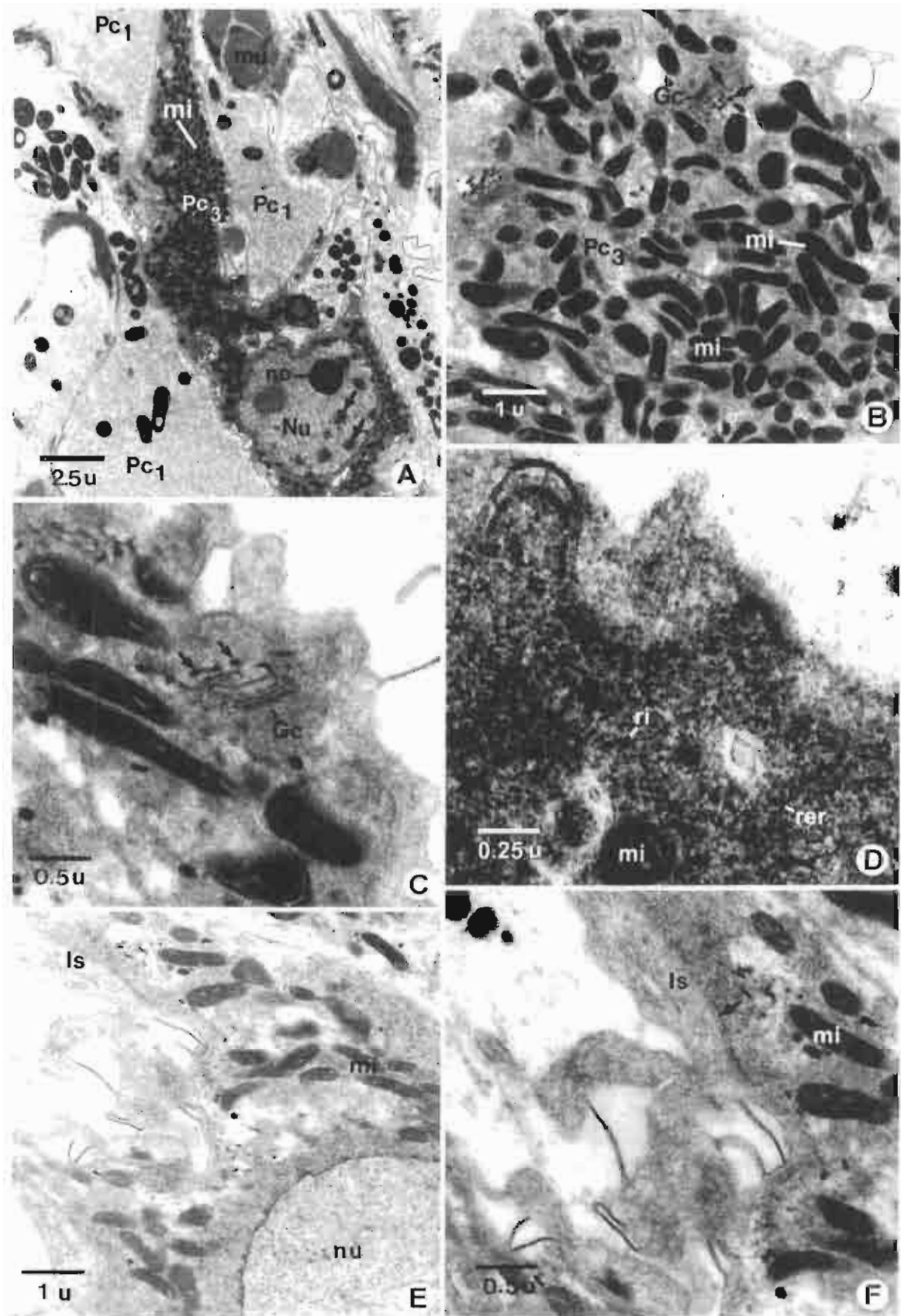
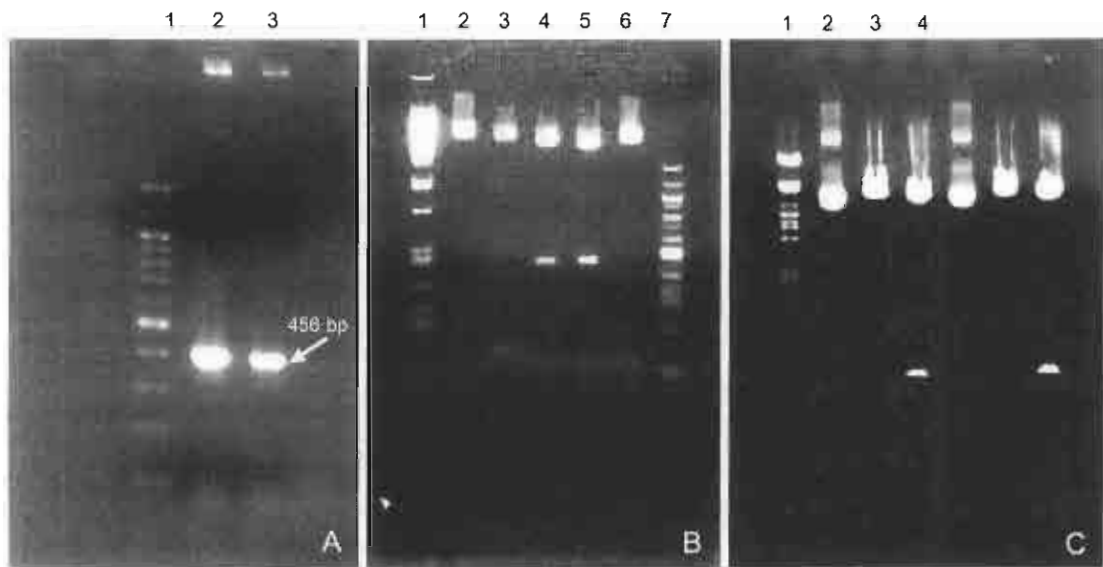
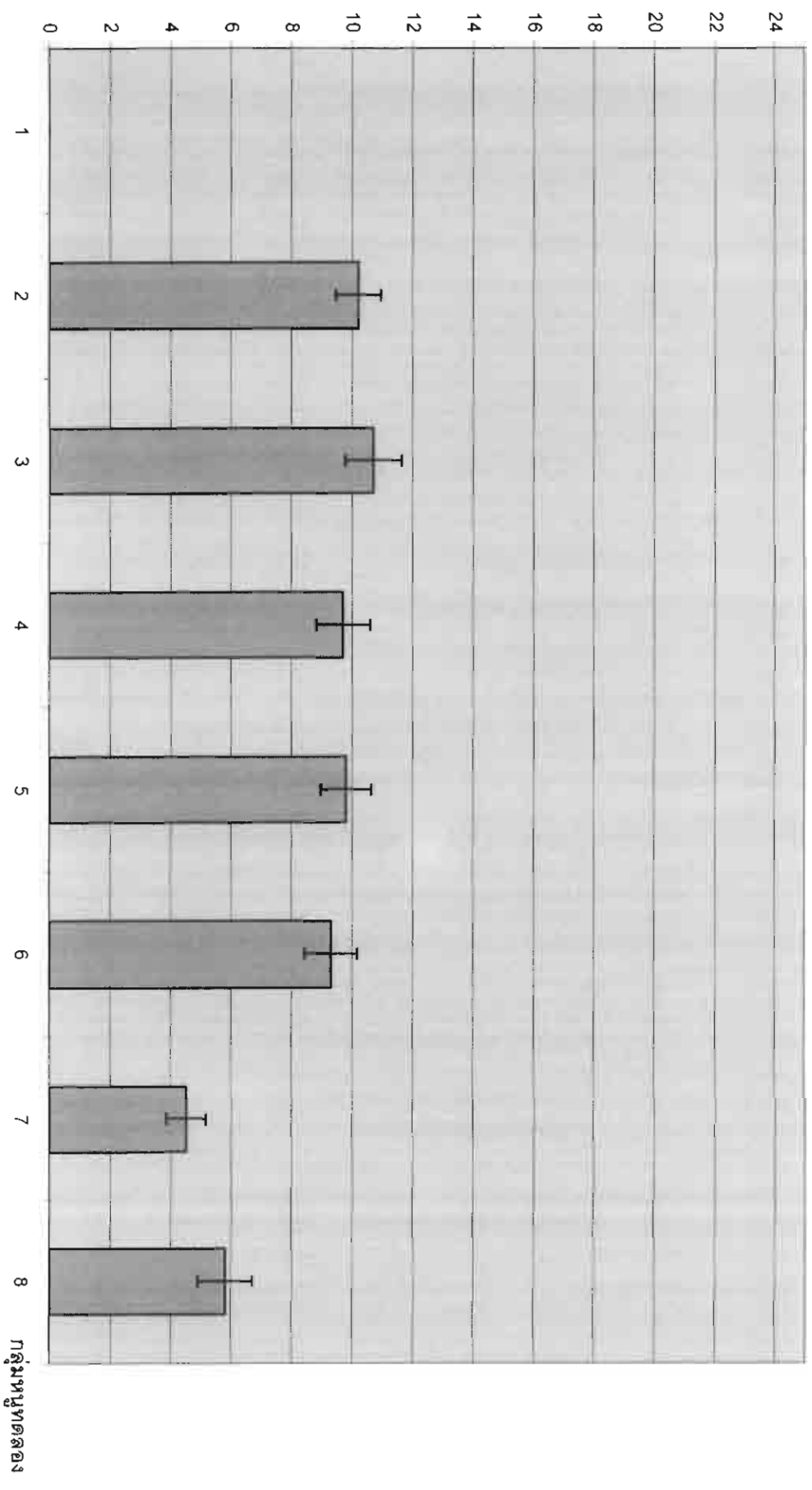


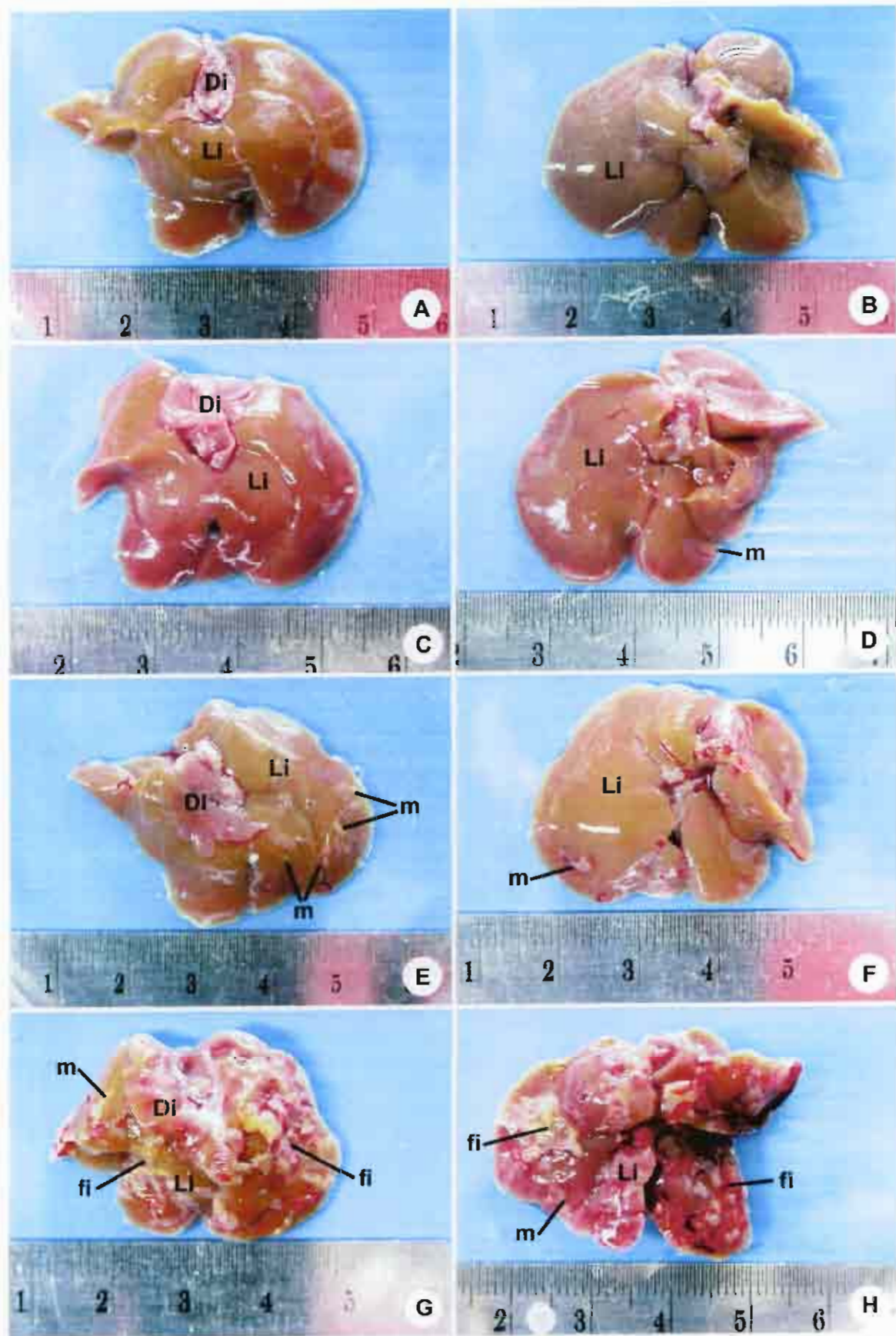




รูปที่ 1.6-18

ค่าเฉลี่ยจำนวนพยาธิสภาพที่ได้จากตับของหนูเมาส์ในแต่ละกลุ่มทดลอง





1.7. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ และการกระจายของโปรตีน 14-3-3

1.7.1. การตรวจหา (screen) ยีน 14-3-3 protein ในพยาธิ ไบโม่ในตับ *Fasciola gigantica* โดยใช้ Polyclonal antibody serum (PoAb) ต่อชั้นผิว (tegument)

การผลิต Polyclonal antibody serum ต่อผิวของพยาธิไบโม่ในตับ *F. gigantica*

กระต่าย (New Zealand White Rabbit) ถูกฉีดด้วยโปรตีนที่สกัดจากผิวของพยาธิ (tegumental extract, TA) โดยนำมาผสมกับ complete Freund adjuvant หลังจากนั้น จึงฉีดกระตุ้นซ้ำ 2 ครั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 7 โดยใช้ปริมาณโปรตีน เท่าเดิมผสมกับ incomplete Freund adjuvant ต่อมาในสัปดาห์ที่ 8 จึงมีการเก็บ serum เพื่อนำมาวิเคราะห์ และใช้ในการทดลองต่อไป

การ immobilize bacteriophage จาก adult cDNA library บน nitrocellulose membrane

Colony เดี่ยวของแบคทีเรีย XL1-BLUE ถูกทำให้เพิ่มจำนวนใน 15 ml LB/maltose/MgSO₄ broth และ incubate พร้อมทั้งเขย่าที่ 37°C นาน 1 คืน จนกระทั่ง colony มีจำนวนเพิ่มขึ้นโดยวัดจาก OD₆₀₀ มีค่าประมาณ 0.8-1.0 หลังจากนั้นจึงนำแบคทีเรียไปปั่นที่ 5000 rpm นาน 5 นาทีเพื่อตกตะกอน แล้วนำกลุ่มตะกอนแบคทีเรีย (bacteria pellet) ผสมกับ 10 mM MgSO₄ โดยให้ได้ค่า OD₆₀₀ มีประมาณ 0.5 ขณะที่ bacteriophage ของ cDNA libraries ของพยาธิในระยะตัวเต็มวัย จะถูกนำมาผสมรวมกับ 600 ไมโครลิตรของ XL1-Blue culture ที่ได้จากขั้นตอนแรกเพื่อให้ได้ bacteriophage ประมาณ 50000 pfu ต่อ plate สารผสม (mixture) ที่ได้นี้ถูกนำมา incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที ก่อนที่จะ ผสมกับ 7.5 มิลลิลิตรของ LB top agarose และเทอย่างรวดเร็วจนลงบน LB/Mg SO₄ plate หลังจากนั้น bacteriophage จะเจริญเติบโตที่ 37°C จนกระทั่งได้ plaques ที่ขึ้นขยายใหญ่ ประมาณ 8-10 ชั่วโมง แล้วจึงนำ nitrocellulose ที่เคลือบด้วย IPTG มาวางบน plate เพื่อดูด ซับ bacteriophage เหล่านั้น ประมาณ 3.5 ชั่วโมงที่ 37°C หลังจากนั้นแผ่น nitrocellulose ที่มี bacteriophages เกาะอยู่นั้นจะถูกนำมาแช่ในสารละลาย TBST ที่ประกอบด้วย 20mM Tris-HCL (pH 7.5), 150 mM NaCL และ 0.05% Tween 20 ประมาณ 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้น จะนำไป incubate กับสารละลายสำหรับ blocking ที่ประกอบด้วย 1% Bovine serum albumin ใน TBS

การ incubate สาร polyclonal antibody rabbit serum และ alkaline phosphatase

หลังจาก incubate แผ่น nitrocellulose กับ blocking solution แล้ว แผ่น nitrocellulose ถูกนำไป incubate กับ rabbit serum ที่มี polyclonal antibody ใน blocking solutions ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น แผ่น nitrocellulose ถูกล้างด้วย TBST เป็นเวลา 5 นาที 5 ครั้ง แล้วแผ่น nitrocellulose ที่ได้ถูกนำไป incubate กับ alkaline phosphatase (AP)-conjugated antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่น nitrocellulose ไปล้างด้วย TBST อีกครั้ง เป็นเวลา 5 นาที 5 ครั้ง หลังจากนั้นล้างด้วย TBS เท่านั้นเพื่อกำจัด Tween 20 ที่เป็นส่วนเกินออก ขณะเดียวกันก็เตรียม สารละลาย NBT-BCIP

ใน color development solution ที่ประกอบด้วย 0.03 mg/ml NBT, 0.15% mg/ml BCIP , 100mM Tris-HCl (pH 9.5), 100mM NaCl, และ 5 mM $MgCl_2$ ในที่มีด หลังจากนั้นจึงนำสารละลาย NBT-BCIP มาราดบนแผ่น nitrocellulose แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาจนกระทั่งพบ positive clones ปรากฏขึ้น positive clone ที่ได้แต่ละตัวจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับ กลุ่มของ control ซึ่งใช้ normal rabbit serum เป็นตัวตรวจจับ หลังจากนั้นชุด positive clones ที่ไม่พบในกลุ่ม normal rabbit serum ออกมาจาก plate แล้วนำมา incubate ใน SM หรือ lambda elution buffer ที่ 4°C นาน 1 คืน ทั้งหมดที่กล่าว ข้างต้นเป็นการทำ primary screening หลังจากนั้นเราได้ทำ secondary and tertiary screening ตามลำดับ โดยการกระทำเหมือนกับ primary screening แต่ใช้ plates ขนาดเล็กกว่าและได้ plaques เดียวๆขึ้นมา

การเปลี่ยน λ TriplEx2 bacteriophage เป็น pTriplEx2 plasmid ด้วยวิธี *in vivo* excision

E. coli BM25.8 ถูกนำมาใช้ในขั้นตอนนี้โดยการนำแบคทีเรียที่เป็น colony เดียวๆ มาใส่ใน LB medium 10 มิลลิลิตร ที่ 31°C เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นแบคทีเรีย เหล่านี้ถูกผสมรวมกับ 1 M $MgCl_2$ และ 150 ไมโครลิตร eluted positive clone แล้วนำมา incubate ที่ 31°C นาน 30 นาที หลังจากนั้นเติม LB broth ลงไปใน mixture และ incubate โดยการเขย่าต่ออีก 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ cell suspension จำนวน 1-10 ไมโครลิตร ราดลงบน LB/carbenicillin plate และ incubate ที่ 31°C เป็นเวลา 1 คืน

การ sequence และวิเคราะห์ผล

สกัด pTriplEx2 plasmid จาก แต่ละ colony ของ *E. coli* BM 25.8 แล้วนำ plasmid ที่ได้ไป วิเคราะห์หา sequence ที่ MWG AG Biotech ประเทศเยอรมันนี นำ sequences มา เรียงเพื่อ เปรียบเทียบโดยใช้ BLAST, Clustral W, และ PAUP program

จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าชิ้นส่วนของ DNA ที่ได้ตรงกับยีน 14-3-3 protein อยู่ในกลุ่มของ zeta isoform โดยแสดงลำดับที่สมบูรณ์ของกรดอะมิโนโดยพบกรดอะมิโน เริ่มต้นที่ตำแหน่งแรกเป็น methionine และตำแหน่งสุดท้ายของยีนนี้ โดยมีความยาวของ open reading frame ที่ 756 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งโคดสำหรับโปรตีน ที่มีกรดอะมิโน 252 ตัว, มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28.75 kDa และ isoelectric point ประมาณ 4.96 ดังแสดง ในรูปที่ 1.7-1 หลังจากนั้นนำลำดับของ amino acids ที่แปลง มาจาก รหัส DNA ของยีน 14-3-3 protein มาเปรียบเทียบกับหาความเหมือน identity ระหว่างยีนนี้ กับ ยีนชุดเดียวกันใน พยาธิใบไม้ในเลือด Schistosoma โดยแสดงไว้ในตารางที่ 1.7-1 และ 1.7-2 ซึ่งพบว่า ยีน Fg 14-3-3 protein มีค่า identity ที่สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็น พยาธิใบไม้ในเลือด กลุ่ม zeta จะมีค่าความเหมือนของกรดอะมิโน (identity of amino acids) ที่มากกว่า 50 % ซึ่งพบในกลุ่ม *Schistosoma mansoni* protein 1 ประมาณ 57%, *Schistosoma japonicum* protein1 (56%), *Schistosoma mansoni* protein 2 (55%) ขณะที่ส่วนของพยาธิใบไม้ใน เลือดในกลุ่ม epsilon จะมี identity ที่ต่ำกว่า 50% ซึ่งประกอบด้วย *Schistosoma japonicum* epsilon, และ epsilon 1,

Schistosoma mansoni epsilon 2 มีค่าความเหมือน (identity matrix) ประมาณ 49-45% ดังแสดงในตารางที่ 1.7-1

ตารางที่ 1.7-1 Identity matrix ของ Fg 14-3-36 protein เปรียบเทียบกับยีน 14-3-3 protein ใน *Schistosoma* spp.

Seq	Fg14	Sm-pr2	Sj-pr1	Sm-pr1	Sj-ep	Sm-ep2	Sm-ep
Fg	1.000	0.552	0.562	0.576	0.492	0.488	0.454
Sm-pr2		1.000	0.517	0.521	0.482	0.494	0.511
Sj-pr1			1.000	0.685	0.469	0.492	0.473
Sm-pr1				1.000	0.509	0.505	0.492
Sj-ep					1.000	0.664	0.521
Sm-ep2						1.000	0.561
Sm-ep							1.000

ตารางที่ 1.7-2 Identity matrix ของ Fg 14-3-3 protein เปรียบเทียบกับยีน 14-3-3 protein ใน กลุ่ม zeta isoform ของแต่ละ species

Seq	Fg	Sm-prot1	Sj-prot1	Ce-prot2	Dm-zeta	Mm-zeta	Rn-zeta	Bt-zeta	Hs-zeta
Fg	1.0000	56.0785	56.2500	56.5738	56.4001	57.4899	57.8948	58.2996	55.4656
Sm-prot1		1.0000	67.9688	60.3217	61.2001	60.7288	60.7288	61.1337	58.7045
Sj-prot1			1.0000	60.7143	62.000	60.7288	61.1337	61.5385	59.1094
Ce-prot2				1.0000	76.4000	75.7086	75.3037	76.1134	73.6843
Dm-zeta					1.0000	80.5669	80.9717	80.9717	78.9474
Mm-zeta						1.0000	97.9758	97.5709	93.5223
Rn-zeta							1.0000	97.9758	93.9272
Bt-zeta								1.0000	94.3320
Hs-zeta									1.0000

จากการเปรียบเทียบลำดับความเหมือนของกรดอะมิโน (identity matrix) ของยีน 14-3-3 protein ในพยาธิใบไม้ในตับกับทุกๆ species ใน GeneBank และ Swiss-Prot โดยใช้ โปรแกรม ClustalW พบว่า กรดอะมิโนของยีน 14-3-3 protein มีลักษณะ conserve สูง เมื่อ เปรียบเทียบกับ species อื่นๆ

โดยเฉพาะ วัว (Bovine, identity 58%), หนู (เมาส์ และ แรท, identity 57%), กลุ่มของพยาธิใบไม้ในเลือด (*Schistosoma mansoni* protein1 และ *Schistosoma japonicum* protein1) พบ identity 56% เท่ากับกลุ่มของ แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) และ *Caenorhabditis elegans* ขณะที่เมื่อเทียบกับมนุษย์มี identity ประมาณ 55% (ตารางที่ 1.7-2)

ในกลุ่มพยาธิใบไม้ในเลือด (*Schistosoma mansoni* protein1 และ *Schistosoma japonicum* protein1) มีลำดับกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงกับวัว, หนู, แมลงหวี่ และ *C. elegans* มากกว่า 60% โดยเฉพาะในกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ประกอบไปด้วย หนูเมาส์ และ หนูแรท , วัว และ มนุษย์ จะมี identity ของกรดอะมิโนที่มากกว่า 93 % ซึ่งสรุปได้ว่ายีน 14-3-3 protein ค่อนข้างมีการอนุรักษ์สูงในสัตว์ที่มีวิวัฒนาการสูง

เมื่อวิเคราะห์ phylogenic tree พบว่ายีน 14-3-3 protein ของ *Fasciola gigantica* อยู่ในกลุ่มของ zeta isoform โดยมี identity ที่ใกล้เคียงกับ *Schistosoma mansoni* protein1 และ *Schistosoma japonicum* protein1 ซึ่งภายในกลุ่ม zeta isoform ยังประกอบด้วยยีน 14-3-3 จาก species ต่างๆ เช่น แมลงหวี่ (*D. melanogaster*), *C. elegans*, หนูเมาส์ และ หนูแรท, วัว, มนุษย์ นอกจากนั้นยังพบว่า ยีน 14-3-3 protein ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วย 7 isoforms คือกลุ่ม eta, gamma, beta, sigma, theta, zeta และ epsilon isoforms (รูปที่ 1.7-2)

1.7.2 การหาขนาด mRNA gene transcript ของยีน 14-3-3 protein ในพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* โดยวิธี Northern blot

สกัด Total RNA ของพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* ด้วยการ homogenize พยาธิ ตัวเต็มวัยในสารละลาย Trizol (life Technologies) และ chloroform แล้วตกตะกอนด้วยสาร isopropanol จากนั้น total RNA จะถูกนำมาแยกตามขนาดใน 1.2% agarose gel ละลาย ในสาร 1X MOPS และ 2.2 M formaldehyde และถูก transfer สู่ม้วน nylon โดยวิธี capillary transfer ในสารละลาย 10X SSC จากนั้น RNA ที่เกาะอยู่บนแผ่น nylon จะถูกนำมา อบที่อุณหภูมิ 80°C เพื่อให้สาย RNA ยึดเกาะกับแผ่น nylon ได้แน่นขึ้น ต่อมาจะนำมา hybridize กับ DIG RNA antisense 14-3-3 gene probe ที่อุณหภูมิ 72°C ในสารละลาย hybridization buffer (50% formamide, 5X SSC, 2% blocking reagent (Roche), 0.02% SDS) ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 15 ชั่วโมง แผ่น nylon ที่ถูก hybridize เสร็จแล้วจะถูก นำมาล้างในสารละลาย 2X SSC ผสมกับ 0.1% SDS ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที 2 ครั้ง และตามด้วยการล้างในสารละลาย 0.1X SSC ผสมกับ 0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 15 นาที 2 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อล้างเอา probe ที่ไม่ยึดเกาะกับสาย RNA ที่ complementary กันออก จากนั้นแผ่น nylon จะถูกนำมาแช่ในสารละลาย 1X blocking reagent (Roche) นาน 30 นาทีและในสารละลาย 1X blocking reagent ผสมกับ anti-DIG-Alkaline phosphatase conjugate ในอัตราส่วน 1:5000 นาน 30 นาที แผ่น nylon จะถูกนำมาล้างอีกครั้งเพื่อกำจัด anti-DIG-Alkaline phosphatase conjugate ที่ไม่เกาะกับ probe ออก ด้วยสารละลาย

ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย Maleic acid (1M Maleic acid, 0.15 M NaCl) ผสมกับ 0.3% Tween 20 เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง สุดท้ายแผ่น nylon จะถูกกระตุ้นให้เกิดสีในสารละลาย Nitroblue tetrazolium salt (NBT)/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)

