



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ
โปรตีนของ *Fasciola gigantica* ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
เพื่อพัฒนาชุดตรวจ

Construction and production of recombinant
antibody against Excretory Secretory (ES) antigen of
Fasciola gigantica in mammalian cells for diagnosis

ผศ.ดร.นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๕๙๓๓๘
สัญญาเลขที่ ๑๘/๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ
โปรตีนของ *Fasciola gigantica* ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
เพื่อพัฒนาชุดตรวจ

Construction and production of recombinant
antibody against Excretory Secretory (ES) antigen of
Fasciola gigantica in mammalian cells for diagnosis

ผศ.ดร.นรินทร์ ช่างกลิ้งเหมาะ

สาขาวิชาพยาธิวิทยากายวิภาค

คณะสหเวชศาสตร์

ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๖๒

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 18/2562

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 18/2562).

บทคัดย่อ

Glutathione peroxidases (GPx) เป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่พยาธิ *Fasciola* spp. หลั่งออกมาเพื่อใช้ในการหลบหลีกและปกป้องตัวเองจากระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้สร้างแอนติบอดีชนิด monoclonal antibody (MoAb) ชื่อว่า 7B8 จากหนูต่อโปรตีน glutathione peroxidase จากพยาธิ *F. gigantica* (rFgGPx) โดยการฉีดโปรตีน rFgGPx เข้าสู่บริเวณ subcutaneous ในหนูสายพันธุ์ BALB/c เพื่อให้หนูสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ rFgGPx ด้วยเทคนิค hybridoma จากเซลล์ที่เก็บจากม้ามของหนู แอนติบอดีที่สร้างขึ้นเป็นชนิด IgG1 ประกอบไปด้วย K light chains เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับ rFgGPx ด้วยวิธี immunoblotting พบว่าสามารถจับได้อย่างจำเพาะที่ขนาด 19 kDa และเมื่อทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี indirect ELISA กับ native FgGPx โปรตีนพบที่สามารถทำปฏิกิริยากับ whole body (WB), metacercariae, newly excysted juveniles (NEJs), 4 week-old juveniles และ adult *F. gigantica* แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนจากพยาธิโตเต็มวัยชนิดอื่นประกอบด้วย *Fischoederius cobboldi*, *Paramphistomum cervi*, *Setaria labiato-papillosa*, *Eurytrema pancreaticum*, *Gastrothylax crumenifer* และ *Gigantocotyle explanatum* จากนั้นนำ MoAb ต่อ rFgGPx ไปย้อมด้วยวิธี immunolocalization กับพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยพบว่าเกิดปฏิกิริยาการจับอย่างจำเพาะที่บริเวณ tegument, vitelline cells และ egg นอกจากนี้เมื่อนำ serum จากเลือดหนูที่ติดเชื้อ *F. gigantica* มาทดสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าให้ผลเป็นบวกจากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าโปรตีน FgGPx มีการหลั่งออกมาในปริมาณมากโดยเฉพาะที่บริเวณ tegumental antigens (TA) ดังนั้น MoAb ต่อ rFgGPx จึงอาจนำไปใช้เพื่อวินิจฉัยโรคโดยวิธี immunodiagnosis ในโรค fasciolosis ในมนุษย์และสัตว์

Abstract

Glutathione peroxidases (GPx), major antioxidant enzymes, secreted by *Fasciola* spp., are important for the parasite evasion and protection against the host's immune responses. In the present study, a monoclonal antibody (MoAb) against recombinant *F. gigantica* glutathione peroxidase (rFgGPx) was produced by hybridoma technique using spleen cells from BALB/c mice immunized with rFgGPx. This MoAb (named 7B8) is IgG1 with **K** light chains, and it reacted specifically with rFgGPx at a molecular weight 19 kDa as shown by immunoblotting, and reacted with the native FgGPx in the extracts of whole body (WB), metacercariae, newly excysted juveniles (NEJs), 4 week-old juveniles and adult *F. gigantica* as shown by indirect ELISA. It did not cross react with antigens in WB fractions from other adult trematodes, including *Fischoederius cobboldi*, *Paramphistomum cervi*, *Setaria labiatopapillosa*, *Eurytrema pancreaticum*, *Gastrothylax crumenifer* and *Gigantocotyle explanatum*. By immunolocalization, MoAb against rFgGPx reacted with the native protein in the tegument, vitelline cells, and eggs of adult *F. gigantica*. In addition, the sera from mice experimentally infected with *F. gigantica* were tested positive by this indirect sandwich ELISA. This result indicated that FgGPx is an abundantly expressed parasite protein that is secreted into the tegumental antigens (TA), therefore, FgGPx and its MoAb may be used for immunodiagnosis of both early and late fasciolosis *gigantica* in animals and humans.

Keywords: *Fasciola gigantica*, Liver fluke, Glutathione peroxidase, Monoclonal antibody, Diagnosis

สารบัญเนื้อเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทนำ	1
เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	2
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	4
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
เนื้อเรื่อง	5
รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	5
การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ	5
การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย <i>L. ollula</i>	5
การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ	5
การโคลนยีนและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน	6
การโคลนยีนที่สร้างแอนติบอดี	6
การสังเคราะห์ recombinant antigen และ recombinant monoclonal antibody	6
การพัฒนาและทดสอบวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ	6
การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb)	6
การผลิตรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนัลแอนติบอดี (rMoAb)	7
การตรวจสอบคุณลักษณะของ rMoAb ด้วยวิธี immunoblotting	9
การสกัดโปรตีนแอนติเจนจากส่วนต่างๆของพยาธิเพื่อนำมาทดสอบกับ rMoAb	9
การแยกโปรตีนโดยใช้ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis	9
การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blotting	10
การนำ rMoAb และ recombinant proteins ไปพัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อพยาธิ	10
การพัฒนาวิธีตรวจแบบ sandwich ELISA	10
การพัฒนาวิธีตรวจแบบ immune-chromatography (Immunochromatographic strip test)	11
วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล	12
ผลการวิจัย	13
การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgGPx	13
การวิเคราะห์ปริมาณ Polyclonal Antibody FgGPx ด้วยวิธี indirect ELISA	13

การผลิต Monoclonal antibody ต่อ FgGPx	14
ศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดมาจากพยาธิ <i>F. gigantica</i> ด้วยวิธี Lawry method	14
วิเคราะห์ความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ต่อโปรตีน TA, WB และ ES ด้วยวิธี western blot	14
วิเคราะห์ความจำเพาะของโปรตีน FgGPx โดยการทดสอบ cross reaction	15
วิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีน FgGPx ในพยาธิ <i>F. gigantica</i> ด้วยวิธี immunohistochemistry	21
อภิปรายและวิจารณ์	
สังเคราะห์โปรตีน rFgGPx	24
การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของ MoAb ต่อ rFgGPx	24
สรุปผลการวิจัยและเสนอแนะ	26
ผลผลิต	26
รายงานการเงิน	27
บรรณานุกรม	28
ภาคผนวก	33
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ	34
ประวัตินักวิจัยและคณะ	41

สารบัญตาราง (List of Table)

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FgGPx และค่าดูดกลืนแสง OD₄₅₀

หน้า

13

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1 ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA	13
รูปที่ 2 แสดงชุดตรวจแบบ ICS	11
รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FgGPx และค่าดูดกลืนแสง OD ₄₅₀	14
รูปที่ 4 แสดงความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ต่อโปรตีน TA, WB และ ES ด้วยวิธี western blot	15
รูปที่ 5 แสดงความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ด้วยวิธี western blot	16
รูปที่ 6 การทำให้โปรตีน rFgGPx บริสุทธิ์ ด้วย Ni-NTA affinity-purified column	17
รูปที่ 7 แสดงการจับกันอย่างจำเพาะ 7B8 MoAb ต่อ rFgGPx ด้วยวิธี Immunoblot	18
รูปที่ 8 แสดงการวิเคราะห์แอนติบอดีหลังจากการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ ด้วย protein A binding	19
รูปที่ 9 แสดงการจับกันอย่างจำเพาะ 7B8 MoAb ต่อ native FgGPx โปรตีน ใน <i>F. gigantea</i>	19
รูปที่ 10 แสดงการจับกันอย่างจำเพาะ 7B8 MoAb ต่อ native FgGPx โปรตีน ใน WB ของ <i>F. gigantea</i>	21
รูปที่ 11 แสดงการตรวจหาตำแหน่งของโปรตีน GPx ในเนื้อเยื่อของ <i>F. gigantea</i> ระยะตัวเต็มวัย	22
รูปที่ 12 แสดงการตรวจวัด FgGPx ในเลือดหนูที่ติดเชื้อ <i>F. gigantea</i> ด้วยวิธี sandwich ELISA	23

สารบัญแผนภาพ

	หน้า
แผนภาพที่ 1 สรุปลวิธี sandwich ELISA	10
แผนภาพที่ 2 แสดงชุดตรวจแบบ ICS	11

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 สรุปวิธี sandwich ELISA

หน้า

11

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

GPx	glutathione peroxidase
TRP14	thioredoxin related protein 14 kDa
PCR	Polymerase chain reaction
MoAb	monoclonal antibody
PoAb	polyclonal antibody
r	recombinant
Fg	<i>Fasciola gigantica</i>
NEJ	Newly excysted juvenile
JV	Juvenile
AD	Adult
ES	Excretion-secretion
TA	Tegumental antigen
cDNA	Complementary DNA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
AP	alkaline phosphatase
NBT/BCIP	nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indodyl phosphate
WB	Whole body
Ig	Immunoglobulin
PEG	polyethyleneglycol
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ICS	Immunochromatographic strip
PC	<i>Paramphistomum cervi</i>
Ge	<i>Gigantocotyle explanatum</i>
Cc	<i>Cotylophoron cotylophorum</i>
Sl	<i>Setaria labiatopapillosa</i>
Fc	<i>Fischoederius cobboldi</i>
Ep	<i>Eurytrema pancreaticum</i>
Gc	<i>Gastrothylax crumenifer</i>
Ov	<i>Opisthorchis viverrini</i>

บทนำ (Introduction)

เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

Fasciola gigantica เป็นพยาธิที่พบทั่วไปในโค กระบือ แพะ และแกะที่เลี้ยงในประเทศไทย และประเทศเขตร้อนอื่น ๆ ทั่วโลก เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะต่อเกษตรกรและอุตสาหกรรมการสัตว์เลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตเนื้อและนม จากการสำรวจพบว่าโค กระบือมีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ 11.8 และในบางพื้นที่อัตราการติดเชื้ออาจสูงถึงร้อยละ 85 ดังนั้นพยาธิใบไม้ตับจึงเป็นพยาธิที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรที่มีอาชีพเลี้ยงโค กระบือ แพะ และแกะ มีการประมาณว่าโรคพยาธิชนิดนี้สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรปีละไม่น้อยกว่า 300 ล้านบาท (Sukhapesna et al., 1990; Sirihakim and Pholpark, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีคนติดเชื้อพยาธิ ชนิดนี้ไม่น้อยกว่า 30 ราย และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากการขยายตัวของ การเลี้ยงสัตว์ในประเทศเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีการแพร่ กระจายของหอยพาหะอย่างกว้างขวางในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา

เมื่อสัตว์เคี้ยวเอื้องหรือมนุษย์กินตัวอ่อนระยะติดต่อก็คือระยะเมตาเซอร์คาเรียเข้าไป ผนังหุ้มตัวอ่อนระยะนี้จะถูกทำลายโดยน้ำย่อยทำให้ตัวอ่อนระยะ newly excysted juvenile (NEJ) ออกจากซิสต์บริเวณลำไส้เล็กของโฮสต์ NEJ จะไชผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าไปในช่องท้องภายในลำตัวของโฮสต์ และเคลื่อนไปสู่ตับแล้วเจริญเป็นพยาธิตัวอ่อนซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อของตับ ทำให้เนื้อเยื่อตับถูกทำลายเกิด haemorrhage และ fibrosis ในเนื้อตับ เมื่อพยาธิเจริญเป็นตัวเต็มวัยก็จะเดินทางไปอาศัยในท่อน้ำดีโดยใช้อวัยวะยึดเกาะ (oral และ ventral suckers) เกาะผนังของท่อน้ำดี เนื่องจากมีความต้องการอาหารในปริมาณสูง พยาธิจะทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์ของโฮสต์บริเวณที่พยาธิอาศัยอยู่ จากการเคลื่อนที่ไปมา พยาธิใช้ oral sucker กัดหรือฉีกเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดเพื่อดูดกิน ในขณะที่หนามบริเวณผนังลำตัวจะครูดและทำลายเนื้อเยื่อของโฮสต์ ในขณะที่พยาธิเคลื่อนที่ไปมา เอนไซม์และสารที่พยาธิหลั่งออกมาโดยเฉพาะกลุ่ม proteases และ lytic proteins จะช่วยทำลายและย่อยสลายเนื้อเยื่อและเซลล์ของโฮสต์มากยิ่งขึ้น เอนไซม์กลุ่ม endoproteases ในกลุ่ม cathepsin L (CatL), cathepsin B (CatB) และกลุ่ม exopeptidases ในสกุล leucine aminopeptidase (LAP) เป็นเอนไซม์หลักที่พยาธิหลั่งออกมาในสารคัดหลั่ง (excretion-secretion (ES) material) และพบว่ามีอยู่ในพยาธิตั้งแต่ระยะ NEJ จนกระทั่งระยะตัวเต็มวัย โดยอาจมี isotype ที่ปรับเปลี่ยนไปเช่น CathB3 ถูกสร้างและปล่อยโดย NEJ ในช่วงที่ไชเข้าเนื้อเยื่อของโฮสต์ ส่วน CatB2 พบในชั้นตัวอ่อน และ CatB1 เป็นเอนไซม์หลักในตัวเต็มวัย (Meemon et al., 2004) เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายตัวที่ tegumental cells และ caecal epithelial cell ในตัวพยาธิ (Carmona et al., 1993; Smith et al., 1993; Creaney et al., 1996; Wilson et al., 1998; Law et al., 2003; Meemon et al., 2004) นอกจากนี้พยาธิจะขับ lytic protein ที่ช่วยทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก ได้แก่ สารพวก saposin-like protein (SAP) ซึ่งจะจับกับไขมันบนผนังเซลล์ทำให้เกิดรูและทำให้เซลล์ของโฮสต์แตกออกเพื่อเป็นอาหารพยาธิต่อไป

ได้มีการศึกษาคุณสมบัติบางประการของยีน saposin-like protein (SAP) สองชนิดในพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. hepatica* (FhSAP-1 และ FhSAP-2) (Reed et al., 1998; Reed et al., 2000; Espino and Hillyer, 2003) โปรตีนทั้งสองตัวนี้มีน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างคล้ายกับโปรตีน amoebopore ของ

Entamoeba spp. ซึ่งเป็นปรสิตกลุ่มเดียวที่มีการศึกษาและวิเคราะห์คุณสมบัติของ SAP อย่างสมบูรณ์ที่สุด นอกเหนือจากโปรตีน SAP แล้ว ยังพบโปรตีน NK-lysin และ granulysin ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่มีคุณสมบัติคล้ายกันกับโปรตีน amoebopore โดยโปรตีนในกลุ่มนี้ของโปรโตซัวจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์แปลกปลอมทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์เป้าหมายแตก (Zhai and Saier, 2000; Bruhn, 2005) โปรตีนกลุ่มนี้จึงถูกใช้เป็นกลไกในการป้องกันตัว และย่อยอาหารของอะมีบา ส่วนในพยาธิ *Fasciola* SAP ถูกใช้สำหรับการสลายสารอาหารโดยเฉพาะการสลายเซลล์เม็ดเลือดซึ่งเป็นอาหารหลัก (Espino and Hillyer, 2003) เซลล์เม็ดเลือดที่แตกออกจะถูกพยาธินำมาใช้เป็นอาหาร โดยมีการหลั่งเอนไซม์พวก proteases ดังกล่าวแล้ว ออกมาย่อย อีกต่อหนึ่งจนกลายเป็นโมเลกุลเชิงเดี่ยวที่ถูกดูดซึมผ่านทางผนังลำไส้เข้าสู่ตัวพยาธิ ซึ่งแอนติเจนต่างๆที่กล่าวมาในขั้นต้นเป็นแอนติเจนที่พยาธิสร้างขึ้นและปล่อยออกมา จึงทำให้แอนติเจนเหล่านี้หลุดลอยไปในกระแสเลือด จึงเป็นแอนติเจนเป้าหมายที่จะสามารถตรวจพบได้ในเลือดผู้ติดเชื้อ

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* ใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อโดยวิธีของ Kato ซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำและเป็นวิธีที่ไม่สะดวก และต้องให้ผู้ชำนาญสูงเสาะผ่านกล้องจุลทรรศน์เป็นผู้บอกลักษณะของไข่พยาธิที่มีลักษณะจำเพาะ อีกทั้งสามารถตรวจพบไข่พยาธิได้เฉพาะหลังจากติดเชื้อแล้วประมาณ 10-16 สัปดาห์ เมื่อพยาธิได้เจริญเป็นตัวเต็มวัยแล้ว จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามพัฒนาการตรวจโรคพยาธิโดยใช้วิธี immunoassay ที่ตรวจระดับแอนติบอดีหรือแอนติเจนในเลือดของสัตว์ที่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมายังไม่สามารถใช้ทดแทนวิธีตรวจไข่ในอุจจาระได้เนื่องจากมีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ไม่ดีเพียงพอ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาวิเคราะห์แอนติเจนที่มีความจำเพาะสูง เช่น TA 28.5 kD, CatB3, CatL และ SAP2 ซึ่งมีการหลั่งออกสู่เลือดในปริมาณสูงที่ตรวจวัดได้โดยการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี (Chaitheerayanon *et al.*, 2002, Anuracpreeda *et al.*, 2009, Anuracpreeda *et al.*, 2012, Anuracpreeda *et al.*, 2016 และ Kueakhai *et al.*, 2015) จึงน่าจะนำทั้งแอนติเจนและโมโนโคลนัลแอนติบอดีเหล่านี้ที่เหมาะสมไปพัฒนาชุดตรวจสอบแบบimmunoassays โดยเฉพาะแบบ sandwich ELISA และแบบ immunochromatography ต่อไปได้

