

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา

ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนวิจัยประเภทเงินรายได้ประจำปี 2547 จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เรื่อง การศึกษาคุณลักษณะ ตำแหน่งและการกระจายของ leucine aminopeptidase ใน  
พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*

Characterization and localization of leucine aminopeptidase in *Fasciola  
gigantica*

โดย นายวิฑูร ขาวสุข

อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

A9 0062281

- 6 ต.ค. 2552

26 004 2

๒๕๕๒๐๐๕๒

รับบริการ

- 5 พ.ย. 2552

ชื่อโครงการฯ (ภาษาไทย)..การศึกษาคุณลักษณะ ตำแหน่งและการกระจายของ leucine  
aminopeptidase ในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*  
(ภาษาอังกฤษ)..Characterization and localization of leucine aminopeptidase  
in *Fasciola gigantica*.....

ชื่อหัวหน้าโครงการ ฯ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail  
นายวิฑูร..ชาวสุข.....อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์.....คณะวิทยาศาสตร์...  
มหาวิทยาลัยบูรพา...หมายเลขโทรศัพท์ 038-745-900.#..3167...โทรสาร...038-393-497  
e-mail...Witoonj@yahoo.com.....

งบประมาณทั้งโครงการ ฯ.....177,600.....บาท.....

ระยะเวลาดำเนินงาน.....1..ปี.....

## 1. บทสรุปของงานวิจัย

*Fasciola gigantica* เป็นพยาธิที่ก่อให้เกิดโรค fasciolosis ในปศุสัตว์และมนุษย์ ปัจจุบันการวินิจฉัยและการรักษาโรคพยาธิยังมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร การศึกษาหาโปรตีนชนิดใหม่เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการนำไปวินิจฉัยโรคและการป้องกันโรคจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง leucine aminopeptidase (LAP) เป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการนำไปผลิตวัคซีนรวมถึงการวินิจฉัยโรคพยาธิโดยวิธี immunodiagnosis การทดลองในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ LAP รวมถึงการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเอนไซม์ชนิดนี้ที่พบได้ในตัวพยาธิ การผลิต polyclonal antibody เริ่มต้นโดยการฉีด cytosolic porcine kidney LAP ที่ผสมกับ complete หรือ incomplete Freund's adjuvant ในหนู แล้วนำ serum ไป screen หา specificity และปริมาณของ antibody ที่สร้างขึ้นด้วยวิธี ELISA หลังจากนั้นนำ polyclonal antibody ที่ได้ไปศึกษาลักษณะของ LAP ในพยาธิ *F. gigantica* ระยะต่าง ๆ ได้แก่ ระยะไข่ ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ และพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี western immunoblotting และศึกษาดำแหน่งและการกระจายของ LAP ในเนื้อเยื่อพยาธิระยะต่าง ๆ ด้วยวิธี immunoperoxidase ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิต polyclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ porcine kidney LAP และสามารถมีปฏิกิริยา cross reaction กับ *F. gigantica* ได้ ซึ่งพบว่า LAP เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในพยาธิทุกระยะของการพัฒนา โดยมีสัดส่วนของ LAP มากที่สุดใน excretory-secretory material ของพยาธิตัวเต็มวัย รองลงมาคือไข่ที่มีการพัฒนาของ miracidium อยู่ภายใน ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ และ crude extract ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยตามลำดับ ส่วน tegumental antigen มีสัดส่วนของ LAP น้อยที่สุด ซึ่ง LAP ดังกล่าวสร้างมาจากเนื้อเยื่อหลัก คือ เซลล์เยื่อบุผิว caecum และ bladder ของพยาธิทุกระยะ นอกจากนี้ยังมีการผลิต LAP ในเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ ซึ่งพบได้ทั้งในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ได้แก่ head ของ sperm เยื่อบุผิวของ seminal vesicle และ prostate gland cells และระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ได้แก่ mature oocyte mature vitelline cell Mehlis' gland cell และ เยื่อบุผิว uterus โดย LAP ที่ตรวจพบในการศึกษานี้จะรวมทั้งชนิด cytosolic และ membraned LAP