ผลการศึกษาพบว่า mRNA probe ยึดเกาะกับ gene transcript ที่มีขนาดประมาณ 1.25 kb โดย hybridize ที่อุณหภูมิสูงๆซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่า mRNA probe ของ ยีน 14-3-3 ที่ใช้มีความจำเพาะสูง ต่อ RNA ของพยาธิใบไม้ในตับ และจากรูปที่ 1.7-1 ซึ่งแสดงยีน Fg 14-3-3 ที่พบจาก cDNA library of adult *F. gigantica* มีลักษณะเป็น complete sequence ประมาณ 756 bp ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่า ประมาณ 500 bp น่าจะเป็นส่วนของปลาย 3' และส่วนของ poly (A)⁺ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออก ของยีน Fg 14-3-3 protein ในระยะ พยาธิตัวอ่อน (4 week juvenile worms) ใกล้เคียงกับพยาธิตัวเต็ม วัยดังแสดงในรูปที่ 1.7-3

1.7.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน 14-3-3 ในพยาธิใบไม้ในตับโดยวิธี *in situ* hybridization

การวิเคราะห์ตำแหน่งของการแสดงออกของยีนทั้งสองในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ใน ตับ *F. gigantica* ทำโดยวิธี *in situ* hybridization ซึ่งมีวิธีการย่อยๆคือ นำเนื้อเยื่อพยาธิ ใบไม้ในตับ *F. gigantica* มาทำการ fix ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) กับ 4% paraformaldehyde แล้วจากนั้น จึงทำการ embed ใน paraffin ตัดชิ้นเนื้อหนา 7 ไมโคร เมตร นำ section มา hybridize กับ RNA probe ของยีน 14-3-3 protein ซึ่งถูกสังเคราะห์ ขึ้นโดยวิธี *in vivo* transcription โดยใช้ DIG-RNA labeling kit (Roche) ที่อุณหภูมิ 42°C ใน hybridization buffer (40% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 1X Denhardt's solution, 4X SSC, 10 mM dithiothreitol, 1 mg/ml yeast t-RNA, 1mg/ml denatured and sheared salmon sperm DNA) จากนั้นจึงนำไป incubate ใน anti-DIG alkaline phosphatase (1:1000) นาน 2 ชั่วโมง แล้วใส่ในสารละลาย NBT/BCIP เพื่อทำให้เกิดสี

ผลของ *in situ* hybridization ยีน 14-3-3 มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อ caecal epithelium ของท่อ ทางเดินอาหารของพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* เซลล์ชั้นผิว (tegument) ที่หุ้มผิวนอกของพยาธิ และบุ ผิวในส่วน oral และ ventral sucker, parenchymal cells และเนื้อเยื่อในระบบสืบพันธุ์ของพยาธิเพศผู้ และเพศเมีย ซึ่งได้แก่ เซลล์ vitelline และเซลล์ไข่ ภายใน uterus และเซลล์ spermatocytes ใน testis, sperm ใน cirrus (รูปที่ 1.7-4, 1.7-5, และ 1.7-6)

ในส่วนของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์และตัวอ่อนระยะ newly excysted juvenile การ แสดงออกของยีน 14-3-3 มีลักษณะคล้ายกับที่พบในพยาธิตัวเต็มวัย คือมีการติดสีที่ caecum, parenchymal และเซลล์ชั้นผิว (tegumental cells) และที่ระบบสืบพันธุ์ของพยาธิ ตัวอ่อนของเพศผู้ที่ยัง ไม่พัฒนา (รูปที่ 1.7-7) สรุปได้ว่ายีน 14-3-3 เป็นยีนที่กระจายและแสดง เกือบทุกๆที่ของพยาธิ เนื่องจาก เป็นโปรตีนที่มีความ สำคัญในกระบวนการ cell signalling

1.7.4 การสังเคราะห์ recombinant rFg14-3-3 protein และการผลิตโพลีโคลนัล แอนติบอดีต่อโปรตีนสังเคราะห์

ยีน 14-3-3 ถูกตัดต่อใส่ในพลาสมิด pET-21 a (+) ซึ่งอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-BLUE หลังจากนั้นถูกย้ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 DE3 ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะถูกกระตุ้นให้สร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG หลังจากนั้นแยก rFg 14-3-3 protein ด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และย้อมด้วยสี Coomassie blue

การตัดและต่อยีน 14-3-3 เพื่อใช้ในการผลิต rFg14-3-3 protein ในระบบ Bacterial syst

นำ PCR product ที่มียีน Fg 14-3-3 ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นซึ่งมีส่วนที่ตัดโดยเอนไซม์ *HindIII* และ *NdeI* ประกอบอยู่ที่ส่วนปลายทั้งสองด้านมาต่อในพลาสมิด pET-21 a (+) ที่ถูกตัดโดยใช้เอนไซม์ *HindIII* และ *NdeI* โดยการ ligation ที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 1 คืน ligation product ที่ได้จะถูกนำมาใส่ใน *E. coli* สายพันธุ์ XL1-BLUE.

เตรียมเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-BLUE (competent cells) ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C มาปรับอุณหภูมิเป็น 0 °C แล้วนำ competent cells 100 ไมโครลิตร ใส่ใน falcon tube ขนาด 14 มิลลิลิตรที่มี พลาสมิด pET21a(+) 0.1-0.5 นาโนกรัม ทำการผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 0°C นาน 20 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวมาผ่าน ความร้อน (Heat shock) ที่ 42°C นาน 45 วินาทีแล้วนำมาใส่ใน ภาชนะที่มีน้ำแข็งนาน 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 ต่อมาจึงนำ white colony ไปเพิ่มจำนวนเซลล์, ทำการแยก plasmid โดยการตัดด้วย เอนไซม์ *HindIII* และ *NdeI* หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน rFg 14-3-3 โดย agarose gel.

เมื่อพบ clone ที่มี insert แล้ว จึงนำพลาสมิดนั้นย้ายเข้า *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 DE โดยวิธี electrotransformation เตรียมเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 DE (competent cells) ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C มาปรับอุณหภูมิเป็น 0 °C แล้วนำ competent cells 50 ไมโครลิตร ใส่ใน cuvette ที่มี พลาสมิด pET 21 b(+) ทำการผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นจึงนำ cuvette ใส่ในช่องที่ให้กระแสไฟที่ 2,400 โวลต์ เมื่อครบรอบของ การทำงานแล้ว จึงนำ SOC media ผสมลงไปใน cuvette แล้วย้ายส่วนผสมลงไป ใน Falcon tube แล้ว incubate ที่ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 260 รอบต่อนาทีนาน 1 ชั่วโมงแล้วนำเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวไป plate ลงบน agar plate โดย incubate ที่ อุณหภูมิ 37°C นาน 12 ชั่วโมง

การสังเคราะห์ recombinant protein Fg 14-3-3 (rFg14-3-3 protein)

นำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 DE ที่มีพลาสมิด pET 21 a(+) และ insert rFg 14-3-3 ยีนมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย LB-Ampicillin ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ 37 °C นาน 12 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำ bacterial cell culture มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรแล้วเลี้ยงแบคทีเรียจนกระทั่ง OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5-0.7 หลังจากนั้นจึง กระตุ้นให้เซลล์แบคทีเรียสร้างโปรตีนด้วย 1mM IPTG เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียต่อที่ 37°C นาน 3.5 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาปั่นในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที กลุ่มเซลล์แบคทีเรียที่ตกตะกอนถูกละลายด้วย lysis buffer แล้วเติม Lysozyme จนได้ปริมาตรที่ 1 mg/ml แล้ว incubate ในน้ำแข็งประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นเซลล์จะถูกทำให้แตกโดยใช้ sonicator แล้วจึงนำไปปั่นที่ 16,000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที กลุ่มแบคทีเรียที่ตกตะกอนถูกนำไปละลายใน Binding buffer แล้วทำซ้ำ อีกครั้ง สุดท้ายจึงนำไปละลายใน Binding buffer และ 6M Urea แล้ว incubate ในน้ำแข็ง ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วปั่นอีกครั้งเพื่อแยกเอาส่วนของ supernatant ไปใส่ลงใน Ni-NTA column chromatography เพื่อทำการ purify โปรตีน rFg 14-3-3 โดยการใช้สารละลาย washing buffer และ elution buffer ตามลำดับ หลังจากนั้นโปรตีนที่ได้จะถูกนำไปตรวจ สอบโดย SDS-PAGE แล้วย้อมสีโดย Coomassie blue (รูปที่ 1.7-8) ในแถวที่ 2 (Non-induced, NI) แสดง bacterial cell lysate ที่ยังไม่ได้ถูกกระตุ้นให้มีการสร้าง rFg 14-3-3 protein แต่หลังจากที่กระตุ้นแบคทีเรียโดยใช้ด้วย IPTG เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมงพบว่า แบคทีเรียสามารถสร้าง recombinant 14-3-3 protein โดยแถวที่ 3 แสดงแถบของโปรตีนสะสมอยู่ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 kDa. แถวที่ 4-9 แสดงโปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย ในแต่ละขั้นตอนของการ purify โปรตีนจาก Ni-NTA column โดยใช้ Binding buffer และ Washing buffer พบว่าใน washing ครั้งที่ 1-4 จะไม่เห็นแถบของ rFg 14-3-3 protein ขณะที่ในขั้นตอนสุดท้ายคือการ elute โปรตีนออกมาจาก columns พบว่ามีแถบของ rFg 14-3-3 protein มีขนาดประมาณ 30 kDa ในแถวสุดท้าย (Elution I, EI) ในขณะที่แถวแรกของรูปจะแสดง marker protein ที่ประกอบด้วย 14.4, 18.4, 25, 35, 45, 66.2, และ 116 kDa

1.7.5 การศึกษาการกระจาย rFg 14-3-3 protein โดยวิธี Western Immunoblot และ Immunoperoxidase

การผลิต Polyclonal antibody serum ต่อ rFg 14-3-3 protein

rFg 14-3-3 protein ที่สกัดได้จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดย SDS-PAGE หลังจากนั้น recombinant protein จะถูกแยกตามน้ำหนักโมเลกุล แถบที่มี rFg 14-3-3 protein อยู่จะถูกตัดออกมาแล้วนำไปผสมกับ Complete Freund Adjuvant เพื่อนำไปฉีดได้ผิวหนัง ของกระต่ายทดลอง หลังจากนั้นฉีดซ้ำด้วย rFg 14-3-3 protein ซึ่งผสมกับ Incomplete Freund Adjuvant ในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 หลังจากฉีดครั้งที่ 2 และ 3 ได้หนึ่งสัปดาห์ ทำการเก็บ เลือดกระต่ายเพื่อรวบรวมเป็นเซรัมไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

Immunoblotting

หลังจากแยก rFg14-3-3 และโปรตีนที่สกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยและจากชันผิวด้วย กระบวนการ electrophoresis แล้ว นำ gel มาถ่ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose ใน transfer buffer (Tris-Cl,

Glycine, Methanol, pH 9.2) โดยควบคุมให้กระแสไฟฟ้าที่ใช้ มีความต่างศักย์คงที่ที่ 20 โวลต์ นาน 60 นาที หลังจากนั้นทำการย้อมแผ่น nitrocellulose ด้วย สีย้อม Ponceau S และล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงตัดแผ่น nitrocellulose ออกเป็น strips ตามแต่ละแถวของโปรตีน strips ของโปรตีนต่างๆ เช่น rFg 14-3-3 protein, โปรตีนจากพยาธิตัวเต็มวัย (whole worm extract, WB) โปรตีนจากผิวพยาธิ (tegumental extract, TA) จะถูกนำมาล้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.01M PBS, pH 7.2) แล้วจึง นำมาใส่ในสารละลาย 3% skim milk เพื่อป้องกันการจับตัวระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจง โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้าง ออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วจึงใส่แอนติบอดีจำเพาะ (PoAb α rFg 14-3-3) ที่ dilution 1 : 500 และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น ล้าง strip ด้วย สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้วนำมา incubate กับแอนติบอดีระดับสองที่ติดฉลากด้วย เอนไซม์ (alkaline phosphatase) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เมื่อล้างแอนติบอดีที่ติดฉลากกับเอนไซม์ออกแล้วจึงใส่ซับสเตรท (ส่วนผสมระหว่าง alkaline phosphate buffer และ NBT/BCIP) พบว่า rFg 14-3-3 protein, whole worm extract ตั้งแต่ระยะตัวอ่อน metacercaria, newly excysted juvenile, ตัวอ่อนระยะ 4 และ 7 สัปดาห์ และ ตัวเต็มวัยของ พยาธิใบไม้ในตับ, และ tegumental extract มีแถบจำเพาะที่ถูกจับด้วย PoAb α rFg 14-3-3 ซึ่งแถบลักษณะนี้มี molecular weight ประมาณ 29 kDa ขณะที่ในสารคัดหลั่ง (excretory-secretory antigen) ของพยาธิตัวเต็มวัย มีแถบจำเพาะที่ molecular weight ประมาณ 28 kDa (รูปที่ 1.7-9)

นอกจากนี้ยังพบว่า rFg14-3-3 protein สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการ ติดเชื้อของพยาธิใบไม้ในตับได้ โดยสามารถวัดการติดเชื้อได้เริ่มตั้งแต่ระยะ 2 สัปดาห์แรก ของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับในกระต่าย จนกระทั่ง 10 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ (รูปที่ 1.7-10) ซึ่งแสดงว่าหลังจากติดเชื้อพยาธิมีการเริ่มปล่อยโปรตีน 14-3-3 ออกจากตัวพยาธิวัยอ่อน 2 สัปดาห์จนถึงขั้นตัวเต็มวัยในระดับที่สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ในหนูได้

การศึกษาการกระจายของโปรตีน 14-3-3 ด้วยวิธี immunoperoxidase

นำพยาธิใบไม้ในตับตัวเต็มวัยมา fix ในสารละลายผสม 4% paraformaldehyde จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการ dehydration และการ embed ใน paraffin แล้วจึงทำการตัด section ที่ความหนา 6 μ m นำ section มา deparaffinize ด้วย xylene และทำการ rehydration จากนั้นใส่ในไมโครเวฟเป็นเวลา 5 นาที สามครั้ง และ block nonspecific binding ด้วย 0.3% H₂O₂ กับ normal goat serum อย่างละ 30 นาที จากนั้นนำมา incubate กับแอนติบอดี PoAb α rFg 14-3-3 ตามด้วยแอนติบอดีตัวที่สองคือ HRP-conjugated rabbit antirabbit IgG แล้วทำการย้อมสีด้วยการใส่สารละลาย AEC จนกระทั่งสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา ระหว่าง ซับสเตรตกับ HRP ปรากฏในระดับที่ชัดเจน

ผลการศึกษาในพยาธิตัวเต็มวัย พบว่า แอนติบอดีสามารถแสดงการกระจายของ แอนติเจน 14-3-3 ในส่วนชั้นผิว (tegument) ซึ่งมีความเด่นมาก เนื้อเยื่อ Parenchyma, และ เซลล์เนื้อเยื่อระบบ

สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย เช่น ใน testes, vitelline cells, Mehli's gland และ ovary มีการกระจายของ แอนติเจนดังกล่าวในลักษณะปานกลาง และพบปริมาณน้อยในเนื้อเยื่อ บูดอาหารทางเดินอาหาร ขณะที่ กล้ามเนื้อและนิวเคลียสไม่พบการกระจายของโปรตีน 14-3-3 (รูปที่ 1.7-11 และ 1.7-12) ในพยาธิตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์และตัวอ่อนระยะ metacercaria และ newly excysted juvenile มีการกระจายของ โปรตีน 14-3-3 ลักษณะเหมือนกับในระยะตัวเต็มวัย กล่าวคือ แอนติเจน 14-3-3 กระจายอยู่ทั่วไปใน เนื้อเยื่อพยาธิ และยังคงพบการกระจายที่ชั้นผิวที่มีลักษณะเด่น (tegument) ในส่วนของกล้ามเนื้อ และ นิวเคลียสของเซลล์ทั่วไปไม่ติดสีเลย (รูปที่ 1.7-13 และ 1.7-14)

1.7.6 การผลิตและวิเคราะห์การกระจายของโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) ต่อ 28.5 kDa ของชั้นผิวพยาธิใบไม้ในตับเพื่อตรวจหา (screen) ยีน ที่จำเพาะต่อ ชั้นผิวพยาธิ ใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*

การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) ต่อ 28.5 kDa ของชั้นผิวพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica*

หนู (Balb/C) ถูกฉีดด้วยโปรตีนที่สกัดจากชั้นผิวของพยาธิ (tegumental extract, TA) โดยนำมา ผสมกับ complete Freund adjuvant หลังจากนั้นจึงฉีดกระตุ้นซ้ำ 2 ครั้ง ในสัปดาห์ ที่ 4 และ 7 โดยใช้ ปริมาณโปรตีน เท่าเดิมผสมกับ incomplete Freund adjuvant แล้วคัดเลือกหนูที่แสดงค่า titer ของ แอนติบอดีสูงโดยวิธี ELISA เพื่อนำมาฉีดอีกครั้งทาง intravenous route ด้วยโปรตีนที่สกัดจากชั้นผิว โดยไม่ผสมกับ adjuvant ต่อมาในวันที่ 4 จึงนำม้ามของหนูไปหลอมกับ myeloma cells ด้วยสาร PEG เพื่อผลิตเป็นเซลล์ลูกผสม (hybridoma cells) เซลล์ลูกผสมที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ 28.5 kDa ใน ชั้นผิวพยาธิ จะถูกคัดเลือกโดยวิธี limiting dilution แล้วนำมาเพิ่มจำนวนและวิเคราะห์โดย immunoblotting พบว่า โมโนโคลนัลแอนติบอดีจากเซลล์ hybridoma clone 1C11.1.2 ทำปฏิกิริยากับ แอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28.5 kDa ในพยาธิระยะตัวอ่อน metacercaria, newly excysted juvenile, ตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์, 7 สัปดาห์, พยาธิตัวเต็มวัย และสารสกัดจากชั้นผิวพยาธิตัวเต็มวัย (tegumental antigen) ยกเว้นไม่พบในสารคัดหลั่ง (excretory-secretory antigen) (รูปที่ 1.7-15) นอกจากนี้โมโนโคลนัลแอนติบอดียังแสดงปฏิกิริยาจำเพาะต่อแอนติเจน 28.5 kDa ในพยาธิใบไม้ในตับ (*F. gigantica*) เท่านั้นและไม่ทำปฏิกิริยาต่อแอนติเจนจากพยาธิชนิดอื่นๆ คือ *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. mekongi*, *Eurytrema spp.*, และ *Paramphistomum spp.* (รูปที่ 1.7-16) จากการ ทดสอบด้วยเทคนิค immunoblotting พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดี 28.5 kDa ที่ผลิตได้นั้นมี ความจำเพาะ (genus-specific) ต่อแอนติเจนของ *F. gigantica* ดังนั้น MoAb clone 1C11.1.2 อาจ สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อ (immunodiagnosis) ได้ในอนาคต

การวิเคราะห์หาตำแหน่งการกระจายของแอนติเจน 28.5 kDa ของชั้นผิวพยาธิ ไบไม้ตับ *F. gigantica* โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb)

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) จากเซลล์ hybridoma clone 1C11.1.2 ซึ่งได้พิสูจน์โดยวิธี immunoblotting แล้วว่ามีปฏิกิริยากับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28.5 kDa มาย้อม frozen sections ของพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี immunofluorescence ผลปรากฏว่า มีการติดสีเรืองแสงสีเขียวของแอนติบอดี แสดงว่ามี แอนติเจนชนิดนี้กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมของชั้นผิวพยาธิ กิ่งของเซลล์ชั้นผิว (tegumental processes) ที่แทรกอยู่ระหว่าง เซลล์กล้ามเนื้อและในเซลล์ชั้นผิวพยาธิ (tegumental cells) รวมทั้งยังพบ แอนติเจนในส่วนของ Mehlis' gland , เซลล์ไข่ (ovum) ของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย และเซลล์ prostrate gland ของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ส่วนนิวเคลียสของเซลล์ทั่วไป, หนาม (spine) ในชั้นผิว, เซลล์บุผิวต่อ caecum, เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ในชั้น parenchyma ไม่ติดสี (รูปที่ 1.7-17)

ในพยาธิระยะตัวอ่อน 4 สัปดาห์ พบว่ามีการกระจายของแอนติเจน 28.5 kDa ของสีเรืองแสง คล้ายกับระยะตัวเต็มวัยของพยาธิ ที่บริเวณเซลล์ชั้นผิว (tegumental cells), กิ่งของเซลล์ผิว (tegumental processes) และชั้นผิว (tegument) (รูปที่ 1.7-18) ส่วนในพยาธิระยะ newly excysted juvenile การติดสีเรืองแสงยังคงชัดเจนในชั้นผิว ซึ่งปรากฏเป็นชั้นแคบๆ หุ้มรอบ ตัวพยาธิ (รูปที่ 1.7-19) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ผิว (tegumental cells) ยกเว้น นิวเคลียส ซึ่งปรากฏเป็นสีแดง จากการย้อม ด้วยสี propidium iodide ที่ใช้ย้อมกรดนิวคลีอิก

การตรวจหา (screen) ยีน ที่จำเพาะต่อชั้นผิวพยาธิ ไบไม้ในตับ *Fasciola gigantica* โดยใช้ Monoclonal antibody against 28.5 kDa (MoAb) ต่อชั้นผิว (tegument)

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ได้มาวิเคราะห์หา ยีนโดยใช้วิธี immunoscreening กับ cDNA library ของพยาธิไบไม้ในตับตัวเต็มวัย ดังในวิธี 1.7.1 ที่ใช้ polyclonal antibody serum ผลปรากฏว่าพบ จำนวน positive clones ที่ไม่มีความจำเพาะต่อชั้นผิวพยาธิ อาจมีสาเหตุจาก MoAb 28.5 kDa เป็น single epitope ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่เฉพาะเท่านั้นซึ่งไม่สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ แอนติเจนที่ได้จากการ expression of protein จาก bacteriophage ได้

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.7

- รูปที่ 1.7-1 ลำดับของ nucleotides และ amino acids ของยีน 14-3-3 protein พยาธิใบไม้ตับ
- รูปที่ 1.7-2 Phylogenic Tree แสดงความสัมพันธ์ของยีน Fg 14-3-3 กับยีนเดียวกันใน species อื่น
- รูปที่ 1.7-3 Northern hybridization: A แสดง total RNA (25 ไมโครกรัม) ที่สกัดมาจากพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* ในระยะ ตัวอ่อน 4 สัปดาห์ (หมายเลข 1) และตัวเต็มวัย (หมายเลข 2) และ B แสดงภายหลังการ hybridize ด้วย 14-3-3 RNA probe
- รูปที่ 1.7-4 การกระจายตัวของ 14-3-3 mRNA ในพยาธิใบไม้ในตับตัวเต็มวัย ซึ่งพบที่เซลล์ ของ caecal epithelium (Ca) ของท่อทางเดินอาหาร, parenchyma (Pa), vitelline cells (Vi), เซลล์ผิว (tegumental cells, Tc), tegumental-type epithelial cells ใน ventral sucker (1.7-4D) ยกเว้น กล้ามเนื้อ (Mu) เมื่อเทียบกับ negative control (1.7-4A)
- รูปที่ 1.7-5 การกระจายตัวของ 14-3-3 mRNA ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของพยาธิใบไม้ในตับ ตัวเต็มวัย ซึ่งพบที่เซลล์ของ prostate gland (Pg) และเซลล์ของ testes (Ti)
- รูปที่ 1.7-6 การกระจายตัวของ 14-3-3 mRNA ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของพยาธิใบไม้ ในตับตัวเต็มวัย ซึ่งพบที่เซลล์ของ Mehlis' gland (Mg), เซลล์ vitelline (Vi), ovary (Ov) และ เซลล์ไข่ egg ใน uterus
- รูปที่ 1.7-7 การกระจายตัวของ 14-3-3 mRNA ในตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (77B-D) พบที่เซลล์ของ caecal epithelium (Ca), parenchyma (Pa), เซลล์ผิว (tegumental cells, Tc), tegumental-type epithelial cells ใน oral sucker ยกเว้นที่ nucleus (Nu) spines (Sp) (1.7-7C) ตัวอ่อนระยะ newly excysted juvenile (1.7-7F) แสดงการกระจายตัวของ 14-3-3 mRNA ที่ caecal epithelium (Ca), parenchyma (Pa), เซลล์ผิว (tegumental cells, Tc), และ pharynx (Ph) เมื่อเทียบกับ negative control (1.7-7A, E) โดยใช้ 14-3-3 mRNA sense probe ซึ่งไม่ปรากฏผล
- รูปที่ 1.7-8 แสดง 15% SDS-PAGE ของ bacterial lysate ที่ย้อมสีโดยใช้ Coomassie blue; แถวที่ 1 แสดง marker protein, แถวที่ 2 แสดง bacterial lysate ที่ยังไม่ induce ด้วย IPTG

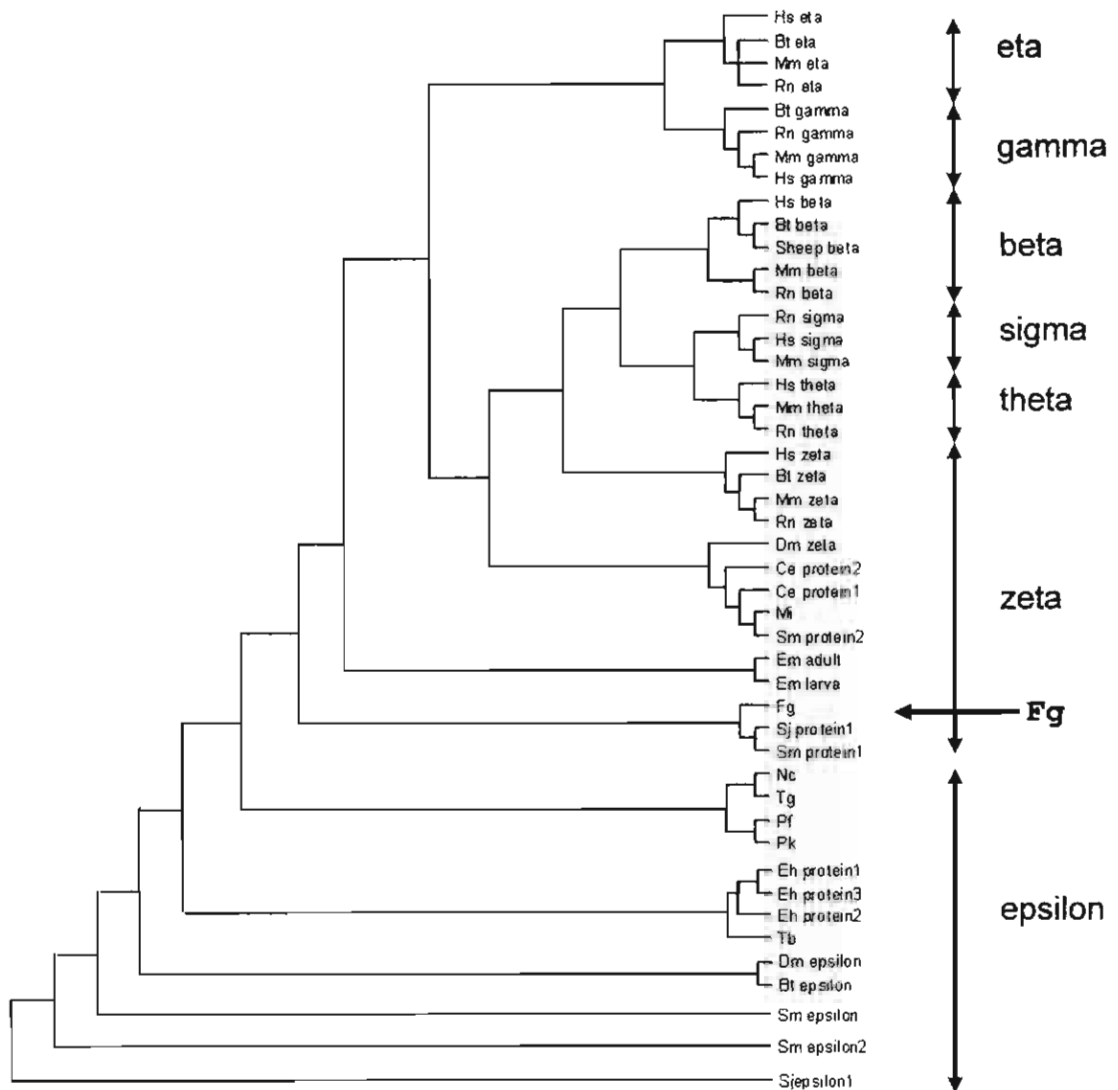
และที่ induce ด้วย IPTG ในแถวที่ 3, แถวที่ 4-10 แสดงการ purify recombinant protein โดยใช้ Ni-NTA column ประกอบด้วย Clear Lysate (CL), Flow through (FT), Washing I (WI), Washing II (WII), Washing III (WIII), Washing IV (WIV) และ Elution I (EI)

