู่ มีไมโทคอนเดรียอยู่ล้อมรอบ

- รูปที่ 1.6-16** A) ภาพเซลล์ Pc_3 แสดงนิวเคลียส (Nu) กลม ใหญ่ นิวคลีโอลัสเด่น มี euchromatin เป็นส่วนใหญ่ และมี heterochromatin ขนาดกลางอยู่ประปราย ไซโตพลาสซึมทึบแสง อีเลคตรอน เนื่องจากมีไมโทคอนเดรีย (mi) อยู่หนาแน่นมาก
- B-D) ภาพ TEM ของเซลล์ Pc_3 แสดงไซโตพลาสซึมเนื้อแน่นทึบแสงอีเลคตรอน ภายในมีไมโทคอนเดรียจำนวนมากอยู่อย่างหนาแน่น มี golgi complexes (Gc) และ granules และพบ rough endoplasmic reticulum (rer) กระจายอยู่ทั่วไป
- E-F) ภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ Pc_3 แสดงเส้นใยละเอียด (Is) เกาะติดขอบเยื่อหุ้มเซลล์และล้อมรอบเซลล์ Pc_3 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับที่พบใน เซลล์ Pc_1 และ Pc_2

- รูปที่ 1.6-17** A) ภาพแสดงผลจากการทำ PCR (PCR product) ที่ตำแหน่ง 456 bp (lane 2, 3) ตรวจสอบใน 1% Agarose gel (lane 1: 100 bp marker)
- B) ภาพแสดงผลการเตรียม FABPcDNA ใน pGEMTEasy vector ซึ่งตัด (double digest) ด้วยเอนไซม์ *Xho* I และ *Sal* I (lane 1: λ DNA marker ที่เตรียมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hind*III; lane 2, 3, 6: pGEMTEasy vector + FABPcDNA; lane 4, 5: FABPcDNA in pGEMTEasy vector ที่ตรวจโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho* I และ *Sal* I; lane 7: 100 bp marker)
- C) ภาพ Agarose gel แสดงผลการตรวจสอบ insert DNA หลังจากการทำ ligation เข้าพลาสมิด pCI แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Xho* I และ *Sal* I (lane 1: λ DNA marker ที่เตรียมจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Pst* I; lane 2: พลาสมิด pCI; lane 3: FABPcDNA ที่อยู่ในพลาสมิด pCI; lane 4: FABPcDNA ที่อยู่ในพลาสมิด pCI แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Xho* I และ *Sal* I)

- รูปที่ 1.6-18 ภาพแผนภูมิแท่งแสดงจำนวนพยาธิ *F. gigantea* ที่มีชีวิตรอดในหนูทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนของยีน FABP (กลุ่มที่ 7 ฉีดแบบ intradermal, กลุ่มที่ 8 ฉีดแบบ intramuscular) โดยเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ 1-หนูที่ไม่ได้รับการฉีดสารใดๆและไม่ได้รับการติดเชื้อพยาธิ; กลุ่มที่ 2- หนูที่ไม่ได้รับการฉีดสารแต่ได้รับการติดเชื้อพยาธิ; กลุ่มที่ 3- หนูที่ได้รับการฉีดด้วยพลาสมิด pCI แบบ intradermal; กลุ่มที่ 4- หนูที่ได้รับการฉีดด้วยพลาสมิด pCI แบบ intramuscular; กลุ่มที่ 5- หนูที่ได้รับการฉีดด้วย TE buffer แบบ intradermal; กลุ่มที่ 6- หนูที่ได้รับการฉีดด้วย TE buffer แบบ intramuscular
- รูปที่ 1.6-19 ภาพถ่ายดับหนูทดลองแสดงพยาธิสภาพในระดับต่างๆ หลังจากได้รับการฉีดวัคซีนและทำการติดเชื้อพยาธินาน 4 สัปดาห์
- A, B) ภาพถ่ายดับของหนูปกติที่ไม่ได้รับการฉีดสารและป้อนเชื้อพยาธิแสดง ระดับ 0 ซึ่งไม่พบความผิดปกติใดๆ ที่ดับ
- C, D) ภาพถ่ายดับหนูทดลองที่ได้รับการฉีดสารและติดเชื้อแสดงพยาธิสภาพ ระดับ 1 ซึ่งพบพยาธิสภาพเห็น migratory tract (m) ที่ส่วนปลายของดับ
- E, F) ภาพถ่ายดับหนูทดลองที่ได้รับการฉีดสารและติดเชื้อแสดงพยาธิสภาพ ระดับ 2 พบว่า migratory tract (m) มีขนาดใหญ่ขึ้นและกระจายมากขึ้นบนดับ
- G, H) ภาพถ่ายดับหนูทดลองที่ติดเชื้อแสดงพยาธิสภาพ ระดับ 3 โดยจะพบ migratory tract (m) ทุกพูของดับ มีแผ่นหนองปกคลุมที่ผิวดับ (fibrinopurulent exudate-f) และพบการเชื่อมติดกันของดับและกระบังลม (Diaphragm-D)