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Fasciola gigantica เป็นพยาธิที่พบทั่วไปในโค กระบือ แกะ และคนในประเทศไทย และประเทศเขตร้อนอื่น ๆ ทั่วโลก เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านเกษตรอุตสาหกรรมสัตว์เลี้ยงของประเทศในอัตราสูง จากการสำรวจพบว่าโค กระบือมีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ 11.8% และในบางบริเวณของประเทศไทยอาจมีอัตราการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 85 ดังนั้นพยาธิใบไม้ตับจึงเป็นพยาธิที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรและอุตสาหกรรม การเลี้ยงโค กระบือ แพะ และแกะ เนื่องจากทำให้ผลผลิตเนื้อ นม และการใช้แรงงานลดลงอย่างมาก มีการประมาณว่าโรคพยาธิชนิดนี้สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรปีละประมาณ 300 ล้านบาท (Sukhapesna *et al.*, 1990 : Sirihakim and Pholpark,

1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในประเทศไทย มีคนติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* มีแนวโน้มจะมากขึ้น เนื่องจากมีการขยายตัวของการเลี้ยงสัตว์ในประเทศ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 10 ปีที่แล้วมา

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* และ *F. hepatica* ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำ ซึ่งการเก็บอุจจาระสัตว์นั้นทำได้ยาก และเสียเวลามากในการตรวจ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้เนื่องจากจะตรวจพบไข่ที่ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์ ทำให้ไข่ของพยาธินั้นปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งทำให้วงจรการระบาดยังคงมีอยู่

ในประเทศไทยจะมีรายงานการติดพยาธิ *F. gigantica* ในคนน้อยนั้น ไม่สามารถแปลผลได้ว่าประเทศไทยไม่มีการระบาดของของโรค Fasciolosis เป็นเพราะคนส่วนใหญ่ของประเทศไม่ได้รับการตรวจทางการแพทย์ เนื่องจากพฤติกรรมของคนไทยนั้นถ้าอาการของโรคไม่รุนแรงมากก็จะไม่ไปตรวจรักษา ซึ่งถ้าติดเชื้อ *F. gigantica* น้อยก็จะไม่แสดงอาการของโรคมานัก ในทางตรงกันข้ามคนไทยนิยมบริโภคผักสด และผักบางชนิดนั้นปลูกในน้ำ เช่น ผักกะเฉด ผักบุ้งไทย เป็นต้น รวมถึงการนำน้ำธรรมชาติจากหนองบึงมาลดน้ำผักที่ปลูก ดังนั้นคนไทยจึงตกอยู่ในภาวะเสี่ยงเป็นโรค Fasciolosis จากพฤติกรรมบริโภคโดยไม่รู้ตัว และอีกประการที่สนับสนุนได้ว่า *F. gigantica* มีการติดในคนได้มากเช่นกันดังมีรายงานการติดเชื้อ *F. gigantica* ในกลุ่มประเทศตะวันออกกลาง และแอฟริกาเหนือ ส่วนการติดเชื้อ *F. hepatica* มีรายงานการติดทั้งคนและสัตว์เช่นกัน ในช่วงระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยได้ออกเก็บตัวอย่างพยาธิจากโรงฆ่าสัตว์ เช่น เชียงใหม่ ปทุมธานี เพชรบุรี นครราชสีมา แม่ฮ่องสอน ยังพบวัวและควายติดเชื้อ *F. gigantica* อยู่ หรือสัตว์บางตัวไม่มีตัวพยาธิให้เห็นแต่กลับมีรอยโรค fasciolosis ให้เห็นอยู่ แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันการแพร่ระบาดของโรค fasciolosis ในประเทศไทยนั้นไม่ได้ลดลงเลย น่าจะเพิ่มขึ้นมากยิ่งขึ้นอีก ภาวะโรครื้อนยังเป็นตัวเร่งของวงจรชีวิตของ *Fasciola* spp. ให้เร็วและเพิ่มขึ้นด้วย ในสถานการณ์ปัจจุบันมีการนำวัวจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่า บังกลาเทศ เข้ามา ซึ่งวัวในแถบนั้นมีการติดเชื้อ *Fasciola* spp. อยู่มาก และในอนาคตมีโอกาสมากที่เชื้อ *F. hepatica* จะมาแพร่ระบาดในประเทศไทยด้วย จึงยิ่งทำให้สถานการณ์การแพร่ระบาดไม่อาจหายไปได้เลย ดังมีรายงานหอยในแหล่งน้ำสาธารณะมีการติดเชื้อ *F. gigantica*

พันธุกรรมของ *F. gigantica* และ *F. hepatica* นั้นมีความคล้ายกันร้อยละ 95-100 จึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคให้ครอบคลุมทั้งสองชนิด และปัญหาโรค fasciolosis ยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขและปศุสัตว์อยู่มาก จึงเป็นโอกาสทางการค้าที่ประเทศไทยจะสามารถผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรค fasciolosis ได้เองและสร้างมูลค่ารายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างดี และถ้างานวิจัยนี้สามารถเป็นสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรคที่ใช้งานได้จริง ซึ่งจะเป็นต้นแบบแนวคิดที่จะสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรคสำหรับโรคพยาธิอื่นๆ เช่น *Opisthorchis viverrini* ที่มีการแพร่ระบาดมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ในการวิจัยพัฒนาชุดตรวจที่ผ่านมานั้นใช้แอนติบอดีที่เป็นโมโนโคลนอลและโพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีข้อเสียในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมในด้านคุณภาพของชุดตรวจ เนื่องจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตไม่สามารถควบคุมคุณภาพได้เพราะการตอบสนองของสัตว์แต่ละตัวแต่ละรอบที่ผลิตไม่เหมือนกัน ส่วนโมโนโคลน

แอนติบอดีนั้นเป็นแบบเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำให้ไม่มีความเสถียรในการสร้างแอนติบอดีและเมื่อเลี้ยงไปนานๆ จะทำให้การสร้างแอนติบอดีลดลง จึงเป็นปัญหาในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม

ดังนั้นคณะวิจัยซึ่งได้เห็นแนวโน้มที่จะสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรค fasciolosis ด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีแทนเพื่อให้การสร้างแอนติบอดีมีความคงตัว จึงคิดที่จะต่อยอดงานวิจัยให้เป็นนวัตกรรมที่สร้างขึ้นจากคนไทย ซึ่งจะสามารถแก้ไขปัญหาโรคพยาธิใบไม้ตับประเทศได้

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อแอนติเจนของ *Fasciola spp.* เพื่อพัฒนาศักยภาพของชุดตรวจให้สามารถตรวจการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และ *F. hepatica* ได้ทุกระยะของการติดเชื้อ

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

เป็นการวิจัยต่อยอดจากผลงานวิจัยที่ได้ทำวิจัยไปแล้วคือ การโคลนยีน การศึกษาคุณสมบัติของยีน การแสดงออกของยีน และการทดสอบศักยภาพการเป็นชุดตรวจของแต่ละแอนติบอดีคือ CatB, CatL และ SAP และ 28.5 kDa ซึ่งสามารถตรวจการติดเชื้อ *F. gigantica* ได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องการต่อยอดพัฒนาปรับปรุงชุดตรวจเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรวจหาการติดเชื้อ *F. gigantica* และ *F. hepatica* ให้มีความแม่นยำและความจำเพาะมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการผลิตชุดตรวจโดยใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีเข้ามาร่วมด้วยในการการผลิต เพื่อลดต้นทุนในการผลิตและเก็บไว้ได้นาน รวมถึงได้มีการสังเคราะห์และสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MoAb) และโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PoAb) ต่อแอนติเจนอื่นๆ ด้วยเช่น glutathione peroxidase (GPx) และ thioredoxine related protein 14 (TRP14) โดยคณะวิจัยได้แบ่งการศึกษาวิจัยออกเป็น 4 ขั้นตอนหลัก

- 1) การสร้างและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนเป้าหมายและทดสอบศักยภาพการต่อแอนติเจนเป้าหมาย
- 2) การโคลนยีนโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีศักยภาพในการสร้างชุดตรวจ
- 3) การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอลแอนติบอดีและทดสอบศักยภาพการต่อแอนติเจนเป้าหมาย
- 4) การสร้างชุดตรวจแบบต่างๆจากรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอลแอนติบอดีและทดสอบศักยภาพความไวและความจำเพาะต่อการเป็นชุดตรวจ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ในวารสาร

คาดว่าจะสามารถตีพิมพ์บทความวิชาการในวารสารนานาชาติที่มี impact factor ค่อนข้างดี (Q1 หรือ Q2) ได้ไม่น้อยกว่า 1 บทความ

หน่วยงานที่สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สถาบันผลิตสัตว์และสุขภาพสัตว์
2. สถาบันบำรุงพันธุ์และวิเคราะห์โรคสัตว์ กรมปศุสัตว์
3. ฟาร์มปศุสัตว์
4. เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์รายย่อย

เนื้อเรื่อง (Main body)

รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ

นำเอาตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมจากไข่พยาธิไปติดเชื้อในหอย *Lymnaea ollula* ซึ่งนำมาจากประเทศญี่ปุ่นเพื่อให้ได้ตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียสำหรับการทดลองได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากหอย *L. ollula* เป็นพันธุ์ที่มีความทนต่อการติดเชื้อพยาธิกว่าหอย *Radix rubiginosa* ซึ่งเป็นพาหะกลางของพยาธิใบไม้ตับ โค กระบือ ตามธรรมชาติในประเทศไทย การเพาะเลี้ยงหอย *L. ollula* กระทำโดยนำหอยตัวเต็มวัย ประมาณ 30 ตัว ใส่ในอ่างพลาสติกสีขาว ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 ซม. สูงประมาณ 9 ซม. ภายในอ่าง ใส่ดินเหนียวและก้อนหิน ทำเป็นทางลาดเพื่อให้หอยวางไข่ เติมน้ำให้ท่วมดินเหนียวและก้อนหิน ประมาณ 2 ซม. ให้ออกซิเจนโดยใช้เครื่องพ่นอากาศลงในอ่างน้ำตลอดเวลาและให้แสงสว่างโดยใช้ไฟนีออน ขนาด 40W เป็นเวลา 8 ชม. ต่อวัน ให้อาหารคือผักกาดหอม

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย *L. ollula*

(1) นำเอาไข่พยาธิที่ได้จากถุงน้ำดีของโคหรือกระบือที่ติดเชื้อพยาธิมาล้างน้ำตอกด้วยน้ำที่ปราศจากคลอรีน จากนั้นรวมเอาไข่ที่ได้ใส่จานแก้ว (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 ซม. เติมน้ำให้ท่วมฝา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการพัฒนาของไข่พยาธิทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope) พยาธิใช้เวลาประมาณ 14-16 วัน จึงจะเจริญเป็นระยะไมราซิเดียม และฟักออกมาจากไข่

(2) นำหอยที่โตเต็มที่ขนาดประมาณ 4-5 มม. แยกออกมาใส่ถ้วยพลาสติกซึ่งบรรจุน้ำปราศจากคลอรีน ใส่อตัวอ่อนพยาธิระยะไมราซิเดียม จำนวน 2 ตัว ใส่ลงในถ้วยที่ใส่หอยไว้แล้วใช้หลอดไฟขนาด 40W ส่องห่าง ๆ เพื่อช่วยกระตุ้นไมราซิเดียมซึ่งไวต่อแสง ตั้งถ้วยทิ้งไว้ประมาณ 2 ชม. เพื่อให้ไมราซิเดียมไชเข้าไปในหอย หลังจากนั้นแยกเอาหอยออกมาเลี้ยงตามปกติ

การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercariae) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ

จากการศึกษาพบว่า ตัวอ่อนพยาธิใช้เวลาในการเจริญในหอยประมาณ 6 สัปดาห์ จึงจะได้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) ซึ่งจะออกจากหอยมาว่ายอยู่ในน้ำ หลังการติดเชื้อได้สัปดาห์ที่ 5 จึงเริ่มตรวจดู

หอยที่ติดเชื้อไว้ และแยกหอยที่ติดเชื้อออกมาเลี้ยงรวมกันในที่ซึ่งปราศแสง เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียออกมาจากหอย

สำหรับการเก็บตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียดำเนินการดังต่อไปนี้

- (1) นำหอยที่ได้ติดเชื้อไว้แล้วแยกใส่ถ้วยพลาสติกใสที่มีน้ำปราศจากคลอรีนทำเช่นนี้ทุกวันเว้นวัน
- (2) ใช้แผ่นพลาสติกบางใสขนาด 5x5 ซม. ใส่ลงในถ้วย
- (3) ใช้โคมไฟขนาด 40W ส่องกระตุ้นให้เซอร์คาเรียออกจากหอย
- (4) ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียที่ออกมาจากหอยจะว่ายอยู่ในน้ำระยะเวลาสั้น ๆ แล้วจึงเกาะกับแผ่นพลาสติก สลัดหางทิ้ง สร้างซิสต์ระยะเมตาเซอร์คาเรียขึ้นมา
- (5) หลังจากนั้นประมาณ 2 ชม. แยกเอาหอยออกไปเลี้ยงตามเดิม นำเอาแผ่นพลาสติกออกมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บแผ่นพลาสติกที่มีเมตาเซอร์คาเรียไว้ในตู้เย็น ซึ่งเมตาเซอร์คาเรียจะมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 1 สัปดาห์

การโคลนยีนและผลิตรีคอมบรินันท์โปรตีน

การโคลนยีนที่สร้างแอนติบอดี

ทำการสกัด total RNA ของเซลล์ hybridoma โดยสารละลาย TRIzol (Invitrogen) วิธีการสกัดทำตามวิธีที่แนะนำในหนังสือคู่มือสารละลาย RNA ที่ได้ต้องมีคุณภาพดีและไม่มี DNA ปน เปื้อน โดยจะทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้เพื่อสังเคราะห์ cDNA

การสังเคราะห์ cDNA ทำได้โดยใช้ RNA ที่สกัดได้เป็นสายต้นแบบ (template) โดยมี oligo dT เป็น primer สำหรับให้เอนไซม์ RNA reverse transcriptase สามารถสร้างสาย cDNA complementary กับ RNA ต้นแบบได้ และทำการโคลนยีนที่สร้างแอนติบอดี ด้วยวิธี PCR จากนั้นนำยีนที่โคลนได้มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGTM-T Easy เพื่อทำการหาลำดับเบสว่าเป็นเป็นยีนที่สร้างแอนติบอดี จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนเก็บไว้เพื่อเป็นต้นแบบในการทำ recombinant monoclonal antibody ต่อไป

การสังเคราะห์ recombinant antigen และ recombinant monoclonal antibody

กระบวนการผลิต recombinant antigen ของจีนเป้าหมาย และ recombinant monoclonal antibody จะกระทำโดยใช้ expression vector ของระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย (prokaryotic system) คือ pET-30b และ pET-21b หลังจากนั้นจึงนำ vector เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งคือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนและสุดท้ายทำให้เซลล์แบคทีเรียสลายและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

การพัฒนาและทดสอบวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MoAb)

นำ recombinant proteins ฉีดเข้าช่องท้องของหนูทดลอง (intraperitoneal injection) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนในหนูทดลองสร้างและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในม้าม โดยการฉีดกระตุ้นจำนวน 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะฉีดห่างกัน 3 สัปดาห์ จากนั้นทำการฉีดเข้าเส้นเลือดบริเวณหาง (tail vein) ก่อนทำการแยกเซลล์ม้าม 3 วัน เมื่อครบกำหนดทำการแยกเซลล์ม้ามที่ได้จากหนูที่มีการฉีดกระตุ้นเพื่อใช้สำหรับเชื่อมกับเซลล์ myeloma

นำเซลล์ myeloma และเซลล์ม้ามมาทำการเชื่อมต่อกันด้วย polyethyleneglycol (PEG) นำเซลล์ hybridoma ที่ได้หยอดลงใน 96 well plate แล้วนำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมปริมาณ CO₂ ที่ร้อยละ 5 และทำการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี limiting dilution หลังจากนั้นจึงคัดเลือกโคลนด้วย enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และ enzyme linked immunoelectrotransfer blot (EITB) ทำการตรวจหา class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Immunopure Monoclonal Antibody Isotyping kit (HRP/ABTS) (PIERCE) ซึ่งใช้หลักการ sandwich ELISA

การผลิตรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอลแอนติบอดี (rMoAb)

การโคลนยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาวและสายสั้นเข้าสู่ pGEM-T vector นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีน ES ของพยาธิ *F. gigantica* มาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด Gencatch™ total RNA miniprep (Epoch life sciences) จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA ของโมเลกุลแอนติบอดีสายยาวด้วย MulgCHgamma reverse primer (5'-CTGGACAGGG ATCCAGAGTTCCA-3') และ cDNA ของโมเลกุลแอนติบอดีสายสั้นด้วย MulgCLKappa reverse primer (5'-CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAC-3') จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณขึ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีสายยาวและสายสั้นด้วยเทคนิค RACE-PCR โดยนำ cDNA ของโมเลกุลสายยาวและสายสั้นที่สังเคราะห์ขึ้นมาเติม homopolymeric dG ที่บริเวณปลาย 5' โดยใช้เอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณขึ้นยีนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ RACE dCTP forward primer และ MulgCHgammaNested reverse primer (5'-TARCCYTTGACMAGGCATCC-3') สำหรับยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาว ส่วนยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายสั้นนั้นจะใช้ RACE dCTP forward primer (5'-CAAGGAATTCCCCCCCCCCCC-3') และ MulgCLKappa Nested reverse primer (5'-CGTTCAC T GCCATCAATC-3') นำขึ้นยีนโมเลกุลสายยาวและสายสั้นที่ได้มาเติม singledA ที่บริเวณปลาย 3' ด้วยเอนไซม์ Ex taq DNA polymerase จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยเทคนิค heat shock transformation และทำการคัดเลือก transformant บนอาหารที่จำเพาะ โดยสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวมาตรวจสอบ recombinant clone ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ T7 promoter forward primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') และ MulgCHgammaNested reverse primer สำหรับยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาว ส่วนยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายสั้นนั้นจะใช้