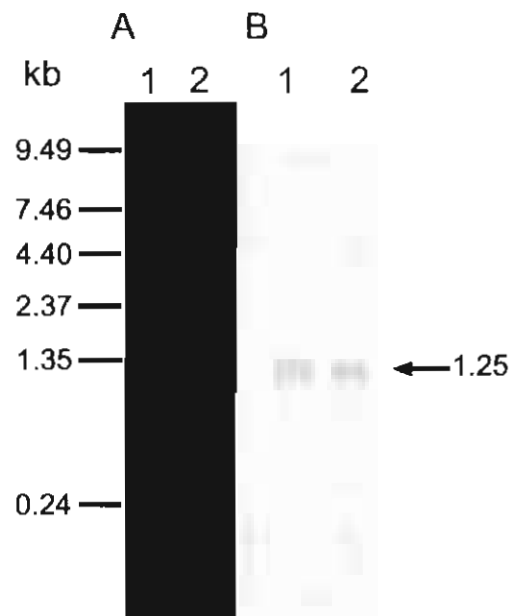
- รูปที่ 1.7-9** Immunoblotting แสดง standard marker proteins (STD), แถวที่ 1-8 แสดงแถบของ native 14-3-3 protein ที่สามารถพบใน ตัวอ่อนระยะ metacercariae (Met), และ newly excysted juvenile (Nej), ตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์ (4wk), 7 สัปดาห์ (7wk), ตัวเต็มวัยของพยาธิ (WB), สารคัดหลั่ง (ES), สารสกัดชั้นผิว (TA) และ rFg 14-3-3 protein โดยการใช้ western blot และ PoAb α rFg 14-3-3
- รูปที่ 1.7-10** Immunoblotting แสดงการใช้ rFg 14-3-3 protein ตรวจสอบ แอนติบอดีในเลือดของ กระจ่ายที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในต้น *F. gigantica* ตั้งแต่ระยะ 2, 5, 7 ถึง 10 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ซึ่งใช้ normal rabbit serum
- รูปที่ 1.7-11** การกระจายตัวของ 14-3-3 protein ในพยาธิใบไม้ในต้นตัวเต็มวัย พบโปรตีน ดังกล่าวที่ ชั้นผิว tegument (Te) และ เซลล์ผิว (tegumental cells, Tc) เด่นมาก, parenchyma (Pa), caecal epithelium (Ca), vitelline cells (Vi), และในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ที่ prostate gland (Pg), seminal vesicle (Se) และ testes (Ti) ยกเว้น กล้ามเนื้อ (Mu) เมื่อเทียบกับ negative control (1.7-11A)
- รูปที่ 1.7-12** การกระจายตัวของ 14-3-3 protein ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของพยาธิใบไม้ในต้นตัวเต็มวัย ซึ่งพบโปรตีนดังกล่าวที่เซลล์ของ Mehlis' gland (Mg), เซลล์ vitelline (Vi), ovary (Ov) และเซลล์ไข่ egg ใน uterus
- รูปที่ 1.7-13** การกระจายตัวของ 14-3-3 protein ในตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ พบโปรตีนดังกล่าว กระจายอยู่ทั่วไปในพยาธิ เช่นที่เซลล์ของ caecal epithelium (Ca), parenchyma (Pa), เซลล์ผิว (tegumental cells, Tc), tegumental-type epithelial cells ใน oral sucker และ ventral sucker (Vs) ยกเว้นที่ nucleus (Nu) และกล้ามเนื้อ (Mu) ซึ่งในรูปนี้ได้ย้อม นิวเคลียสด้วยสี Meyer's hematoxylin

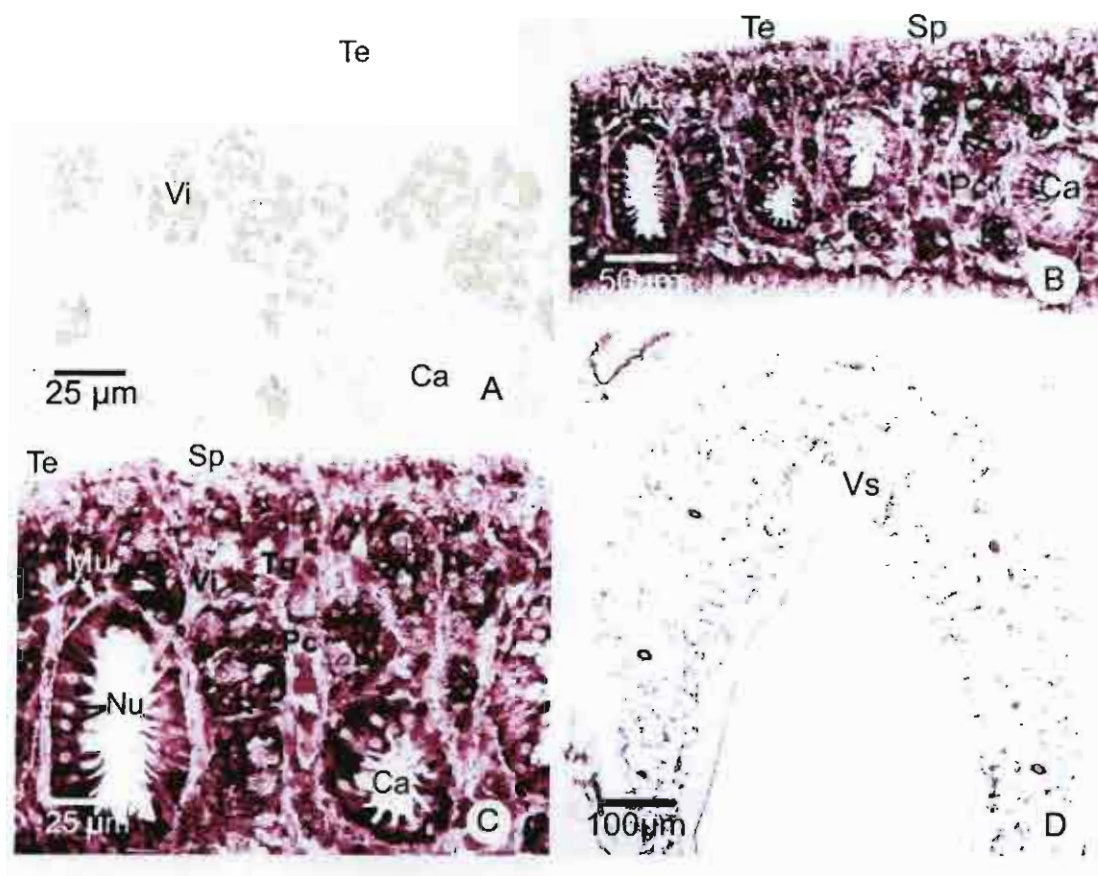
- รูปที่ 1.7-14 การกระจายตัวของ 14-3-3 protein ในตัวอ่อนระยะ metacercaria (1.7-14B, C) และ newly excysted juvenile (1.7-14D) แสดงการกระจายตัวของโปรตีน 14-3-3 อยู่ตลอดทั้งตัวของพยาธิ โดยเฉพาะที่ชั้นผิว (tegument, Te), parenchyma (Pa), และในระดับต่ำที่ caecal epithelium (Ca) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ที่ใช้ normal mice serum
- รูปที่ 1.7-15 Immunoblotting แสดง standard marker proteins (STD), แถวที่ 1-8 แสดงแถบของแอนติเจน 28.5 kDa โดยโมโนโคลนัลแอนติบอดี ที่สามารถพบในตัวอ่อนระยะ metacercariae (Met), และ newly excysted juvenile (Nej), ตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์ (4wk), 7 สัปดาห์ (7wk), ตัวเต็มวัยของพยาธิ (WB), สารสกัดชั้นผิว (TA), ยกเว้น สารคัดหลั่ง (ES) โดยการใช้ western blot และ MoAb
- รูปที่ 1.7-16 Immunoblotting แสดง standard marker proteins (STD), แถวที่ 6 แสดงแถบของแอนติเจน 28.5 kDa โดยโมโนโคลนัลแอนติบอดี (1C11.1.2) เฉพาะใน พยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* (Fg) และไม่พบในพยาธิชนิดอื่น คือ *S. japonicum* (Sj), *S. mansoni* (Sman), *S. mekongi* (Smek), *Eurytrema spp* (Eu), และ *Paramphistomum* (Pa) โดยการใช้ western blot และ MoAb
- รูปที่ 1.7-17 การกระจายตัวของแอนติเจน 28.5 kDa โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี clone 1C11.1.2 ในพยาธิใบไม้ในตับตัวเต็มวัยพบแอนติเจนกระจายตัวอยู่ที่ไซโตพลาสซึมของชั้น ผิว tegument (Te) และ ไซโตพลาสซึมของเซลล์ผิว (cytoplasm of tegumental cells, Tc) ในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย Mehlis' gland (Mg) และ ovary (Ov) และยังพบการกระจาย ตัวของแอนติเจนในตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์ ที่ชั้นผิว tegument (Te) และ เซลล์ผิว (tegumental cells, Tc) ยกเว้นนิวเคลียส
- รูปที่ 1.7-18 การกระจายตัวของแอนติเจน 28.5 kDa โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี clone 1C11.1.2 ในตัวอ่อนระยะ newly excysted juvenile พบที่ชั้นผิว (tegument, Te), และไซโต พลาสซึมของเซลล์ผิว (cytoplasm of tegumental cells, Tc) ขณะที่นิวเคลียสของแต่ละเซลล์ ถูกย้อมด้วยสีแดงของ propidium iodide

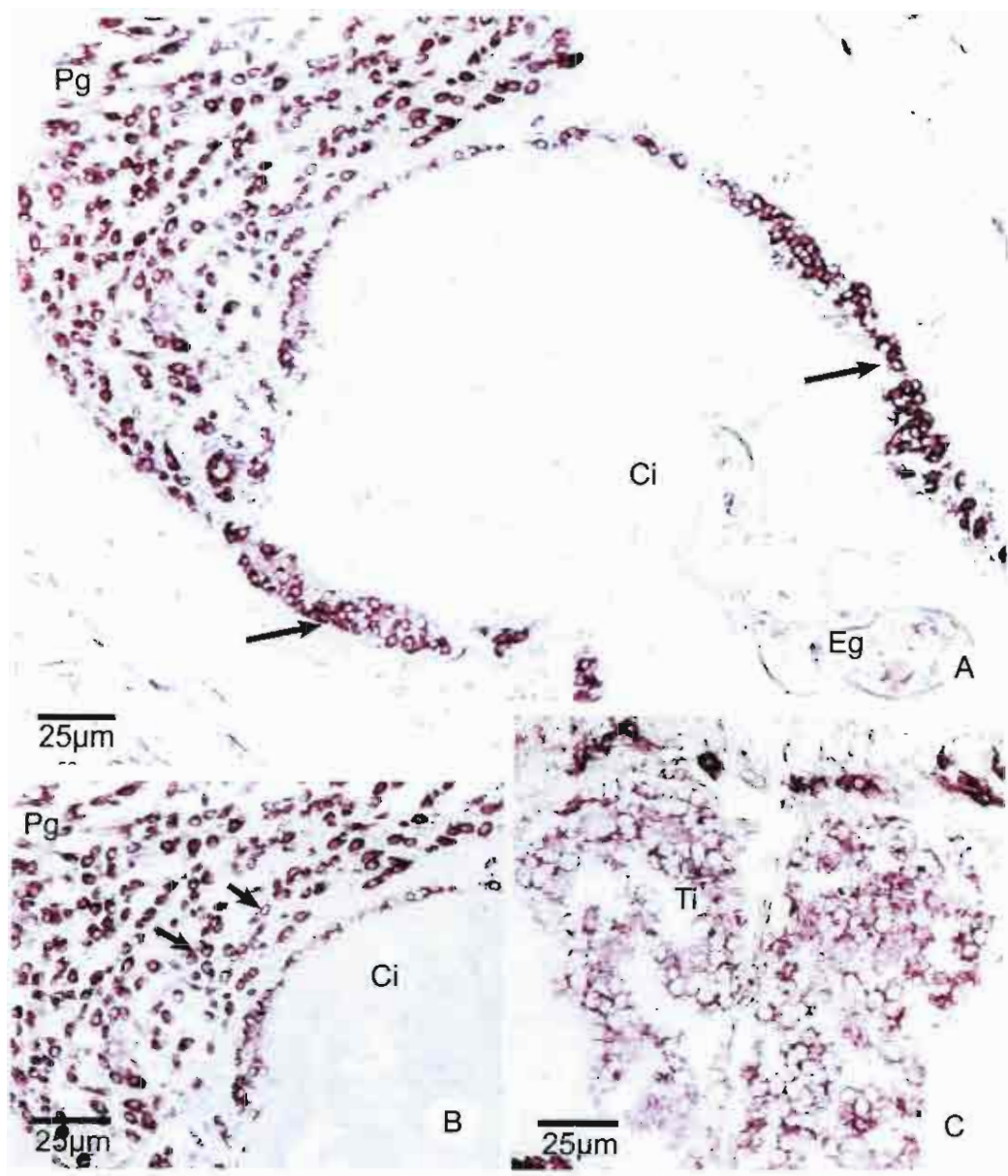
1	ATG	TCG	CCG	TGC	TGG	TTG	ACG	CAG	TGT	GAT	TTC	AGC	TCT	GAG	CAG	45
1	M	S	P	C	W	L	T	Q	C	D	F	S	S	E	Q	15
46	CTC	GTC	TTT	TTG	GCC	AAG	TGT	GCT	GAG	AGG	GCG	GAG	CGA	TAT	GAG	90
16	L	V	F	L	A	K	C	A	E	R	A	E	R	Y	E	30
91	GAT	ATG	GCT	GCA	GCT	ATG	AAA	ATG	CAT	ACC	GAG	AAG	ATT	GGA	AAG	135
31	D	M	A	A	A	M	K	M	H	T	E	K	I	G	K	45
136	AAG	GGG	CTG	TCA	AAC	GAG	GAA	CGG	AAT	CTC	CTA	TCC	GTC	GCC	TAC	180
46	K	G	L	S	N	E	E	R	N	L	L	S	V	A	Y	60
181	AAG	AAT	GTT	GTA	GGT	GCT	AGA	CGG	TCT	GCT	TGG	CGT	ATC	ACC	TGT	225
61	K	N	V	V	G	A	R	R	S	A	W	R	I	T	C	75
226	GGT	TCC	ATA	AAG	CCC	GAC	CTA	AAG	GAG	GTG	CAG	CTG	AAA	GCC	ACC	270
76	G	S	I	K	P	D	L	K	E	V	Q	L	K	A	T	90
271	AAG	GAT	TAC	ATC	AAG	AGG	ATG	GTT	GTT	GAA	CTG	AAC	GAT	ATC	TGC	315
91	K	D	Y	I	K	R	M	V	V	E	L	N	D	I	C	105
316	AAG	GAA	GTC	TTG	GAC	ATA	TTG	CAA	AAT	TAT	TTG	ATC	CCG	AAT	GCT	360
106	K	E	V	L	D	I	L	Q	N	Y	L	I	P	N	A	120
361	GTG	TCC	GAC	GAG	AGT	CGA	GTG	TTC	TAC	ATG	AAG	ATG	CAG	GGT	GAT	405
121	V	S	D	E	S	R	V	F	Y	M	K	M	Q	G	D	135
406	TAT	TAT	CGG	TAT	TGC	GCT	GAA	GTT	GCT	GAC	ACC	GAG	AAT	CGC	CAG	450
136	Y	Y	R	Y	C	A	E	V	A	D	T	E	N	R	Q	150
451	GCA	ATT	GTC	GAC	AGC	TCG	TTC	GAT	GCT	TAT	AAG	AAG	GCC	ATG	GAA	495
151	A	I	V	D	S	S	F	D	A	Y	K	K	A	M	E	165
496	ATT	GCA	AGT	GGT	CTG	CAT	CCC	ACC	CAT	CCT	ATC	CGT	CTG	GGC	TTG	540
166	I	A	S	G	L	H	P	T	H	P	I	R	L	G	L	180
541	GCC	CTG	AAC	TTT	TCG	GTC	CTT	TAT	TAC	GAA	ATT	AAA	GAC	CAG	CCT	585
181	A	L	N	F	S	V	L	Y	Y	E	I	K	D	Q	P	195
586	AAA	GAG	GCT	TGC	GAT	CTG	GCT	CAG	AAG	TCC	TTT	GAT	GAA	GCC	TTA	630
196	K	E	A	C	D	L	A	Q	K	S	F	D	E	A	L	210
631	GCG	GAA	CTC	GAT	ACT	TTG	GGA	GAG	GAT	TCA	TAC	AAA	GAT	AGC	ACT	675
211	A	E	L	D	T	L	G	E	D	S	Y	K	D	S	T	225
676	CTC	ATA	ATG	CAG	TTG	CTC	AGA	GAT	AAC	CTA	ACG	TTG	TGG	ACA	ACT	720
226	L	I	M	Q	L	L	R	D	N	L	T	L	W	T	T	240
721	GAT	CAG	CCA	GAA	AAC	GAG	GTT	GAT	GCT	GGT	GAC	AAG	TAA	TAT	CAA	765
241	D	Q	P	E	N	E	V	D	A	G	D	K	*	Y	Q	255
766	ACT	ATG	TAC	TTC	GCT	TTG	TCG	ATC	ACT	GTC	GAA	CAT	CCG	CAA	AAA	810
256	T	M	Y	F	A	L	S	I	T	V	E	H	P	Q	K	