## 2. ความสำคัญของโครงการวิจัย

พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* เป็นสาเหตุของโรค Fasciolosis ในปศุสัตว์รวมถึงมนุษย์ ซึ่งมีการระบาดค่อนข้างมากในประเทศเขตร้อนรวมถึงประเทศไทย ทำให้ผลผลิตทางปศุสัตว์ลดลง รวมถึงเป็นสาเหตุการตายของสัตว์ในรายที่มีการติดเชื้อรุนแรง ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคพยาธิสามารถทำได้โดยการตรวจไข่ของพยาธิชนิดนี้ในอุจจาระของสัตว์ อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยนี้เป็นการตรวจพบโรคในช่วงหลังของการติดเชื้อ ทำให้การรักษาไม่ค่อยมีประสิทธิภาพเท่าที่ควร ปัจจุบันโรคพยาธิชนิดนี้รักษาโดยการให้ยา Triclabendazole แก่สัตว์ที่ติดเชื้อ แต่ยาชนิดนี้มีราคาค่อนข้างแพงและต้องใช้ในปริมาณมากถึงจะฆ่าพยาธิได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพยาธิชนิดสามารถพัฒนาตัวเองให้สามารถต้านยาชนิดนี้ได้ ซึ่งทำให้ในแต่ละปีจะต้องใช้ยาฆ่าพยาธิในปริมาณที่มากขึ้นทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง นักวิทยาศาสตร์จึงคิดค้นวิธีใหม่ ๆ ในการป้องกันและรักษาโรคพยาธิ

ชนิดนี้ วิธีการที่ค่อนข้างถูก มีประสิทธิภาพและให้ผลการป้องกันที่ยาวนานคือการให้ vaccine แก่ปศุสัตว์ เพื่อให้ปศุสัตว์สร้างภูมิคุ้มกันในการต้านพยาธิขึ้นมาได้เองก่อนที่จะมีการติดเชื้อพยาธิ ปัจจุบันมีโปรตีนหลายชนิดที่ถูกนำมาศึกษาความสามารถในการเป็น vaccine ในการต้านพยาธิ ได้แก่ Glutathione S-transferase (GST), Fatty acid binding protein (FABP) ซึ่งเป็น somatic โปรตีนที่พบมากในตัวยพยาธิ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่หลั่งออกมาจากตัวยพยาธิที่เรียกว่า excretory-secretory (ES) material โดยแอนติเจนที่พบมากใน ES คือ เอนไซม์ในกลุ่ม cystein protease ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ cathepsin L (Cat L) และ cathepsin B (Cat B) โดยเอนไซม์ทั้งสองมีการศึกษาแล้วค่อนข้างมาก นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์กลุ่ม metalloprotease ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAP) มีการศึกษาพบว่า LAP เป็นเอนไซม์ที่พบมากในเยื่อบุทางเดินอาหารของพยาธิใบไม้ จากการศึกษาคือความเป็นวัคซีนของ LAP ในการต้านพยาธิใบไม้ตัว *Fasciola hepatica* พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามข้อมูลพื้นฐานในด้านต่าง ๆ ของ LAP ในพยาธิกลุ่ม Trematode ยังมีค่อนข้างน้อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพยาธิ *F. gigantica* ซึ่งเป็นพยาธิที่พบระบาดค่อนข้างมากในประเทศไทย เพราะฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาคูณลักษณะพื้นฐานของ LAP ในพยาธิใบไม้ตัว *F. gigantica* รวมถึงการศึกษาตำแหน่ง และการกระจายของ LAP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพยาธิ *F. gigantica* อีกด้วย การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปสู่การศึกษาคือความสามารถในการเป็น vaccine ของ LAP เพื่อที่จะใช้ในการต้านพยาธิใบไม้ตัว *F. gigantica* ในภาคสนามต่อไป