T7 promoter forward primer และ MulgCLKappaNested reverse primer จากนั้นนำ recombinant clone ที่มีชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาวและสายสั้นมาเพาะเลี้ยงและสกัด recombinant plasmid ด้วยชุดสกัด Gencatch™ plus plasmid DNA miniprep (Epoch life sciences) นำ recombinant plasmid ที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR sequencing โดยใช้ T7 promoter forward primer จากนั้นนำ PCR products ที่ได้มาอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดี (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและโมเลกุลสายสั้นสำหรับนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนส่วน variable region ต่อไป การโคลนยีนส่วน variable region เข้าสู่ mammalian expression vector นำ recombinant plasmid ที่บรรจุชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีมาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนส่วน variable region ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ HB3VH forward primer (5'-CTGCTTAAGGG CGTCCAATGCGAAGTGAACTGGTGGAGTCT-3') คู่กับ HB3VH reverse primer (5'-ACTAGGGCCCTT TGTGCTAGAGGAGACTGTGAGAGTGGT-3') สำหรับโมเลกุลสายยาวซึ่งออกแบบให้มี AflII restriction site ที่ปลาย 5' ของ forward primer และ PspOMI restriction site ที่ปลาย 3' ของ reverse primer ส่วนโมเลกุลสายสั้นจะใช้ HB3VL forward primer (5'-ACCACCGCCGACATTGTGATGACCCAGTCT-3') คู่กับ HB3VL reverse primer (5'-TTCCAGCTTTGTCCCACCGCCGAA-3') จากนั้นนำยีนส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและเวกเตอร์ pcDNA3.4-CHY ที่บรรจุยีนส่วน constant region ชนิด gamma ของมนุษย์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ AflII และ PspOMI แล้วจึงเชื่อมต่อยีนเข้ากับเวกเตอร์สำหรับยีนส่วน variable region ของโมเลกุลสายสั้นนั้นจะนำมาเติมหมู่ฟอสเฟตที่บริเวณปลาย 5' โดยใช้เอนไซม์ T4 polynucleotide kinase แล้วจึงนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pcDNA3.4-CLK ที่บรรจุชิ้นยีนส่วน constant region ชนิด kappa ของมนุษย์ที่นำหมู่ฟอสเฟตที่บริเวณปลาย 5' ออก จากนั้นนำเวกเตอร์ที่เชื่อมต่อกับยีนแล้วเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ DH5α ด้วยเทคนิค heat shock transformation และทำการคัดเลือก transformant บนอาหาร 2XYT-AG agar หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารมาตรวจสอบ recombinant clone ที่มีชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลในส่วน variable region ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ XbaIKozHuHleader forward primer (5'-GACTCTAGAGGATCGAACCCCTGCCGCCACCATGGAGTTCGGA-3') คู่กับ pcDNA3.4 reverse primer (5'-CAACATAGTTAAGAATACCAGTC-3') สำหรับตรวจสอบโมเลกุลสายยาว และ XbaIKozHuKleader forward primer (5'-GACTCTAGAGGATCGAACCCCTGCCGCCACCATGGAGA CTCCA-3') คู่กับ pcDNA3.4 reverse primer สำหรับโมเลกุลสายสั้น จากนั้นนำ recombinant clone ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2XYT-A broth และสกัด recombinant plasmid มาทำปฏิกิริยา PCR sequencing โดยใช้ CMVpSeq forward primer (5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3') และนำ PCR products ที่ได้มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและสายสั้น เพื่อคัดเลือก recombinant plasmid ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องเพื่อนำไปใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อไป

การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีและการทำแอนติบอดีให้มีความบริสุทธิ์นำ heavy chain recombinant plasmid และ light chain recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์ human embryonic kidney 293-F (invitrogen) โดยใช้ Gencarrier-1™ transfection reagent (Epoch life sciences) จากนั้นนำ transfected เซลล์ไปเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วันจึงเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาแยกรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค affinity chromatography โดยใช้โปรตีน A sepharose™ (GE Healthcare) หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ได้มาตรวจสอบคุณลักษณะเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ western blot ตามลำดับการวิเคราะห์ค่า antibody titer และ sensitivity ในการตรวจหาการติดเชื้อ Fasciolosis ด้วยเทคนิค sandwich ELISA และ Dot-ELISA ดังกล่าวมาข้างต้น และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความไวและ ความจำเพาะต่อ Fasciolosis โดยใช้สูตรคำนวณของ Lalkhen และ McCluskey (2008)

การตรวจสอบคุณลักษณะของ rMoAb ด้วยวิธี immunoblotting

เมื่อได้ rMoAb แล้วเราจะนำ rMoAb ไปตรวจการทำปฏิกิริยากับ recombinant proteins เป้าหมายและโปรตีนธรรมชาติชนิดเดียวกันที่มีอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพยาธิ เช่น ภายในตัว (whole body proteins) โปรตีนจากชั้นผิว (tegument proteins-TA) และโปรตีนจากสารขับถ่ายและคัดหลังจากพยาธิ (excretory-secretory protein-Es)

การสกัดโปรตีนแอนติเจนจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิเพื่อนำมาทดสอบกับ rMoAb

นำพยาธิตัวเต็มวัยที่เก็บได้จากตับของวัวที่เชื่อที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์มาสกัดโปรตีนจากชั้นผิว (TA) ใน extracting buffer ซึ่งประกอบด้วย 1XPBS pH 7.4 ที่มี 1% (v/v) nonidet P-40, 1% (w/v) sodium deoxycholate, และ 0.025% (w/v) phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) โดยแช่พยาธิเป็นเวลา 30 นาที นำชั้น TA ที่หลุดออกมาไป sonicate โดยใช้ ultrasonic disintegrator ที่ amplitude 10-14 micron นาน 1 นาที ทำ 5 รอบ นำ suspension มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 xg ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส นาน 15 นาที นำ supernate ที่ได้มาวัดความเข้มข้นของโปรตีน จากนั้นเก็บ supernate ที่มี TA แอนติเจน ไว้ที่ -20° เซลเซียส เพื่อนำมาทำการทดสอบต่อไป ส่วนลำตัวของพยาธิที่เหลือจะถูกสกัดต่อไป และ homogenized จนละเอียดแล้วปั่นเอา supernatant ที่มี whole body (WB) แอนติเจนเก็บไว้ใช้ต่อไป ส่วน excretory-secretory (ES) แอนติเจน ได้จากการ incubate พยาธิตัวเต็มวัยเป็น ๆ ที่เก็บมาจากตับโค ใน RPMI medium 2 ชั่วโมงแล้วเก็บ medium เพื่อนำไปปั่นตกตะกอน ส่วน supernatant คือ ES แอนติเจนที่จะเก็บไว้ใช้ต่อไป

การแยกโปรตีนโดยใช้ sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำ supernates ที่ได้ข้างต้น และ recombinant proteins มาทำการแยกโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE ด้วยวิธีของ Laemmli, 1970 โดยนำ supernate ที่มีปริมาณโปรตีน 25 µg มาแยกในส่วน SDS-polyacrylamide mini-slab gel ที่มี 10% acrylamide separating gel และ 3% acrylamide stacking

gel ทำการ electrophoresis ใน running buffer ที่มี 25 mM Tris, 192 mM glycine และ 0.1% SDS, pH 8.3 โดยใช้ ที่ความต่างศักย์ 200 V ที่อุณหภูมิ 10-15° เซลเซียส

Western blotting

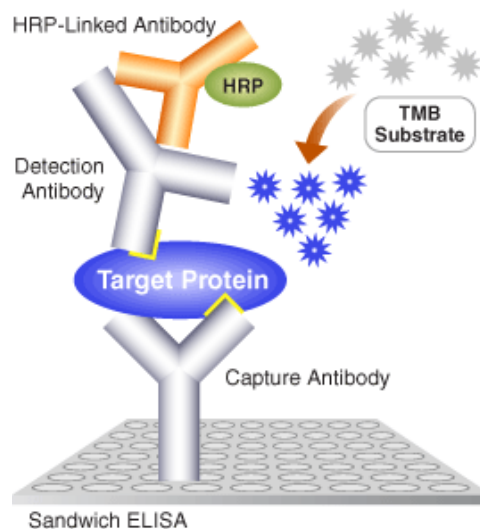
หลังจากทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้ว ทำการย้ายโปรตีนจาก gel สู่ PVDF membrane ใน transferring buffer ที่มี 40 mM Tris, pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 20% (v/v) methanol, และ 0.05% SDS ทำการย้ายโปรตีนโดยใช้ constant voltage ที่ 10 v, อุณหภูมิ 10-15° เซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (over-night) ใช้ Mini Trans-Blot^R transfertank

นำแผ่น PVDF membrane ที่ได้มา block ด้วย 3% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween-20 ใน 1XPBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย PBST (ประกอบด้วย PBS pH 7.4 ที่มี 0.1% (v/v) Tween-20) นำแผ่น membrane ที่ถูก block แล้วมาทำการตรวจหาโปรตีนที่เป็นแอนติเจนเป้าหมาย โดยใช้ monoclonal antibodies ที่จำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย 1XPBS-Tween นานครั้งละ 10 นาที ทำการตรวจปฏิกิริยาการจับระหว่าง antigen และ antibody ที่เกิดขึ้น โดยใส่ horseradish peroxidase – conjugated secondary antibody บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย 1XPBS-Tween เติม peroxidase substrate solution ที่มี 1.3 mM diaminobenzidine (DAB), 0.02% (v/v) H₂O₂ ใน PBS pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่น membrane แช่น้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง แล้วนำมาวิเคราะห์ผล ในการทำ SDS-PAGE ใช้ pre-stained protein markers เป็น molecular weight control

การนำ rMoAb และ recombinant proteins ไปพัฒนาวิธีตรวจการติดเชื้อพยาธิ

การพัฒนาวิธีตรวจแบบ sandwich ELISA

เป็นวิธีที่มี sensitivity สูงใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจนจากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ขั้นตอน ในการตรวจหาแอนติเจนดังกล่าวแสดงโดยย่อ โดยแผนผังและภาพประกอบ ดังนี้



ภาพที่ 1 ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA

เคลือบ ELISA plate ด้วย แอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนเป้าหมาย

↓
ใส่โมโนโคลนัลแอนติบอดี (capture antibody) ลงในหลุมของ ELISA plate

↓
ใส่ skim milk เพื่อ block non specific binding

↓
ใส่ซีรัมสัตว์ที่ติดเชื้อลงในหลุมของ ELISA plate

↓
ใส่ rMoAb ต่อแอนติเจนเป้าหมายที่เชื่อมกับ biotin (detection antibody)

↓
ใส่ streptavidin-HRP ลงในหลุมของ ELISA plate

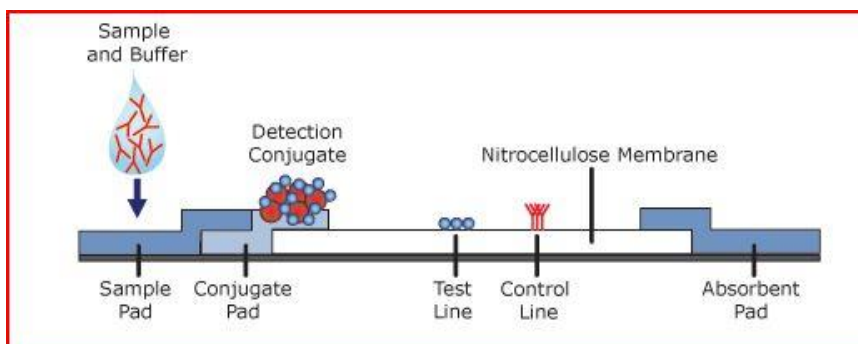
↓
ใส่ TMB substrate ลงในหลุมของ ELISA plate

↓
หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N HCL แล้วอ่าน OD

แผนภูมิที่ 1 ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA

การพัฒนาวิธีตรวจสอบ immuno-chromatography (Immunochromatographic strip (ICS) test)

ICS test ใช้หลักการของ immuno-chromatography เป็นการตรวจสอบชนิด rapid qualitative หรือ semi-quantitative ใช้สำหรับตรวจแอนติเจนเป้าหมาย ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่ เลือด และ ซีรัม เป็นต้น



ภาพที่ 2 แสดงชุดตรวจแบบ ICS

ICS ประกอบด้วย ส่วนสำคัญ 4 ส่วน ได้แก่ sample pad, conjugate release pad, analytical membrane และ wicking (absorbent) pad (ดูภาพประกอบ)

1. Sample pad เป็นส่วนที่ใช้ใส่ตัวอย่างที่ต้องการตรวจ ตัวอย่างจะเคลื่อนที่โดย capillary action ไปยังส่วน conjugate release pad และ analytical membrane
2. Conjugate release pad เป็นส่วนที่ประกอบด้วย โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles ที่จำเพาะต่อแอนติเจนจากชั้นผิวพวยจารีที่น้ำหนักมวลโมเลกุล 28.5 กิโลดาลตัน (หรือแอนติเจนเป้าหมายอื่น)
3. Analytical lines เป็นส่วนที่ประกอบด้วย โพลีโคลนัลแอนติบอดี ต่อแอนติเจนซึ่งเป็นบริเวณทดสอบ (capture line) และ แอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles ซึ่งเป็นบริเวณควบคุม (control line)
4. Wicking (absorbent) pad เป็นส่วนที่ใช้ในการควบคุมการเคลื่อนตัวของแอนติเจน ในตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

การแปลผลการทดสอบของ ICS test

เมื่อหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ เช่น เลือด ในบริเวณ sample pad ตัวอย่างดังกล่าว จะเคลื่อนตัวโดย capillary action ในกรณีที่มีแอนติเจนปนอยู่จะเกิดแถบสีขึ้น 2 แถบซึ่งมาจากแอนติเจนที่จับตัวกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles เป็น antibody-antigen complex เคลื่อนตัวไปจับกับ โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดนี้ในบริเวณทดสอบ (capture line) และ มาจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles จับตัวกับแอนติบอดีต่อโมโนโคลนัล แอนติบอดีที่บริเวณควบคุม (control line) แต่ในกรณีที่ตัวอย่างไม่มีแอนติเจนปนอยู่ จะเกิดแถบสีขึ้นเพียงแถบเดียวจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เคลือบด้วย gold particles จับตัวกับแอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่บริเวณควบคุม (control line) จากข้อมูลที่ได้จะนำค่า MoAb และ PoAb และแอนติเจนที่แสดงผลดีที่สุดไป พัฒนาเป็นวิธีตรวจสอบ ที่จะนำไปใช้ในภาคสนามต่อไป

ผลการวิจัย (Results)

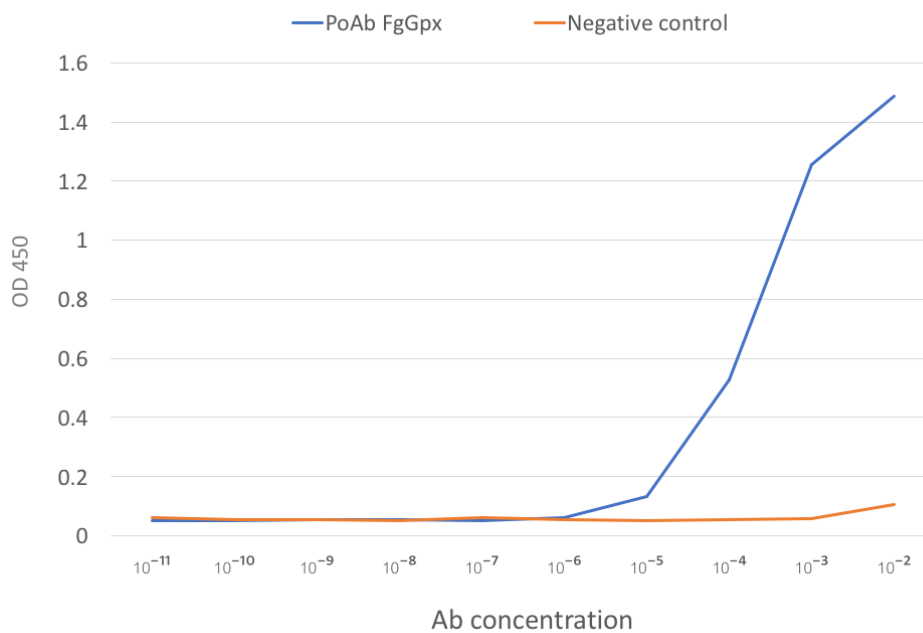
การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgGPx

การวิเคราะห์ปริมาณ Polyclonal Antibody FgGPx ด้วยวิธี Indirect ELISA

หลังจากที่ทำการ Immunization หนูทดลองด้วย FgGPx (Ag) เพื่อศึกษาปริมาณ Polyclonal Antibody FgGPx ที่หนูผลิตออกมาต่อโปรตีน GPx ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า titer ของ Ab ที่ความเข้มข้นต่างกัน (10 fold serial dilution) พบว่าปริมาณของ Ab ที่เริ่มสร้างขึ้นต่อโปรตีน GPx ที่ titer $\sim 10^{-6}$ ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง (OD_{450}) เท่ากับ 0.063

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FgGPx และค่าดูดกลืนแสง OD_{450}

ความเข้มข้นของ Antibody (Titer)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	
	Polyclonal antibody FgGPx	Negative control
10^{-11}	0.051	0.06
10^{-10}	0.05	0.053
10^{-9}	0.054	0.054
10^{-8}	0.054	0.052
10^{-7}	0.051	0.061
10^{-6}	0.063	0.054
10^{-5}	0.134	0.051
10^{-4}	0.526	0.054
10^{-3}	1.256	0.057
10^{-2}	1.487	0.107



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FgGPx และค่าดูดกลืนแสง OD₄₅₀ พบว่าตำแหน่ง titer ~10⁻⁶ พบปริมาณของ Ab ที่สร้างขึ้นต่อโปรตีน GPx ต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้