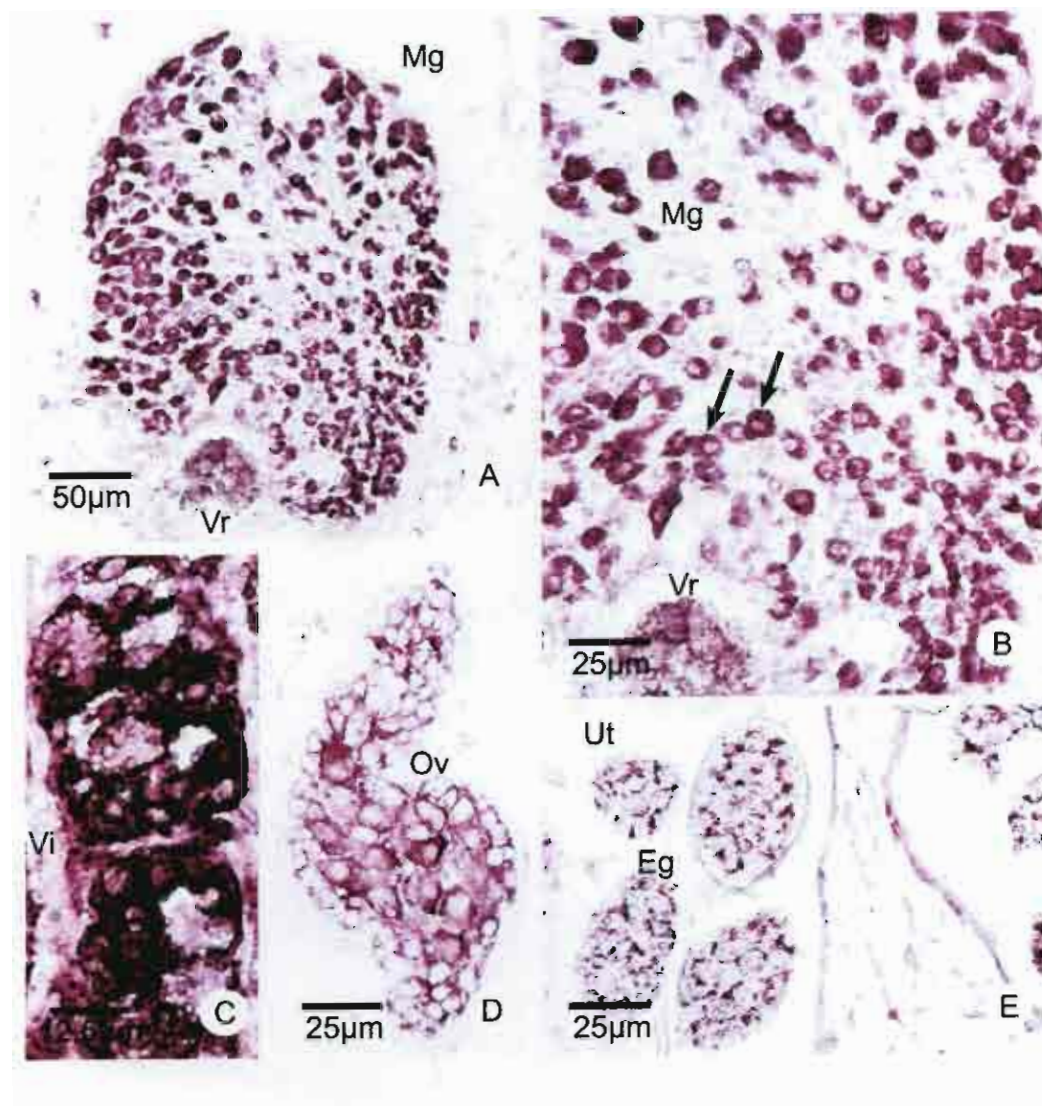
รูปที่ 1.7-2

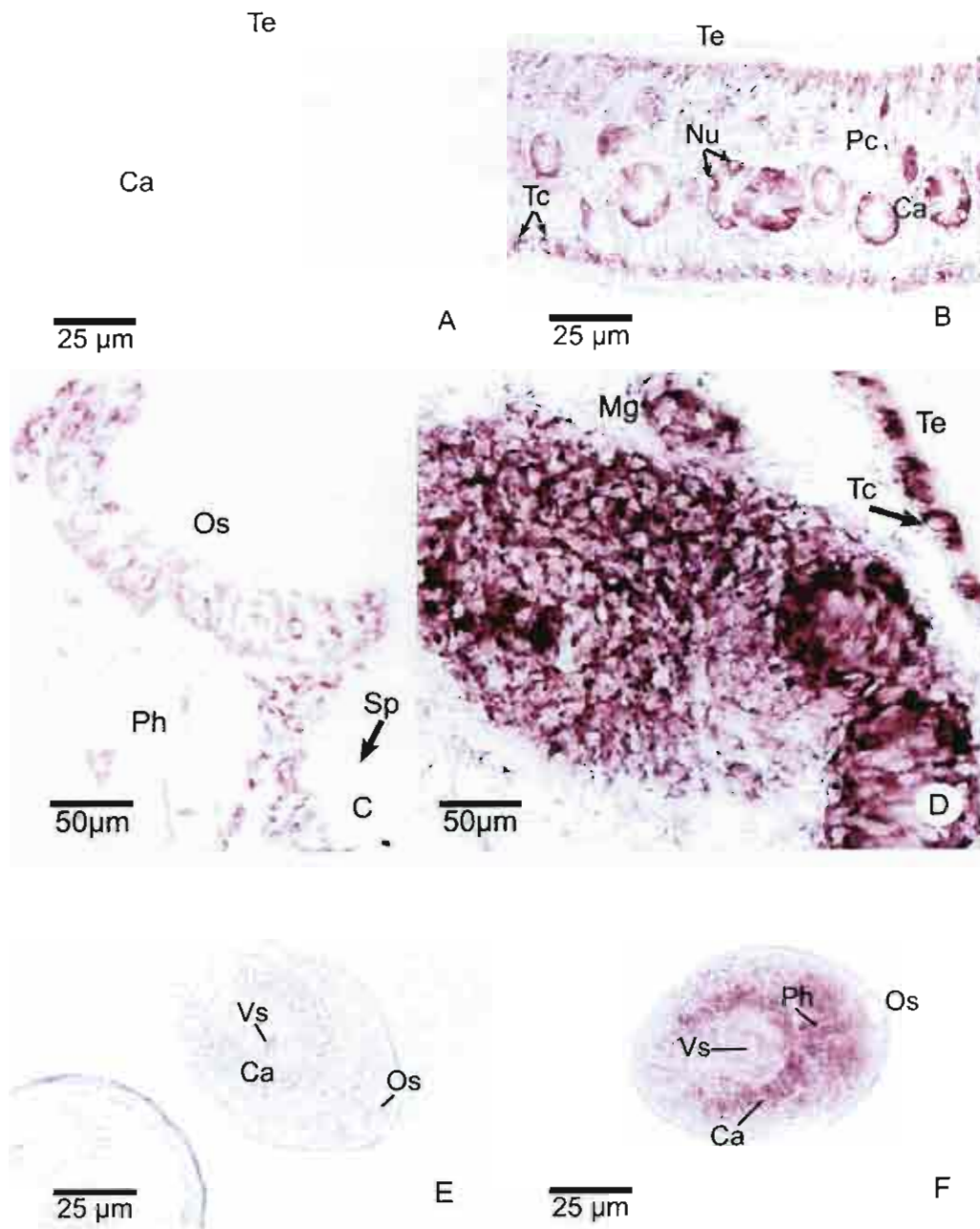




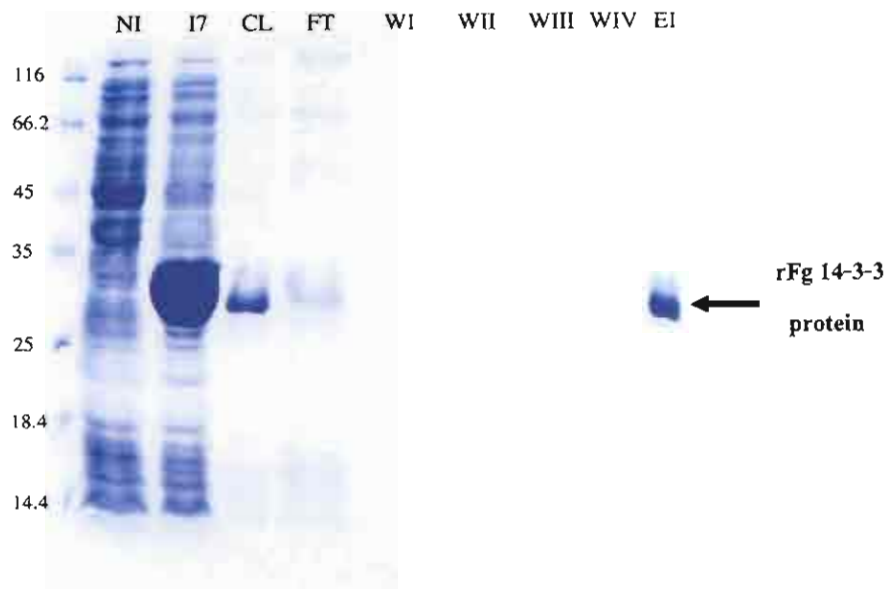


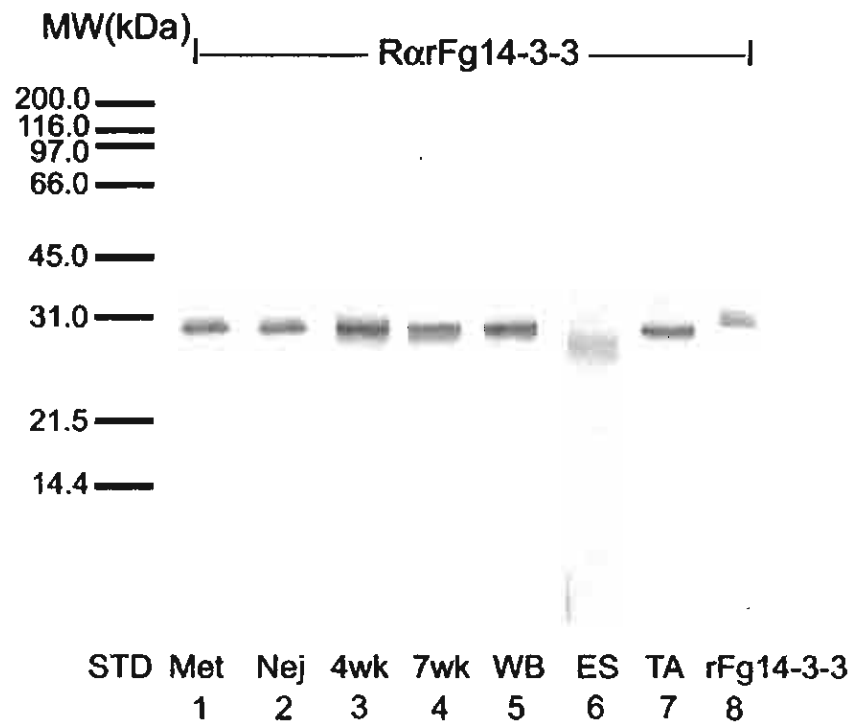


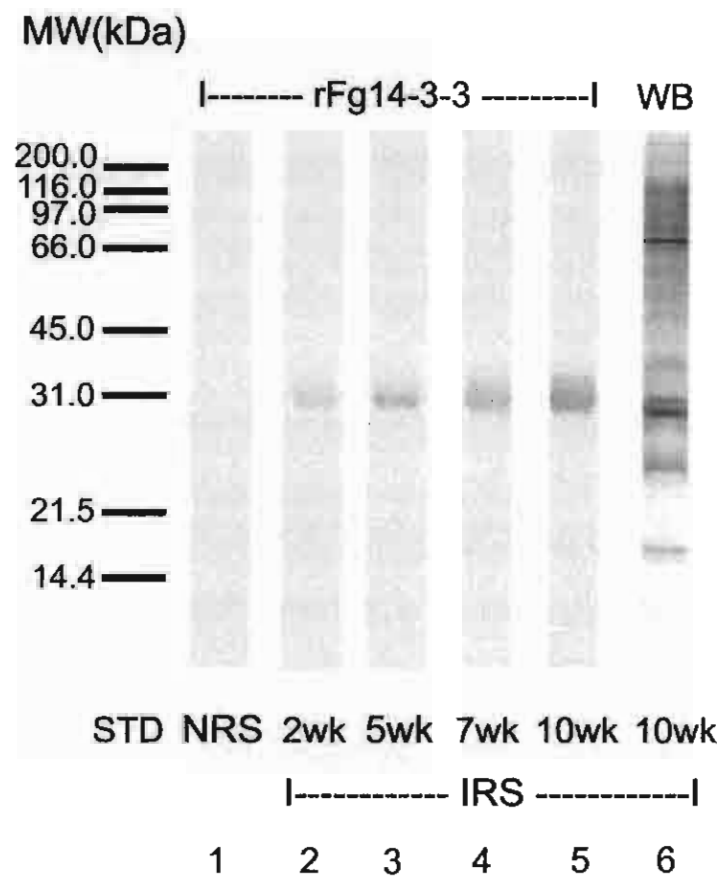


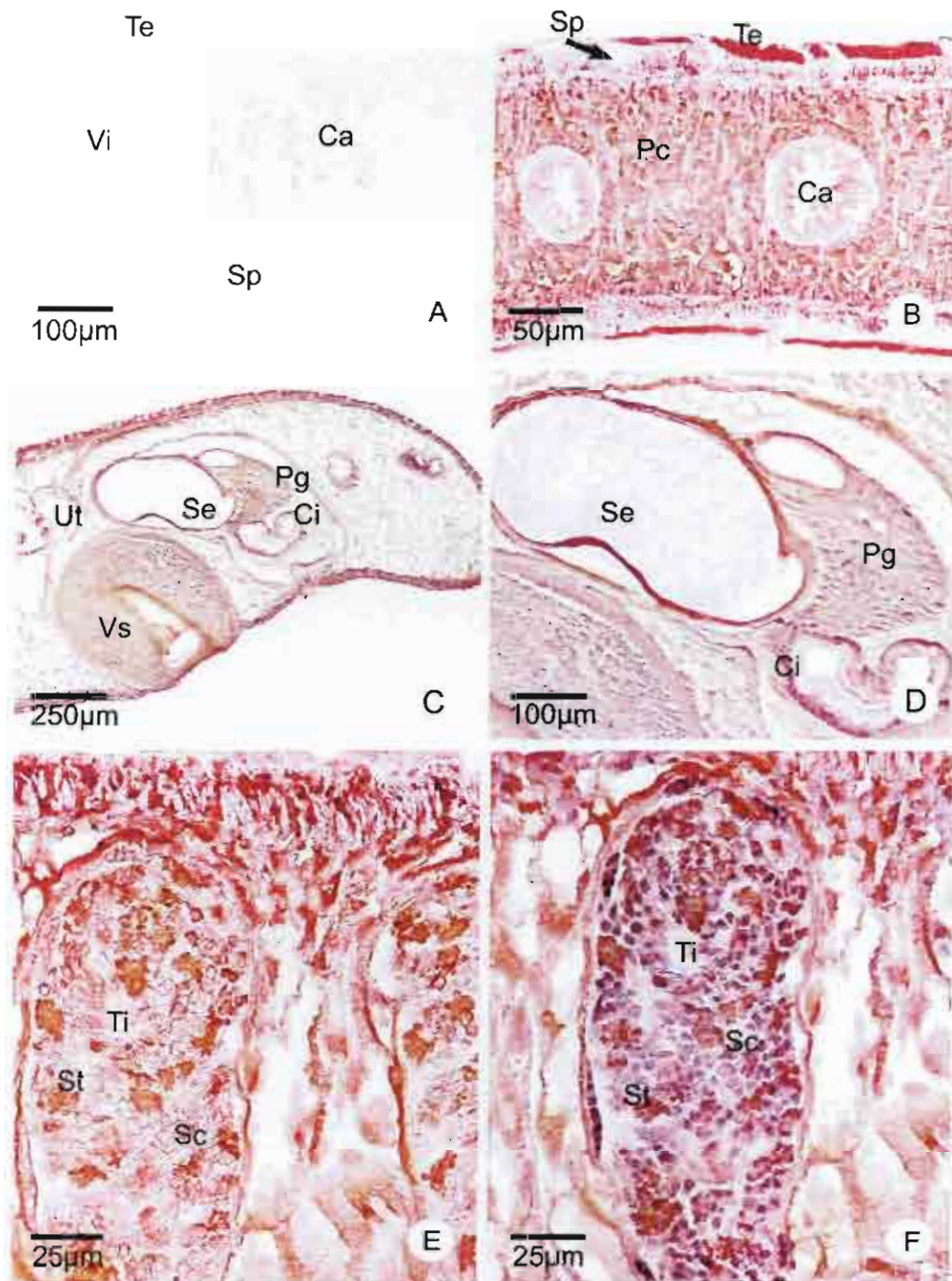


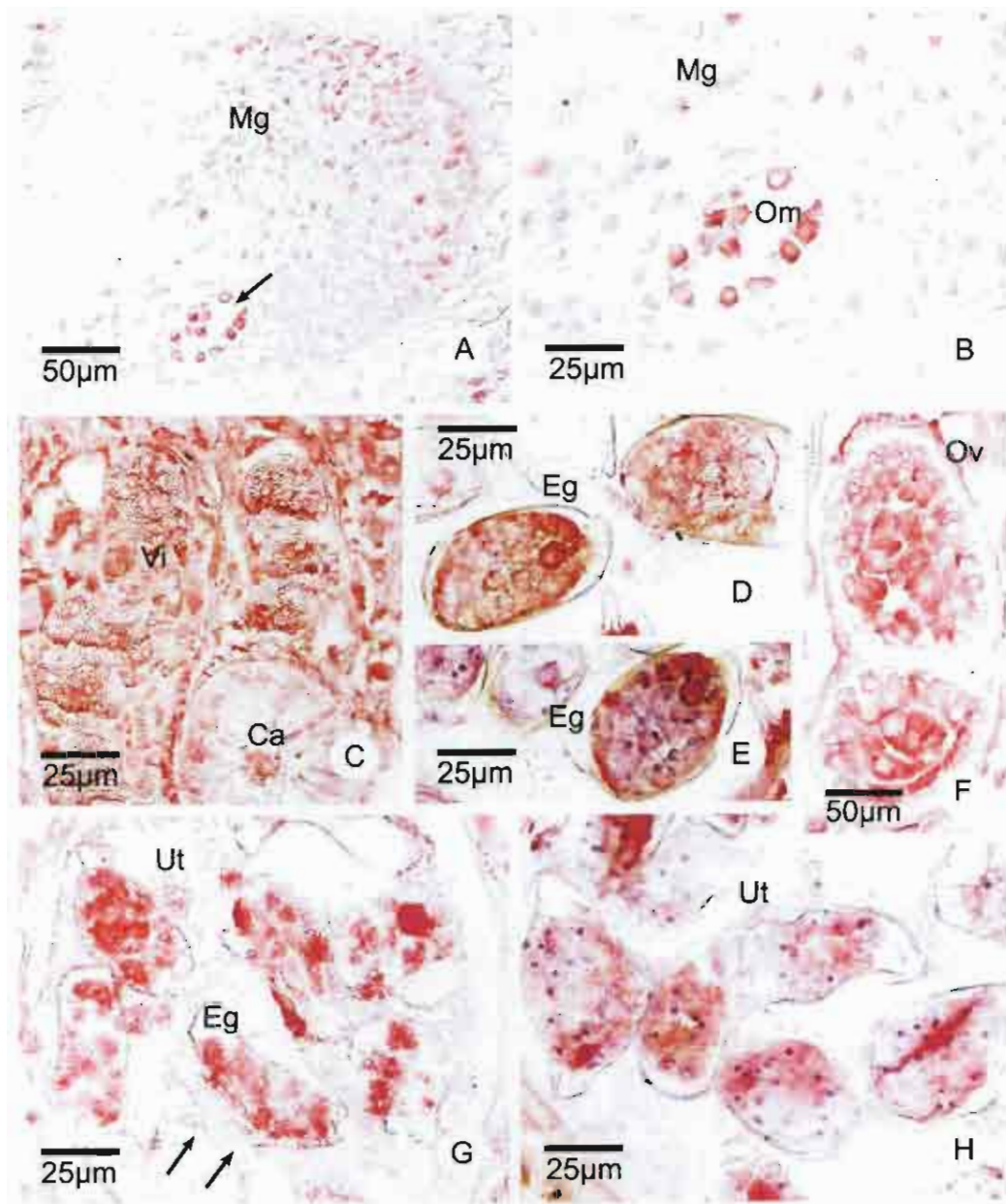
รูปที่ 1.7-8

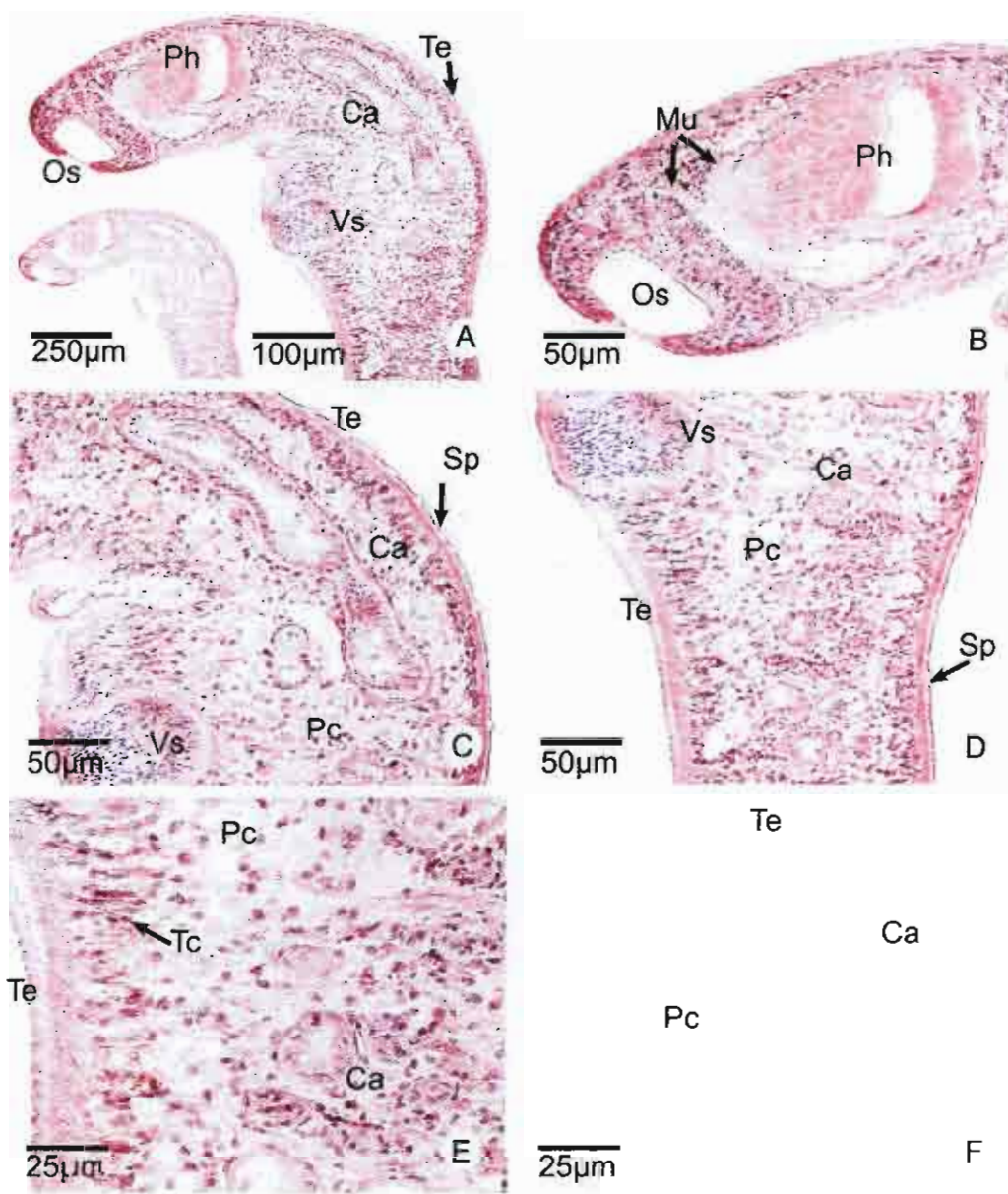


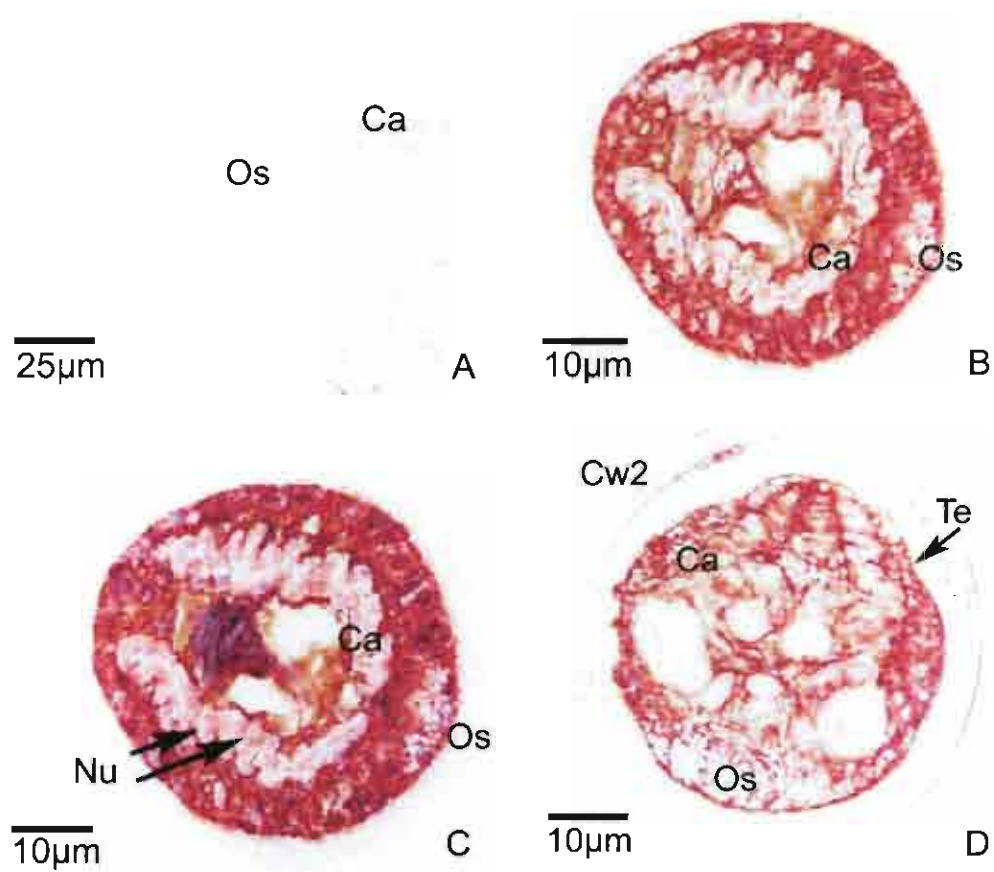


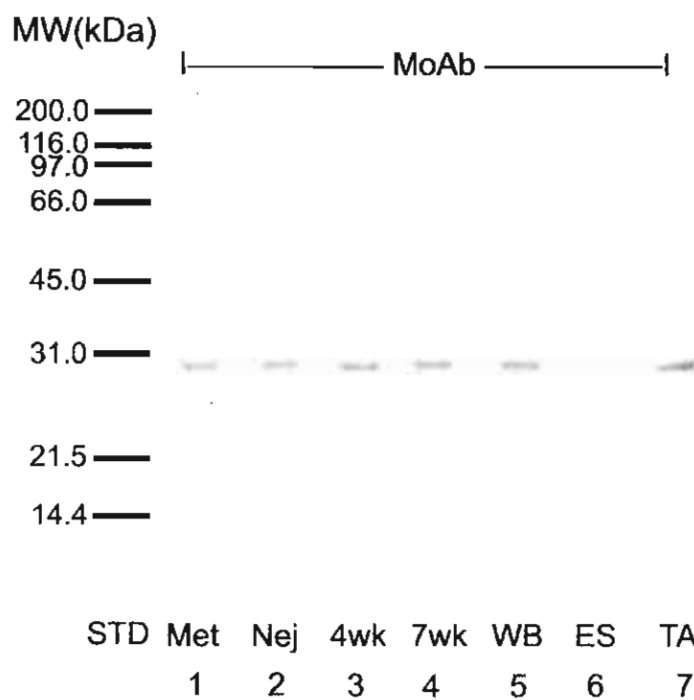


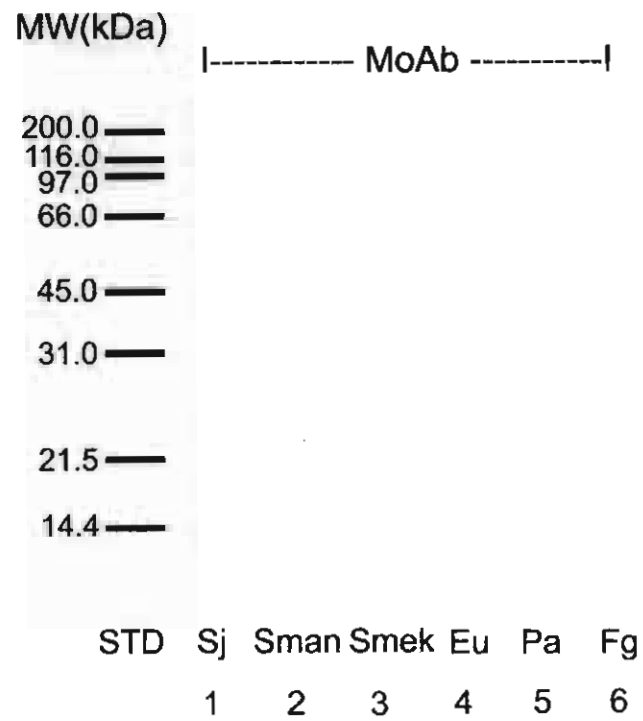


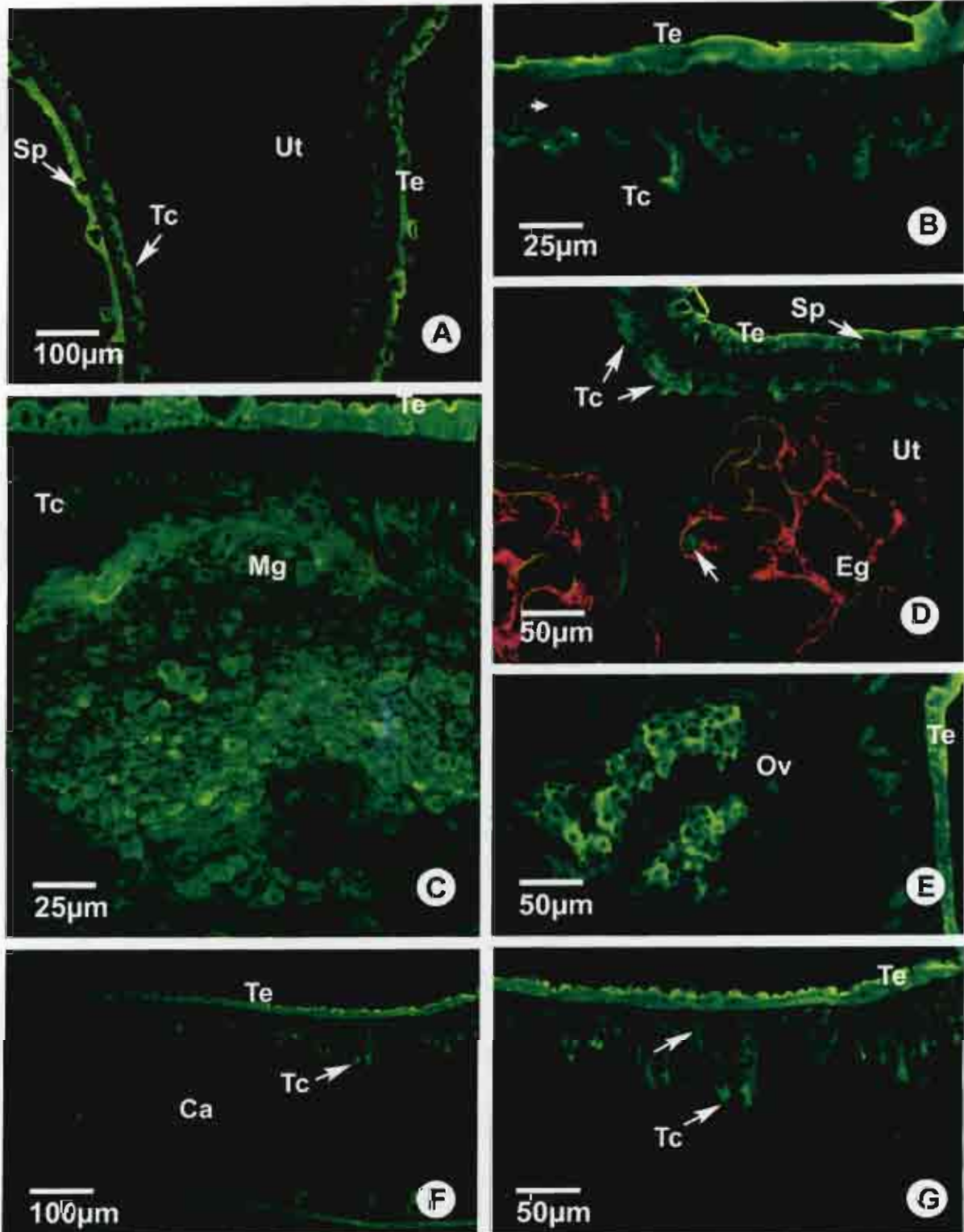


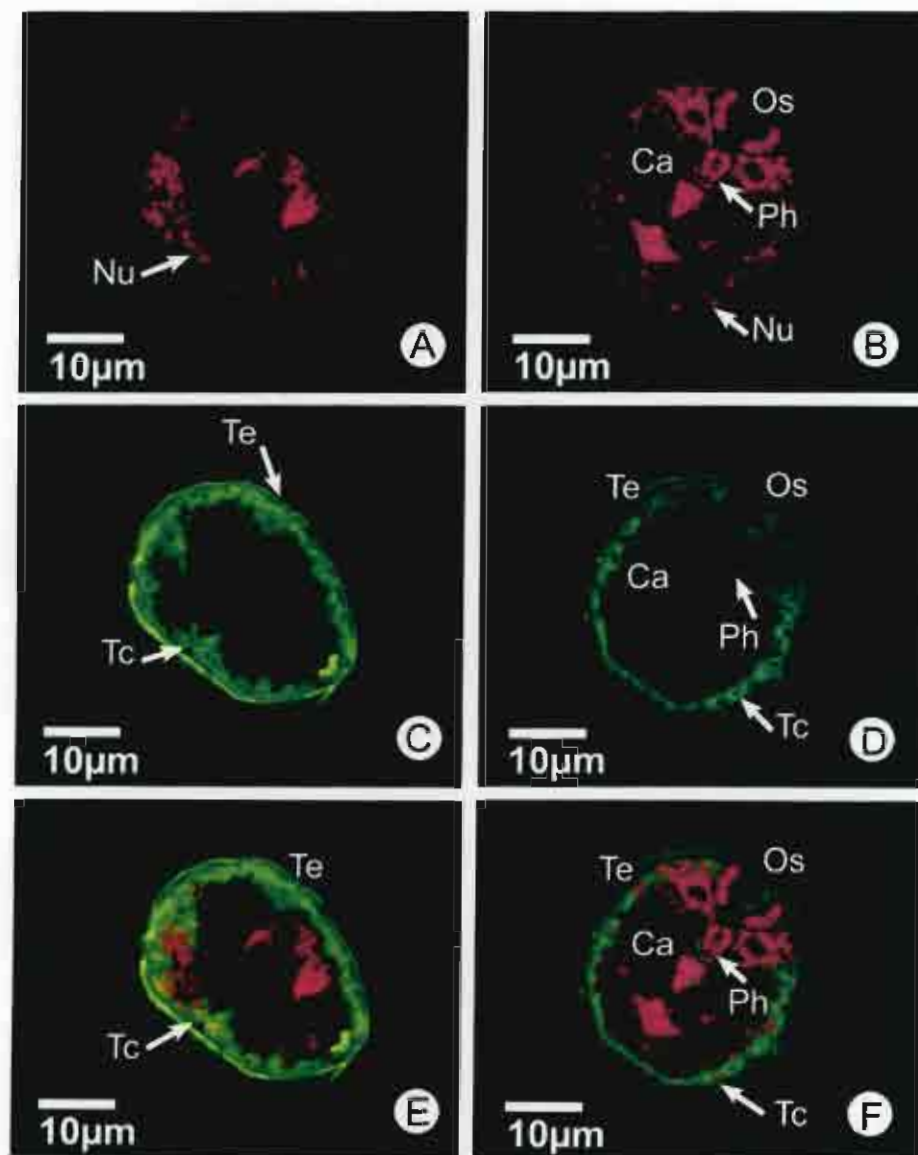












1.8. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การแสดงออกของยีน Vitelline B และการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ vitelline B เพื่อพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิ

1.8.1. การสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของยีนที่เก็บรหัสของ vitelline B proteins กลไกการสร้างไข่และเปลือกไข่

พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* มีการสืบพันธุ์ 2 ขั้นตอน คือการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ใน definitive host และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศซึ่งเกิดขึ้นใน intermediate host สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นต้องใช้ตัววัยสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียซึ่งมีอยู่ร่วมกันภายในพยาธิแต่ละตัว แต่การผสมพันธุ์มักจะเกิดข้ามตัว (cross fertilization) หลังจากนั้นมีการสร้างไข่และเปลือกไข่มาหุ้มรอบซึ่งล้อมรอบด้วย vitelline cells จำนวนหนึ่ง vitelline cells ดังกล่าวนี้อาจมีส่วนสำคัญในการสร้างเปลือกไข่ การให้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและการช่วยให้ตัวอ่อนออกจากเปลือกไข่ กระบวนการสร้างเปลือกไข่เกี่ยวข้องกับตัววัยสืบพันธุ์เพศเมียที่สำคัญ 2 ส่วน คือ vitelline gland และ duct และ Mehlis' gland complex ซึ่งประกอบด้วยตัววัยหรือโครงสร้างต่างๆดังนี้ Mehlis' gland, ootype, oviduct, vitelline reservoir และ median vitelline duct, Laurer's canal และ proximal part ของ uterus