### 3. การสำรวจจรรยาบรรณที่เกี่ยวข้อง

*Fasciola gigantica* เป็นพยาธิใบไม้ตัวเขตร้อน ก่อให้เกิดโรค Fasciolosis ซึ่งมีการติดเชื้อในสัตว์ที่กินหญ้าและพืชน้ำเป็นอาหาร เช่น โคและกระบือ (1) โรคพยาธิชนิดนี้เป็นปัญหาที่สำคัญของการปศุสัตว์ในเขตร้อนทั่วโลก (2) โดยแหล่งระบาดส่วนใหญ่พบในทวีปเอเชีย แอฟริกาและแถบอเมริกาใต้ เช่น ในประเทศโคลัมเบีย ฮาวาย อิรัก อิหร่าน รัสเซีย ปากีสถาน อินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย รวมทั้งประเทศไทย (3-5) พยาธิชนิดนี้อาศัยอยู่ในท่อนี้ดและตับของโฮสต์ซึ่งก่อให้เกิดพยาธิสภาพอย่างรุนแรงที่ตับโดยเฉพาะส่วนของ parenchyma และทำให้เกิดการอุดตันของท่อน้ำดี สัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิจะมีการเจริญเติบโตช้า ให้ผลผลิตโดยเฉพาะเนื้อและนมลดลง (6) ถ้ามีการติดเชื้อพยาธิในจำนวนมากหรือสัตว์ที่ติดเชื้ออายุน้อยอาจทำให้สัตว์ตายได้ ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจทั่วโลก (2) ปัจจุบันโรคพยาธิชนิดนี้ยังเป็นปัญหาที่สำคัญของการปศุสัตว์ในประเทศไทย โดยมีอัตราการแพร่กระจายของโรคในโคและกระบือประมาณ 4-24 % (7) ซึ่งพบมากที่สุดภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ตามลำดับ ทำให้ประเทศไทยต้องสูญเสียรายได้ถึง 350-400 ล้านบาทต่อปี (5) นอกจากนี้พบว่าพยาธิ *F. gigantica* สามารถติดเชื้อในคนได้เช่นกัน ซึ่งพบผู้ป่วยจำนวน 16 คนที่ติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (3)

พยาธิ *F. gigantica* เป็นพยาธิที่จัดอยู่ใน Phylum Platyhelminthes, Class Trematoda; Subclass Digenea, Superorder Anepitheliocystida, Order Echinostomatida, Family Fasciolidae และ Genus Fasciola โดยมีวงจรชีวิตเริ่มจากเมื่อไข่ถูกปล่อยออกมาจากอุจจาระของ host ตัวอ่อนภายในไข่จะยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งจะใช้เวลาอยู่ในน้ำประมาณ 10-15 วัน ที่อุณหภูมิ 22-27 องศาเซลเซียส ตัวอ่อนจะเจริญไปเป็น miracidium อยู่ภายในไข่ หลังจากฟักออกมาจากไข่ miracidium จะว่ายอยู่ในน้ำ เมื่อพบหอยที่เป็น intermediate host ซึ่งได้แก่ *Lymnaea rubiginosa* miracidium จะไชเข้าไปภายในตัวของหอยแล้วเจริญเป็น sporocyst redia และ cercaria ตามลำดับ ภายใน 3-6 สัปดาห์ cercaria จะไชออกมาจาก intermediate host และว่ายอยู่ในน้ำเป็นระยะเวลาสั้น ๆ หลังจากนั้นจะเกาะอยู่ตามพืช เช่น ผักแว่น ผักบุ้ง ผักกระเฉด หรือหญ้า เมื่อสลัดหางออกจะสร้างผนังหุ้มลำตัวเรียกว่า cyst กลายเป็นพยาธิระยะ metacercaria ซึ่งเป็นระยะติดต่อก่อน เมื่อคนหรือสัตว์ที่เป็น specific host กินพืชที่มีตัวอ่อนระยะ metacercaria ปะปนอยู่โดยไม่ทำให้สุกเสียก่อนก็จะติดเชื้อพยาธิเข้าสู่ร่างกาย cyst ของ metacercaria จะถูกย่อยภายในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น ทำให้ตัวอ่อนพยาธิสามารถออกมาจาก cyst และไชผ่านผนังลำไส้เข้าสู่ช่องท้อง หลังจากนั้นจะเดินทางไปยังตับผ่านเข้าสู่เนื้อตับและเข้าสู่ท่อน้ำดีเจริญไปเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (8)

การวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* สามารถทำได้ทั้งวิธีทางปรสิตวิทยาและวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน วิธีทางปรสิตวิทยาทำได้โดยการตรวจหาไข่พยาธิที่ออกมากับอุจจาระ แม้ว่าจะเป็นวิธีที่แม่นยำที่สุดแต่ก็มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ซึ่งจะเป็นการตรวจพบโรคนี้ในช่วงท้ายของการติดเชื้อ เนื่องจากในระยะแรกของการติดเชื้อมีพยาธิยังเจริญไม่เต็มที่ซึ่งไม่มีไข่ปนออกมากับอุจจาระทำให้ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาไข่พยาธิได้ นอกจากนี้ถ้ามีการติดเชื้อจำนวนน้อยไข่พยาธิก็จะมีในอุจจาระน้อยเช่นกัน จึงอาจต้องตรวจซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง อีกทั้งไข่ของพยาธิ *F. gigantica* ยังมีลักษณะคล้ายคลึงกับไข่พยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ เช่น *Fasciolopsis* sp. และ *Echinostoma* sp. (9) เป็นต้น จึงอาจทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดได้ อีกวิธีหนึ่งคือวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิใน serum และหาแอนติเจนของพยาธิใน serum และในอุจจาระซึ่งอาจจะเป็นวิธีที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคในระยะแรกของการติดเชื้อ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะเป็วิธีที่มีผู้ได้ศึกษากันมากแต่ยังคงอยู่ในช่วงพัฒนาให้มีความไว เทียงตรงและแม่นยำสูง แต่ก็ยังมีข้อเสียคือไม่สามารถแยกผู้ป่วยหรือสัตว์ที่กำลังติดเชื้อกับผู้ป่วยหรือสัตว์ที่หายจากโรคได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนของพยาธิมาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ โดยการตรวจหาแอนติเจนที่พยาธิสร้างขึ้นและขับออกมาจากตัวพยาธิ (excretory-secretory materials, ES) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งใน serum (10) และในอุจจาระของผู้ป่วย (11)

การควบคุมโรค Fasciolosis สามารถทำได้หลายวิธีเช่น การใช้ยาฆ่าพยาธิ การควบคุมอาหารและน้ำที่เลี้ยงสัตว์ ควบคุมบริเวณที่ใช้เลี้ยงสัตว์ และการทำลายหอยที่เป็น intermediate host ของพยาธิ นอกจากนี้การควบคุมโรคนี้ยังขึ้นอยู่กับสภาพเศรษฐกิจและการศึกษาของผู้เลี้ยงสัตว์ซึ่งยังขาด

ความรู้ความเข้าใจในการป้องกันโรค และไม่ทราบถึงประโยชน์ที่จะได้รับหากสามารถป้องกันและควบคุมโรคพยาธิได้ ในปัจจุบันการควบคุมโรคส่วนมากจะให้ยาฆ่าพยาธิแก่สัตว์ โดยยาที่นิยมใช้ คือ Triclabendazole (6, 12) แต่การใช้ยาฆ่าพยาธิชนิดนี้มีข้อเสีย คือเมื่อใช้ยาในระยะเวลาสั้น ๆ จะทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมลดลงเนื่องจากพยาธิเกิดการดื้อยา (13) นอกจากนี้การใช้ยาฆ่าพยาธิและการใช้สารเคมีกำจัดหอยจะทำให้มีสารตกค้างอยู่ในร่างกายของ host และมีการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการคิดค้นวัคซีนขึ้นมาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพยาธิซึ่งเชื่อว่าจะสามารถควบคุมโรคนี้ได้ในระยะยาวและมีราคาถูก (6)

ในปัจจุบันมีการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับชีววิทยาภูมิคุ้มกันของโรคพยาธิใบไม้ตับที่ติดเชื้อในสัตว์เคี้ยวเอื้องมากขึ้นเพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิใบไม้ตับกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็น Specific host วิธีการหนึ่งคือการศึกษาในระดับโมเลกุลมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวัคซีนสำหรับใช้ในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและการวินิจฉัยโรค ก่อนปี ค.ศ. 1987 ได้มีการทดลองฉีดวัคซีนให้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อต้านต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ซึ่งสกัดได้จากตัวพยาธิตามธรรมชาติและเอนไซม์ protease ที่ปล่อยออกมาจากพยาธิ (14) จากผลการพิสูจน์และแสดงลักษณะเฉพาะของโปรตีนที่สกัดได้จากพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ที่ได้ทดสอบการใช้วัคซีนแล้วนั้นพบว่าสามารถลดการติดเชื้อได้และพยาธิที่พบจะมีขนาดเล็กลงซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการฉีดวัคซีนให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ต้านต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยใช้ metacercaria ที่ผ่านการฉายรังสีและหนูที่ถูกฉีดวัคซีนที่สกัดได้จาก metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* (15) แอนติเจนบริสุทธิ์ 4 ชนิดที่สกัดได้จากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* นั้นประกอบด้วย fatty acid binding protein (FABP), glutathione S-transferase (GST), cathepsin L และ paramyosin ถูกนำมาทดสอบวัคซีนในโคพันธุ์ Brahman-cross ในประเทศอินเดียให้ผลการทดลองที่สามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ได้ (16) ปัจจุบันพบโปรตีนหลายชนิดที่มีแนวโน้มและมีศักยภาพที่จะเป็นวัคซีนตัวเลือก ได้แก่ 1. Fatty acid-binding protein (Fh12) พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *S. mansoni* และ *F. hepatica* ในหนูได้ 31-100 % (17) 2. Glutathione S-transferase พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ในแกะ 57 % (18) และในโค 41-69 % (19) 3. Cathepsin L พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ในแกะได้ 69 % (20) 4. Haemoglobin พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ในโคได้ 42-69 % 5. Cathepsin L และ haemoglobin พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ได้ 72 % (21).