การผลิต Monoclonal antibody ต่อ FgGPx

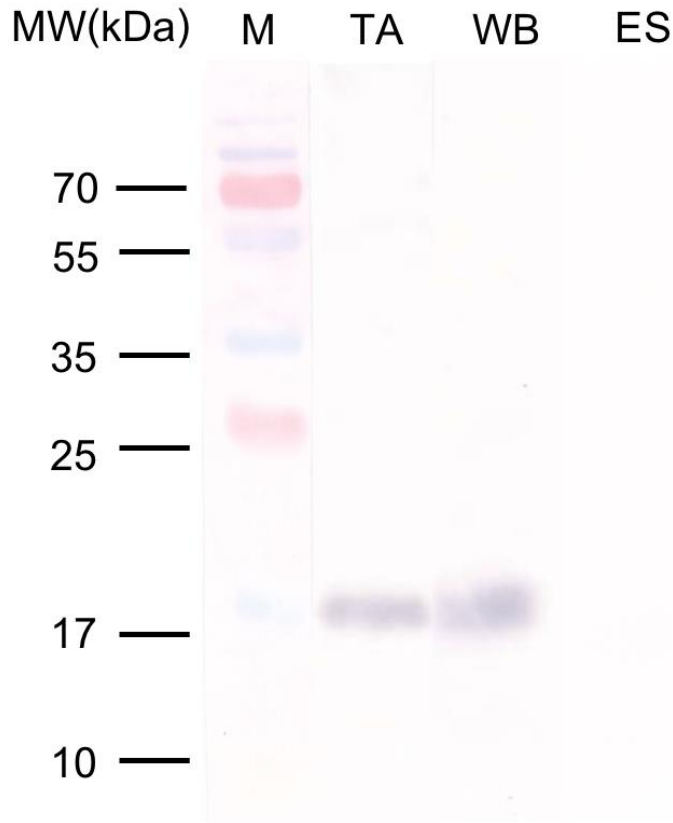
จากผลการทดลอง ELISA ได้เลือก culture fluid จาก Hybridoma clone ชื่อ 7B8 ทำการหาคะชนิด (isotype) ของ MoAb พบว่า heavy chain เป็นชนิด IgG1 และ light chain เป็นชนิด K ดังนั้นจึงนำ clone นี้มาใช้ในการทดลองต่อไป

ศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดมาจากพยาธิ *F.gigantica* ด้วยวิธี Lawry method

ก่อนทำการ run โปรตีนในวิธี SDS-PAGE นำโปรตีนมาวัดความเข้มข้นด้วยวิธี Lawry method โดยเครื่อง spectrophotometry (Versamax Program) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าโปรตีน TA มีความเข้มข้นเฉลี่ย 3.624 µg/ µl และ WB มีความเข้มข้นเฉลี่ย 2.742 µg/ µl

วิเคราะห์ความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ต่อโปรตีน TA, WB และ ES ด้วยวิธี indirect western blot

จากผลการทำ indirect western blot แสดงถึง MoAb (clone 7B8) ที่มีความจำเพาะทำให้เกิด Positive band ที่น้ำหนักโมเลกุล 18 kDa ที่ adult TA และ adult WB ส่วน adult ES ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GPx



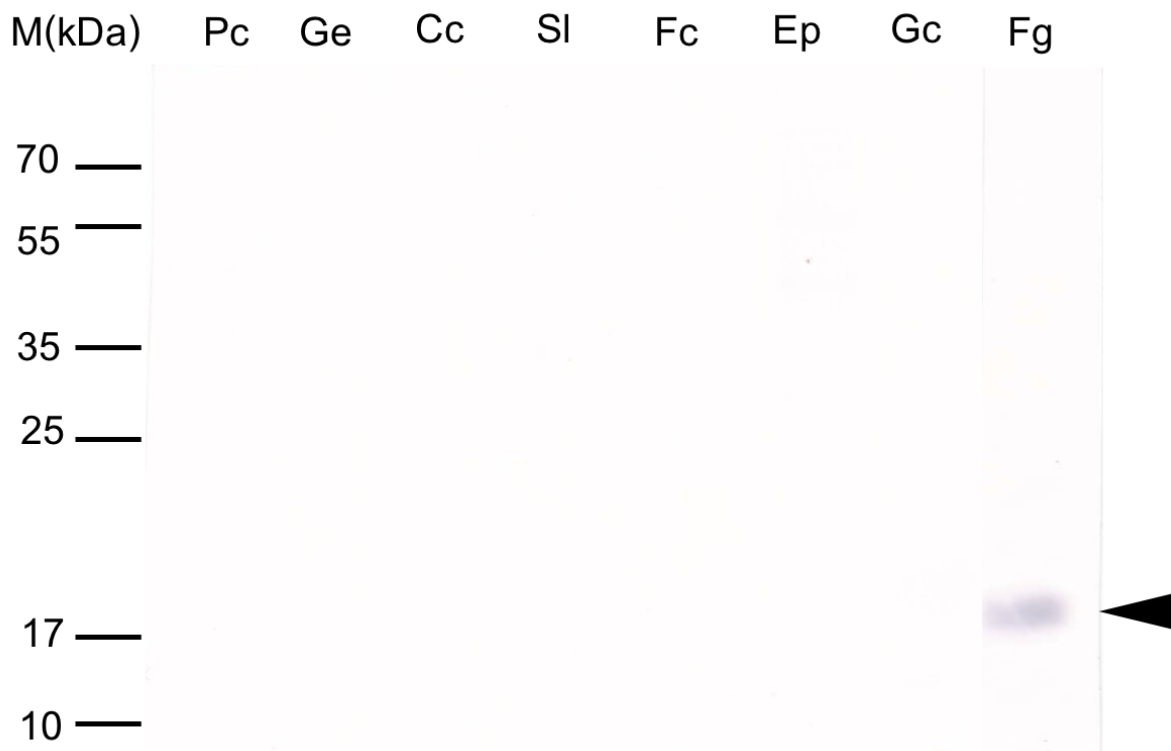
ภาพที่ 4 แสดงความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ต่อ โปรตีน TA, WB และ ES ด้วยวิธี indirect western blot ให้ผล positive กับ TA และ WB และให้ผล negative กับ ES

- Lane 1 Protein Ladder Marker (M)
- Lane 2 Protein Tegument (TA) ของ *F. gigantica* แสดงน้ำหนักโมเลกุล 18 kDa
- Lane 3 Protein Whole body (WB) ของ *F. gigantica* แสดงน้ำหนักโมเลกุล 18 kDa
- Lane 4: Protein Excretory and secretory (ES) ของ *F. gigantica*

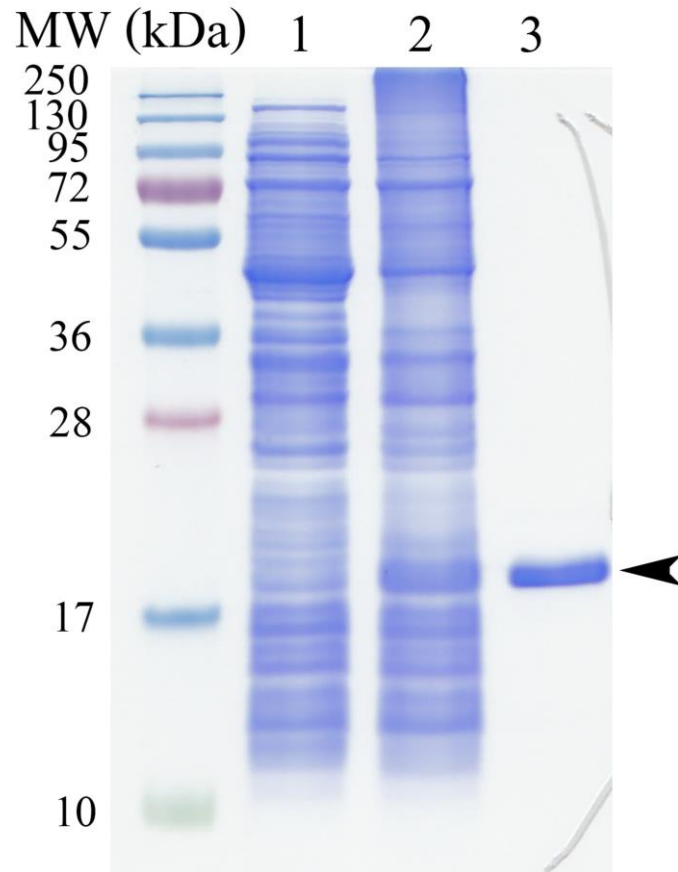
วิเคราะห์ความจำเพาะของโปรตีน FgGPx โดยการทดสอบ Cross reaction กับพยาธิชนิดอื่นๆด้วยวิธี Indirect western blot

หลังจากที่ทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE โปรตีนของพยาธิชนิดอื่น 8 ชนิด ได้แก่ *Paramphistomum cervi* (Pc), *Gigantocotyle explanatum* (Ge), *Cotylophoron cotylophorum* (Cc), *Setaria labiatopapillosa* (Sl), *Fischoederius cobboldi* (Fc), *Eurytrema pancreaticum* (Ep), *Gastrothylax crumenifer* (Gc) และ *Fasciola gigantiga* (Fg) เพื่อทำการแยกขนาดโมเลกุลของโปรตีน จากนั้นทำการ transfer มายัง แผ่น membrane และทดสอบ cross-reaction ด้วยวิธี Indirect western blot โดยใช้ mouse anti-GPx (7B8) เป็น primary antibody โดยการอ่านผล positive สังเกตจากลักษณะ

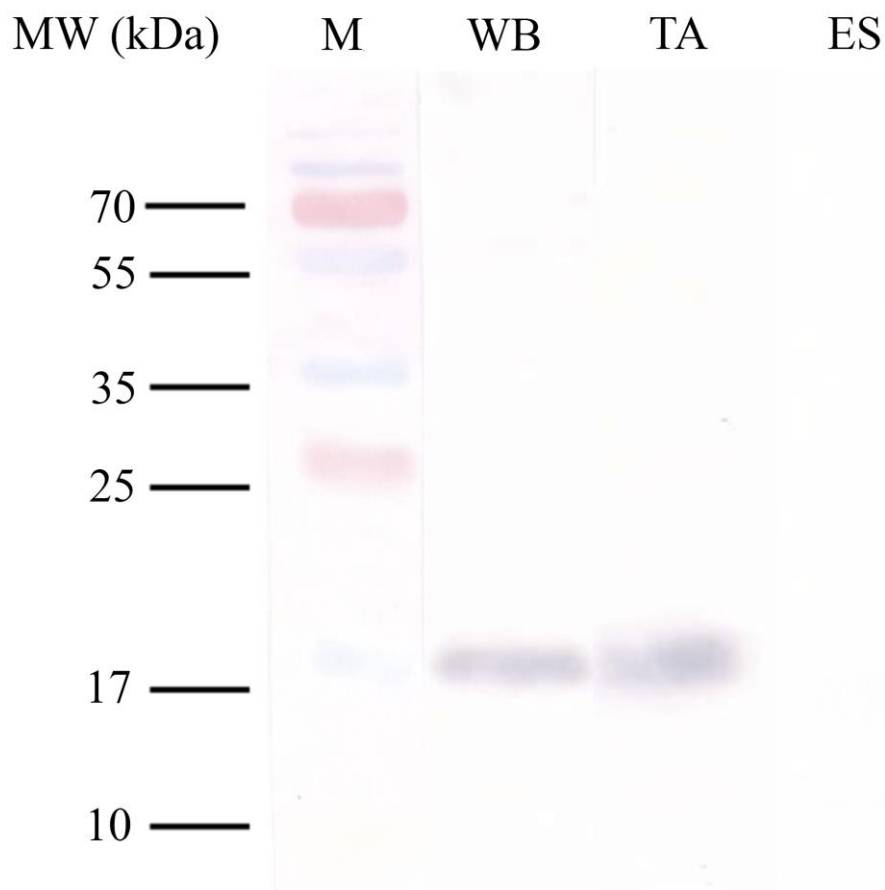
แถบสีที่ปรากฏบนแผ่น membrane จากการทดสอบพบว่า MoAb ต่อ GPx ไม่มีการทำปฏิกิริยาข้ามกับ โปรตีนของพยาธิชนิด *Paramphistomum cervi*, *Gigantocotyle explanatum*, *Cotylophoron cotylophorum*, *Setaria labiatopapillosa*, *Fischoederius cobboldi*, *Eurytrema pancreaticum* และ *Gastrothylax crumenifer* มีแต่เพียงโปรตีนของ *F. gigantea* ที่ปรากฏลักษณะแถบสี (band) เนื่องจากมีความจำเพาะต่อโปรตีน GPx มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 18 k Da ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 5 แสดงความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ด้วยวิธี Indirect western blot และในแถบสุดท้าย ปรากฏลักษณะของแถบสี (band) แสดงถึงความจำเพาะของ FgGPx แต่เพียงแค่ว่า โปรตีน adult whole body ของ *F. gigantea*



ภาพที่ 6 การทำให้โปรตีน rFgGPx บริสุทธิ์ ด้วย Ni-NTA affinity-purified column และวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE จากนั้นนำไปย้อมด้วย Coomassie Blue แถวที่ 1 คือโปรตีนจากแบคทีเรีย (whole bacterial lysate); แถวที่ 2 คือโปรตีนจากแบคทีเรีย (whole bacterial lysate) หลังจากได้รับการกระตุ้นด้วย IPTG; แถวที่ 3 โปรตีน recombinant FgGPx ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ ที่ขนาด MW ดังลูกศรชี้



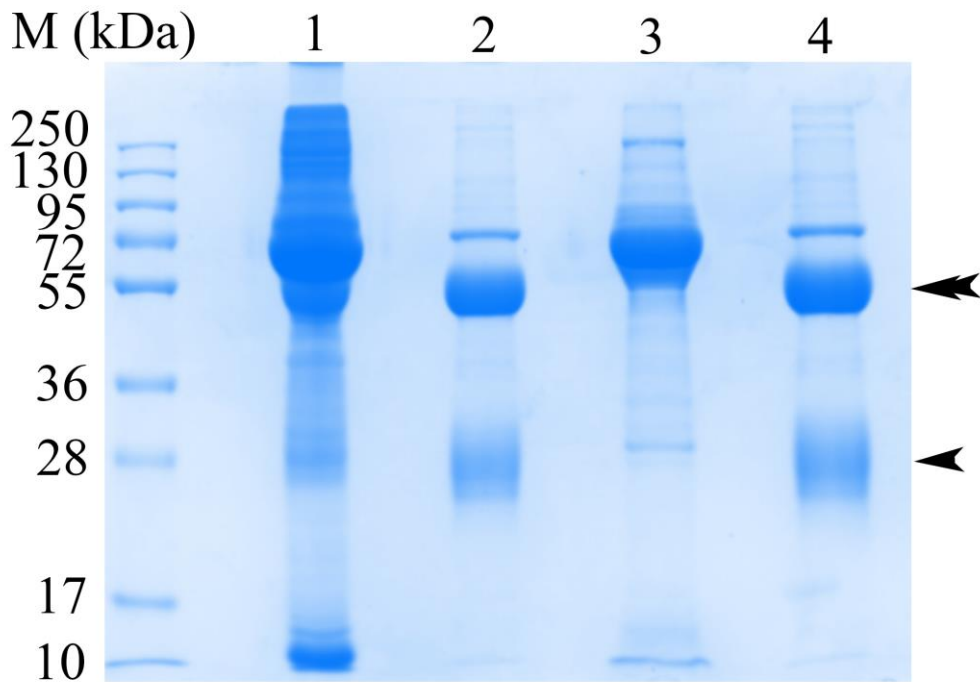
ภาพที่ 7 แสดงการจับกันอย่างจำเพาะของ 7B8 MoAb ต่อ rFgGPx โปรตีน ด้วยวิธี Immunoblots กับ WB, TA, และ ES ด้วยวิธี indirect western blot ให้ผล positive กับ TA และ WB และให้ผล negative กับ ES

Lane 1 Protein Ladder Marker (M)

Lane 2 Protein Whole body (WB) ของ *F. gigantea* แสดงน้ำหนักโมเลกุล 18 kDa

Lane 3 Protein Tegument (TA) ของ *F. gigantea* แสดงน้ำหนักโมเลกุล 18 kDa

Lane 4: Protein Excretory and secretory (ES) ของ *F. gigantea*



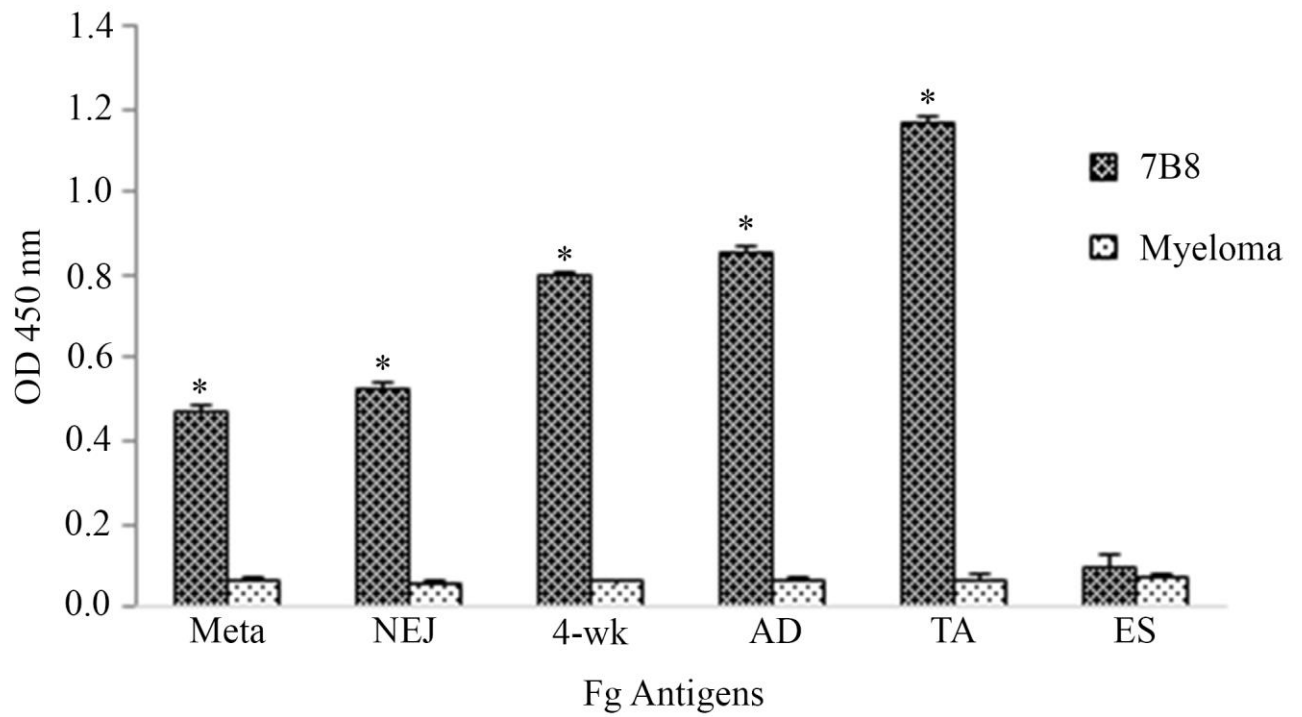
ภาพที่ 8 แสดงการวิเคราะห์แอนติบอดีหลังจากการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ ด้วย protein A binding โดย single head arrow แสดง light chain ส่วน double head arrow แสดง heavy chain