ไข่พยาธิชนิดนี้ถูกสร้างขึ้นภายในส่วนต้นของ uterus ภายในไข่ประกอบด้วย zygote ล้อมรอบด้วย vitelline cells ประมาณ 30 เซลล์ และห่อหุ้มด้วยเปลือกไข่ โดยเปลือกไข่เกิดจากการรวมตัวของ eggshell granules ที่ปล่อยมาจาก vitelline cells ซึ่งอาจเกิดจากการกระตุ้นโดยสารที่หลังจาก Mehlis's gland cells ขณะที่กลุ่มของ vitelline cells เคลื่อนตัวผ่าน ootype มาพร้อมกับเซลล์ไข่ eggshell granules ที่ถูกปล่อยออกจาก vitelline cells ทั้งที่ล้อมรอบเซลล์ไข่และที่อยู่อย่างอิสระจะเกิดการรวมกันกลายเป็นแถบหนาที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ รอบๆกลุ่มของเซลล์ zygote และ vitelline cells กระบวนการรวมกันของสารจาก eggshell granules อาจถูกกระตุ้นโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมจากสภาพกรดกลายเป็นสภาพด่าง สภาวะด่างนี้เองอาจทำให้ phenol oxidase enzyme ที่ถูกปล่อยมาจาก vitelline cells พร้อมกับ eggshell granules กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา tannin ซึ่งเป็นผลให้ eggshell protein จาก eggshell granules เชื่อมโยงกัน (cross-link) กลายเป็นโครงของเปลือกไข่ที่มีความแข็งแรง eggshell granules ที่ถูกปล่อยออกมาจากกลุ่ม vitelline cells ที่เคลื่อนที่ช้ากว่าก็จะค่อยๆเข้ามาพอกกับเปลือกไข่ที่สร้างขึ้นก่อนทำให้เปลือกไข่มีความหนาเพิ่มขึ้นจนกลายเป็นเปลือกไข่ที่สมบูรณ์

เนื่องจากพยาธิมีการผลิตไข่จำนวนมากในหนึ่งวันและตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตอยู่ได้ภายใต้เปลือกไข่ที่แข็งแรง ซึ่งสามารถป้องกันอันตรายจากน้ำย่อยหรือเอนไซม์จาก host ได้ จึงนับได้ว่ากระบวนการสร้างเปลือกไข่เพื่อให้ได้เปลือกไข่ที่สมบูรณ์เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อพยาธิ จากการศึกษาใน *Fasciola hepatica* พบว่ามี 3 องค์ประกอบที่สำคัญในกระบวนการสร้างเปลือกไข่ คือ eggshell precursor proteins, phenol oxidase และ phenol oxidase activating enzyme

eggshell precursor proteins นั้นถูกสร้างและเก็บไว้ภายใน vitelline cells ใน vitellaria ซึ่งมีโปรตีนกลุ่มนี้เล็กน้อย 3 ชนิด คือ vitelline A, B และ C มี molecular weight เรียงตามลำดับคือ 70 kDa, 31 kDa และ 17 kDa โปรตีน vitelline B เป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดถึง 6-7% ในโปรตีนของพยาธิตัวเต็มวัย โปรตีน vitelline B มี amino acid ชนิด DOPA เป็นส่วนประกอบมากที่สุด รองลงมาคือ glycine, aspartic และ lysine ตามลำดับ

phenol oxidase เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ใน vitelline cells เช่นเดียวกับ eggshell precursor proteins ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน DOPA ไปเป็น o-quinones ซึ่งเป็นสารที่สำคัญในกระบวนการสร้างเปลือกไข่แต่ phenol oxidase จะสามารถทำหน้าที่ดังกล่าวได้ก็ต่อเมื่อมีการกระตุ้นจาก phenol oxidase activating enzyme ซึ่งไม่ทราบแน่ชัดว่าถูกสร้างหรือเก็บไว้ที่ใด เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษามากนัก ซึ่ง activating enzyme ดังกล่าวอาจจะเป็น Cathepsin B หรือ Cathepsin L ที่ได้กล่าวมาแล้วก็ได้ ซึ่งผู้วิจัยในกลุ่มพบการแพร่กระจายของ Cathepsin B อยู่ใน vitelline cell ด้วย ซึ่งจะถูกมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป กลไกการสร้างไข่และเปลือกไข่ของพยาธิ *F. gigantica* ยังไม่ได้มีการศึกษาในรายละเอียดดังนั้นการเข้าใจในกลไกดังกล่าวนับได้ว่ามีความสำคัญในการที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรค การผลิตวัคซีนป้องกันโรคพยาธิเพื่อการป้องกันการแพร่ระบาดของพยาธิชนิดนี้ต่อไป

การสังเคราะห์ vitelline protein encoding genes

การสังเคราะห์ cDNA ของ vitelline proteins ด้วยกรรมวิธี RT-PCR

Primer สำหรับทำ RT-PCR ออกแบบมาจาก mRNA sequence ของ vitelline protein B1 และ B2 ของพยาธิ *Fasciola hepatica* โดยจัดเรียงและเปรียบเทียบลำดับเบสด้วย program Clustal W 1.81 (รูปที่ 1.8-1)

จากการเปรียบเทียบและจัดเรียงลำดับเบสดังกล่าวทำให้สามารถเลือกลำดับเบสที่ใช้เป็น primer สำหรับ RT-PCR ดังนี้

Forward primer 1 (F1) 5' GAC TCC TAT GGC AAA TAC G 3' = 19 BASES

Forward primer 2 (F2) 5' ACA TGC CTC ATA TGA CGA CC 3' = 20 BASES

Reverse primer 1 (R1) 5' GGA GTC CCT CGC GTA ATC ATC C = 22 BASES

Reverse primer 2 (R2) 5' CGT ATC CCC TCA GAT GAC C 3' = 19 BASES

นำ primers ทั้ง 4 มาจับคู่ ทำปฏิกิริยา RT-PCR ดังนี้

Reaction ที่ 1 ใช้ primer F1 และ R1

Reaction ที่ 2 ใช้ primer F1 และ R2

Reaction ที่ 3 ใช้ primer F2 และ R1

Reaction ที่ 4 ใช้ primer F2 และ R2

นำ RT-PCR products ที่ได้จากทั้ง 4 reactions ไปแยกและวิเคราะห์ด้วย 0.7% agarose gel electrophoreses แล้ว ย้อมด้วย ethidium bromide เพื่อสังเกตดูแถบของ cDNA ที่เป็น PCR product ภายใต UV light พบว่า (รูปที่ 1.8-2A)

Reaction 1 (F1-R1) มีแถบของ cDNA จำนวน 2 แถบ ขนาดประมาณ 700 และ 250 bp

Reaction 2 (F1-R2) มีแถบของ cDNA จำนวน 2 แถบ ขนาดประมาณ 650 และ 630 bp

Reaction 3 (F2-R1) มีแถบของ cDNA จำนวน 2 แถบ ขนาดประมาณ 680 และ 200 bp

Reaction 4 (F2-R2) มีแถบของ cDNA จำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 600 bp

นำ PCR product จาก reaction 4 ซึ่งมีขนาดและความจำเพาะของ primer ดีกว่า reactions อื่น ๆ ไปทำบริสุทธิ์และต่อเข้ากับ pGEM T-easy vector (Promega) และ transformed เข้าสู่แบคทีเรีย XL1-blue competent cells จากนั้นนำไปคัดเลือก clones ของแบคทีเรียด้วยการเพาะเลี้ยงใน LB-ampicillin-Agar plates เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และสุ่มเลือก colonies ของแบคทีเรียที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าว 4 colonies (ตั้งชื่อว่า Egg-Fg1-4) ไปเพาะเลี้ยงใน LB-ampicillin medium เพื่อเพิ่มปริมาณ ก่อนที่จะนำไปสกัดเอา plasmid vector ที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรียออกมาทดสอบโดยการตัดด้วย restriction enzyme เพื่อตรวจดูว่ามี PCR product ถูกต่อเข้าไปใน vector หรือไม่ จากการตัดด้วย *EcoRI* ซึ่งเป็น restriction enzyme ที่ตัด vector ได้ 2 ตำแหน่งบริเวณหัวและท้ายของ inserted DNA พบว่า plasmid vector ที่สกัดมาจากแบคทีเรียทั้ง 4 colonies มี inserted DNA ขนาดเท่ากัน คือ ประมาณ 600 bases (รูปที่ 1.8-2B) ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดของ PCR product ที่นำมา ligated เข้ากับ vector โดย clone Egg-Fg4 มีปริมาณของ plasmid vector มากที่สุดจึงส่งไปตรวจหาลำดับเบสที่ Bioservice Unit, BIOTEC, NSTDA

ผลการตรวจหาลำดับเบสพบว่า inserted cDNA มีความยาว 598 bases ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ mRNA sequence ของ vitelline proteins B1 และ B2 ของ *F. hepatica* ด้วย program Clustal W1.81 (รูปที่ 1.8-3) และ BLAST จากฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ mRNA sequence ของ vitelline protein B1 ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 88 จนถึงตำแหน่งที่ 687 ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึง (identity) เท่ากับ 501/598 คิดเป็น 83% และ mRNA sequence ของ vitelline protein B2 ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 93 จนถึงตำแหน่งที่ 691 ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 584/598 คิดเป็น 98%

การคัดเลือก vitelline protein encoding genes จาก cDNA library

การสังเคราะห์ RNA probe

cDNA ที่สกัดได้จาก clone Egg-Fg4 ถูกนำไปเป็นแม่แบบในการสร้าง cRNA probe โดยใช้ DIG RNA labeling kit (Roche) โดยการตัด vector ด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ *Sal I* ทางด้าน 5' end ของ inserted DNA เพื่อให้ได้ linear DNA จากนั้นสังเคราะห์ cRNA probe โดยใช้ T7 RNA polymerase และ mixed NTP ซึ่งมี 25 % ของ UTP conjugated ด้วย digoxigenin (DIG) ซึ่งเป็นสารที่สามารถ

ตรวจสอบได้ด้วย anti-digoxigenin ทำการตรวจปริมาณและคุณภาพของ RNA probe ด้วยเทคนิค dot blot โดยการเจือจาง cRNA probe ที่สังเคราะห์ได้และ control RNA-DIG labeling (Roche) ที่ทราบความเข้มข้น ในปริมาณต่าง ๆ กันแล้วหยดลงบน nitrocellulose membrane ความเข้มข้นละ 1 μ m ตามด้วยการตรึง cRNA ดังกล่าวลงบน membrane ด้วยการฉายแสง UV เป็นเวลา 3 นาที และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ membrane ใน blocking solution, anti-DIG conjugated กับ alkaline phosphatase อย่างละ 30 นาที และสุดท้ายทำให้เกิดสีด้วยการแช่ลงในสารละลาย NBT/BCIP 10-15 นาที ผลจากการทำ dot blot พบว่าปริมาณของ RNA probe ที่สังเคราะห์ได้มีประมาณ 1 μ g/ μ l และสามารถตรวจหาได้ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng จากนั้นเก็บ RNA probe ที่สังเคราะห์ได้ไว้ที่ -20 °C เพื่อนำใช้ในการคัดเลือก vitelline protein encoding genes จาก cDNA library ต่อไป

การคัดเลือกขั้นที่ 1

นำ XL1-blue competent cells เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-Mg⁺⁺ ที่ 30 °C จนได้ค่า O.D. 600 เท่ากับ 1 แล้วนำมาปั่นตกตะกอนที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.1 M MgSO₄ เพื่อให้ได้ค่า O.D. 600 เท่ากับ 0.5 สำหรับใช้ในการ transfect λ ZAPII

การ transfect λ ZAPII cDNA library กระทำโดยใช้ cDNA library ที่สร้างจาก cDNA ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย และ ZAPII ที่ได้รับจาก Dr.Terry Spithill, Monash University, Australia ซึ่งถูกนำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 1:10,000 จากนั้นนำ 5, 20 และ 40 μ l ของ λ phage ผสมกับ 600 μ l ของ competent cells ที่เตรียมไว้ และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นผสมด้วย 4.5 ml LB-top agarose แล้วเทราดลงบนผิวหน้าของ LB-agar plate และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาทีเพื่อให้ top agarose แข็งตัวก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C 14-16 ชั่วโมงหรือจนกว่ามีการพัฒนาของ plaques ขนาดประมาณ 0.2-1 mm ที่ผิวหน้าของชั้น top agarose ในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง plaques เกิดขึ้นนี้มีปริมาณแตกต่างกันตามความเข้มข้นของ library ที่ใช้ในการ transfect โดยที่ 5 μ l ของ library เจือจาง 1:10,000 มีปริมาณของ plaques น้อยที่สุดและเกิดอยู่อย่างอิสระดีกว่าบนจานเพาะเชื้อที่ใส่ library 20 และ 40 μ l ซึ่งมีปริมาณของ plaques เจริญขึ้นมากและอยู่กันอย่างหนาแน่นและมี plaques อิสระน้อย

λ phage ที่เจริญอยู่ที่ผิวหน้าของจานเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก library 5 μ l ถูกถ่ายโอนไปยัง nitrocellulose membrane โดยเทคนิค plaque lifted ซึ่งมีหลักการดังนี้ คือนำ nitrocellulose membrane มาวางทับผิวหน้าของจานเลี้ยงเชื้อและปล่อยให้ plaques ติดกับ membrane 5 นาที จากนั้นนำ membrane ขึ้นจากจานเลี้ยงเชื้อไปละลายโครงสร้างของ λ phage ตามด้วยการแยก DNA ของ λ phage ให้เป็น DNA สายเดี่ยว เพื่อให้พร้อมสำหรับการ hybridize กับ RNA probe ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้

และตามด้วยการปรับสภาพให้เป็นกลาง จากนั้นตรึง DNA ดังกล่าวให้ติดกับ membrane ด้วยการฉายแสง UV เป็นเวลา 3 นาที และขจัดโครงสร้างอื่น ๆ ของ λ phage ที่เหลืออยู่ออกด้วยการrupture membrane ด้วยกระดาษเนื้อนุ่มเบา ๆ ในสารละลาย และสุดท้ายอบ membrane ให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่ -20 °C จนกว่าจะใช้สำหรับการ hybridize

จากการนำแผ่น membrane ที่ได้ hybridize กับ RNA probe ที่สร้างจาก cDNA ที่ได้จากการทำ PCR และตรวจหาด้วย anti-DIG alkaline phosphatase conjugate พบว่ามี plaques อย่างน้อย 10 plaques ที่ให้ผลบวก (รูปที่ 1.8-4A) จากนั้นนำ membrane ที่ได้ไปเทียบกับจานเลี้ยงเชื้อต้นแบบและตัดเอาเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณ plaques ที่ให้ผลบวกไปแช่ในสารละลายเพื่อให้ phages ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเคลื่อนที่ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อมาอยู่ในสารละลายเพื่อนำ phages ที่ได้นี้ไปทำการคัดเลือกซ้ำอีกครั้งโดย PCR technique

การคัดเลือกขั้นที่ 2

phages ที่ได้จาก plaques ที่ให้ผลบวกดังกล่าวถูกนำไปเพิ่มปริมาณ inserted cDNA อยู่ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ T7 และ T3 primers ซึ่ง primers ทั้งสองจะเข้าไปจับกับบริเวณ T3 และ T7 promoters ซึ่งอยู่ที่ปลาย 3' และ 5' ของ inserted cDNA ตามลำดับ จากนั้นนำ PCR products ที่ได้ไปหาขนาดของโมเลกุลใน 0.7% agarose gel electrophoresis และทำการถ่ายโอน cDNA ลงบน nitrocellulose membrane ตามด้วยการ hybridize ด้วย cRNA probe และตรวจหาด้วย anti-DIG alkaline phosphatase conjugate

จากการนำ plaques ที่ให้ผลบวกมาตรวจสอบจำนวน 10 plaques (Egg-Fg-R1 - R10) พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างมีขนาดของ PCR products อยู่ระหว่าง 800 - 1600 KB (รูปที่ 1.8-4B) และเมื่อนำไป hybridize ด้วย cRNA probe พบว่า PCR products ทั้ง 10 ตัวอย่างให้ผลบวก (รูปที่ 1.8-4C) เมื่อเปรียบเทียบขนาด PCR products กับขนาดของ mRNA ของ vitelline protein BI และ BII ของ *F. hepatica* พบว่า PCR products ที่ได้จาก Egg-Fg-R2 มีขนาดใกล้เคียงกับ vitelline protein BII และ Egg-Fg-R7 และ R8 มีขนาดใกล้เคียงกับ vitelline protein BI สำหรับ PCR products อื่น ๆ มีขนาดเล็กกว่า vitelline protein BI ของ *F. hepatica* จึงเป็นไปได้ว่าเป็น clone ที่มียีนซึ่งยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงนำ PCR products จาก Egg-Fg-R2, R7 และ R8 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ *EcoRI* และ *XhoI* ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองจะตัด PCR products บริเวณลำดับเบสที่เป็นส่วนของ phage บริเวณ 5' และ 3' ของ inserted cDNA และต่อเข้า pBlueScript SK vector ซึ่งใช้เอนไซม์ที่มีการตัดเฉพาะเช่นเดียวกับที่ใช้ตัด PCR products จากนั้นนำ vectors ที่ต่อกับ PCR products ไป transformed เข้าสู่เซลล์ *E. coli* XL1-blue เพื่อเก็บรักษาไว้และเพื่อการตรวจสอบหาลำดับเบสต่อไป

จากการตรวจหาลำดับเบสของ cDNA ที่ได้จาก plaques ทั้ง 3 และเปรียบเทียบกับ vitelline protein BI และ BII ของ *F. hepatica* พบว่า Egg-Fg-R2 เป็นยีนที่ยังไม่สมบูรณ์ และมีลำดับเบสคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ mRNA ของ vitelline protein BII ของ *F. hepatica* ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 200 เป็นต้นไป Egg-Fg-R7 และ R8 มีลำดับเบสเหมือนกันและคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ mRNA ของ vitelline protein BI ของ *F. hepatica* แต่ Egg-Fg-R7 มีลำดับเบสสั้นกว่า 10 bp และ เป็นยีนที่ไม่สมบูรณ์จากการนำลำดับเบส Egg-Fg-R8 ไปเทียบกับ vitelline BI และ BII ของ *F. hepatica* พบว่ามีบริเวณที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนสั้นกว่า โดย start codon ของ Egg-Fg-R8 ตรงกับรหัสของกรดอะมิโนตัวที่ 3 ของ *F. hepatica* (รูปที่ 1.8-5)

จากการนำลำดับเบสของ Egg-Fg-R8 ไปแปลรหัสเป็นลำดับของ amino acid พบว่าจาก start codon จนถึง stop codon มีรหัสของ amino acid 270 ตัว ซึ่งสั้นกว่า amino acid ของ vitelline BI ของ *F. hepatica* ที่มี 272 amino acid และเมื่อนำรหัส amino acid ของ Egg-Fg-R8 ไปเทียบกับ รหัส amino acid ของ vitelline protein BI และ BII ของ *F. hepatica* พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ vitelline BI 93 % และ BII 85% (รูปที่ 1.8-6)

1.8.2. การตรวจสอบการแสดงออกของ vitelline protein encoding genes ในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวเต็มวัย

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี Northern blot

นำ RNA ที่สกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยมาแยกด้วย 1.2 % formaldehyde agarose gel electrophoreses และถ่ายลง nitrocellulose membrane จากนั้นทำการ hybridize ด้วย cRNA probe ที่สังเคราะห์จาก clone Egg-Fg-R8 ที่อุณหภูมิ 60 °C 16 ชั่วโมง และทำให้เกิดสีด้วยวิธี immunodetection พบว่า มีแถบที่ติดสีเพียงแถบเดียวขนาดประมาณ 1200 bp (รูปที่ 1.8-7) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ารหัสของ cDNA จาก Clone Egg-Fg-R8 ที่สังเคราะห์ได้ และมีขนาดใหญ่กว่า mRNA ของ vitelline protein BI ของ *F. hepatica* แต่เล็กกว่า mRNA ของ vitelline protein BII ทั้งนี้เนื่องจาก RNA ที่สกัดได้จากพยาธินั้นมีการเติม poly-A tail ที่ปลายด้วย 3' ถึงแม้ว่า vitelline BI และ BII นั้นจะมีรหัสสารพันธุกรรมที่มีความคล้ายคลึงกัน แต่ในส่วนกลางของยีนดังกล่าวมีความแตกต่างกัน ดังนั้นในการ hybridize ที่อุณหภูมิสูง ๆ cRNA probe ที่ใช้จึงมีความจำเพาะสูง และไม่สามารถจับคู่กับ vitelline BII mRNA ได้

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี In Situ hybridization

จากการนำพยาธิตัวเต็มวัยที่ฝังอยู่ใน paraffin มาตัดเป็นแผ่นหนา (section) ประมาณ 10 um และทำการ hybridize section ด้วย cRNA probe ที่สังเคราะห์จาก clone Egg-Fg-R8 ที่อุณหภูมิ 45 °C 16 ชั่วโมง และทำให้เกิดสีด้วยวิธี immunodetection พบว่า มีการติดสีที่ developing vitelline cells

ที่อยู่ภายใน vitelline follicles โดยเริ่มมีสีจาง ๆ ในไซโตพลาสซึมของ vitelline cells ที่กำลังพัฒนาระยะที่ 2 และมีการติดสีเข้มขึ้นในเซลล์ระยะที่ 3 และ 4 ตามลำดับ (รูปที่ 1.8-8A-D) และมีการติดสีเข้มที่สุดใน mature vitelline cells ที่อยู่ใน vitelline ducts นอกจากนี้ยังพบการติดสีที่ vitelline cells ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่อยู่ภายใน uterus โดย vitelline cells ดังกล่าวได้มีการปล่อย eggshell globules ออกจากเซลล์เพื่อสร้างเป็นเปลือกไข่แต่ตัวเปลือกไข่เองไม่ติดสี (รูปที่ 1.8-8E, F)

1.8.3. การสังเคราะห์และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน vitelline B1 ที่ได้จากระบบแบคทีเรีย

การเตรียม recombinant vitelline B1 (rVitelline B1)

ยีน Vitelline B1 ถูกนำมาขยาย (amplify) จำนวนสาย โดยใช้ primers ที่มีตำแหน่งสำหรับ เอนไซม์ที่ตัดดีเอ็นเอ (restriction enzymes) ทั้งในพลาสมิด pET-30b(+) (รูปที่ 1.8-9A) และในยีน Vitelline B1 (รูปที่ 1.8-9B) และเติม FLAG-tag ใน reverse primer เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางอิมมูโน (แสดงในตารางที่ 1.8-1) หลังจากนั้นทำการเชื่อมต่อยีนและพลาสมิดเข้าด้วยกันโดยใช้ เอนไซม์ T4 ligase แล้วย้ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 (DE3) ซึ่งถูกกระตุ้นให้สร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG โปรตีน Vitelline B1 ที่ได้ถูกแยกด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) แล้วย้อมด้วยสี Coomassie blue และ Immunoblotting

ตารางที่ 1.8-1 คู่ primers จำเพาะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทาง PCR

ชุด	Primers	สายนิวคลีโอไทด์
ชุดที่ 1	VB1-pET (Forward)	5'-AACAGACATCATATGTATGACGAC-3'
	VB1-pET (Reverse)	5'-CGGCCGCCATGGCTCGAGCTTGTCTG
		TCATCGTCCTTGTAGTCGTATTTGTCATATGG-3'

การย้ายพลาสมิด pET 30 b(+) เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ด้วยวิธี Heat shock เตรียมเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 (DE3) (competent cells) ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 80 °C มาปรับอุณหภูมิเป็น 0 °C แล้วนำ competent cells 100 ไมโครลิตร ใส่ใน Falcon tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี พลาสมิด pET 30 b(+) 0.1-0.5 นาโนกรัม ทำการผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 0°C นาน 20 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวมาผ่านความร้อน (Heat shock) ที่ 42°C นาน 45 วินาที แล้วนำมาใส่ในภาชนะที่มีน้ำแข็งนาน 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย LB 0.9 มิลลิลิตร ที่ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวจำนวน 100-200

ไมโครลิตรไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด LB-Kanamycin ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16 ชั่วโมง เพื่อให้มีการเจริญของกลุ่มแบคทีเรีย

การตรวจสอบเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pET30 b(+)
ด้วยวิธี Colony screening

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้กระทำโดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัย primers ที่สร้างขึ้น มาใช้ขยายสาย fragment ของยีน vitelline BI โดยวิธี PCR ร่วมกับเอนไซม์ Taq DNA polymerase และ dNTPs โดยใช้ และพลาสมิด pET-30b (+) ที่มียีน Vitelline BI ในกลุ่มของแบคทีเรียเป็นสาย templates ปฏิบัติ PCR จะกระทำในเครื่อง Thermal cycler ที่อุณหภูมิ 94°C, 54°C, 72°C อุณหภูมิละ 1 นาทีเป็นจำนวน 30 รอบ จากนั้นนำผลผลิต PCR มาแยกขนาดใน เจล agarose และเปรียบเทียบกับผลผลิต PCR ของยีน Vitelline BI (รูปที่ 1.8-10)

การสังเคราะห์โปรตีน

นำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL 21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pET30 b(+) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย LB-Kanamycin ในปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ 37 °c นาน 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ LB-Kanamycin ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียต่อที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นกระตุ้นให้เซลล์แบคทีเรียสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียต่อที่ 37°C นาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 0°C นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาปั่นในหลอดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 8-10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน รวบรวมเซลล์ที่ได้ แล้วเติมสารละลาย Tris-Cl และ NaCl 20 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตก โดยใช้ French Press แล้วปั่น ด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่ 4°C เก็บส่วน supernatant ไว้ที่ -20°C เพื่อทำการศึกษาต่อไป

การทำบริสุทธิ์ rVitelline B1 โดยใช้ Ni-NTA คอลัมน์

นำ supernatant ที่ได้มาผ่านลงใน Ni-NTA คอลัมน์ 3 รอบ ซึ่งภายในคอลัมน์ มีเม็ด resin ที่ทำการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เรียบร้อยแล้ว จากนั้นชะโปรตีน rVitelline BI ที่ติดกับเม็ด resin ดังกล่าวด้วยสารละลาย ที่มีส่วนผสมของ imidazole ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เก็บโปรตีนที่ได้ไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การแยกชนิดโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี SDS-PAGE

นำโปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (0.5M Tris-Cl, Sodium dodecyl sulfate, Dithiothreitol, Glycerol และ Bromophenol blue) ซึ่งมีส่วนผสมที่สามารถรีดิวซ์โปรตีนให้อยู่ในรูปของโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) จากนั้นนำสารผสมดังกล่าวมาหยอดบน SDS-PAGE (12% separating gel และ 4% stacking gel) โดยแต่ละแผ่นของ acrylamide gel มีการหยอด molecular weight standard เพื่อใช้ในการวัดหาขนาดของโปรตีนที่ตรวจพบ การแยกโปรตีน

กระทำโดยปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านในปริมาณ 40 มิลลิแอมป์ เป็นเวลานาน 60 นาที ใน electrophoresis buffer (Tris-Cl, Glycine, SDS, pH 8.3) แล้วย้อมสี Coomassie blue เพื่อแสดงแถบโปรตีนเป้าหมาย เปรียบเทียบกับ molecular weight standard และคำนวณหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน พบว่าโปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์มีขนาด 31000 ± 800 kDa (รูปที่ 1.8-11)

การตรวจหาแอนติเจนที่มีความสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูด้วยวิธี

Immunoblotting

นำโปรตีนที่อยู่บนแผ่น acrylamide gel หลังจากผ่านกระบวนการ electrophoresis แล้ว มาถ่ายลงบนแผ่น polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane ใน transfer buffer (Tris-Cl, Glycine, Methanol, pH 9.2) โดยควบคุมให้กระแสไฟฟ้าที่ใช้มีความต่างศักย์คงที่ที่ 20 โวลต์ นาน 60 นาที เมื่อถ่ายโปรตีนแล้วทำการย้อมแผ่น PVDF ด้วยสีย้อม Ponceau S และล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ทำให้สามารถมองเห็นว่าโปรตีนที่ถูกแยกโดย gel electrophoresis นั้นได้ถูกถ่ายมาลงบนแผ่น nitrocellulose แล้ว จากนั้นจึงตัดแผ่น PVDF ออกเป็น strips ตามแต่ละเลนของโปรตีน เก็บ strips ของ molecular weight standard ไว้เพื่ออ้างอิงขนาดโมเลกุลของโปรตีน ในขณะที่ strips ของโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย และโปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์ถูกนำมาล้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.01M TBS, pH 7.4) แล้วจึงนำมาใส่ในสารละลาย 5% skim milk เพื่อป้องกันการจับตัวระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจง จากนั้นจึงนำแต่ละ strips มาแช่ใน antibody-Flag M2 monoclonal antibody หรือเซรัมที่ได้จากหนู โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วจึงใส่แอนติบอดีจำเพาะต่อหนูเมาส์ ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (horse radish peroxidase) แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เมื่อล้างแอนติบอดีที่ติดฉลากกับเอนไซม์ออกแล้วจึงใส่ซับสเตรท (ส่วนผสมระหว่าง Diaminobenzidine, Nickel chloride, 50mM Tris-Cl, 150mM Sodium chloride และ Hydrogen peroxide) โดยในขณะที่ใส่ซับสเตรทลงไปเพื่อทำปฏิกิริยาพบว่าตำแหน่งของโปรตีนจะปรากฏเป็นแถบสีดำของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น หลังจากทึววงแผ่น strips ไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาวัดค่า relative mobility (R_f) เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับ molecular weight standard และคำนวณหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนต่อไป