Q9UAS2	1	-MADEVGSWRYGDSSENMEAYLKKLGISSDMVDKILNAKPEFTFTLEGN-QMTIKMVSSLR
AAB06722	1	H.....IV.....K.....
Fh15	1	H.....IV.....K.....
CAB65015	1	..N.....LEQ....D.V.Q....NVIKRL.TSS...I.....K.M.T.A..
Q7M4G1	1	..N.....LEH....DGVW.A..VP.....AR.E....E.....K.....
Q9U1G6	1	..N.....LEQ....D.V.Q....NVIKRL.TSS...I.....K.M.T.A..
P29498	1	..SS.L.K..LSE.H..ED.VMS..V.WATRQIGNTVT.TV...MD.D.K..MLTE.TF.
O45035	1	..SS.L.K..LSE.H..ED.VMS..V.WPIRQMGNTVT.TV...MD.D.T..MLTE.TF.
Q02970	1	..EAL.T..MEK..GFDKIMER..VDFVTRKMGNLV..NLIV.DL.GGKYMRSE.TF.
NP_077076	1	MADA..T..LV..K.FDD.M.S..VGFATRQVASMT..TTIEKN.D.TI...TH.TF.
P02693	1	..MADST..VDRN..Y.KEME.M..NVVKRLGAHDNLKL.I.Q....KF.V.ES.NFR
NP_001434	1	..MS.S.K.TQSQ..F..EM.AI.LPEELIQ.GKDI.GVSEIVQN.K.HFKETITAGS.
P12104	1	..MADST..VDR..YDKEME.M.VNIVKRLAHDNLKL.I.Q....KF.V.ES.AFR
Q9UAS2	59	TKITFTFOEFPREETADCKTAMT.VTKDSESKMTQVTTGPE-YTHVREVVGDKMIAT
AAB06722	53	E..P..KV..K.....IK.....CI.E.....
Fh15	59	E..P..KV..K.....IK.....CI.E.....
CAB65015	59	TVIS.....R.V..E....D..IS..QKC..N.....T.G....
Q7M4G1	58	..T.....D..F..NR.V.S....N.I..QK....H...I....T.G....VI.
Q9U1G6	59	TVIS.....R.V..E....D..IS..QKC..N.....T.G....
P29498	59	NLSC..K...D.K.S..RNVKSV.E.N....L..TQVD.K.N..VI...D..T.KT.
O45035	59	NLSV..K...D.K.S..RNVKSV.....I..TQKDAK.N..VI...I..T.KT.
Q02970	60	TECS.KL..K..V.P.SREVASLI.VEN-GV.KHEQDDKT.KV.YIE.V.E.NELK..
NP_077076	60	NTEIS..QL.V..D.V..DRNVKSV..L.G-G.LVH.QKWDG.QE.TLT..LSDG..L.L.
P02693	58	NIDVV..ELVD..AYSL..TELTG.W.MEGNKLVGKFKRVDNGKELIA..IS.NEL.Q.
NP_001434	58	VIQNE..V..CEL..MT..EKVK.V..QLEGDN.LVTTFKNIK.----S..T.LN..IITN.
P12104	58	NIEVV..ELVT..NYNL..TELRG..WSLEGNKLGKFKRTDNGNEINT..II..ELVQ.
Q9UAS2	118	WTVGDVKAIVTLLKA- 132
AAB06722	112	 126
Fh15	118	 132
CAB65015	118	V.....NNYH.V. 132
Q7M4G1	117	I.....N..R.M. 121
Q9U1G6	118	V.....NNYH.V. 132
P29498	118	V.....T.IRNYKRLS 133
O45035	118	V.....T.IRNYKRL. 132
Q02970	118	VK..DE.VC.R.YS.VA 133
NP_077076	118	L.H.N.VSTR.YE.EA 133
P02693	118	Y.YEG.E.KRIEK.E. 132
NP_001434	113	M.L..IVFKRISKRI. 127
P12104	118	YVYEG.E.KRIEK.D. 132

Sequence Identity Matrix

[illegible]