Lane 1 rabbit polyclonal antibody (serum)

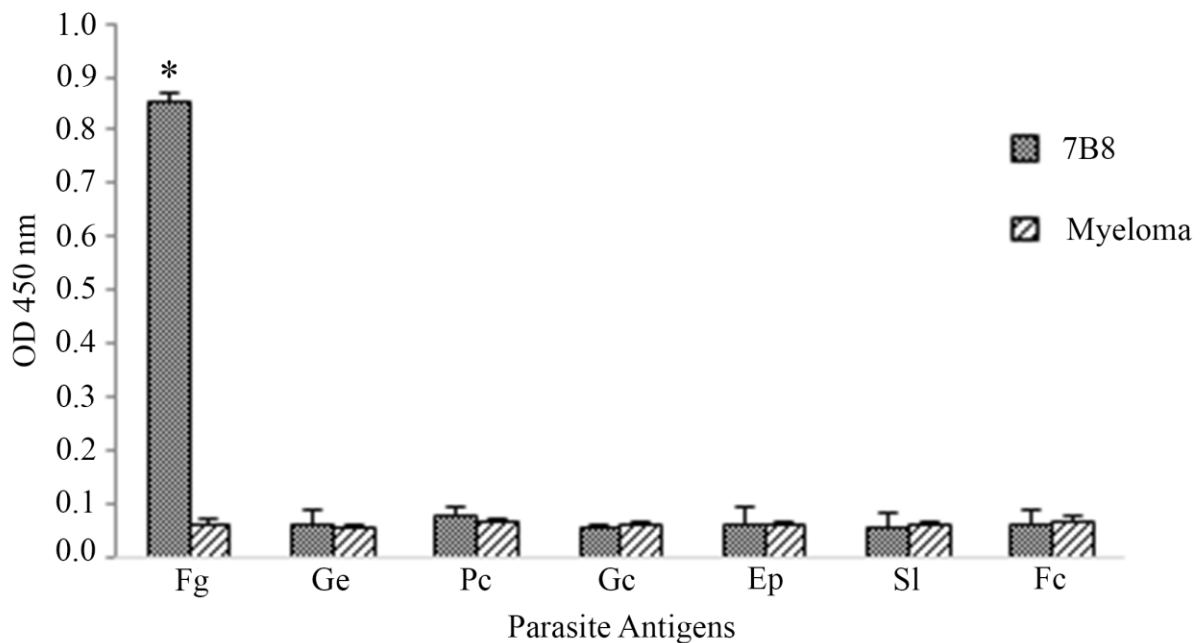
Lane 2 purified PoAb (IgG) แสดงน้ำหนักโมเลกุล 50 kDa

Lane 3 monoclonal antibody (MoAb) – culture fluid

Lane 4: purified MoAb (IgG) แสดงน้ำหนักโมเลกุล 25 kDa



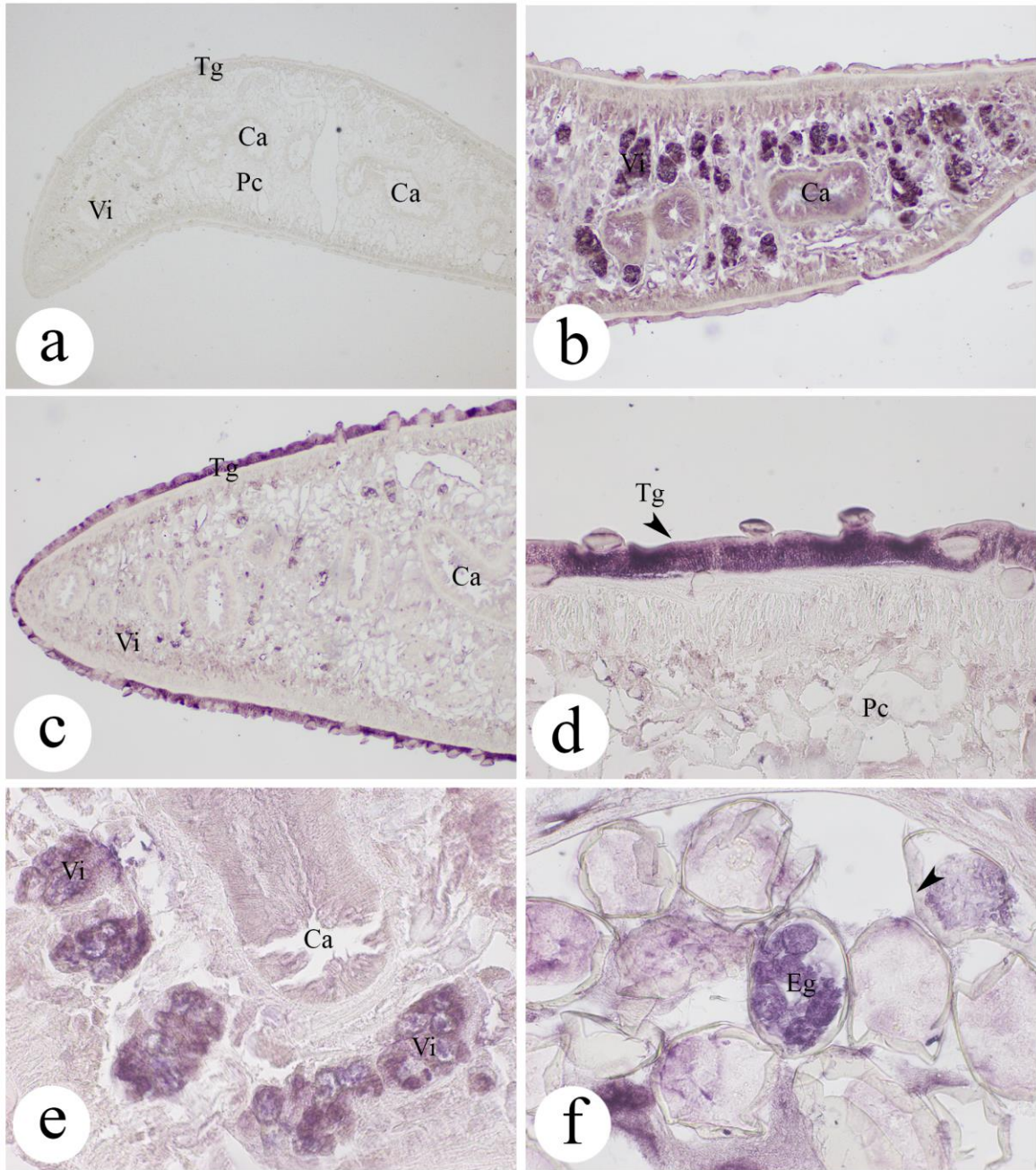
ภาพที่ 9 แสดงการจับกันอย่างจำเพาะของ 7B8 MoAb ต่อ native FgGPx โปรตีน ในพยาธิ *F. gigantica* ระยะต่างๆ (metacercariae, NEJ, 4-week old juveniles, adult, ES และ TA) ด้วยวิธี indirect ELISA ให้ผล positive กับ TA และ WB ของ *F. gigantica* ทุกระยะ และให้ผล negative กับ ES



ภาพที่ 10 แสดงการจับกันอย่างจำเพาะของ 7B8 MoAb ต่อ native FgGPx โปรตีน ใน WB ของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย (Fg) และ พยาธิชนิดอื่นๆ (Ge, Pc, Gc, Ep, Sl, Fc) ด้วยวิธี indirect ELISA ให้ผล positive เฉพาะ *F. gigantica* แต่ไม่มีปฏิกิริยากับโปรตีนของพยาธิชนิดอื่น

การวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีน FgGPx ในพยาธิ *F.gigantica* ด้วยวิธี Immunohistochemistry

ทำการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีน GPx ด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้ mouse anti-GPx (7B8) เป็น primary antibody และในส่วนของ negative control ใช้ myeloma เป็น primary antibody ผลการย้อมเนื้อเยื่อพยาธิ *F.gigantica* ในระยะพยาธิตัวเต็มวัย (Adult) ผลการย้อมเนื้อเยื่อพยาธิ *F.gigantica* ในระยะพยาธิตัวเต็มวัย (Adult) เป็น negative control (ภาพ A) และระยะ adult (จากภาพ B-D) จากกำลังขยายต่ำไปกำลังขยายสูง ดังภาพที่ 18 พบว่าย้อมติดสปีบริเวณผิว (tegument) ของพยาธิ *F.gigantica* และไม่มีแสดงออกที่ caecum (Ca), parenchymal cell (Pc) และ spine (Sp)



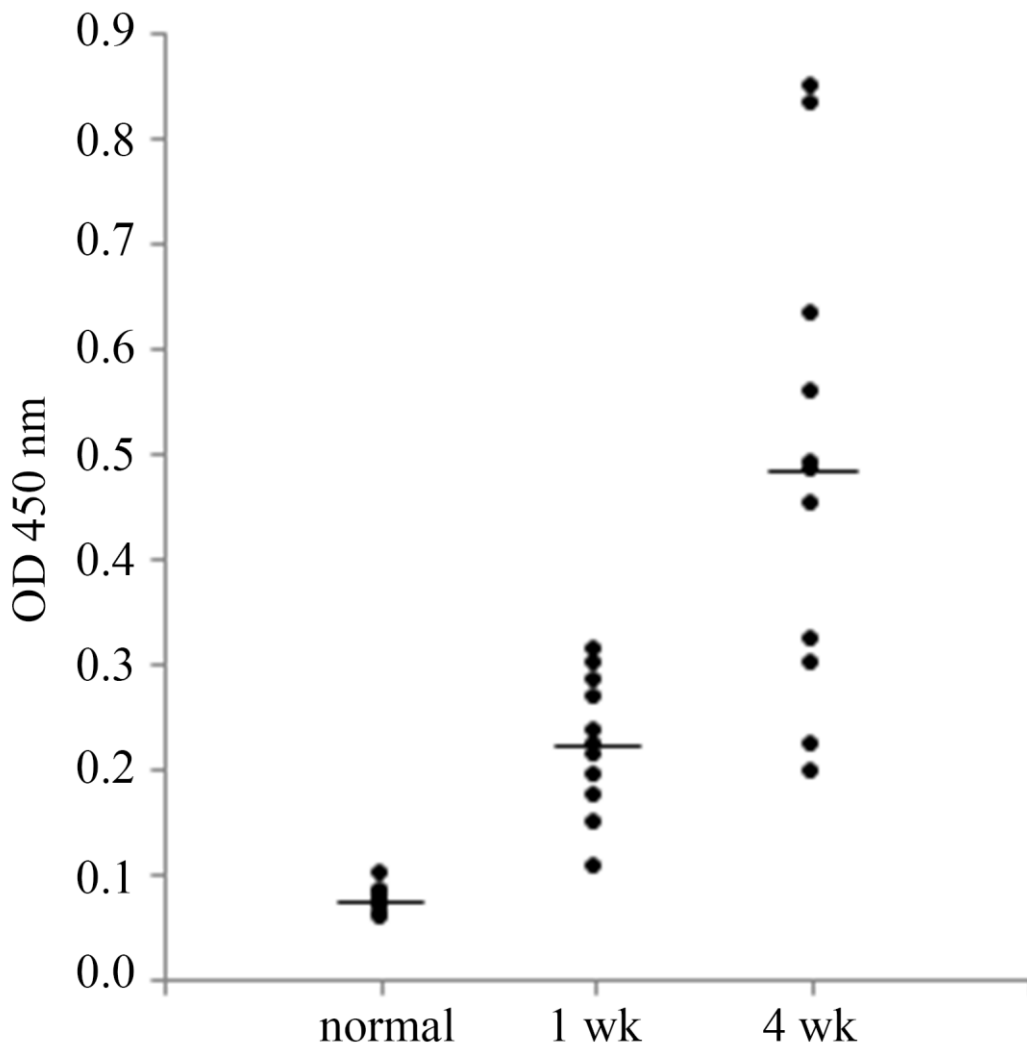
ภาพที่ 11 แสดงการตรวจหาตำแหน่งของโปรตีน GPx ในเนื้อเยื่อของ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยด้วยวิธี

Immunohistochemistry ซึ่งใช้ culture fluid (7B8) เป็น primary antibody

ภาพ A ภาพกำลังขยายปานกลางของชั้นผิวในพยาธิตัวเต็มวัย (Adult) ซึ่งใช้ myeloma culture fluid เป็น primary antibody (negative control)

ภาพ B และ C ภาพกำลังขยายกลาง (10x) ของพยาธิตัวเต็มวัย พบการแสดงออกของโปรตีน GPx บริเวณผิว (Tg=tegument) และ vitelline ลักษณะเป็นสีม่วงๆที่ชั้นผิว แต่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GPx ใน caecum(Ca),parenchymal cell (Pc) และ spine(Sp)

ภาพ D, E และ D ภาพกำลังขยายสูงพยาธิตัวเต็มวัย แสดงถึงตำแหน่งที่มีการแสดงออกของโปรตีน GPx (positive reaction) ในบริเวณผิว (Tg=tegument), vitelline (Vi) และ egg (Eg) ลักษณะเป็นสีม่วงๆ แต่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GPx ใน caecum(Ca), parenchymal cell (Pc) และ spine(Sp)



ภาพที่ 12 แสดงการตรวจวัด FgGPx ในเลือดหนูที่ติดเชื้อ *F. gigantica* หลังติดเชื้อ 1 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ ด้วยวิธี sandwich ELISA พบว่าสามารถตรวจวัด FgGPx (circulating FgGPx) ได้ตั้งแต่ 1 สัปดาห์ หลังติดเชื้อ *F. gigantica*

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

สังเคราะห์ โปรตีน rFgGPx

การศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการสังเคราะห์ยีนและรีคอมบิแนนท์โปรตีน glutathione peroxidase (rFgGPx) ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ซึ่งสังเคราะห์ด้วยวิธีโคลนนิ่งด้วยพีซีอาร์ (PCR) จาก cDNA ของพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัย พบว่ายีน FgGPx มีลำดับ conseve sequences 3 ตำแหน่ง คือ NVACKUG, FPCNQFGGQ และ WNF ซึ่งตรงกับ conseve sequences ของ GPx เมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และจาก phylogenetic tree พบว่า FgGPx มีความใกล้เคียงกับ *F. hepatica* รีคอมบิแนนท์โปรตีน FgGPx ประกอบด้วยกรดอะมิโน 168 ตัว หลังจากนั้นได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนในแบคทีเรีย (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) พบว่าจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE รีคอมบิแนนท์โปรตีน FgGPx มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19 กิโลดาลตัน และได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน rFgGPx ในหนู (anti-rFgGPx) หลังจากนั้นนำแอนติบอดีมาทดสอบความจำเพาะโดยวิธี immunoblotting และ immunohistochemistry พบว่าจากการทดสอบด้วย immunoblotting แอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน FgGPx มีปฏิกิริยากับ rFg GPx ที่น้ำหนักโมเลกุล 19 กิโลดาลตัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อโปรตีน FgGPx และแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน FgGPx สามารถทำปฏิกิริยากับ whole body ของพยาธิ *F.gigantica* ระยะต่าง (egg, metacercariae, NEJs, 4-week-ole juveniles, adult) และทำปฏิกิริยากับ tegumental antigen (TA) ของพยาธิตัวเต็มวัย และไม่ทำปฏิกิริยากับพยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ ดังนี้ *G. crumenifer* (Gc), *P. cervi* (Pc), *G. explanatum* (Ge), *C. cotylophorum* (Cc), *S. labiato papillosa* (Sl), *F. cobboldi* (Fc), *E. pancreaticum* (Ep) ชางแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgGPx มีความจำเพาะกับโปรตีน FgGPx ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*

การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของ MoAb ต่อ rFgGPx

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ผลิต MoAb และทำการเช็ค isotype ของ MoAb (7B8) ต่อ recombinant *Fasciola gigantica* GPx (rFgGPx) ด้วยวิธี ELISA พบว่าเป็นชนิด immunoglobulin (Ig) G1 และ K light chain ที่มีความจำเพาะต่อ native FgGPx ในพยาธิ ผลจากการทำ indirect western immunoblot แสดงให้เห็นถึง MoAb(7B8) ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ผิว(tegument) ของพยาธิ *F.gigantica* และโปรตีนที่สกัดจากทั้งตัว(whole body) ของพยาธิ *F.gigantica* ที่น้ำหนักโมเลกุล 18 kDa เนื่องจากว่าบริเวณที่มีการสัมผัสกับ free radicals เป็นส่วนแรกคือ ผิวของพยาธิ(tegument) จึงเป็นส่วนที่มีการผลิต GPx ออกมา และถือได้ว่าโปรตีนที่ผิว(tegument) ของพยาธิ *F.gigantica* นั้น ถือเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนที่สกัดจากทั้งตัว (whole body) ของพยาธิ *F.gigantica* จึงสามารถแสดงลักษณะที่จำเพาะต่อ GPx ได้ แต่ไม่พบใน excretory-secretory (ES) เนื่องจากไม่มีการผลิตโปรตีน GPx ออกมาในบริเวณนั้น และทำการทดสอบ Cross reaction กับพยาธิชนิดอื่นๆ ได้แก่ พยาธิชนิด *P. cervi*, *G. explanatum*, *C. cotylophorum*, *S. labiatopapillosa*, *F. cobboldi*, *E. pancreaticum* และ *G. crumenifer* ไม่มีการทำปฏิกิริยากับแอนติเจน (antigen) ของพยาธิที่กล่าวมา เพราะฉะนั้นจึงยืนยันได้ว่า MoAb (7B8) มีความจำเพาะแต่เพียงพยาธิ *F.gigantica* เท่านั้น