จากการทดลองทั้งสองวิธีพบว่าแถบโปรตีนมีขนาดเดียวกัน คือมีขนาด 31000 ± 800 kDa เช่นเดียว กับที่แสดงในเจล SDS-PAGE และโปรตีนที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ในการผลิต monoclonal antibody ต่อไป (รูปที่ 1.8-12)

การผลิตและวิเคราะห์โมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) ต่อ recombinant vitelline B1 protein

ได้เตรียมโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ rVit.B1 โดยวิธี 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 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 ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับ recombinant protein (Vitelline B1) แสดง แถบจำเพาะ ที่ ประมาณ 32 kDa (รูปที่ 1.8-13)

1.8.4. การวิเคราะห์หาตำแหน่งการกระจายของแอนติเจน vitelline B1 protein ใน พยัธิตัวเต็มวัย

ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบการกระจายของแอนติเจนในพยัธิตัวเต็มวัย วิธีทำโดยย่อคือ นำ พยัธิตัวเต็มวัยซึ่งเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ โดยการรีดพยัธิตั้งแต่หัวหรือควายที่ติดเชื้อ ล้างด้วย น้ำเกลือหลายๆ ครั้ง แล้วทำการตรึงเนื้อเยื่อพยัธิตัวด้วย 10% formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 70% อัลกอฮอล์ หลายๆ ครั้ง เตรียมชิ้นเนื้อพยัธิตัวด้วย paraffin technique แล้วตัดตัวพยัธิตัวที่ระดับต่างๆ ให้ได้ sections มีความหนาประมาณ 5 ไมครอน ตัด 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 ล้างด้วยน้ำประปาหลังจากนั้นทำลาย endogeneous peroxidase โดยแช่ใน 3% H₂O₂ ใน tap water และ blocking serum (normal horse serum) หลังจากนั้นแช่ใน primary antibodies คือ MoAb ในกลุ่ม negative control เราใช้ myeloma fluid แทน MoAb และในกลุ่ม positive control เราใช้ PoAb ที่สร้างต่อ rVitelline B1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างแอนติบอดีด้วย 0.01M PBS buffer pH 7.5, 0.1% Tween 20 หลังจากนั้นแช่ใน secondary antibodies คือ goat anti mouse conjugate with HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีออกแล้วใส่ substrate คือ 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC substrate kit; Zymed) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาในที่มีผลจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเห็นเป็นสีแดงซึ่งแสดงการกระจายของ vitelline B1 ในเซลล์ชนิดต่างๆ หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบถ่ายภาพแบบดิจิทัล

จากการศึกษาพบว่า ในกลุ่ม Negative control ไม่ปรากฏการติดสีแดงจาก AEC ด้วยวิธี immunoperoxidase ในเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยเลย (รูปที่ 1.8-14A) ส่วนในกลุ่มที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ vitelline B1 ผลปรากฏว่า ส่วนที่ติดสีเข้มได้แก่ เซลล์ใน vitelline gland (รูปที่ 1.8-14B) ส่วนในกลุ่มที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ vitelline B1 ผลปรากฏว่า ส่วนที่ติดสีเข้มได้แก่ เซลล์ใน vitelline gland นอกจากนั้น ยังพบว่า มีการติดสีจางๆที่เนื้อเยื่อ parenchyma และ gut ด้วย (รูปที่ 1.8-14C,D)

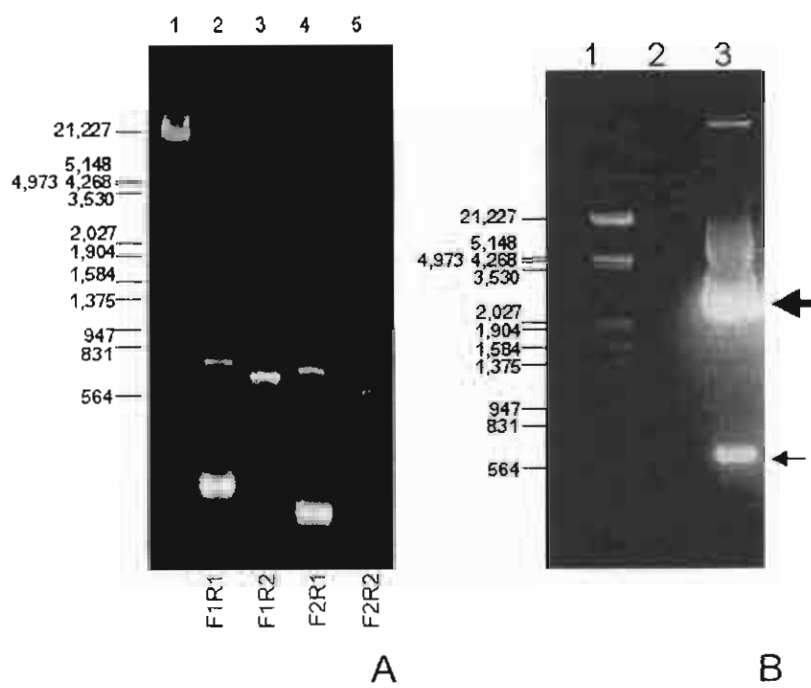
คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.8

- รูปที่ 1.8-1** การเปรียบเทียบลำดับเบสของโปรตีน vitelline BI (FHEVPBI) และ BII (FHEVPBII) ของ *F. hepatica* เพื่อออกแบบ primers: F1, F2, R1 และ R2 คือตำแหน่งที่ใช้เป็น primers
- รูปที่ 1.8-2** A) ภาพของ agarose gel electrophoresis: แถวที่ 1 คือ λ DNA ตัดด้วย *EcoRI* และ *Hind III*, แถวที่ 2-5 cDNA จากกระบวนการ RT-PCR ที่ใช้ primers ที่มี 4 คู่คือ F1R1, F1R1, F2R1 และ F2R2 ตามลำดับ
- B) ภาพของ agarose gel electrophoresis แถวที่ 1 คือ λ DNA ตัดด้วย *EcoRI* และ *Hind III*, แถวที่ 2 ว่าง, แถวที่ 3 คือ PGEM-T easy plasmid vector จาก competent cells ซึ่งมี DNA insert จาก reaction ที่ใส่ในรูป 2A ตัดด้วย *EcoRI* แสดง linear vector (ลูกศรใหญ่) และ inserted cDNA (ลูกศรเล็ก)
- รูปที่ 1.8-3** การเปรียบเทียบลำดับเบสของ Egg-Fg4 กับ vitelline proteins BI (FHEVPBI) และ BII (FHEVPBII) ของ *F. Hepatica*
- รูปที่ 1.8-4** A) ภาพของ nitrocellulose membrane ที่ผ่านกระบวนการ plaque lift และ hybridize ด้วย cRNA probe แสดง plaques ที่ให้ผลบวก (ลูกศร)
- B) ภาพของ agarose gel electrophoresis: แถว M คือ λ DNA ตัดด้วย *EcoRI* and *Hind III* ใช้สำหรับเทียบขนาดของ cDNA แถวที่ 1-10 คือ PCR products ที่ได้จาก positive plaques โดยใช้ T3 และ T7 primers
- C) ภาพของ DNA จากภาพ B ที่ถ่ายลงบน nitrocellulose membrane และ hybridized ด้วย cRNA probe แสดงการติดสีทั้ง 10 ตัวอย่าง
- รูปที่ 1.8-5** การเปรียบเทียบรหัส nucleotides ของ Egg-Fg-R8 (FGIVPBI) กับรหัส nucleotides ของ vitelline proteins BI (FHEVPBI) และ BII (FHEVPBII) of *F. hepatica*
- รูปที่ 1.8-6** การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ของ Egg-Fg-R8 (FGIVPBI) กับลำดับกรดอะมิโนของ vitelline proteins BI (FHEVPBI) และ BII (FHEVPBII) ของ *F. hepatica*

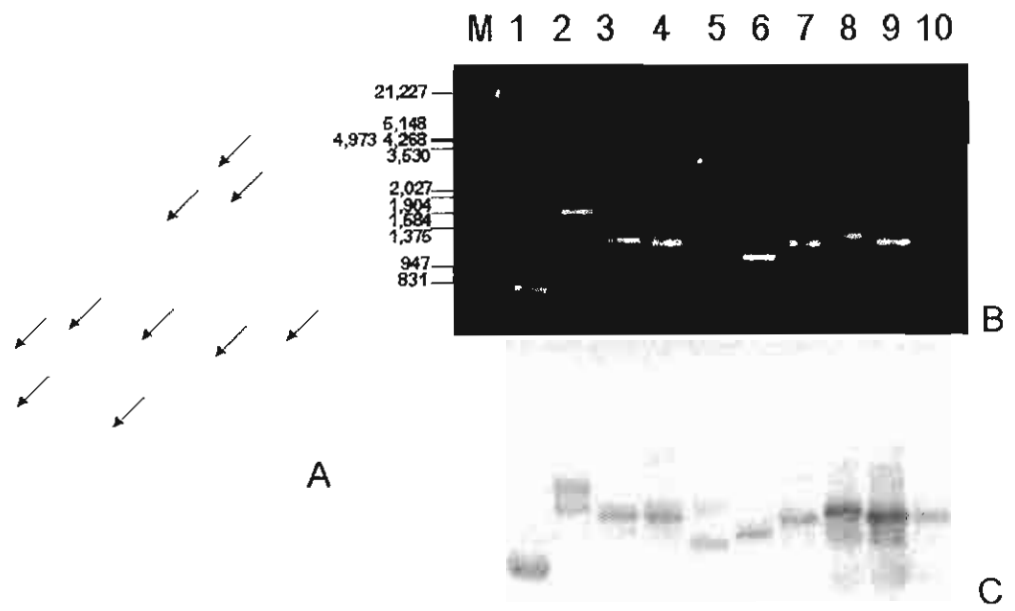
- รูปที่ 1.8-7** A) ภาพ formaldehyde agarose gel electrophoresis: แถวที่ 1 RNA marker, แถวที่ 2 total RNA ที่สกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย
B) ภาพของ total RNA จากภาพ A ซึ่งถ่ายลง nitrocellulose membrane แล้ว hybridized ด้วย cRNA probe และทำให้เกิดสีด้วยวิธี immuno-detection ซึ่งพบแถบสีของ RNA ที่มีขนาดประมาณ 1000 bp (ลูกศร)
- รูปที่ 1.8-8** A-D) ภาพ *In Situ* hybridization ของ vitelline follicles ในพยาธิตัวเต็มวัย ที่ hybridized ด้วย cRNA probe ที่สังเคราะห์จาก Egg-Fg-R8 แสดงการติดสีที่ vitelline cells ที่กำลังพัฒนาดังแต่ ระยะเวลาที่ 2 3 และ 4 ส่วนระยะที่ 1 ไม่ติดสี
E, F) ภาพ *In Situ* hybridization บริเวณ uterus (Ut) ของ พยาธิตัวเต็มวัย ที่ hybridized ด้วย cRNA probe ที่สังเคราะห์จาก Egg-Fg-R8 แสดงการติดสีที่ vitelline cells (Vc) ที่อยู่ภายในเปลือกไข่ (Sh); Ep คือ epithelial cells ของ uterus
- รูปที่ 1.8-9** A) ภาพของ agarose gel electrophoresis แถวที่ 1 คือ 1 kb DNA ladder และ แถวที่ 2 คือ พลาสมิด pET-30b (+)
B) ภาพของ agarose gel electrophoresis แถวที่ 1 คือ 1 kb DNA ladder และ ผลิตผล PCR ของยีน Vitelline B1
- รูปที่ 1.8-10** ภาพถ่ายของ agarose gel electrophoresis แถวที่ 1 คือ 1 kb DNA ladder, แถวที่ 2 ผลิตผล PCR ของยีน Vitelline B1, แถวที่ 3 และ 4 ผลิตผล PCR ของยีน Vitelline B1 จากวิธี Colony screening
- รูปที่ 1.8-11** rVitelline B1 ที่ได้จากการแยกด้วย SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie ปรากฏแถบ rVitelline B1 มีขนาดประมาณ 31 kDa
- รูปที่ 1.8-12** rVitelline B1 บน แผ่น PVDF มีความจำเพาะต่อการถูกจับด้วยแอนติบอดีที่ได้จากหนู และ antibody-Flag M2 monoclonal antibody ซึ่งปรากฏแถบสีที่ประมาณ 32 kDa
- รูปที่ 1.8-13** rVitelline B1 บน PVDF membranes มีความจำเพาะต่อการถูกจับด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดี react กับ recombinant protein (Vitelline B1) แสดง specific band ที่ประมาณ 32 kDa

รูปที่ 1.8-14 การวิเคราะห์หาตำแหน่งการกระจายของแอนติเจน vitelline B1 protein ใน พยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี immunoperoxidase พบว่าในกลุ่ม Negative control ไม่ปรากฏการติดสีแดงจาก AEC ในเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยเลย (รูปที่ 1.8-14A) และในกลุ่มที่ย้อมด้วย PoAb ต่อ vitelline B1 ผลปรากฏว่า ส่วนที่ติดสีเข้มได้แก่ เซลล์ใน vitelline gland (รูปที่ 1.8-14B) ส่วนในกลุ่มที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ vitelline B1 ผลปรากฏว่า ส่วนที่ติดสีเข้มได้แก่ เซลล์ใน vitelline gland นอกจากนั้นยังพบว่า มีการติดสีจางๆที่เนื้อเยื่อ parenchyma และ gut ด้วย (รูปที่ 1.8-14C,D)

FHEVPBII	1	CATG		80
FHEVPBI	1	---		76
			F2	
FHEVPBII	81			160
FHEVPBI	77			156
FHEVPBII	161			240
FHEVPBI	157			236
FHEVPBII	241			320
FHEVPBI	237			316
FHEVPBII	321			400
FHEVPBI	317			396
FHEVPBII	401			480
FHEVPBI	397			476
FHEVPBII	481			560
FHEVPBI	477			556
			F1	
FHEVPBII	561	TCTG		640
FHEVPBI	557	CTAC		636
			R2	
FHEVPBII	641			720
FHEVPBI	637			716
			R1	
FHEVPBII	721			800
FHEVPBI	717			796
FHEVPBII	801			880
FHEVPBI	797			871
FHEVPBII	881			960
FHEVPBI	872			888

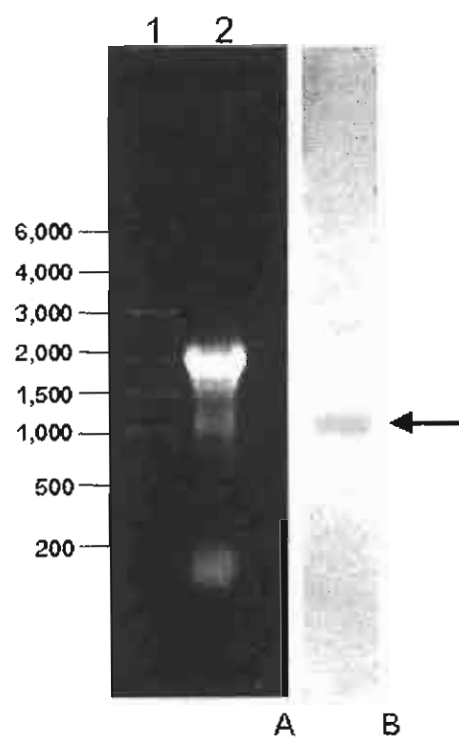


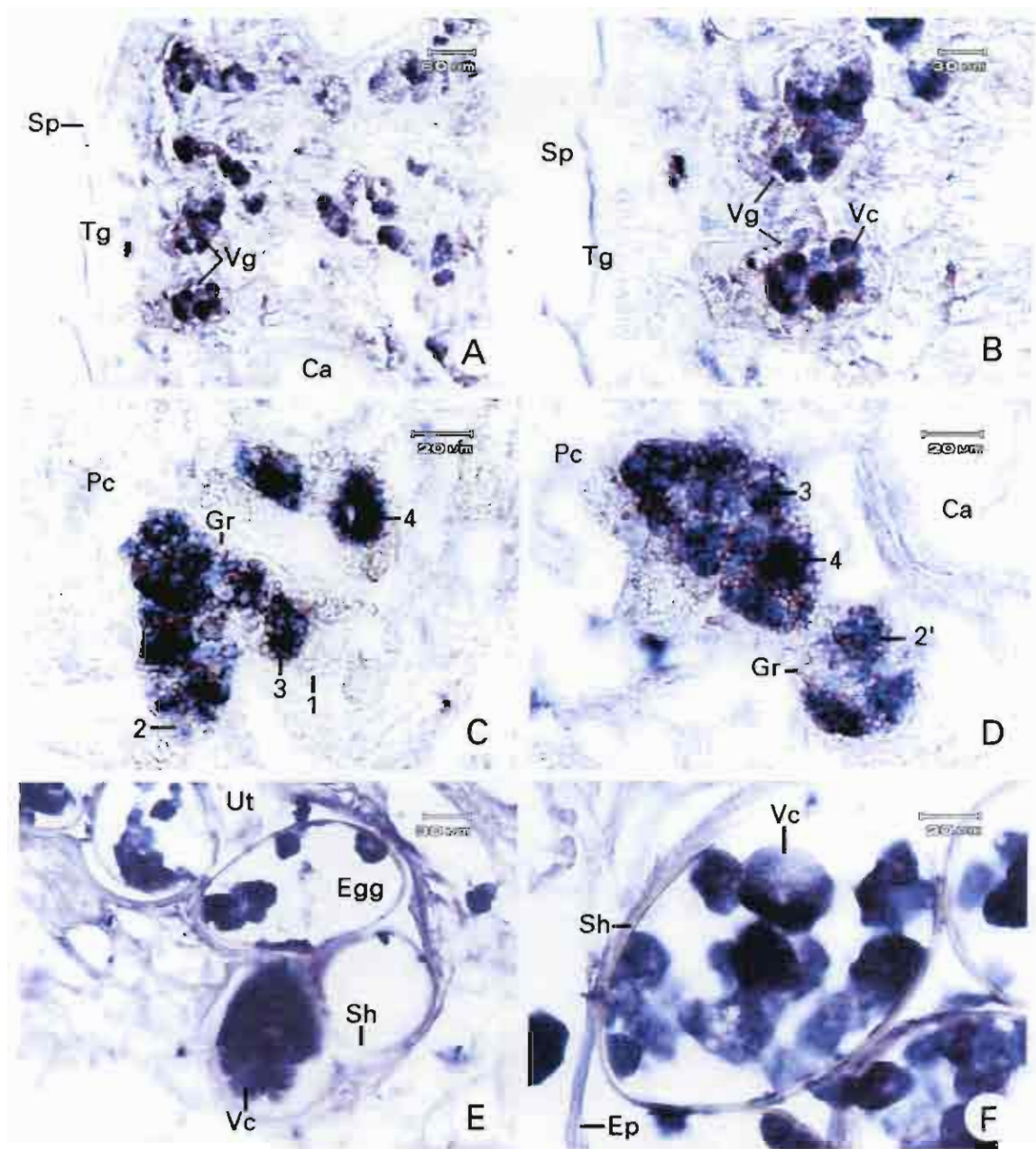
FHEVPBII	1	CATGACCAAATGAAAAATGAAGTTCACITTTAGTGCTTCTGTTGGCAATCGTCCCACTCACACTTGCTCGGC	70
FHEVPBI	1		66
Egg-Fg-4	1		1
FHEVPBII	71	ACCCGCACGGCAAGTTCACAG.....	140
FHEVPBI	67		136
Egg-Fg-4	1		48
FHEVPBII	141		210
FHEVPBI	137		206
Egg-Fg-4	49		118
FHEVPBII	211		280
FHEVPBI	207		276
Egg-Fg-4	119		188
FHEVPBII	281		350
FHEVPBI	277		346
Egg-Fg-4	189		258
FHEVPBII	351		420
FHEVPBI	347		416
Egg-Fg-4	259		328
FHEVPBII	421		489
FHEVPBI	417		485
Egg-Fg-4	329		398
FHEVPBII	490		559
FHEVPBI	486		555
Egg-Fg-4	399		468
FHEVPBII	560		629
FHEVPBI	556		625
Egg-Fg-4	469		538
FHEVPBII	630		699
FHEVPBI	626		695
Egg-Fg-4	539		600
FHEVPBII	700	TCTGCGCCAGCAAGAGTGAGAATTATGGGAATGCACGTGAATCCGGACGATATGAGCCTTATGGACGAT	769
FHEVPBI	696		765
Egg-Fg-4	600		600
FHEVPBII	770	ATGAGAAATATGAGGATGATTACGCGAGGGAGACTCCATATGACAAATACAGTTACTAAACTCACACGGT	839
FHEVPBI	766	TGA..TTTA..	835
Egg-Fg-4	600		600

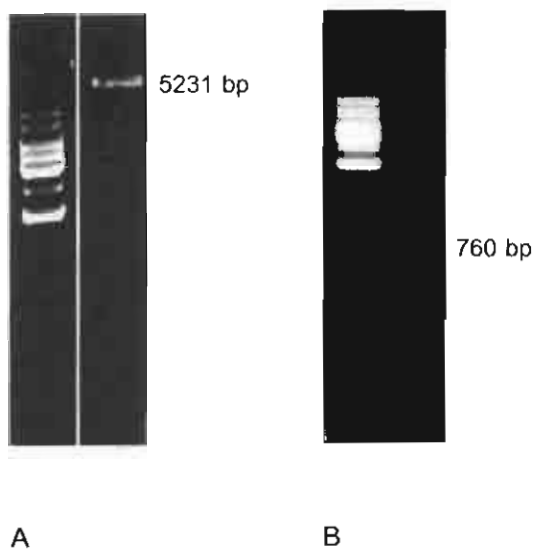


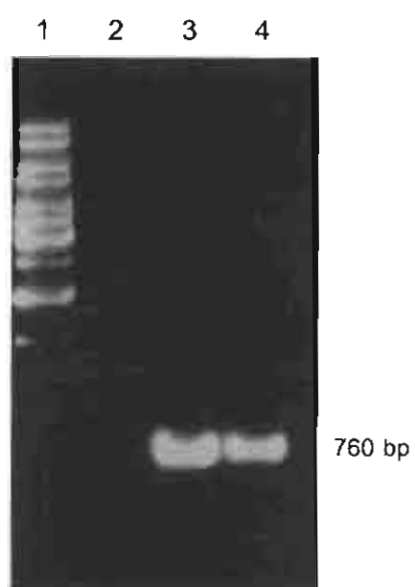
FGIVPBI	1	-----	55
FHEVPBI	1	ACCAAATGAAA	66
FHEVPBII	1	CATGACCAAATGAAA	70
FGIVPBI	56	-----	125
FHEVPBI	67	-----	136
FHEVPBII	71	-----	140
FGIVPBI	126	-----	195
FHEVPBI	137	-----	206
FHEVPBII	141	-----	210
FGIVPBI	196	-----	265
FHEVPBI	207	-----	276
FHEVPBII	211	-----	280
FGIVPBI	266	-----	335
FHEVPBI	277	-----	346
FHEVPBII	281	-----	350
FGIVPBI	336	AAATGAC	405
FHEVPBI	347	-----	416
FHEVPBII	351	TCGGA	420
FGIVPBI	406	-----	475
FHEVPBI	417	-----	486
FHEVPBII	421	-----	490
FGIVPBI	476	-----	545
FHEVPBI	487	-----	556
FHEVPBII	491	-----	560
FGIVPBI	546	CTAC	615
FHEVPBI	557	-----	626
FHEVPBII	561	TCTG	630
FGIVPBI	616	-----	685
FHEVPBI	627	-----	696
FHEVPBII	631	-----	700
FGIVPBI	686	-----	755
FHEVPBI	697	-----	766
FHEVPBII	701	-----	770
FGIVPBI	756	-----	822
FHEVPBI	767	-----	833
FHEVPBII	771	-----	840
FGIVPBI	822	-----	867
FHEVPBI	833	-----	888
FHEVPBII	841	-----	910
FGIVPBI	867	-----	867
FHEVPBI	888	-----	888
FHEVPBII	911	TTGTTTAGTGCAATTTTCATAATAACAGAAACGTATCACGGAATCGTGCCACCATCGGGAGACTGGCCAG	980

FGIVPBI	1	--	ERTLYVILLATVPLTLARHNSHTSMHAYDNRHCHNGTFHENCYLTTELCGFARHAYLHNPPI	68
FHEVPBI	1	MR		70
FHEVPBII	1	MR		70
FGIVPBI	69		GHENEWIDC MYS LARHNGHCHNMTANCDKYNIMAMTLMTPHAWDS	138
FHEVPBI	71			140
FHEVPBII	71			140
FGIVPBI	139		STURTSTHLK N PC LARHNGHCHNMTANCDKYNIMAMTLMTPHAWDS	208
FHEVPBI	141			210
FHEVPBII	141			210
FGIVPBI	209		YNAHJLUTHEPTARHNGHCHNMTANCDKYNIMAMTLMTPHAWDS	270
FHEVPBI	211			272
FHEVPBII	211			272

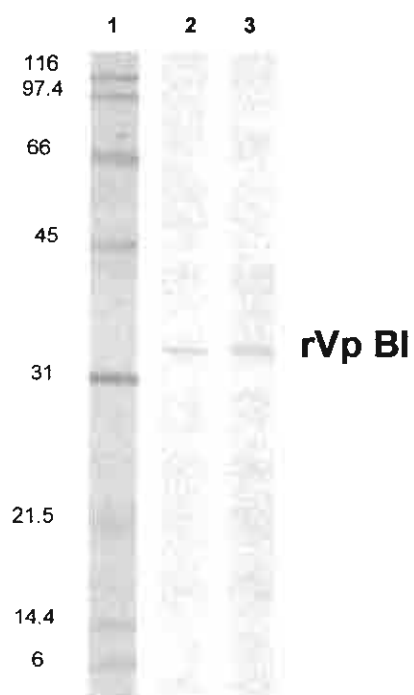


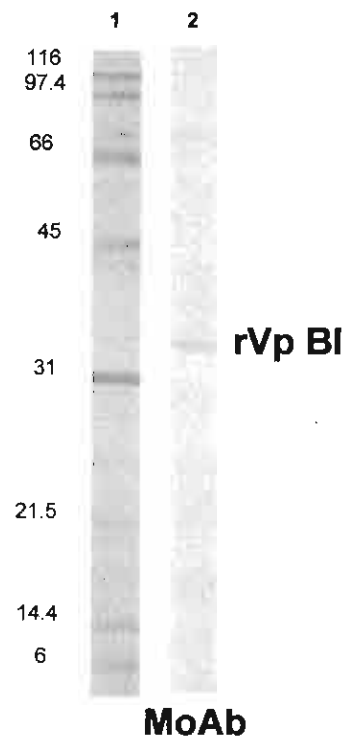


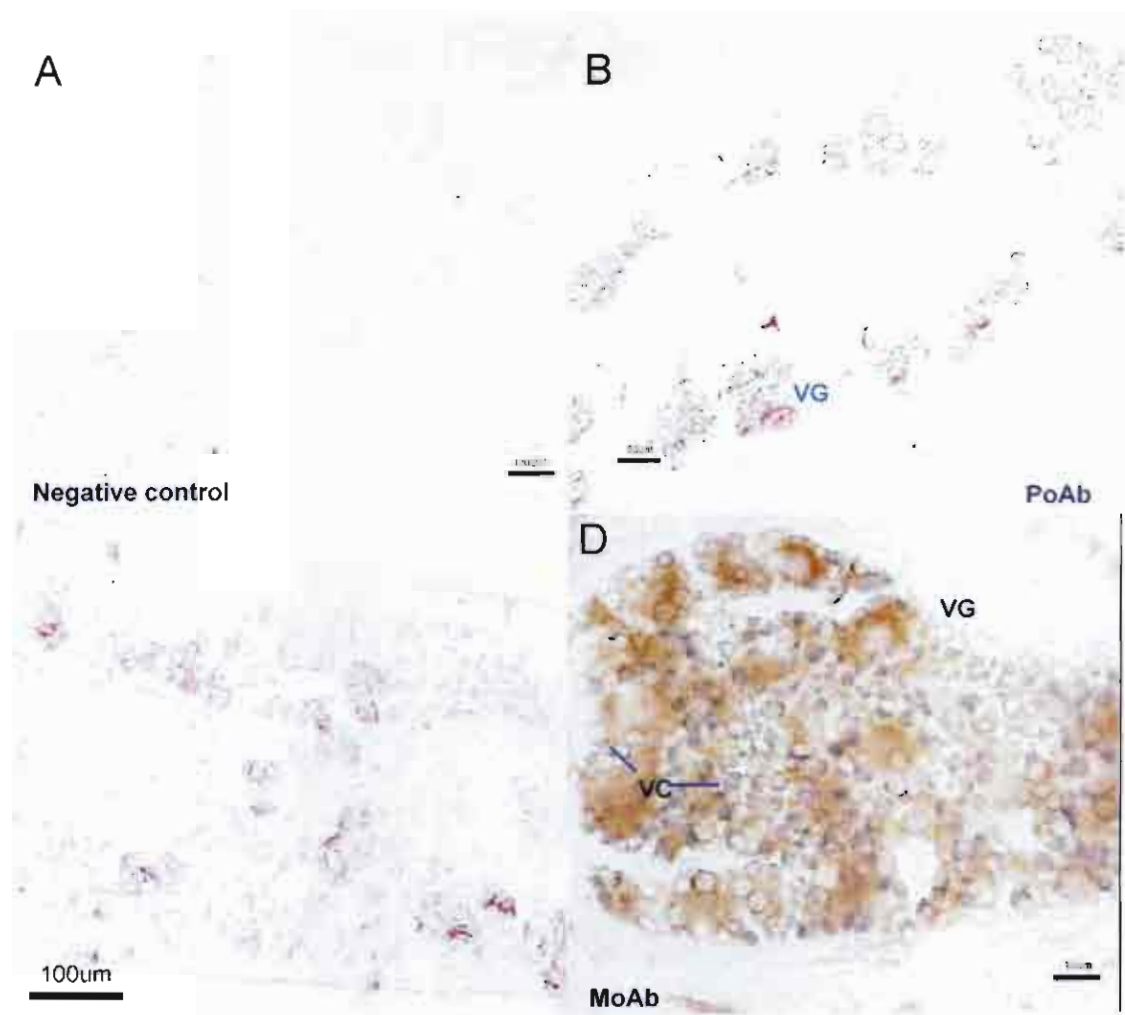












โครงการที่ 2 การควบคุมกระบวนการสร้างและหลังเซลล์สืบพันธุ์โดยประสาทฮอริโมนในหอยเป่าฮื้อ (Neuroendocrine controls of gametogenesis and spawning in a tropical abalone, *Haliotis asinina*)

