

Abstract

Project Code : TRG5880085

Project Title : Characterization and localization of saposin-like protein 1 (SAP-1) in *Fasciola gigantica*

Investigator : Assistant Professor Dr.Pornanan Kueakhai

Burapha University

E-mail Address : pornanan@buu.ac.th; earn_patho@hotmail.com

Project Period : 2 years

The recombinant *Fasciola gigantica* Saposin-like protien-1 (rFgSAP-1) was cloned by polymerase chainreaction (PCR) from NEJ cDNA, expressed in Escherichia coli BL21 (DE3) and used for production of a polyclonal antibody in rabbits (anti-rFgSAP-1). By immunoblotting and immunohistochemistry, rabbit IgG anti-rFgSAP-1 reacted with rFgSAP-1 at a molecular weight 12 kDa, but not with rFgSAP-2. The rFgSAP-1 reacted with antisera from mouse infected with *F. gigantica* metacercariae collected at 2, 4, and 6 weeks after infection. The FgSAP-1 protein was expressed at a high level in the caecal epithelium of metacercariae and NEJs. The vaccination was performed in Imprinting Control Region (ICR) mice (n = 10) by subcutaneous injection with 50 g of rFgSAP-1 combined with Alum adjuvant. Two weeks after the second boost, mice were infected with 15 metacercariae per mouse by the oral route. The percents protection of rFgSAP-1 vaccine were estimated to be 73.2% and 74.3% when compared with non vaccinated-infected and adjuvant-infected controls, respectively. The levels of IgG1 and IgG2a specific to rFgSAP-1 in the immune sera, which are indicative of Th2 and Th1 immune responses, were inversely and significantly correlated with the numbers of worm recoveries. The rFgSAP-1-vaccinated mice showed significantly reduced levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), and liver damage. These indicated that rFgSAP-1 has strong potential as a vaccine candidate against *F. gigantica*, whose efficacy will be studied further in large economic animals including cattle, sheep, and goat.

Keywords : *Fasciola gigantica*, Saposin-like protein 1, Characterization, Localization
, Vaccine

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5880085

ชื่อโครงการ : การศึกษาคุณลักษณะและการแสดงออกของ saposin-like protein 1 (SAP-1) ในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรอนันต์ เกื้อไข

มหาวิทยาลัยบูรพา

E-mail Address : pornanan@buu.ac.th; earn_patho@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

รีคอมบิแนนท์โปรตีน Saposin-like protien-1 (rFgSAP-1) ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ถูกสังเคราะห์ด้วยวิธีโคลนนิ่งด้วยพีซีอาร์ (PCR) จาก cDNA ของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับระยะแรก (NEJ) และมีการสังเคราะห์โปรตีนในแบคทีเรีย (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) และทำการผลิตโพลีโคลนอนแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน rFgSAP-1 ในกระต่าย (anti-rFgSAP-1) หลังจากนั้นนำแอนติบอดีมาทดสอบความจำเพาะโดยวิธี immunoblotting และ immunohistochemistry พบว่าจากการทดสอบด้วย immunoblotting มีปฏิกิริยากับ rFgSAP-1 ที่น้ำหนักโมเลกุล 12 กิโลดาลตัน แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ รีคอมบิแนนท์ FgSAP-2 และยังพบว่า rFgSAP-1 สามารถทำปฏิกิริยากับเลือดหนู (antisera) ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* หลังจากทำให้หนูติดเชื้อมีระยะติดต่อ (metacercariae) ระยะ 2, 4 และ 6 สัปดาห์หลังจากติดเชื้อ และจากการทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าโปรตีน FgSAP-1 แสดงออกในระดับสูงในเยื่อหุ้มของระยะติดต่อ (metacercariae) และตัวอ่อนระยะแรก (NEJs) การทดสอบการเป็นวัคซีนของโปรตีน rFgSAP-1 โดยการทดสอบในหนู imprinting control region (ICR) จำนวน 10 ตัวต่อกลุ่มโดยการกระตุ้นทางผิวหนัง (subcutaneous) ด้วยโปรตีน rFgSAP-1 50 กรัม ร่วมกับ Alum adjuvant และสองสัปดาห์หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่สอง จะทำให้หนูติดเชื้อมีระยะติดต่อ จำนวน 15 เม็ด ต่อตัวโดยการป้อนเข้าปาก พบว่าความเป็นวัคซีนของโปรตีน rFgSAP-1 มีร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อมีระยะติดต่อเท่ากับร้อยละ 73.2 และ 74.3 เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่ม adjuvant ตามลำดับ หนูในกลุ่มที่ทดสอบ (กลุ่มที่ได้รับวัคซีน) มีระดับของแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ที่จำเพาะกับ rFgSAP-1 เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันมีทั้งระบบ Th2 และ Th1 และหนูที่ได้รับการฉีดวัคซีน rFgSAP-1 มีระดับเอนไซม์ตับ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) ที่ลดลง บ่งบอกถึงความเสียหายของตับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า rFgSAP-1 มีศักยภาพในการเป็นวัคซีนที่ป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ซึ่งจะมีการศึกษาประสิทธิภาพในสัตว์เศรษฐกิจที่มีขนาดใหญ่เช่นโค, แกะและแพะ ต่อไป

คำหลัก : *Fasciola gigantica*, Saposin-like protein 1, Characterization, Localization, Vaccine