ผลจากการทำ immunohistochemistry ย้อมเนื้อเยื่อพยาธิ *F.gigantica* ในระยะ metacercaria , 3 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ และพยาธิตัวเต็มวัย(Adult) สามารถยืนยันการทดสอบของ indirect western immunoblot พบว่าระยะ metacercaria ไม่มีการแสดงออกของ GPx เนื่องจากในระยะนี้มี cyst wall หุ้มถึงสองชั้นและยังไม่ได้สัมผัสกับ free radicals แต่ในระยะ 3 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ และพยาธิตัวเต็มวัย(Adult) ย้อมติดสีบริเวณผิว (tegument) ของพยาธิ *F.gigantica* อย่างชัดเจน จึงยืนยันได้ว่าผิวของพยาธิ *F.gigantica* มีการผลิตโปรตีน GPx ออกมาจริง เพราะเมื่อพยาธิ *F.gigantica* บุกรุกเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์ จะต้องการป้องกันตนเองจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และลดความเป็นพิษของ free radicals (neutralizaion) โดยหลั่งสารออกมาหลายชนิดเช่น hydrogen peroxidase , peroxidized lipid รวมถึง Glutathione peroxidase ด้วย (Mei et al.,1996) งานวิจัยก่อนหน้ากล่าวไว้ว่าแอนติเจนตัวเด่นๆที่พยาธิ *F.gigantica* ปล่อยออกมา ได้แก่ glutathione-s-transferase, cysteine, paramyosin และ membrane protein (ศรีรัฐ ภัคศิรินชิต,2553) GPx เป็นเอนไซม์มีคุณสมบัติเป็น Antioxidant เป็นตัวสำคัญต่อร่างกายในการต้านสารอนุมูลอิสระ และช่วยในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H₂O₂) ให้กลายเป็นน้ำ (H₂O) และออกซิเจน (O₂) รวมถึงกำจัด Organic Hydroperoxide ซึ่งบริเวณที่พบการหลั่งมากคือ บริเวณผิวหนังของพยาธิ *F.gigantica* เนื่องจากบริเวณนั้นถือได้ว่าเป็นบริเวณที่สัมผัสกับ free radicals ในโฮสต์ได้โดยตรง ดังนั้นจึงสามารถนำ MoAb (7B8) ที่ผลิตได้นำมาใช้ในการ immunodiagnosis ในมนุษย์และสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ติดเชื้อจากพยาธิ *F.gigantica* ที่ก่อให้เกิดโรค Fasciolosis เพราะวิธีนี้ถือได้ว่าเป็นความแม่นยำ (sensitivity) สูงและมีความจำเพาะ (specificity) สูงเช่นกัน นำมาพัฒนาต่อไปเป็นชุดตรวจ วัคซีน และช่วยนำรายได้เข้าประเทศอย่างสูงอีกด้วย

จากการศึกษาพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MoAb against rFgGPx-7B8) สามารถทำปฏิกิริยากับ native FgGPx กับพยาธิ *F. gigantea* ทุกระยะตั้งแต่ metacercariae, NEJ, 4-week old juvenile และ adult โดยการวิเคราะห์จากวิธี western blot และ indirect ELISA รวมถึงได้มีการพบการแสดงออกของโปรตีน FgGPx ในเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantea* ระดับสูงที่ tegument, vitelline และ egg ของพยาธิตัวเต็มวัย ด้วยวิธี immunohistochemistry นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ FgGPx ในเลือดของหนูที่ติดเชื้อ *F. gigantea* ตั้งแต่ 1 สัปดาห์หลังติดเชื้อ จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำ MoAb และ FgGPx มาพัฒนาเป็นชุดตรวจต่อไป

สรุปและเสนอแนะ

จากวิธีการทดสอบและผลการทดลองในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgGPx รวมถึงการศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MoAb against rFgGPx-7B8) สามารถทำปฏิกิริยากับ native FgGPx กับพยาธิ *F. gigantica* ทุกระยะตั้งแต่ metacercariae, NEJ, 4-week old juvenile และ adult โดยการวิเคราะห์จากวิธี western blot และ indirect ELISA รวมถึงได้มีการพบการแสดงออกของโปรตีน FgGPx ในเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantica* ระดับสูงที่ tegument, vitelline และ egg ของพยาธิตัวเต็มวัย ด้วยวิธี immunohistochemistry นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ FgGPx ในเลือดของหนูที่ติดเชื้อ *F. gigantica* ตั้งแต่ 1 สัปดาห์หลังติดเชื้อ จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำ MoAb และ FgGPx มาพัฒนาเป็นชุดตรวจต่อไป นอกจากนี้สามารถนำ MoAb โดยเทคนิค hybridoma และศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgGPx ซึ่งการต่อยอดจากการศึกษานี้คือสามารถนำ hybridoma clones ที่ได้ไปสร้างเป็นรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี และสามารถนำไปพัฒนาและใช้ประโยชน์โดยสร้างเป็น rapid diagnosis kit สำหรับตรวจโรค fasciolosis ต่อไป

(5) ผลผลิต (Output)

(5.1) ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในและระดับชาติ และนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

1. Kueakhai P, Chaithirayanon K, Chaiwichien A, Samrit T, Osotprasit S, Suksomboon P, Jaikua W, Sobhon P & Changklungmoa N. Monoclonal antibody against *Fasciola gigantica* glutathione peroxidase and their immunodiagnosis potential for fasciolosis. Vet Parasitol 2019; 276:108979;1-7. (ภาคผนวก)

(5.2) การจดสิทธิบัตร

ไม่มี

(5.3) ผลงานเชิงพาณิชย์ (มรกรรนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

ไม่มี

(5.4) ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ไม่มี

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 3860100299xxx สัญญาเลขที่ 18/2562

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนของ *Fasciola gigantica* ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพื่อพัฒนาชุดตรวจ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2562

ระยะเวลาดำเนินการ.....1.....ปี.....6.....เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	404,150	บาท	เมื่อวันที่ 28 เดือน ตุลาคม	ปี 2561
งวดที่ 2 (40%)	323,320	บาท	เมื่อวันที่ 22 เดือน สิงหาคม	ปี 2562
งวดที่ 3 (10%)		บาท	เมื่อวันที่ - เดือน -	ปี -
รวม	727,470			

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	24,000	24,000	-
2. ค่าจ้าง	120,000	120,000	-
3. ค่าวัสดุ	456,470	456,470	-
4. ค่าใช้สอย	127,000	127,000	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (ค่าสาธารณูปโภค)	80,830	80,830	-
รวม	808,300	808,300	-

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม (Bibliography)

- Aban JL, Ramajo V, Arellano JL, Oleaga A, Hillyer GV, Muro A, 1999. A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice from challenge infection with *Schistosoma bovis*. *Vet Parasitol.* 83: 107-121.
- Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C, Tort JF. 2008. *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 158, 52-64.
- Alarcon JB, Waine GW, McManus DP, 1999. DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. *Adv Parasitol.* 42: 343-410.
- Bruhn H, 2005. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem J.* 389: 249-257.
- Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP, 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated coxinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol.* 62: 9-17.
- Changklungmoa N, Kueakhai K, Riengrojpitak S, Chaithirayanon K, Chaichanasak P, Preyavichyapugdee N, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P. 2013. Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against *Fasciola gigantica* in mice. *Parasitol Res.* 112, 3653–3659.
- Changklungmoa N, Poinok N, Yenchan C, Sobhon P, Kueakhai P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. *Vet Parasitol* 2016; 226: 124-131.
- Chantree P, Phatsara M, Meemon K, Chaichanasak P, Changklungmoa N, Kueakhai P, Lorsuwannarat N, Sangpairoj K, Songkoomkrong S, Wanichanon C, Itagaki T, Sobhon P. 2013 Vaccine potential of recombinant cathepsin B against *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology* 135:102-109.
- Creaney J, Wilson L, Dosen M, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC, 1996. *Fasciola hepatica*: irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol.* 83: 202-215.
- Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ, 1996. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun.* 64: 5066-5074.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA, 1997. DNA vaccines. *Annue Rev Immunol.* 15: 617-648.

- EL-Ahwany E, Rabia I, Nagy F, Zoheiry M, Diab T, Zada S, 2012. Protective Role of Purified Cysteine Proteinases against *Fasciola gigantica* Infection in Experimental Animals. *Korean J Parasitol.* 50: 45-51.
- Espino AM, Hillyer GV, 2003. Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J Parasitol.* 89: 545-552.
- Espino AM, Morales A, Delgado B, Rivera FM, Figueroa O, Suárez E. 2010. Partial immunity to *Fasciola hepatica* in mice after vaccination with FhSAP2 delivered as recombinant protein or DNA construct. *Ethnicity and Disease* 20, S1-17-23.
- Estuningsih SE, Smooker PM, Wiedosari E, Widjajanti S, Vaiano S, Partoutomo S, Spithill TW, 1997. Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. *Int J Parasitol.* 27: 1419-1428.
- Golden O, Flynn R.J, Reed C, Sekiya M, Donnelly S.M, Stack C., et al. 2010. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine.* 28, 5551-5557.
- Hall RF, Lang BZ, 1978. The development of an experimental vaccine against *Fasciola hepatica* in cattle. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.* 82: 56-60.
- Haroun ET, Hillyer GV, 1986. Resistance to fascioliasis—a review. *Vet Parasitol.* 20: 63-93.
- Hillier GV, Haroun ET, Hernandez A, de Galanes MS. 1987. Acquired resistance of *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *Am J Trop Med Hyg.* 37: 363-369.
- Jaikua W, Kueakhai P, Chaithirayanon K, Tanomrat R, Wongwairot S, Riengrojpitak S, Sobhon P, Changklungmoa N, 2016. Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. *Acta Trop.* 162:75-82.
- Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PM. 2010. Liver fluke vaccines: Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of recombinant stage-specific antigens. *Procedia in Vaccinology* 2: 82-85.
- Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PT. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol.* 160: 230-236.
- Kalinna BH, 1997. DNA vaccines for parasitic infections. *Immunol Cell Biol.* 75: 370-375.
- Kueakhai P, Changklungmoa N, Riengrojpitak S, Chaichanasak P, Meemon K, Chaithirayanon K, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P. 2013. Vaccine potential of recombinant saposin-like protein 2 against *Fasciolosis gigantica* in mice. *Vaccine*, Accepted.

- Law RH, Smooker PM, Irving JA, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy NJ, Whisstock JC, Pike RN, Spithill TW. 2003. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infect Immun.* 76: 6921-6932.
- Maggioli G, Acosta D, Silveira F, Rossi S, Giacaman S, Basika T, et al. 2012. The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, 29, 9057-9063.
- Meemon K, Grams R, Vichari-Grams S, Hofmann A, Korge G, Viyanant V, Upatham ES, Habe S, Sobhon P, 2004. Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Mol Biochem Parasitol.* 136: 1-10.
- Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wieker J, Friedel T, Spithill TW, 1996. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine.* 14: 1603-1612.
- Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP, 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine.* 16: 932-939.
- Muro A, Ramajo V, Lopez J, Simon F, Hillyer GV. 1997. *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol.* 69: 219-229.
- Nansen P, 1975. Resistance in cattle of *Fasciola hepatica* induced by gamma-ray attenuated larvae: results from a controlled field trial. *Res Vet Sci.* 19: 278-283.
- Ogra PL, Faden HS, Abraham R, Duffy LC, Sun M, Minor PD, 1991. Effect of prior immunity on the shedding of virulent revertant virus in feces after oral immunization with live attenuated poliovirus vaccines. *J Infect Dis.* 164: 191-194.
- Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C, 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun.* 67: 1954-1961.
- Raina OK, Nagar G, Varghese A, Prajitha G, Alex A, Maharana BR, et al. 2011. Lack of protective efficacy in buffaloes vaccinated with *Fasciola gigantica* leucine aminopeptidase and peroxiredoxin recombinant proteins. *Acta Tropica*, 118, 217-222.

- Reed MB, Spithill TW, Strugnell RA, Panaccio M, 1998. *Fasciola hepatica*: stage-specific expression of novel gene sequences as identified by differential display. *Exp Parasitol.* 89: 169-179.
- Reed MB, Strugnell RA, Panaccio M, Spithill TW, 2000. A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol.* 105: 297-303.
- Reszka N, Cornelissen JB, Harmsen MM, Bienkowska-Szewczyk K, de Bree J, Boersma WJ, Rijsewijk FA. 2005. *Fasciola hepatica* procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis. *Vaccine.* 23: 2987-2993.
- Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchell GF, et al., 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol.* 145: 3905-3910.
- Sexton JL, Wilee MC, Colin T. Wijffels GL, Salvatore L, Feil S, Parker MW, Spithill TW, Morrison CA, 1994. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. *J Immunol.* 152: 1861-1872.
- Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP, 1993. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol.* 62: 1-8.
- Smooker PM, Steeper KR, Drew DR, Strugnell RA, Spithill TW, 1999. Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. *Parasite Immunol.* 21: 357-364.
- Srihakim S, Pholpark M, 1991. Problem of fascioliasis in animal husbandry in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 22: 352-355.
- Sukhapesna V, Sarataphan N, Tuntasuvan D, Sangiamkuksana S, 1990. A study on epidemiology of liver fluke infections in buffaloes. *Thai J Vet Med.* 20: 527-534.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA, 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356: 152-154.
- Tendler M, Vilar MM, Brito CA, Freire NM, Katz N, Simpson A, 1995. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine. *Mem Inst Oswaldo Crus.* 90: 255-256.

- Weeks-Levy C, Tatem JM, DiMichele SJ, Waterfield W, Georgiu AF, Mento SJ, 1991. Identification and characterization of a new base substitution in the vaccine strain of Sabin 3 poliovirus. *Virology*. 185: 934-937.
- Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, Campbell N, Sexton J, Wicker J, Bowen F, et al., 1994. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Exp Parasitol*. 78: 132-148.
- Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW, 1998. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol*. 88: 85-94.
- Zhai Y, Saier MHJ, 2000. The amoebapore superfamily. *Biochem Biophys Acta*. 1469: 87-99.

ภาคผนวก

(Appendix)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ



Monoclonal antibody against *Fasciola gigantica* glutathione peroxidase and their immunodiagnosis potential for fasciolosis

Pornanan Kueakhai^{a,b}, Kulathida Chaithirayanon^c, Athit Chaiwichien^{a,b}, Tepparit Samrit^{a,b}, Supawadee Osotprasit^{a,b}, Phawiya Suksomboon^{a,b}, Wipaphorn Jaikua^{a,b}, Prasert Sobhon^c, Narin Changklungmoa^{a,b,*}

^a Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Long-Hard Bangsaen Road, Mueang District, Chonburi 20131, Thailand

^b Research unit of vaccine and diagnosis of parasitic diseases, Burapha University, Long-Hard Bangsaen Road, Mueang District, Chonburi 20131, Thailand

^c Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok 10400, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:

Fasciola gigantica
Liver fluke
Glutathione peroxidase
Monoclonal antibody
Diagnosis

ABSTRACT

Glutathione peroxidases (GPx), major antioxidant enzymes, secreted by *Fasciola* spp., are important for the parasite evasion and protection against the host's immune responses. In the present study, a monoclonal antibody (MoAb) against recombinant *F. gigantica* glutathione peroxidase (rFgGPx) was produced by hybridoma technique using spleen cells from BALB/c mice immunized with rFgGPx. This MoAb (named 7B8) is IgG1 with κ light chains, and it reacted specifically with rFgGPx at a molecular weight 19 kDa as shown by immunoblotting, and reacted with the native FgGPx in the extracts of whole body (WB), metacercariae, newly excysted juveniles (NEJs), 4 week-old juveniles and adult *F. gigantica* as shown by indirect ELISA. It did not cross react with antigens in WB fractions from other adult trematodes, including *Fischoederius cobboldi*, *Paramphistomum cervi*, *Setaria labiato-papillosa*, *Eurytrema pancreaticum*, *Gastrothylax crumenifer* and *Gigantocotyle explanatum*. By immunolocalization, MoAb against rFgGPx reacted with the native protein in the tegument, vitelline cells, and eggs of adult *F. gigantica*. In addition, the sera from mice experimentally infected with *F. gigantica* were tested positive by this indirect sandwich ELISA. This result indicated that FgGPx is an abundantly expressed parasite protein that is secreted into the tegumental antigens (TA), therefore, FgGPx and its MoAb may be used for immunodiagnosis of both early and late fasciolosis *gigantica* in animals and humans.

1. Introduction

Fasciolosis is a zoonotic disease that is caused by infection with *Fasciola hepatica* or *F. gigantica*. It is a serious health problem for both domesticated animals and humans in the tropical and subtropical regions of Africa, Middle East, and Asia. During penetration and migration, the juvenile parasites come into contact with and are damaged by reactive oxygen species (ROS) released by the host's immune cells, such as macrophages and other inflammatory cells. Therefore, the parasites must defend themselves by posing anti-oxidation mechanism which, in *F. gigantica*, consists of a family of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD, Jaikua et al., 2016), peroxiredoxin (Prx, Chaithirayanon and Sobhon, 2010; Sangpatroj et al., 2014), thioredoxin (Trx, Gupta et al., 2015; Changklungmoa et al., 2014), thioredoxin glutathione reductase (TGR, Kallita et al., 2018; Changklungmoa et al., 2015), glutathione S-transferase (GST, Preyavichyapugdee et al., 2008)

and GPx (Changklungmoa et al., 2018). These enzymes co-ordinate in neutralizing oxidative stress. GPx comprises both intracellular and extracellular isoforms (Ottaviano et al., 2009), and the latter is released from the young as well as adult parasites to protect their exteriors from the host's damaging immune reactions (Changklungmoa et al., 2018). Therefore, GPx is one of key targets for immunodiagnosis and vaccination.

Nowadays, the diagnosis of fasciolosis is based on identification of eggs in fecal samples by stool examination. The technique is cumbersome and needs expert for definite examination. On the other hand, the eggs appear in feces only when mature parasites start laying eggs, and pass them into bile ducts and feces, therefore early infection (less than 10 weeks) cannot be diagnosed. Circulating antigen detection is more specific in reflecting the current infection than circulating antibody detection (Cordova et al., 1999). FgGPx is abundantly expressed in both early and late stages and could be detected in tegument antigens (TA)

* Corresponding author at: Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Long-Hard Bangsaen Road, Saen Sook Sub-district, Mueang District, Chonburi 20131, Thailand.

E-mail address: narinchang@go.buu.ac.th (N. Changklungmoa).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108979>

Received 18 August 2019; Received in revised form 5 November 2019; Accepted 11 November 2019
0304-4017/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

and host's circulation by using polyclonal antibodies (PoAb) (Changklungmoa et al., 2018); therefore, FgGPx should be among the most easily and specifically detected antigens in the host's blood by its corresponding monoclonal antibody (MoAb). In this report, we had successfully produced and characterized a MoAb specifically for circulating FgGPx that may have diagnostic potential for fasciolosis by *F. gigantica*.