เราได้ทำการศึกษาภาพรวมเพื่อวิเคราะห์และบ่งชี้ว่ามีสารสื่อประสาท (Neurotransmitter-NE) และสารขยายสัญญาณประสาท (Neuromodulator-NM) ตัวใดบ้างที่เป็นสารหลักในระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อโดยใช้กรรมวิธี dot blot ELISA ซึ่งกล่าวโดยสั้น ๆ คือ นำปมประสาท gonad และ tentacles (epipodia) ของหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัยที่อยู่ในระยะซึ่ง gonad พัฒนาเต็มที่มาบดให้ละเอียดในสารละลาย Tris buffer, pH 8.0 แล้วนำ crude extracts ที่ได้ไปหยดลงบนแผ่น nitrocellulose membranes (NC) โดยควบคุมปริมาณโปรตีนที่หยดลงไปให้ความเข้มข้น 1, 0.1, 0.01 µg/ml นำแผ่น NC ไปอบแห้งแล้วแช่ใน 5% skimmed milk 2 ชั่วโมงเพื่อป้องกัน non-specific binding จากนั้นนำแผ่น NC ไปแช่ในสารละลายที่มีโมโนโคลนัลแอนติบอดี (mouse MoAb) ต่อ 5-HT, GABA, FMRFamide และฮอริโมนเพศ (dihydrotestosterone-DHT และ estradiol-ES) และ prostaglandin E₂ (PGE₂) 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่น NC ที่ล้างแล้วไปแช่ในสารละลายที่มี rabbit antimouse IgG ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (HRP) 30 นาที นำไปแช่ใน ECL (Chemiluminescence substrate) แล้วทำการ expose แผ่น NC กับฟิล์มเอกซเรย์แบบไวต่อแสง นอกจากเนื้อเยื่อของปมประสาทและ gonad ของหอยเป่าฮื้อแล้ว เรายังนำ crude extract ของปมประสาทและ ovotestis ของหอยทากยักษ์ (Achatina fulica) และ crude extracts จากสมอง กล้ามเนื้อ ม้าม และรังไข่ของหนู mouse มาศึกษาเปรียบเทียบด้วย

ผลปรากฏว่า (ตารางที่ 2-1, รูปที่ 2-1) 5-HT มีปริมาณสูงในปมประสาท cerebral และ pleuropedal ของหอยเป่าฮื้อ และมีปริมาณปานกลางใน gonad ทั้ง testis และ ovary ส่วนใน epipodial tentacles ไม่ปรากฏว่ามี 5-HT อยู่เลย 5-HT มีปริมาณสูงเช่นกันในปมประสาทของหอยทากยักษ์แต่มีปริมาณต่ำใน ovotestis ส่วน mouse brain และ mouse muscle มีปริมาณปานกลาง ใน mouse spleen และ ovary มีปริมาณ 5-HT ต่ำ

GABA มีปริมาณปานกลางในปมประสาทของหอยเป่าฮื้อและปริมาณต่ำใน gonad และ epipodia ในปมประสาทและ ovotestis ของหอยทากยักษ์ที่นำมาทำเปรียบเทียบมีปริมาณของ GABA สูง ใน mouse brain และ muscle, ovary มีปริมาณ GABA สูงเช่นกัน ส่วนใน mouse spleen มีปริมาณ GABA ปานกลาง

FMRFamide มีปริมาณสัมพันธ์ในปมประสาทและ gonad ของหอยเป่าฮื้อเหมือนกับ 5-HT และเนื้อเยื่อของหอยทากยักษ์มีปริมาณ FMRF สูงในปมประสาท มีปริมาณปานกลางใน ovotestis ส่วนในเนื้อเยื่อของหนู mouse มีปริมาณ FMRF คล้ายคลึงกับ 5-HT และไม่ปรากฏว่ามี FMRF อยู่ใน epipodia เลย

Prostaglandin มีปริมาณปานกลางในปมประสาทของหอยเป่าฮื้อและมีปริมาณต่ำใน gonad ส่วนในปมประสาทและ ovotestis ของหอยทากมีปริมาณค่อนข้างสูง ในขณะที่ใน mouse brain และ ovary มีปริมาณปานกลาง ส่วน mouse muscle มีปริมาณต่ำ และใน epipodia ของหอยเป่าฮื้อไม่ปรากฏว่ามี PGE₂ อยู่เลย

นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งในปมประสาทและ gonads ของหอยเป่าฮื้อไม่ปรากฏว่ามีฮอร์โมนเพศ DHT และ ES อยู่เลย ในขณะที่มีฮอร์โมนเพศทั้งสองชนิดปรากฏชัดเจนในปมประสาทและ ovotestis ของหอยทากในปริมาณค่อนข้างสูง อีกทั้งมีปริมาณ DHT และ ES ใน mouse brain ค่อนข้างสูงในขณะที่เนื้อเยื่ออื่น ๆ ของหนูมีปริมาณปานกลาง

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า 5-HT, GABA และ FMRFamide เป็นสารสื่อประสาทและ neuromodulator ตัวหลักในระบบประสาทโดยเฉพาะในปมประสาทของหอยเป่าฮื้อ 5-HT และ FMRFamide มีปริมาณปานกลางใน gonad ส่วนใน epipodia นั้นมี GABA อยู่เพียงอย่างเดียว PGE₂ ก็เป็นฮอร์โมนหลักที่ปรากฏในระดับปานกลางในเนื้อเยื่อประสาทและเนื้อเยื่อสืบพันธุ์ ส่วนฮอร์โมนเพศทั้ง DHT และ ES ไม่ปรากฏอยู่เลยทั้ง ๆ ที่มีปริมาณค่อนข้างสูงในปมประสาทและ ovotestis ของหอยทากและเนื้อเยื่อของหนู mouse ดังนั้นในการศึกษาช่วงถัดไปเราจึงได้มุ่งเน้นที่ 5-HT, GABA, FMRFamide และ prostaglandin E₂

ตาราง 2-1 สรุปผลการวัดปริมาณสัมพัทธ์ของสารสื่อประสาท (Neurotransmitters) และสารขยายสัญญาณประสาท (Neuromodulators) โดยวิธี dot blot ELISA ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของหอยเป่าฮื้อ หอยทากยักษ์และหนู mouse

	Intensity of Dot Blot Immunoreactivity for Each Hormone or Peptide					
	5-HT	FMRFamide	GABA	PGE ₂	DHT	ES
Mouse Brain	++	++	+++	++	++	+++
Mouse Muscle	++	+	+++	+	++	++
Mouse Spleen	+	++	++	+	++	++
Mouse Ovary	+	+	+++	++	++	++
Rat Leydig Cells	+++	+	++	++	+++	+
Achatina Cerebral Ganglion	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Achatina Pleuro-parietal-visceral Complex	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Achatina Ovotestis	+	++	+++	++	+	+
Haliotis Cerebral Ganglion	+++	+++	++	++	-	-
Haliotis Pleuropedal Ganglion	+++	+++	++	++	-	-
Haliotis Ovary	++	++	+	+	-	-
Haliotis Testis	++	++	+	+	-	-
Haliotis Epipodium	-	-	+	-	-	-

DHT = Dihydrotestosterone

ES = Estradiol

PGE₂ = Prostaglandins E₂

5-HT = Serotonin

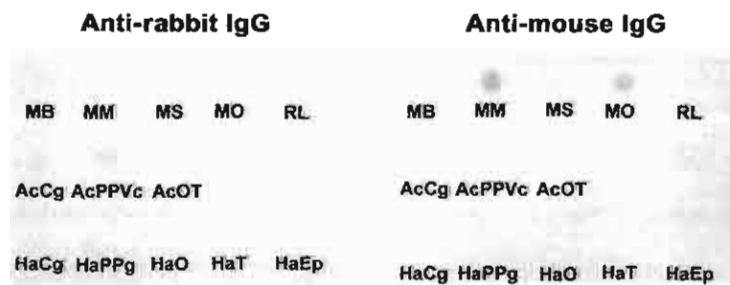
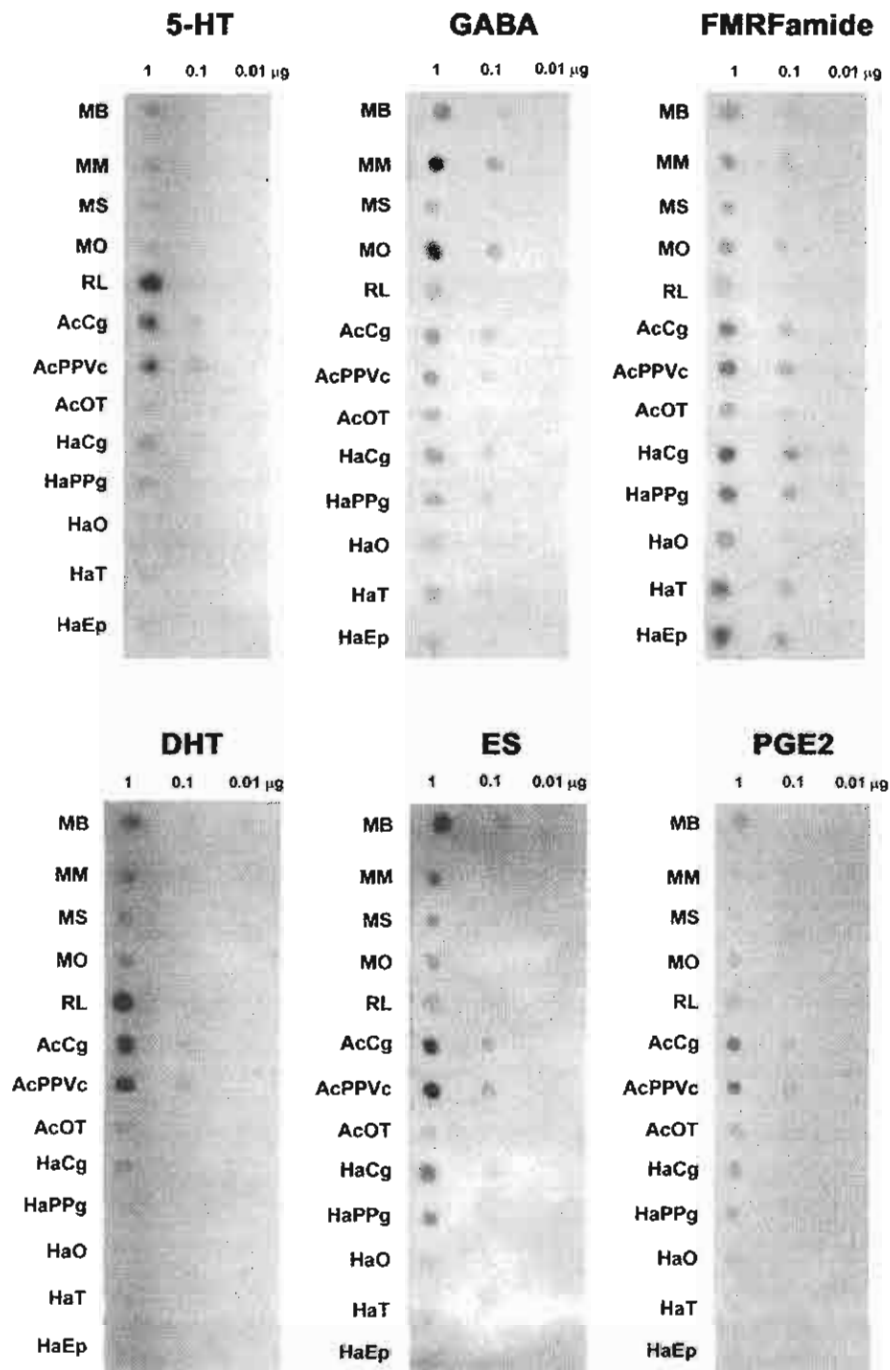
GABA = Gamma aminobutyric Acid

FMRFamide = Phe-Met-Arg-Phe-NH₂

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2

รูปที่ 2-1 แสดงผลการทำ dot blot ELISA ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ที่มีโปรตีนสกัดจากเนื้อเยื่อประสาทและเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อ หอยทากยักษ์และหนู โดยใช้ปริมาณโปรตีนสกัดที่ความเข้มข้น 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ แล้วย้อมด้วยแอนติบอดีต่อสารสื่อประสาทและสารขยายสัญญาณประสาทที่ความเข้มข้น 1:500 จากนั้นย้อมด้วย anti-IgG ที่ความเข้มข้น 1: 14,000 ซึ่งติดฉลากด้วย HRP แล้ว expose ลงบนฟิล์มโดยใช้ chemiluminescence kit เป็น substrate, แผ่น nitrocellulose 2 แผ่นด้านล่างเป็น negative control ซึ่งย้อมด้วยเฉพาะ secondary antibody โดยแช่ในสารละลาย Tris buffer ผสม skimmed milk แทน primary antibodies

5-HT= serotonin, ES= estradiol, PGE2= prostaglandins E2, DHT= dihydrotestosterone, GABA= Gamma aminobutyric acid, FMRFamide= Phe-Met-Arg-Phe-NH₂, MS= mouse brain, MM= mouse muscle, MS= mouse spleen, MO= mouse ovary, RL= rat Leydig cells, AcCg= Achatina cerebral ganglion, AcPPVc= Achatina pleuro-parietal-visceral ganglion, AcOT= Achatina ovotestis, HaCg= Haliotis cerebral ganglion, HaPPg= Haliotis pleuropedal ganglion, HaO= Haliotis ovary, HaT= Haliotis testis, HaEp= Haliotis epipodial tentacles.



2.1. การศึกษาลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท serotonin ในปมประสาท (Neural ganglia) ของหอยเป่าฮือตัวเต็มวัย

สารสื่อประสาท (Neurotransmitter-NE) โดยเฉพาะเซโรโทนิน (5hydroxytryptamine-5HT) เป็นสาร NE ที่หลั่งออกจากเซลล์ประสาทซึ่งถูกกระตุ้นโดยการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ อาหาร ระยะเวลาสว่าง ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของหอยและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด มีการศึกษาที่แสดงว่า 5-HT เป็น NE หลักที่ควบคุมการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ การสร้างและการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตลอดจนการควบคุมพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด แต่ยังไม่มีการศึกษาในหอยเป่าฮือ เราจึงได้ศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท serotonin ในปมประสาท Cerebral, Pleuropedal และ Visceral ของหอยเป่าฮือ *Halotis asinina* โดยการใช้กรรมวิธี immunoperoxidase ที่ขยายสัญญาณโดย NiCl_2 โดยได้ทำแผนที่การกระจายและนับจำนวนเซลล์ที่มีสารสื่อประสาทดังกล่าวพบว่า สามารถแยกกลุ่มของเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารสื่อประสาท serotonin ซึ่งมีการกระจายของกลุ่มเซลล์ที่แตกต่างกันดังนี้

- ปมประสาท Cerebral

พบเซลล์ที่มี serotonin อยู่เป็นกลุ่มบริเวณครึ่งบนของขอบด้านในของปมประสาท (upper half of medial edge) (รูปที่ 2.1-1B, C; 2.1-2) ส่วนบริเวณขอบนอก (lateral edge) และ ขอบบน (dorsal edge) สามารถพบได้บ้างแต่มีจำนวนน้อยกว่า พบเส้นใยประสาทที่มี serotonin กระจายอยู่ทั่วไปใน neuropil ของปมประสาท นอกจากนี้ยังพบแขนงที่แยกออกมาจากปมประสาทที่บริเวณหัวและ buccal nerve ของหอยเป่าฮือมีใยประสาทแบบ serotonin ด้วย (รูปที่ 2.1-1B) จากลักษณะทางจุลกายวิภาคพบว่า เซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารสื่อประสาท serotonin สามารถแยกได้เป็น 2 ประเภทตามการจำแนกโดย Upatham, et al (1998) และ Kruatrachue et al (1999) คือ เซลล์ประสาทขนาดใหญ่ (NR) และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนขนาดกลาง (NS) โดยเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ (NR_1) (ขนาดประมาณ $10 \times 20 \mu\text{m}$) มีรูปร่างเป็นวงรีหรือพีระมิดที่มักมีกึ่งขนาดใหญ่คล้ายกับ axon ยื่นออกไปจากตัวเซลล์ ภายในนิวเคลียสมีลักษณะใสเนื่องจากบรรจุ euchromatin และมีนิวคลีโอลัสขนาดใหญ่ (รูปที่ 2.1-1E, F) ซึ่งต่างจากเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (NS) ที่มีขนาด $8 \times 10 \mu\text{m}$ ลักษณะของเซลล์เป็นรูปวงรีภายในนิวเคลียสค่อนข้างทึบ เนื่องจากมีก้อน heterochromatin ขนาดใหญ่และมีปริมาณมากกว่าที่พบในเซลล์ NR โดยเกาะอยู่ตามขอบของนิวเคลียสและกระจายอยู่ทั่วไป และไม่มีแขนงยื่นออกจากตัวเซลล์ (รูปที่ 2.1-1G) ส่วนในเซลล์ประสาทขนาดเล็ก ($\text{NR}_{2,3,4}$) ที่มีขนาดเล็กกว่า $6 \times 8 \mu\text{m}$ ไม่พบว่ามี serotonin อยู่เลย (รูปที่ 2.1-1E-F) จำนวนของเซลล์ประสาทที่แสดง serotonin มีประมาณ 70/2300 เซลล์ต่อภาคตัดขวางของปมประสาท cerebral

- ปมประสาท Pleuro-pedal

ในปมประสาท pleuro-pedal พบเซลล์ serotonin จำนวนมากในชั้น cortex ที่บริเวณหนึ่งในสามของช่วงบน (upper one third) ของขาบน (dorsal horn) และหนึ่งในสามของช่วงล่าง (lower one third) ของขาล่าง (ventral horn) ของปมประสาท (รูปที่ 2.1-1A-C) และพบว่ามีเซลล์ serotonin กระจายตัวไปตามขอบข้าง (lateral edge) ของขาล่าง (ventral horn) (รูปที่ 2.1-1A; 2.1-4B) พบเส้นใยประสาทที่มี serotonin กระจายอยู่ทั่วไปใน neuropil ของปมประสาท โดยเฉพาะในส่วน medulla ของขาบน (dorsal horn) และขาล่าง (ventral horn) (รูปที่ 2.1-1A, C) เซลล์ประสาทที่มี serotonin มีลักษณะเหมือนเซลล์ประสาทในปมประสาท cerebral (รูปที่ 2.1-1D, E) จำนวนของเซลล์ประสาทที่แสดง serotonin มีประมาณ 120/2700 เซลล์ต่อภาคตัดขวางของปมประสาท

- ปมประสาท Visceral

พบเซลล์ที่แสดง serotonin อยู่รวมกันเป็นกลุ่มที่บริเวณขอบข้างด้านขวา (right lateral edge) และขอบข้างด้านขวา-ล่าง (right latero-ventral edge) ของปมประสาท visceral (รูปที่ 2.1-3A-C; 2.1-4) พบเส้นใยประสาทที่มี serotonin จำนวนเล็กน้อยกระจายอยู่ทั่วไปบริเวณ neuropil ของปมประสาท (รูปที่ 2.1-3A-C) เซลล์ประสาทที่มี serotonin มีลักษณะเหมือนกับเซลล์ประสาทในปมประสาท cerebral และ pleuropedal (รูปที่ 2.1-3D, E) จำนวนของเซลล์ที่แสดง serotonin มีประมาณ 50/400 เซลล์ต่อภาคตัดขวางของปมประสาท

จากผลการทดลองดังกล่าวอาจสรุปได้ว่า 5HT ที่อยู่ในเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ (NR_1) อาจเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณผ่านใยประสาทไปตามเส้นประสาท (nerve) ที่แตกออกจากปมประสาททั้งสามเพื่อไปควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อที่เป็น somatic muscles (โดย NR_1 ในปมประสาท cerebral และ pleuropedal) และ visceral muscles (โดย NR_1 ในปมประสาท pleuropedal และ visceral) เนื่องจาก 5HT สามารถกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อได้ ส่วน 5HT ที่พบในเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (NS) อาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมการพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ตลอดจนพฤติกรรมทางเพศของหอยเป่าฮื้อ

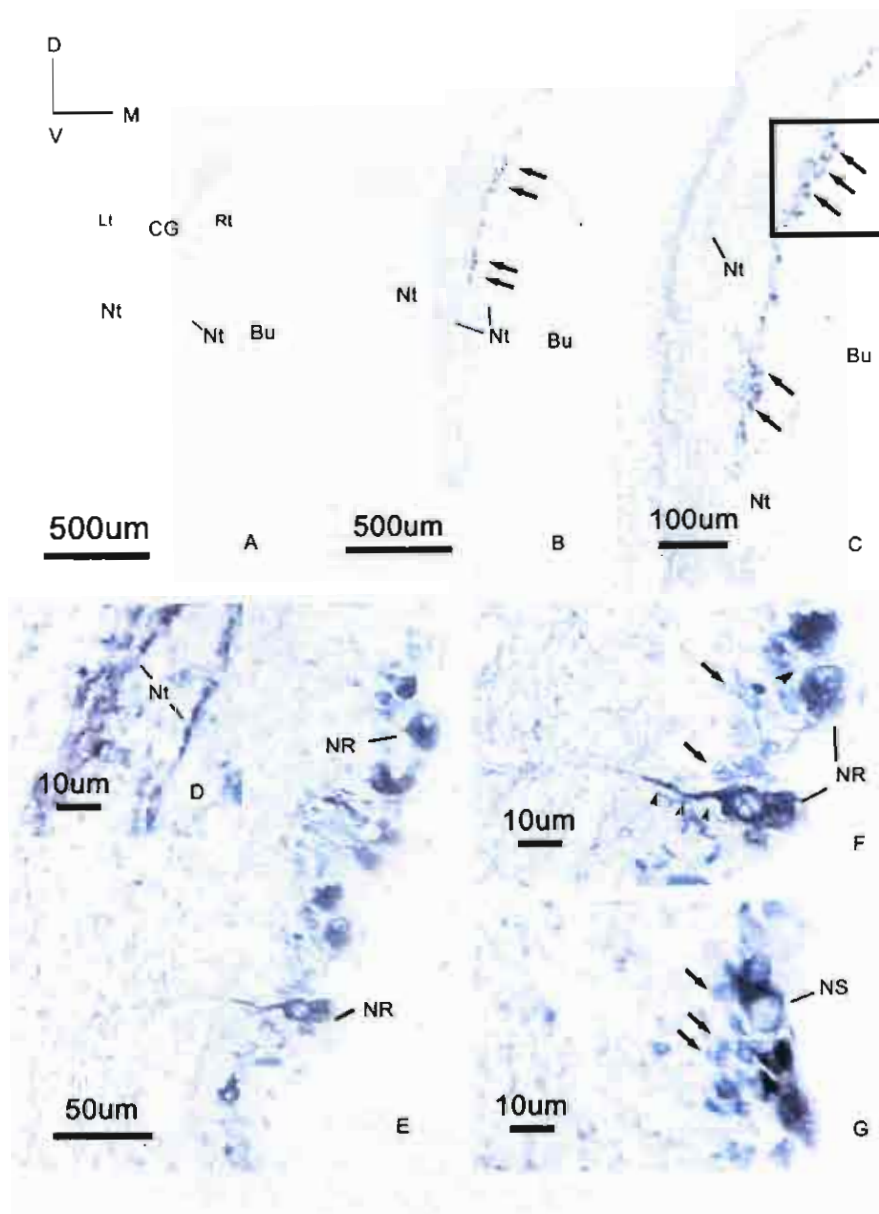
- อวัยวะสืบพันธุ์

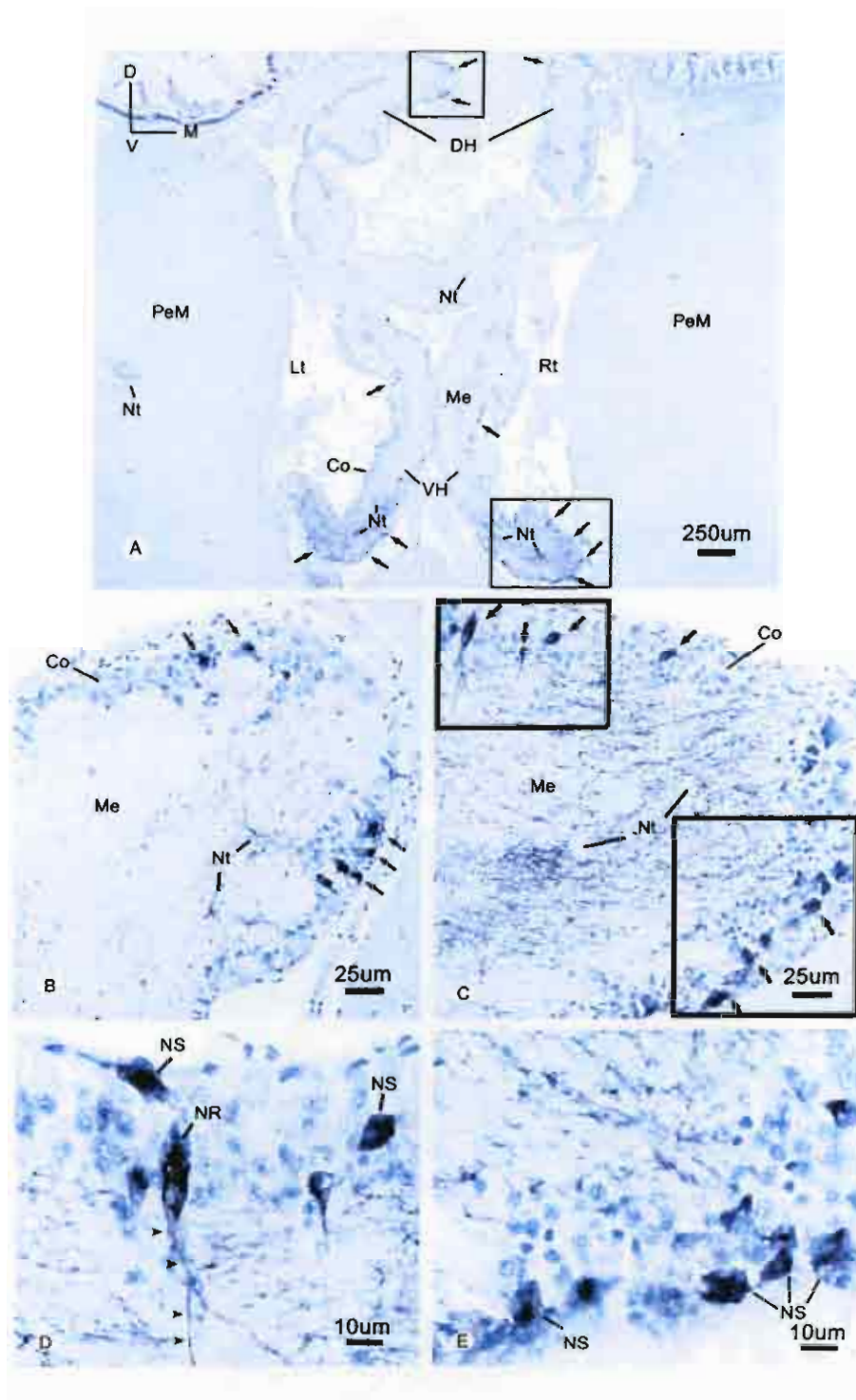
พบการติดของ serotonin ที่บริเวณเยื่อแคปซูลด้านนอก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae ในอัมตะ (รูปที่ 2.1-5A-D) และรังไข่ (รูปที่ 2.1-6A-D) ของหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัย โดยจะพบการติดมากกว่าที่บริเวณเยื่อแคปซูล ซึ่งพอสันนิษฐานได้ว่า serotonin อาจเป็น neurotransmodulator ที่มีบทบาทต่อกระบวนการสืบพันธุ์ เช่น มีบทบาทในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าฮื้อนี้ เช่นเดียวกับในหอยสองฝาชนิดอื่นๆ