2. Methodology

2.1. Preparations of parasites and parasite antigens

The *F. gigantica* metacercariae were collected from *Lymnea* spp. snails infected with miracidia. About 4 weeks after infection period, cercariae were shed from the snails and transformed into metacercariae after settled on the plastic papers. The metacercariae were collected from the plastic papers and washed several times with distilled H₂O. The NEJs were produced by activating the excystment of metacercariae by incubated in a solution containing 0.2 % taurocholic acid, 0.02 % M sodium dithionite, 1 % NaHCO₃, 0.85 % NaCl and 0.5 % HCl at 37 °C for 30 min as previously published (Kueakhat et al., 2011, 2013). The 4 week-old juvenile parasites were obtained from the livers of hamsters infected with metacercariae via stomach tube at the 4th weeks post infection. Adult *F. gigantica*, *Ftschoedertus cobboldi*, *Paramphistomum cervi*, *Setaria labiata-papillosa*, *Eurytrema pancreaticum*, *Gastrothylax crumentifer* and *Gigantocotyle explanatum* were collected from infected cattle killed at a local abattoir Phetchaburi Province, Thailand. All parasites were subsequently washed with phosphate buffer saline (PBS) and used immediately for subsequent experiments.

Whole body (WB) extracts of various stages of *F. gigantica* (metacercariae, NEJ, 4 week-old juveniles, and adult), and other adult trematodes (*F. cobboldi*, *P. cervi*, *S. labiata-papillosa*, *E. pancreaticum*, *G. crumentifer* and *G. explanatum*) were prepared as previously published (Changklungmoa et al., 2018; Kueakhat et al., 2011). Adult *F. gigantica* tegumental antigens (TA) and excretory-secretory (ES) were prepared as described earlier (Changklungmoa et al., 2018).

2.2. Expression and purification of recombinant proteins

Then FgGPx cDNA, cloned by Polymerase chain reaction (PCR) technique as described earlier (Changklungmoa et al., 2018), was inserted into bacterial expression vector (pET-30b) (Novagen). The pET-30b recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The expression of the rFgGPx protein coupled with His-tag at N-terminus was induced with Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 1.0 mM final concentration. The rFgGPx was purified by Ni-NTA affinity-chromatography under native conditions as described earlier (Changklungmoa et al., 2018). Each recombinant protein was eluted with 250.0 mM imidazole. The purity of the rFgGPx was analyzed by 12.5 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and kept at -20 °C for subsequent experiments.

2.3. Production and characterization of MoAbs against rFgGPx

The rFgGPx protein was used for immunization of eight week-old female BALB/c mice by subcutaneous injection. The mouse was primed by injection of 25 μg rFgGPx protein mixed with Freund's complete adjuvant (FCA; Sigma-Aldrich Inc.). The first, second and third boosts were given with 25 μg of the rFgGPx mixed with Freund's incomplete adjuvant (FIA; Sigma-Aldrich Inc.) at 2-week intervals by subcutaneous route. Blood samples from the immunized mice were collected, and the antibody titers (anti-rFgGPx) were estimated by indirect ELISA. B cells from immunized BALB/c mice were fused with myeloma cells (P3-X63-Ag8.653), using polyethylene glycol (PEG) (Sigma-Aldrich Inc.) (Kueakhat et al., 2013). The MoAbs against rFgGPx produced by the hybridoma clones were screened by indirect ELISA. The culture fluid of

positive hybridoma clones that produced high antibody titer of MoAbs against rFgGPx were collected, and the immunoglobulin isotypes were determined by indirect ELISA using the SBA Clonotyping™ System/HRP (Southern Biotech).

2.4. Production of rabbit polyclonal antibody (PoAb) against rFgGPx

A New Zealand White rabbit was injected with 250 μg of purified rFgGPx diluted in sterile PBS mix with FCA for first immunization. The second and third immunizations were injected with 125 μg of purified rFgGPx diluted in sterile PBS mix with FIA. Blood sample was collected at day 10 after the third immunizations, centrifuged, and the serum was collected and kept frozen at -20 °C for subsequent experiments.

2.5. Purification of MoAb against rFgGPx (clone 7B8) and rabbit PoAb against rFgGPx

The MoAb against rFgGPx and rabbit PoAb against rFgGPx were purified by using Aff-Prep protein A (Bio-Rad, USA) as previously published (Kueakhat et al., 2015). Elution of the IgG against rFgGPx bound to protein A was carried out using an elution buffer (Bio-Rad, USA), pH 3.0, and followed by neutralization of the eluent with 1 M Tris HCl, pH 9.0. The eluted fractions containing IgG against rFgGPx (MoAb and PoAb) were concentrated, and stored at 4 °C for subsequent experiments.

2.6. Characterization of MoAb against rFgGPx by immunoblotting analysis

The rFgGPx and WB, TA, ES of adult *F. gigantica* were separated in a 12.5 % SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad) for immunoblotting analysis by MoAb against rFgGPx (7B8). Nonspecific binding was blocked with 4 % (w/v) skim milk in PBS at room temperature (RT) for 1 h, and subsequently by incubation in the culture fluid of MoAb 7B8 at 4 °C overnight. The membranes were washed three times with PBS containing 0.1 % Tween-20 (PBST) and then incubated with goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (AP) (Southern Biotech) diluted at 1:2000 in PBS for 1 h. The membranes were washed three times and then the color was developed in the dark using the substrates nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP). Finally, the reactions were stopped by adding a stop buffer (10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA).

2.7. Characterization of MoAb against rFgGPx by indirect ELISA

The immunoglobulin isotypes of MoAb against rFgGPx were determined by using indirect ELISA. The plates were coated with 100 μl of rFgGPx (1 μg/ml) in coating buffer as previously published (Kueakhat et al., 2015) at 4 °C overnight. The coated plates were washed three times with 0.05 % PBST, and nonspecific binding was blocked by adding 200 μl of 1 % BSA in PBS per well, incubated at RT for 1 h with shaking. Then the coated plates were washed three times with 0.05 % PBST, and 100 μl of culture fluids from hybridoma clone 7B8 and myeloma cells (negative control) were added and incubated at 4 °C overnight. The plates were washed three times and incubated for 1 h, at RT in 100 μl of goat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM conjugated with HRP (Southern Biotech) diluted in PBS at 1:5000 for heavy chain, and κ, λ light chain identifications. The plates were washed three times, and 100 μl of the substrate 2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazolone-6-sulfonic acid]-diammonium salt (ABTS; Southern Biotech) were added per well and incubated for 15 min in dark at RT. The optical densities (OD) were measured at 405 nm in an automatic VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, CA, USA).

The reactivity of the MoAb against rFgGPx (7B8) and native proteins from WB of metacercariae, NEJs, 4-week-old juveniles, adult, and TA, ES of adult *F. gigantica* and WB of other adult trematodes

(including, *E. pancreaticum*, *S. labiato-papilloso*, *G. crumentifer*, *G. explanatum*, *F. cobboldi* and *C. cotylophorum*) were determined by indirect ELISA. The plates were coated with 100 μ l of 10 μ g/ml WB of metacercariae, NEJs, 4-week-old juveniles, adult ES and TA, and WB of other adult trematodes in coating buffer at 4 °C overnight. The coated plates were washed three times with 0.05 % PBST and the nonspecific binding was blocked by adding 200 μ l 1 % BSA in PBS per well at RT for 1 h with shaking. After that the coated plates were washed three times with 0.05 % PBST, and 100 μ l of culture fluid of hybridoma clone 7B8 were added and incubated at 4 °C overnight. The plates were washed three times with 0.05 % PBST and incubated in goat anti-mouse IgG conjugated with HRP (Southern Biotech) diluted in PBS at 1:5000 for 1 h, at RT. Then the plates were washed three times with 0.05 % PBST, and 100 μ l per well of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (KPL, Galthersburg, USA) was added and incubated 15 min in dark at RT. Finally, reactions were stopped by adding 100 μ l of 1 N HCl per well. The ODs were measured at 450 nm in an automatic VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, CA, USA).

2.8. Characterization of MoAb against rFgGPx by immunolocalization in adult *F. giganitica*

Adult *F. giganitica* were fixed in 4 % paraformaldehyde (w/v) in PBS, pH 7.4 at 4 °C for 3 h with shaking. Paraffin sections of adult *F. giganitica*, cut at 5 μ m-thick, were deparaffinized and rehydrated through a serial concentrations of ethyl alcohol. The adult *F. giganitica* sections were treated with citrate buffer (10 mM citric acid, pH 6.0), in a microwave oven at 700 W, three times for 5 min. Nonspecific binding was blocked by incubation in 4 % (w/v) BSA in PBS for 1 h. The adult *F. giganitica* sections were then incubated in the culture fluid of hybridoma clone 7B8, at 4 °C overnight. Sections were then washed three times with 0.1 % PBST and incubated in goat anti-mouse IgG conjugated with AP (Southern Biotech), diluted to 1:2000 in PBS at RT, for 1 h. After that, the sections were washed three times with 0.1 % PBST and incubated in AP buffer, pH 9.5 at RT, for 10 min. The signals development was carried out using NBT/BCIP substrates (Roche) in the dark. Finally, the reactions were stopped by adding stop buffer (10 mM Tris – HCl and 1 mM EDTA, pH 8.0). The sections were examined and photographed under a light microscope (Olympus, CX33).

2.9. Demonstration of circulating FgGPx in mouse sera

Infected mouse sera were collected at 1 and 4 weeks after being infected with *F. giganitica*. Uninfected healthy mice sera were used as a negative control. The circulating FgGPx in mouse sera were detected by using indirect sandwich ELISA. The purified MoAb against rFgGPx (7B8) was used as capturing antibody. The healthy mice, 1-week post infected-, and 4-week post infected mouse sera were added 50 μ l and incubated for overnight at 4 °C, and then 50 μ l of purified rabbit PoAb against rFgGPx conjugated with biotin were added as detecting antibody. The 50 μ l of streptavidin-conjugated HRP (Southern Biotech) was added, and then the plates were incubated with 50 μ l of TMB (KPL, Galthersburg, USA) for 15 min at RT. Finally, the enzymatic reactions were stopped by adding 50 μ l of 1 N HCl. The ODs were measured at 450 nm in an automatic VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, CA, USA).

2.10. Statistical analysis

Differences between the reactivities of the MoAb against rFgGPx (7B8) to the culture fluid of myeloma cells, and native FgGPx proteins from WB of metacercariae, NEJ, 4-week-old juveniles, adult, and ES, TA of adult *F. giganitica* and other adult trematodes were tested using the Independent Samples t-test. A p-value lower than 0.05 was considered statistically significant.

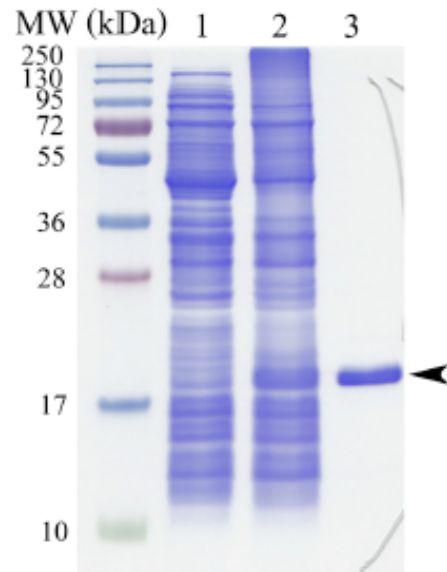


Fig. 1. The Ni-NTA affinity-purified rFgGPx were analysed by SDS-PAGE, and stained with Coomassie Blue. Lane 1, the whole bacterial lysate from the non-induced condition; lane 2, the whole lysate after induction by IPTG; lane 3, the purified recombinant rFgGPx. MW markers are shown on the left side. Single arrow head indicates the MW of rFgGPx.

2.11. Ethics statement

Mice and rabbit were kept in steel cages in an air-conditioned room with a light–dark cycle of 12:12 h, at 22–25 °C, and 50–60 % humidity, and animal protocols were approved by The Animal Care and Use Committee (MUSC-ACUC), Faculty of Science, Mahidol University, Thailand.

3. Results

3.1. Expression of rFgGPx

The rFgGPx protein coupled with His-tag at N-terminus was expressed and purified by Ni-NTA chromatography. The purified rFgGPx was analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. The rFgGPx protein was resolved as single band at approximately 19 kDa on SDS-PAGE (Fig. 1).

3.2. MoAb against rFgGPx

The rFgGPx was used to detect specific MoAb against rFgGPx by indirect ELISA and immunoblotting analysis. It was found that the culture fluid from hybridoma clone 7B8 specifically binds to rFgGPx and native FgGPx from adult WB and TA (Fig. 2). The immunoglobulin isotype of MoAb against rFgGPx in the culture fluid of hybridoma clone 7B8 is IgG1 with κ -light chain.

3.3. Purification of MoAb and PoAb against rFgGPx

SDS-PAGE analysis (Fig. 3) of the purified rFgGPx-immunized rabbit serum IgG and purified MoAb against rFgGPx showed immunoglobulin heavy and light chain bands at MW 50 and 25 kDa, respectively for the MoAb and PoAb anti-rFgGPx. This analysis indicated that IgG was pure.

3.4. Estimation of native FgGPx in *F. giganitica* and other adult trematodes

Relative levels of the immunoreactivities of the MoAb against

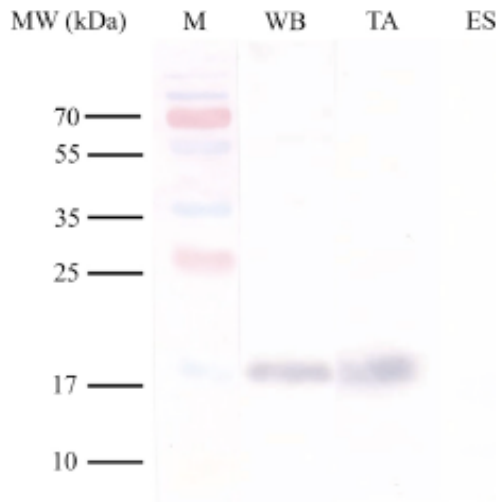


Fig. 2. Immunoblots of WB, TA and ES of adult *F. gigantica* with 7B8 MoAb against rFgGPx shows positive bands at 19 kDa. Lane 1 (WB): WB of adult *F. gigantica*. Lane 2 (TA): TA of adult *F. gigantica*. Lane 3 (ES): ES of adult *F. gigantica*. MW markers are shown on the left side.

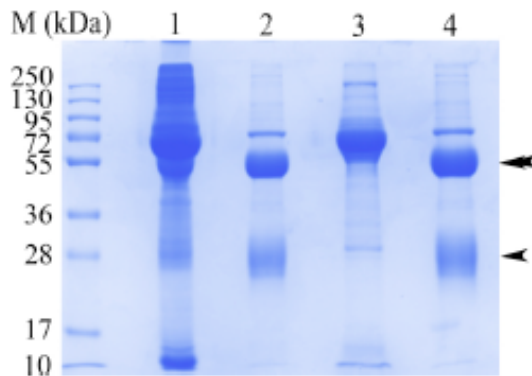


Fig. 3. The purity of MoAb IgG1 and PoAb IgG after purification by Affi-Gel[®] protein A MAPS[®] II Kit was determined by 12.5% SDS-PAGE. Lane 1: Rabbit antiserum (containing all serum proteins including PoAb against rFgGPx). Lane 2: Purified IgG of PoAb against rFgGPx. Lane 3: Culture fluid of MoAb (7B8). Lane 4: Purified MoAb against rFgGPx. Single and double arrow heads indicate molecular weight of light chain and heavy chain, respectively. The MW markers are on the left side.

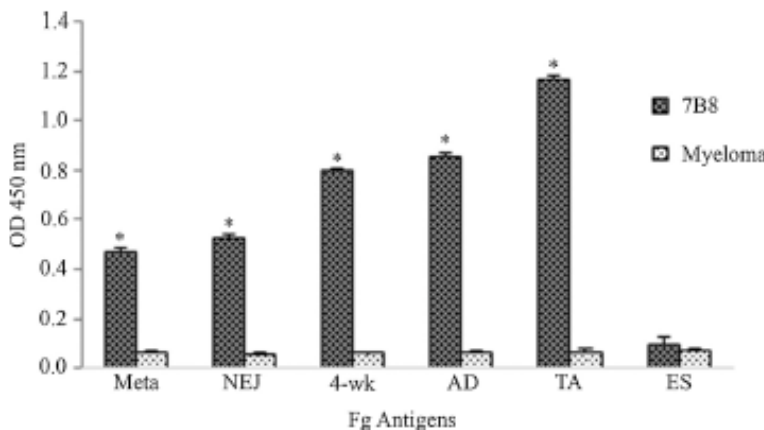


Fig. 4. Semi-quantitation of the levels of expression of native FgGPx in WB of metacercariae, NEJ, 4 week-old juveniles, adult, and ES, TA of adult *F. gigantica* by estimating the reactivities with MoAb 7B8 (black bar) using indirect ELISA. Significant increases of ODs were shown in WB from all developmental stages, and TA of adult *F. gigantica* when compared with culture fluid of control myeloma cells (white bar), denoted by * ($p < 0.05$). No significantly increase was shown in ES.

rFgGPx (7B8) with WB of metacercariae, NEJ, 4-week old juveniles and adult, TA, and ES of adult *F. gigantica* and WB of other adult trematodes, were estimated by indirect ELISA. The results showed that the levels of immunoreactivities of native FgGPx in WB of all stages and TA of adult with the MoAb against rFgGPx (represented by OD values) were significantly higher when compared with culture fluid of control myeloma cells (Fig. 4), while there was no significant difference between the OD levels of ES of adult *F. gigantica* and WB of other adult trematodes, when compared with the control (Fig. 4, Fig. 5).

3.5. Immunolocalization of FgGPx

Immunolocalization of FgGPx in adult *F. gigantica* sections was performed with MoAb against rFgGPx 7B8. The culture fluid of myeloma cells was used as a negative control. Strong positive signal was detected in the tegument, egg, and vitelline cells of adult *F. gigantica* but not in caecal epithelial cells (Fig. 6).

3.6. Detection of circulating FgGPx in sera of infected mice

The mouse sera at 1 and 4 weeks post infection with *F. gigantica* were analyzed by indirect sandwich ELISA. The circulating FgGPx was detected in sera of infected mice with high levels at both 1 and 4 weeks post infection when compared with uninfected mouse sera (Fig. 7).