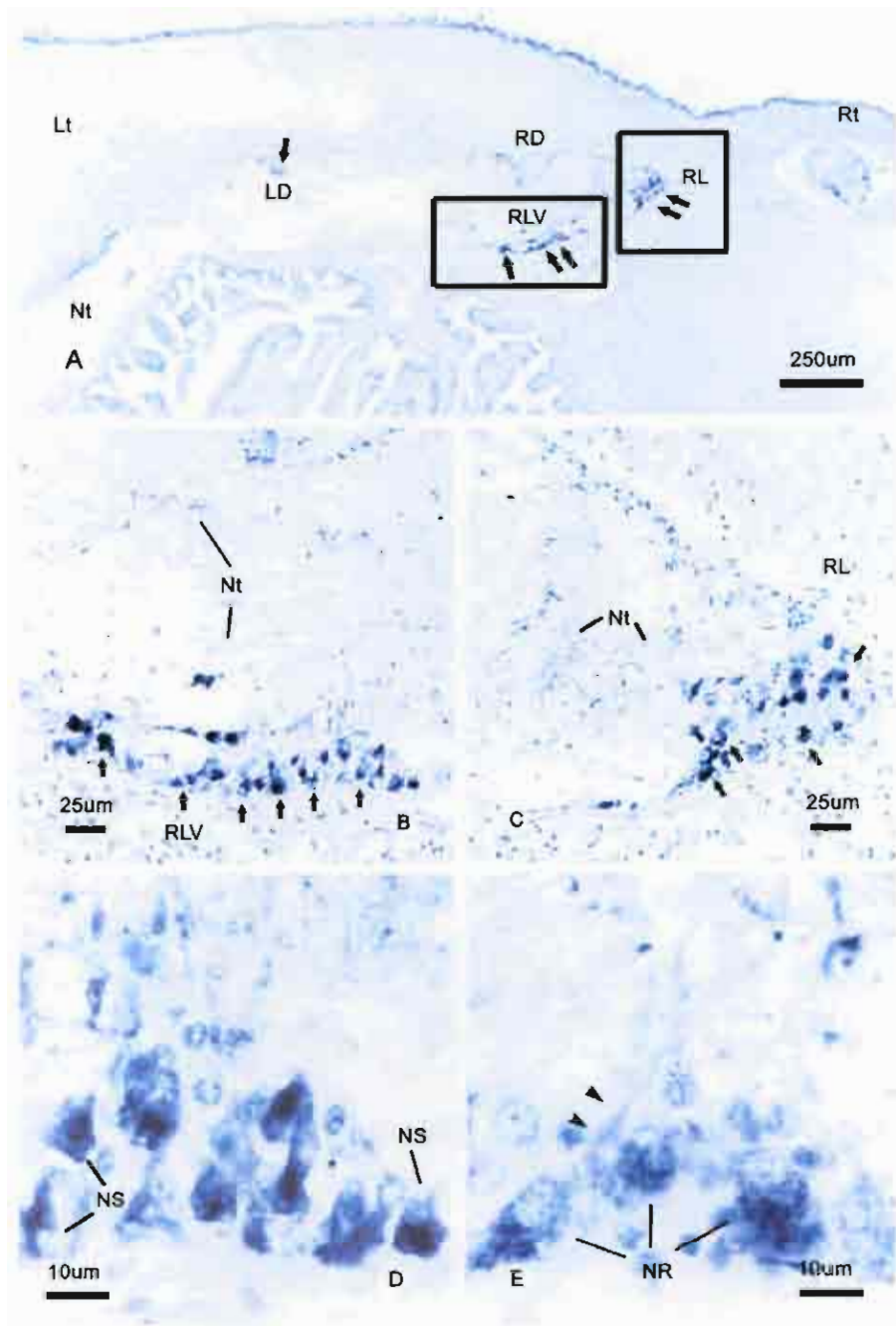
คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อ 2.1

- รูปที่ 2.1-1** ภาพถ่ายจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงตำแหน่งและลักษณะของเซลล์ประสาท serotonin และเส้นใยประสาทในปมประสาท cerebral ของ *H. asinina*
- A) Cross section ของ negative control แสดงปมประสาท cerebral (CG) และ nerve bundles (Nt) ที่ออกจากปมประสาทไปยัง buccal mass (Bu) D=dorsal, V=ventral, M=medial, Lt= ด้านซ้าย, Rt=ด้านขวา
- B, C) แสดงเซลล์ serotonin (ลูกศร) อยู่รวมเป็นกลุ่มบริเวณขอบบนและครึ่งบนของขอบด้านในของปมประสาท พร้อมทั้ง nerve fibers (Nt) ที่ออกจากปมประสาท และแขนงประสาทที่ไปยัง buccal mass (Bu)
- D) ภาพกำลังขยายสูงแสดง neuropil ของปมประสาท cerebral แสดง varicosities ของเส้นใยประสาท serotonin
- E) ภาพขยายจากบริเวณสี่เหลี่ยมในภาพ C) แสดงกลุ่มของเซลล์ประสาท serotonin ในชั้น cortex ของปมประสาท
- F, G) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงจาก E) แสดงลักษณะของเซลล์ประสาท serotonin ซึ่งแบ่งได้ 2 แบบ ได้แก่ เซลล์ประสาทขนาดใหญ่ (NR) แสดงแขนงประสาท (ลูกศร) และเซลล์ผลิตฮอร์โมนสื่อประสาทขนาดกลาง (NS) ส่วนเซลล์ประสาทขนาดเล็กไม่ติดสี
- รูปที่ 2.1-2** ภาพถ่ายจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงตำแหน่งและลักษณะของเซลล์ประสาท serotonin และเส้นใยประสาทในปมประสาท pleuropedal ของ *H. asinina*
- A) ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงการกระจายของเซลล์ประสาท serotonin (ลูกศร) อยู่เป็นกลุ่มบริเวณขอบบนและขอบล่างของ cortex (Co) ของเขาบน (dorsal horn:DH) และเขาล่าง (ventral horn-VH) ส่วน nerve fibers (Nt) พบได้ทั่วไปใน medulla และ pedal muscle (PeM), Lt=ด้านซ้าย, Rt=ด้านขวา
- B, C) ภาพถ่ายกำลังปานกลางของเขาบนซ้าย (B) และเขาล่างขวา (C) จากบริเวณในกรอบสี่เหลี่ยมบนในภาพ A แสดงกลุ่มของเซลล์ประสาท serotonin (ลูกศร) ในชั้น cortex (Co) และ nerve fibers (Nt) ในชั้น medulla (Me)
- D, E) ภาพกำลังขยายสูงจากบริเวณในกรอบสี่เหลี่ยมล่างในภาพ C แสดงเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ (NR) ซึ่งมีแขนง axon (ลูกศร) และเซลล์ผลิตสารสื่อประสาทขนาดกลาง (NS) ไม่มีแขนง axon

- รูปที่ 2.1-3** ภาพถ่ายจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงตำแหน่งและลักษณะของเซลล์ประสาท serotonin และเส้นใยประสาทในปมประสาท visceral ของ *H. asinina*
- A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดงลักษณะของเซลล์ประสาท serotonin 2 กลุ่ม ที่บริเวณขอบขวา (right lateral-RL) และ ขอบขวาด้านล่าง(right latero-ventral-RLV) ของปมประสาท ส่วนด้านขอบขวามบน (RD), ขอบซ้ายบน(LD) มีเซลล์ serotonin จำนวนน้อย
- B, C) ภาพกำลังขยายปานกลางจากกรอบสี่เหลี่ยมลงในภาพ A แสดงกลุ่มของเซลล์ประสาท serotonin และ nerve fibers ในชั้น medulla
- D, E) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงจากบริเวณที่อยู่ในกรอบของภาพ A แสดงลักษณะของเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ (NR) และเซลล์ผลิตสารสื่อประสาทขนาดกลาง (NS)
- รูปที่ 2.1-4** แผนที่แสดงการกระจายที่แตกต่างกันของเซลล์ประสาท serotonin และ FMRFamide ในปมประสาท cerebral (A), pleuropedal (B) และ visceral (C) ของ *H. asinina*, o= เซลล์ประสาท serotonin, x=เซลล์ประสาท FMRFamide
- รูปที่ 2.1-5** ภาพถ่ายจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงการติดสีของ serotonin ภายในอวัยวะของ *H. asinina*
- A, C) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของ negative control แสดงเซลล์สีบัพนธุ์เพศผู้ ที่เกาะอยู่บนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae (Tr) และถูกหุ้มด้วยเยื่อแคปซูล (Cp)
- B, D) ภาพกำลังขยายปานกลางของอวัยวะ แสดงการติดสีของ serotonin ในเยื่อแคปซูล (Cp) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae (Tr)
- รูปที่ 2.1-5** ภาพถ่ายจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงการติดสีของ serotonin ภายในรังไข่ของ *H. asinina*
- A, C) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลาง และสูง ของ negative control แสดงเซลล์ไข่ ที่เกาะอยู่บนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae (Tr) และถูกหุ้มด้วยเยื่อแคปซูล (Cp)
- B, D) ภาพกำลังขยายปานกลาง และสูงของรังไข่ แสดงการติดสีของ serotonin ในเยื่อแคปซูล (Cp) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae (Tr)

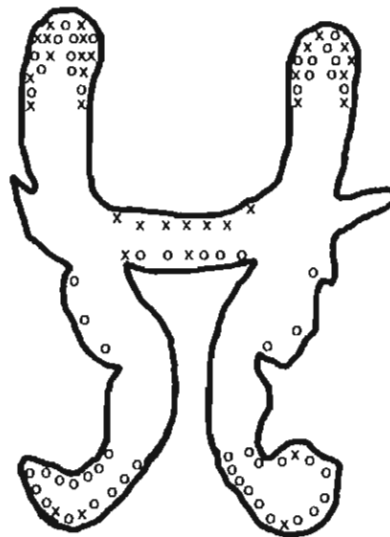








A

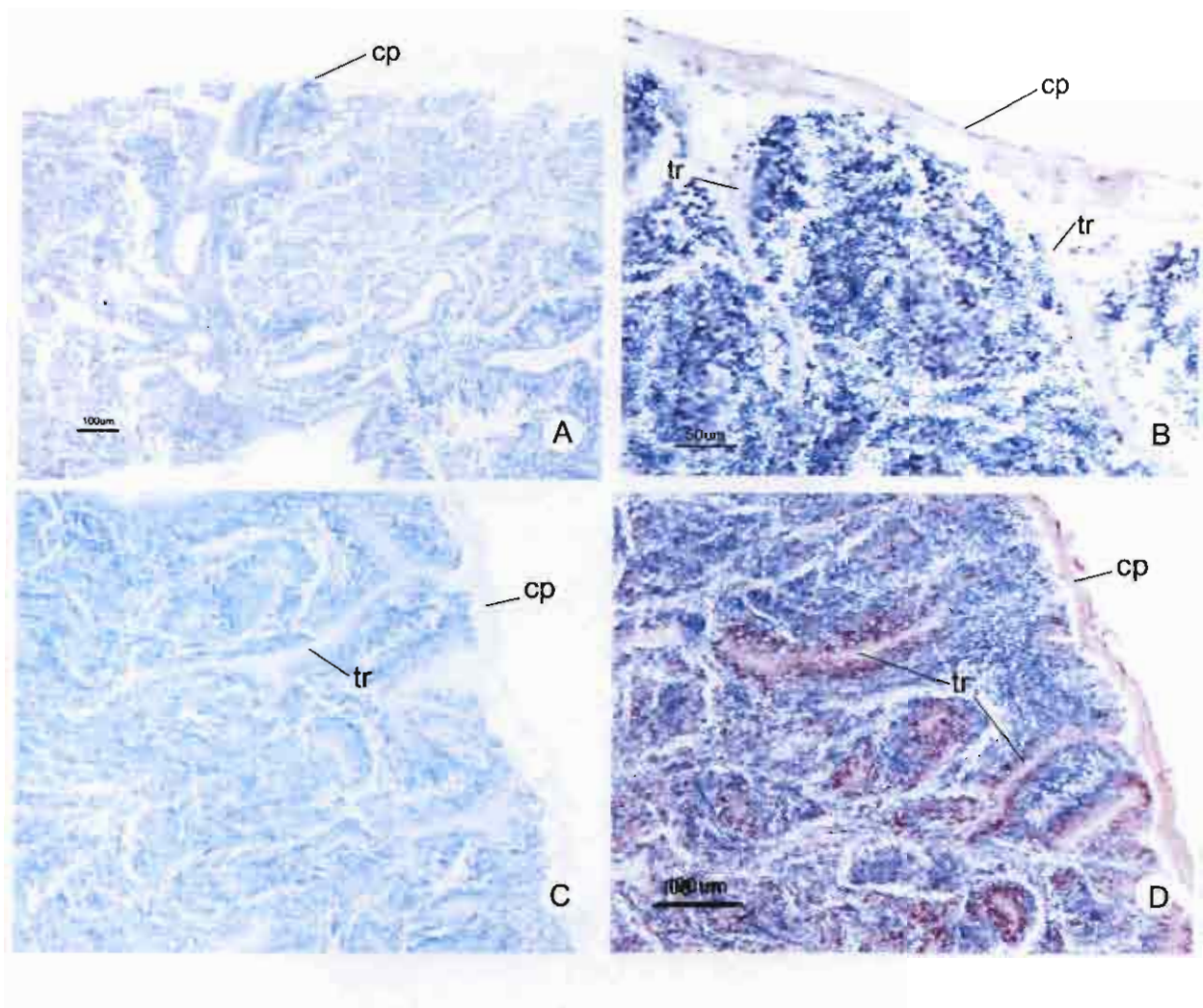


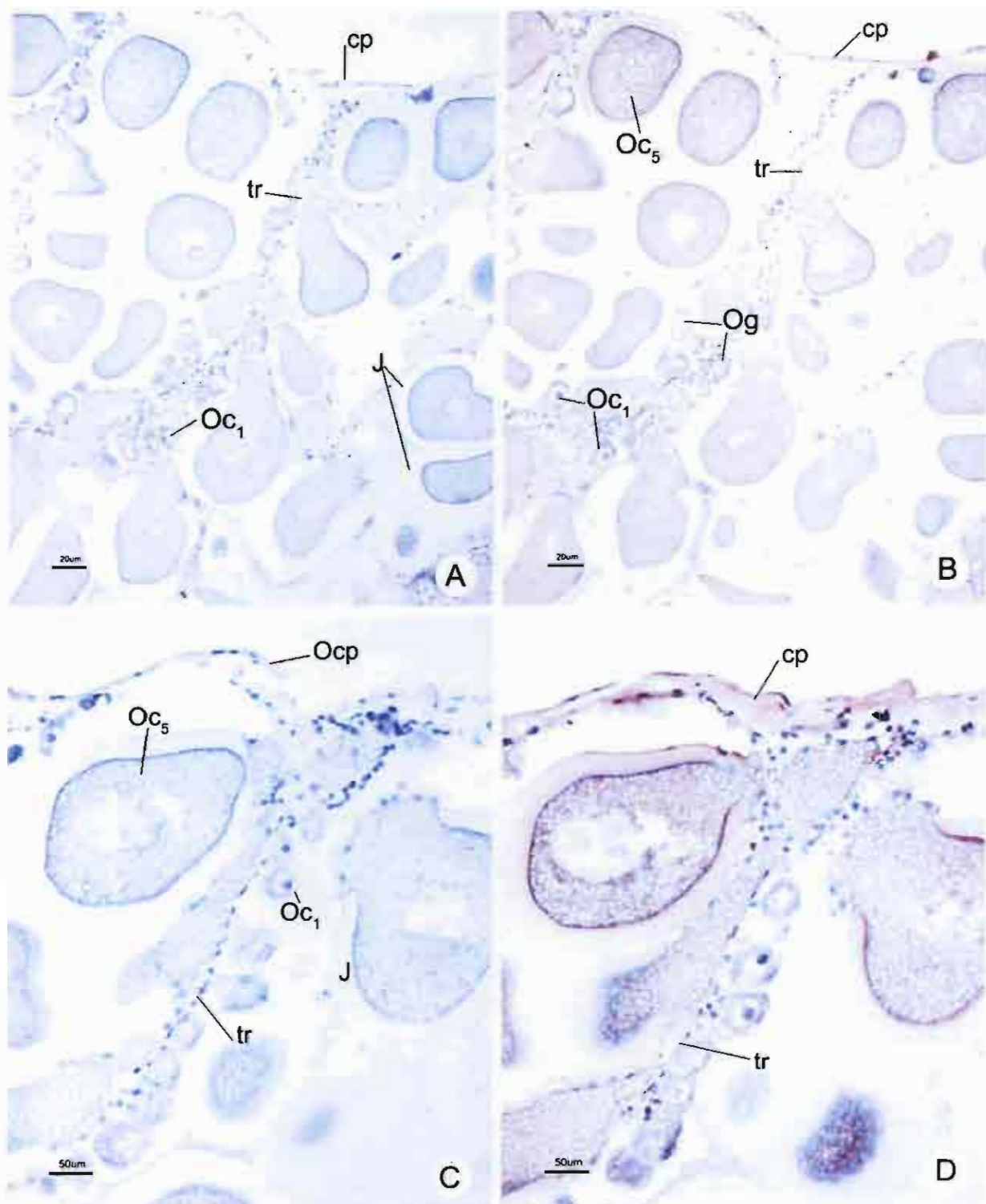
B



C

o=serotonergic neurons
x=FMRF-amidergic neurons





2.2. การศึกษาการกระจายของสารสื่อประสาท GABA ในปมประสาทและอวัยวะรับสัมผัสของหนวดในหอยเป่าฮือตัวเต็มวัย

กรด γ -aminobutyric acid (GABA) เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter-NE) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทแบบยับยั้ง (inhibitory NE) ในระบบประสาทของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง GABA เป็นสารสื่อประสาทซึ่งควบคุมการเคลื่อนไหวของหนวด (tentacle) และ feeding rhythm สารนี้ยังมีประสิทธิภาพในการชักนำเพื่อการลงเกาะ (settlement) ของตัวอ่อนหอยเป่าฮือสูงสุด ในปริมาณความเข้มข้น 10^{-3} M ส่วนที่ความเข้มข้น 10^{-6} M การลงเกาะจะช้ากว่า แต่พบว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำการลงเกาะเพราะว่าอัตราการรอดชีวิตของหอยเป่าฮือหลังจากลงเกาะมีมากกว่าที่ความเข้มข้น 10^{-3} M GABA สามารถทำให้อัตราการรอดในตัวอ่อนระยะแรกเพิ่มมากขึ้น (Morse *et al.*, 1979) นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของหอยเป่าฮือวัยอ่อน ดังนั้นเราจึงได้ศึกษาการกระจายของสารสื่อประสาท GABA ในเซลล์ประสาท และใยประสาทของระบบประสาทและอวัยวะรับสัมผัสพิเศษของหนวดในหอยเป่าฮือตัวเต็มวัยโดยเทคนิคทางจุลทรรศน์ธรรมดาด้วยวิธี dot blot assay และ immunoperoxidase technique และได้ข้อสรุปดังตารางที่ 2.2-1

ตารางที่ 2.2-1 แสดงผลของ dot blot assay ของ GABA ในส่วนเนื้อเยื่อต่างๆ โดยใช้เทคนิค immunoperoxidase

เนื้อเยื่อ	Non-Absorbed BSA	Absorbed BSA	Absorbed GABA
สมองหนูเมาส์	++	+	+
ก้านสมองหนูเมาส์	++	+	+
ปมประสาท cerebral เพศผู้	+++	++	+
ปมประสาท pleuropedal เพศผู้	+++	+++	+
gonad เพศผู้	+++	+++	+
ปมประสาท cerebral เพศเมีย	+++	++	-
ปมประสาท pleuropedal เพศเมีย	+++	+++	-
gonad เพศเมีย	++	++	-
cephalic tentacle	++	++	-
epipodial tentacle	+++	++	+
eye	+++	++	+

Dot blot assay of GABA

ในการทำ dot blot ได้สกัดแล้วนำโปรตีนจากส่วนสกัดของเนื้อเยื่อสมองของหนูเมาส์ เป็นตัว positive control จากปมประสาท cerebral และ ปมประสาท pleuropedal ของหอยเป่าฮื้อ, gonad ของทั้งเพศผู้และเพศเมียของหอยเป่าฮื้อ, tentacle ของหอยเป่าฮื้อที่ความเข้มข้น 1 และ 0.1 mg/ml แล้วนำไปแยกลงบนแผ่น nitrocellulose อบให้แห้งแล้วทำการข้ามปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะด้วยการแช่ใน skimmed milk หลังจากนั้นทำการย้อมด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ GABA ผลการย้อมด้วยโพลีโคลนัลแอนติบอดี (PoAb) ที่เตรียมโดยการฉีดหนูด้วย BSA-GABA conjugate ในเนื้อเยื่อต่างๆ สรุปได้ดังนี้ เนื้อเยื่อสมองของหนูเมาส์ แสดงการติดปานกลางเมื่อเทียบกับปมประสาท cerebral และ pleuropedal ทั้งเพศผู้และเพศเมีย และ gonad เพศผู้ของหอยเป่าฮื้อ (รูปที่ 2.2-1) หลังจากย้อมด้วย PoAb การติดผลบวกซึ่งแสดงด้วยความเข้มของสีในเนื้อเยื่อสมองของหนู ปมประสาทและ gonad ของหอยเป่าฮื้อลดลงเพียงเล็กน้อยซึ่งแสดงว่าการเกาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมีความจำเพาะ gonad ของเพศเมียแสดงผลบวกต่อ PoAb ที่ absorbed แล้วโดย BSA น้อยกว่า gonad เพศผู้และปมประสาท สำหรับอวัยวะรับสัมผัสพิเศษ epithelial tentacle แสดงผลบวกต่อ PoAb ที่ absorbed แล้วโดย BSA มากกว่าเนื้อเยื่ออื่น หลังจาก absorb anti GABA ด้วย BSA ผลของการติดของ PoAb ในอวัยวะรับสัมผัสพิเศษเหล่านี้ไม่เปลี่ยนแปลง ตรงกันข้ามเมื่อทำการ absorb PoAb ด้วย GABA พบว่าความเข้มของสีในเนื้อเยื่อต่างๆ ที่นำมาทดสอบลดลงมากหรือหายไปเลย

ระบบประสาท

ปมประสาท Cerebral

เมื่อย้อมเซลล์ในปมประสาท Cerebral ด้วย anti-GABA ที่ absorbed แล้วด้วย GABA และใช้วิธี immunoperoxidase แบบ AEC พบว่าเซลล์ในชั้น cortex ที่ติดสีแดงกระจายทั่วบริเวณชั้น cortex ของปมประสาท (รูปที่ 2.2-2, 2.2-5) เซลล์ที่ย้อมติดต่อเซลล์ทั้งหมดในส่วนตัดขวางมีจำนวน 27/1585 เซลล์ที่ย้อมติด anti GABA ส่วนใหญ่เป็น neurosecretory cell (NS) โดยย้อมติดใน granules ที่อยู่ใน cytoplasm ของเซลล์

ปมประสาท Pleuropedal

ในปมประสาท Pleuropedal ที่มีรูปร่าง H shape พบเซลล์ที่ติดสีแดงกระจายอยู่ทั่วไปในชั้น cortex ตลอดทั้งปมประสาท (รูปที่ 2.2-3, 2.2-4, 2.2-5) นอกจากนี้ยังพบการติดสีบริเวณใยประสาทอีกด้วย เซลล์ประสาทที่ติดสีในปมประสาทนี้เหมือนกับเซลล์ที่พบในปมประสาท Cerebral คือ NS เซลล์ที่ย้อมติดต่อเซลล์ทั้งหมดในส่วนตัดขวางของปมประสาทมีจำนวน 11/2269

ปมประสาท Visceral

ในปมประสาท Visceral เซลล์ที่ติดสีกระจายอยู่บริเวณขอบด้านซ้ายและขอบค่อนไปทางด้านหน้าของปมประสาท (รูปที่ 2.2-4, 2.2-5) เซลล์ที่ติดสีต่อเซลล์ทั้งหมดในส่วนตัดขวางมีจำนวน

22/596 เซลล์ประสาทที่ติดสีในปมประสาทนี้มีลักษณะเหมือนกับเซลล์ที่พบในปมประสาท Cerebral และ Pleuropedal คือเป็น NS เซลล์

อวัยวะรับสัมผัสพิเศษ

ขนาดของหอยเป้านี้มี 3 ชนิดคือ cephalic tentacles 1 คู่, epipodial tentacles จำนวนมาก และ appendage tentacles 1 คู่ ผลของการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ GABA แสดงผลบวกในหน่วยทั้ง 3 ชนิด

Cephalic tentacle

Cephalic tentacle แบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนบน (รูปที่ 2.2-6) ส่วนกลาง (รูปที่ 2.2-7) และส่วนฐาน (รูปที่ 2.2-8) แต่มีเซลล์ที่ทำปฏิกิริยาต่อ GABA เพียงชนิดเดียวคือ neuroepithelial cell (sensory cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่กึ่งกลางของยอด sensory papillae ที่ส่วนปลายของเซลล์มีซีเลีย นิวเคลียสรูปทรงรี มี euchromatin เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นที่เซลล์ sensory ที่บริเวณฐานของแพพิลลาก็แสดงการติดสีด้วย ในส่วนของกลุ่มเส้นใยประสาทของแต่ละหน่วยก็แสดงผลบวกต่อการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ GABA

Epipodial tentacle

Epipodial tentacle มีโครงสร้างต่าง ๆ คล้ายคลึงกับ cephalic tentacle แต่ epipodium มีขนาดเล็กกว่าและสั้นกว่า tentacle อื่น ๆ ในแต่ละอันแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนบน ส่วนกลางและส่วนฐาน ผลของการย้อมแอนติบอดีต่อ GABA ในหน่วย epithelia พบการติดสีในไซโตพลาสซึมของ neuroepithelial cell ในทั้ง 3 ส่วนของหน่วย (รูปที่ 2.2-9, 2.2-10, 2.2-11)

Appendage tentacle

หน่วยส่วนนี้ประกอบด้วยกล้ามเนื้อและเส้นใยประสาทรวมตัวกันเป็นแกนกลางล้อมรอบด้วยเยื่อบุผิวแบบ simple columnar ซึ่งปกคลุมด้วย brush border อีกชั้นหนึ่ง เซลล์ที่ย้อมติดแอนติบอดีต่อ GABA คือ sensory cells ที่กระจายอยู่ทั่วไปในชั้นเยื่อบุผิวของ tentacle (รูปที่ 2.2-12)