4. Discussion

The gold standard diagnosis of fasciolosis is usually performed by detecting parasite eggs in a fecal sample. This technique can detect only late infection as the eggs can only be found in the fecal sample after the mature parasites move into bile ducts and start laying eggs (Mas-Coma et al., 2005). Immunodetection, based on indirect ELISA to detect antibodies in the sera of infected animals and humans by using either crude extracts of parasites, purified proteins from their ES products and also recombinant proteins (Chaouadi et al., 2019; Aguayo et al., 2018; Mirzadeh et al., 2018; Figueroa-Santiago et al., 2011; O'Neill et al., 1998). However, this method could detect only circulating antibody that may not describe the current infection and parasite load. A better method is an immunoassay that is capable of detecting circulating antigens by either PoAb or MoAb, with the latter proven to be more specific (Cordova et al., 1999). Several MoAbs against specific *F. gigantica* antigens have been used in immunodiagnosis for fasciolosis, including recombinant cathepsin L1H (Wongwairat et al., 2015), recombinant cathepsin B3 (Anuracpreeda et al., 2011), 66 kDa tegumental antigens (TA) (Krallias et al., 1999), 28.5 kDa TA antigen (Chaitrayanon et al., 2002), recombinant *F. gigantica* saposin-like protein-2 (Kueakhat et al., 2013), *F. hepatica* ES antigens (Abdolahi

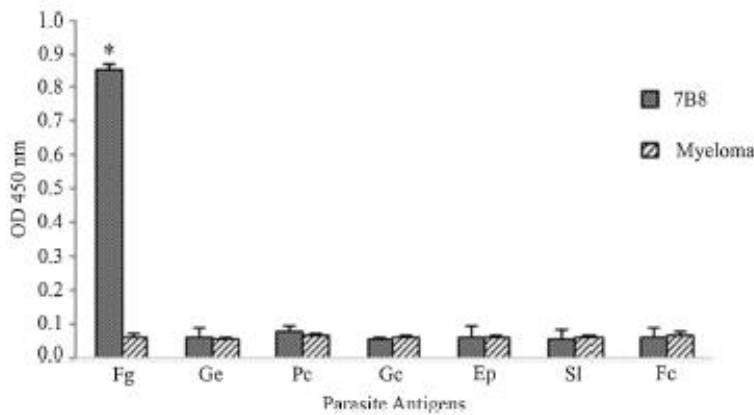


Fig. 5. Semi-quantitation of the levels of expression of native FgGPx in WB extracts of *F. gigantica* (Fg), *C. cotylophorum* (Cc), *S. labiato-papilloso* (Sl), *G. explanatum* (Ge), *G. crumenifer* (Gc), *E. pancreaticum* (Ep), and *F. cobboldi* (Fc) by estimating the reactivities with MoAb 7B8 (black bar) using indirect ELISA. Significant increases of ODs were shown in WB of adult *F. gigantica* when compared with culture fluid of control myeloma cells (white bar), denoted by * ($p < 0.05$). No significantly increase was shown in WB of other trematodes.

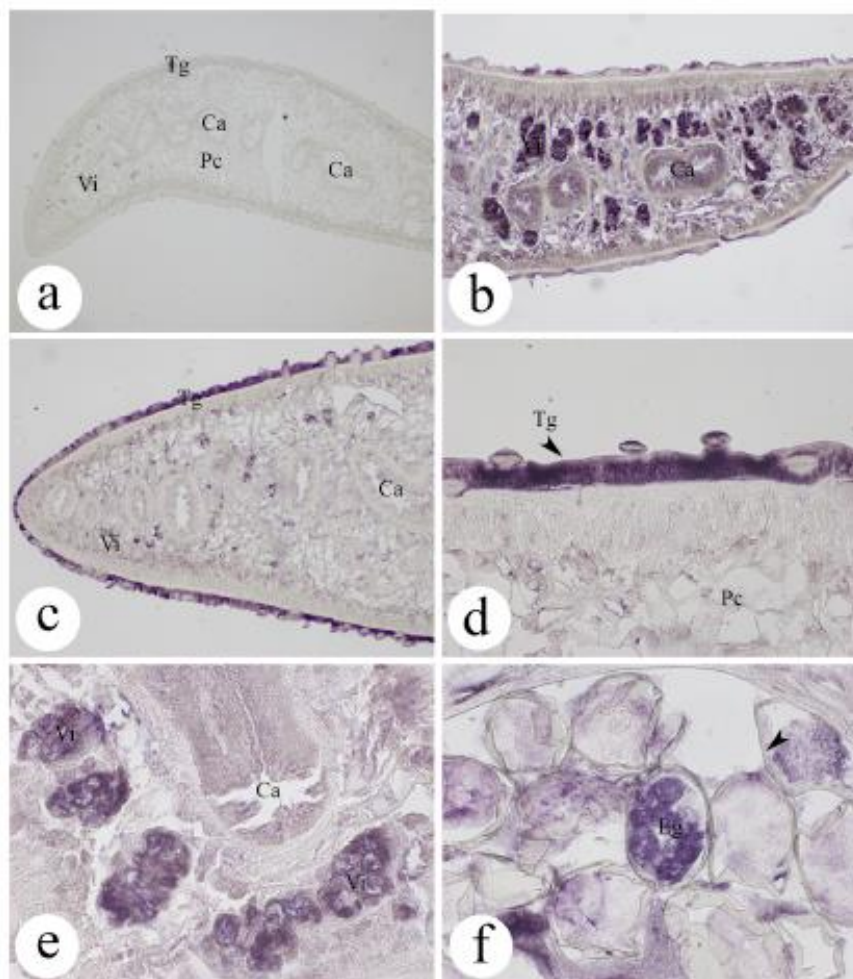


Fig. 6. Localization of native FgGPx in the tissues of adult *F. gigantica* by immunohistochemical detection using MoAb 7B8. (A) A section was probed with culture fluid of myeloma cell shows no staining. (B, C) Sections probed with culture fluid of 7B8 show strong positive signal in tegument (Tg) and cells of vitelline granules (Vi). (D) A section probed with culture fluid of 7B8 shows strong positive signal in the tegument (Tg). No signal was observed in the parenchymal cells (Pc). (E) A section shows strong positive signal only in the vitelline granules (Vi). (F) An adult *F. gigantica* section showing strong positive signal only in the egg (Eg).

Khabisi et al., 2017) and 27–26 kDa ES antigens (Maleewong et al., 1999). Likewise, these MoAb could detect both early and late infection depending on the time in the life cycle that the corresponding proteins

are expressed and released into the blood circulation.

In this study, we have produced and characterized the MoAb specifically against rFgGPx by using hybridoma technique. By

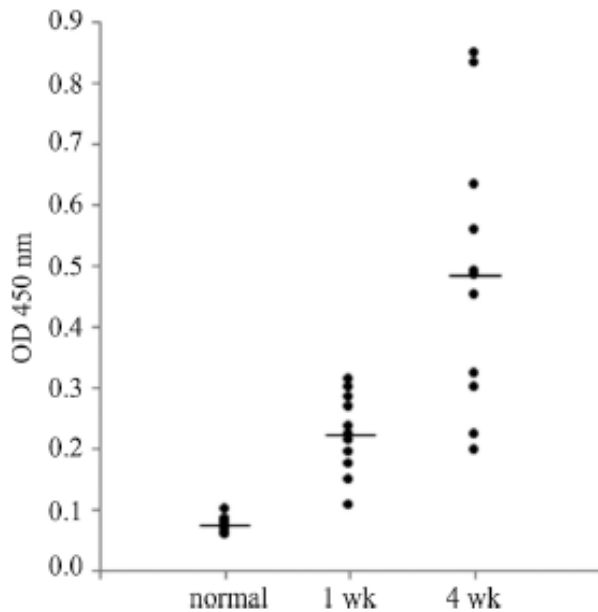


Fig. 7. A scattergram showing relative levels (represented by OD values) of circulating FgGPx in sera of mice infected with *F. gigantica* at 1 and 4 weeks post infection.

Immunoblotting analysis, this MoAb was IgG1 with κ light chain which could react with rFgGPx and the native FgGPx with approximate MW of 19 kDa. When the levels of native FgGPx was estimated by indirect ELISA using the MoAb against rFgGPx (7B8), it was showed that the expression levels of FgGPx were high in WB of all developmental stages of *F. gigantica*, including metacercariae, NEJs, 4 week-old juveniles, adult and adult TA. Therefore, the reactive antigens were produced and predominantly released at high amount in all developmental stages and adult parasite TA (Changklungmoa et al., 2018, 2015, 2014; Jalkua et al., 2016). A similar finding was reported by our group using a polyclonal anti-rFgGPx (Changklungmoa et al., 2018). Furthermore, we have used immunoblotting analysis to show that FgGPx was expressed in all developmental stages and also expressed in TA of adult *F. gigantica* (Changklungmoa et al., 2018). The FgGPx expression in all developmental stages of *F. gigantica* is similar to that of *S. japonicum* (Changklungmoa et al., 2012; Zhang et al., 2015). For the indirect sandwich ELISA, rabbit anti-rFgGPx IgG and MoAb against rFgGPx had been produced and purified by protein-A-affinity as determining by SDS-PAGE analysis which showed heavy and light chains of IgG class at MW 50 and 25 kDa, respectively (Fig. 3). In this present study, protein A from *Staphylococcus aureus* was used as the precoat that could enhance the binding of IgG to the plate as previously described (Kueakhat et al., 2015), and hence also the binding of FgGPx antigen. Furthermore, the applications of MoAb and rabbit PoAb against rFgGPx both as antigen-capturing and antigen-detecting antibodies for detecting circulating FgGPx antigen in infected sera were 100 % positive at both 1 week and 4 week-post infection. Furthermore, while this MoAb (7B8) is specific for FgGPx there was no cross-reactivity with antigens from other trematodes, including *S. labiato-papillosa*, *G. explanatum*, *C. cotylophorum*, *F. cobboldi*, *G. crumentifer*, and *E. pancreaticum*. Thus, we expect that this MoAb can be used for as an immunodiagnosis of both early and late infections in human and ruminant fasciolosis. This assay will be developed in future study.

In conclusion, the MoAb against rFgGPx could react with FgGPx which were expressed at high levels in tegument of all developmental stages of *F. gigantica*, and in the TA, vitelline and egg of adult parasite as well as circulating FgGPx. This MoAb specifically reacted with only FgGPx, but not with antigens from other trematodes (*E. pancreaticum*, *S.*

labiato-papillosa, *C. cotylophorum*, *G. crumentifer*, *F. cobboldi*, *G. explanatum*). This result strongly suggests that the MoAb against rFgGPx can be used for immunodiagnosis of both early and late fasciolosis in ruminants and humans, which is presently being validated.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This research was financially supported by a grant from Burapha University as approved by the National Research Council of Thailand to Assistant Professor Dr. Nartn Changklungmoa (Grant no. 18/2562), a grant from Mahidol University as approved by the National Research Council of Thailand to Associate Professor Dr. Kulathida Chalithrayanon, the Thailand Research Fund for New Scholar to Assistant Professor Dr. Nartn Changklungmoa (Grant no. MRG5980048), and a Senior Research Scholar grant from Thailand Research Fund to Professor Dr. Prasert Sobhon.

References

- Abdolaht Khabest, S., Sarkari, B., Moshfe, A., Jalali, S., 2017. Production of monoclonal antibody against excretory-secretory antigen of *Fasciola hepatica* and evaluation of its efficacy in the diagnosis of fasciolosis. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 36 (1), 8–14.
- Aguayo, V., Valdes, B., Espino, A.M., 2018. Assessment of *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase as an antigen for serodiagnosis of human chronic fasciolosis. *Acta Trop.* 186, 41–49.
- Amurapreesda, P., Songkoomkrong, S., Sethadavit, M., Chotwattthanakun, C., Tinkul, Y., Sobhon, P., 2011. *Fasciola gigantica*: production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant cathepsin B3. *Exp. Parasitol.* 127, 340–345.
- Chalithrayanon, K., Wanichanon, C., Vichasri, G.S., Ardeungneon, P., Grams, R., Vivanant, V., Upatham, E.S., Sobhon, P., 2002. Production and characterization of a monoclonal antibody against 28.5 kDa tegument antigen of *Fasciola gigantica*. *Acta Trop.* 84, 1–8.
- Chalithrayanon, K., Sobhon, P., 2010. Molecular cloning and characterization of two genes encoding 2-Cys peroxiredoxins from *Fasciola gigantica*. *Exp. Parasitol.* 125 (2), 106–113.
- Changklungmoa, N., Chalithrayanon, K., Kueakhat, P., Meemon, K., Sobhon, P., Reingrojpitak, S., 2012. Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase from *Fasciola gigantica*. *Exp. Parasitol.* 131, 283–291.
- Changklungmoa, N., Kueakhat, P., Apisawatetanan, S., Reingrojpitak, S., Sobhon, P., Chalithrayanon, K., 2014. Identification and expression of *Fasciola gigantica* thioredoxin. *Parasitol. Res.* 113, 2335–2343.
- Changklungmoa, N., Kueakhat, P., Sangpatroj, K., Chaitanasak, P., Jalkua, W., Reingrojpitak, S., Sobhon, P., Chalithrayanon, K., 2015. Molecular cloning and characterization of *Fasciola gigantica* thioredoxin-glutathione reductase. *Parasitol. Res.* 114, 2119–2127.
- Changklungmoa, N., Chalithrayanon, K., Cheukamud, W., Chaitwien, A., Osotpratt, S., Samrit, T., Sobhon, P., Kueakhat, P., 2018. Expression and characterization of glutathione peroxidase of the liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Parasitol. Res.* 117, 3487–3495.
- Chaouadi, M., Harhoura, K., Akss, M., Zait, H., Zenia, S., Tazerouti, F., 2019. A post-mortem study of bovine fasciolosis in the Mitidja (north center of Algeria): prevalence, risk factors, and comparison of diagnostic methods. *Trop. Anm. Health. Prod. Inpress*. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01951-w>.
- Cordova, M., Restigui, L., Espinoza, J.R., 1999. Immunodiagnosis of human fasciolosis with *Fasciola gigantica* cysteine proteinases. *Trens. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 54–57.
- Figueroa-Santiago, O., Delgado, B., Espino, A.M., 2011. *Fasciola hepatica* saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fasciolosis. *Diagnos. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 355–361.
- Gupta, A., Pandey, T., Kumar, B., Tripathi, T., 2015. Preferential regeneration of thioredoxin from parasitic flatworm *Fasciola gigantica* using glutathione system. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 983–990.
- Jalkua, W., Kueakhat, P., Chalithrayanon, K., Tanomrat, R., Wongwattrot, S., Reingrojpitak, S., Sobhon, P., Changklungmoa, N., 2016. Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. *Acta Trop.* 162, 75–82.
- Kallita, P., Shukla, H., Shukla, R., Tripathi, T., 2018. Biochemical and thermodynamic comparison of the selenocysteine containing and non-containing thioredoxin-glutathione reductase of *Fasciola gigantica*. *BAA. General. Subjects.* 1862, 1306–1316.
- Krullas, D., Vivanant, V., Ardeungneon, P., Sobhon, P., Upatham, E.S., Keawjam, R., 1999. Identification of circulating antibodies in fasciolosis and localization of 66 kDa antigenic target using monoclonal antibodies. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 17, 53–58.
- Kueakhat, P., Meemon, K., Changklungmoa, N., Chalithrayanon, K., Reingrojpitak, S., Sobhon, P., 2011. Characterization and localization of saposin-like protein-2 (SAP-2) in *Fasciola gigantica*. *Parasitol. Res.* 108, 1493–1500.

- Kueakhaï, P., Changklungmoa, N., Chaitrayanon, K., Songkoomkrong, S., Rengrojptak, S., Sobhon, P., 2013. Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant sapsin-like protein 2 of *Fasciola gigantica*. *Acta Trop.* 125, 157–162.
- Kueakhaï, P., Changklungmoa, N., Chaitrayanon, K., Phatsara, M., Freyavichyapugdee, N., Rengrojptak, S., Sangpatroj, K., Chusongsang, P., Sobhon, P., 2015. Sapsin-like protein 2 has an immunodiagnostic potential for detecting fasciolosis *gigantica*. *Exp. Parasitol.* 151–152, 8–13.
- Maleewong, W., Wongkham, C., Intapan, P.M., Pipitgool, V., 1999. *Fasciola gigantica*-specific antigens: purification by a continuous-elution method and its evaluation for the diagnosis of human fascioliasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 648–651.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A., 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35, 1255–1278.
- Mirzadeh, A., Yoosefy, A., Kazemirad, E., Barati, Z., Golkar, M., Babate, J., Jafarhaghghi, F., Valadkhan, Z., 2018. Evaluation of a set of refolded recombinant antigens for serodiagnosis of human fascioliasis. *PLoS One* 13 (10), e0203490.
- O'Neill, S.M., Parkinson, M., Strauss, W., Angles, R., Dalton, J.P., 1998. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fasciolosis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 417–423.
- Ottaviano, F.G., Tang, S.S., Handy, D.E., Loscalzo, J., 2009. Regulation of the extracellular antioxidant selenoprotein plasma glutathione peroxidase (GPx-3) in mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem.* 327 (1–2), 111–126.
- Freyavichyapugdee, N., Sahaphong, S., Rengrojptak, S., Grams, R., Viyanant, V., Sobhon, P., 2008. *Fasciola gigantica* and *Schistosoma mansoni*: vaccine potential of recombinant glutathione S-transferase (rFgGST26) against infections in mice. *Exp. Parasitol.* 119, 229–237.
- Sangpatroj, K., Changklungmoa, N., Vanichviriyakit, R., Sobhon, P., Chaitrayanon, K., 2014. Analysis of the expression and antioxidant activity of 2-Cys peroxiredoxin protein in *Fasciola gigantica*. *Exp. Parasitol.* 140, 24–32.
- Wongwairo, S., Kueakhaï, P., Changklungmoa, N., Jaikua, W., Sansri, V., Meemon, K., Songkoomkrong, S., Rengrojptak, S., Sobhon, P., 2015. Monoclonal antibody against recombinant *Fasciola gigantica* cathepsin L1H could detect juvenile and adult cathepsin Ls of *Fasciola gigantica*. *Parasitol. Res.* 114 (1), 133–140.
- Zhang, Y., He, Y., He, L., Zong, H.Y., Cai, G.B., 2015. Molecular cloning and characterization of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from a blood fluke *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 203 (1–2), 5–13.