จากการศึกษาข้างต้นโปรตีนที่มีศักยภาพเป็นวัคซีนส่วนใหญ่ถูกปล่อยออกมาจากตัวพยาธิแล้วสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้เป็นอย่างดี ซึ่งโปรตีนดังกล่าวอยู่ในรูปของ excretory-secretory (ES) material (22, 23) ซึ่ง ES antigen ดังกล่าวถูกปล่อยออกมาจากระบบอวัยวะต่าง ๆ ของพยาธิโดยเฉพาะอย่างยิ่งชั้นผิว (tegument) และทางเดินอาหาร (caeca) (24)

ชั้นผิวของพยาธิ *F. gigantica* เป็นระบบที่ติดต่อกับเนื้อเยื่อของ host โดยตรงทำหน้าที่ปกป้องลำตัว ดูดซึมแร่ธาตุและสารอาหารบางอย่างผ่านเข้าไปในผนังลำตัวโดยตรง เช่น น้ำตาล และกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็ก นอกจากนั้นยังทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซจากภายนอกและรับความรู้สึก ชั้นผิวภายนอกจะปกคลุมด้วยหนามเป็นจำนวนมาก ยกเว้นในส่วนของ oral sucker, ventral sucker และ excretory pore ซึ่งจะเป็นส่วนที่ช่วยในการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อของ host ผิวของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* มีลักษณะเป็น syncytium โดยมีเซลล์อยู่ชั้นล่างของชั้นผิวและส่งแขนงขึ้นมาเชื่อมกับชั้นผิว (25) ภายในชั้นผิวของพยาธิมี organelle ที่เด่นได้แก่ mitochondria, lysosomes และ excretory vesicles จำนวนมาก (25)

ระบบย่อยอาหารแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหน้าประกอบด้วย oral sucker, pharynx และหลอดอาหาร ส่วนหลังประกอบด้วยลำไส้ที่แตกแขนงจำนวนมากจนถึงท้ายสุดของลำตัว (26) เยื่อบุผิวลำไส้ของพยาธิ *F. gigantica* ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างคล้ายพีระมิด ภายในไซโตพลาสซึมมี RER และ zymogen granules จำนวนมาก (26) ซึ่ง zymogen granules เหล่านี้จะถูกปล่อยออกมาจากตัวพยาธิในรูปของ ES material (27) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ES materials นี้ประกอบด้วยเอนไซม์ 4 กลุ่ม ได้แก่ serine, cysteine, metallo และ aspartic protease (28) เอนไซม์ protease เหล่านี้มีความสำคัญในการดำรงชีวิตของพยาธิเนื่องจากพยาธิใช้เอนไซม์ protease ในการย่อยอาหาร ย่อยเนื้อเยื่อของโฮสต์ในขณะ migration นอกจากนี้พบว่าพยาธิยังใช้เอนไซม์ protease ในการหลบหลีกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ host อีกด้วย ซึ่งเอนไซม์ที่พบมากที่สุด ใน ES material คือ กลุ่ม cysteine protease (29)

Cysteine protease เป็นเอนไซม์สามารถพบได้ทั่วไปในพืชและสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรโตซัวจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งแบ่งออกเป็นหลายชนิดและชนิดที่มีผู้ศึกษาค้นคว้ากันอย่างแพร่หลายคือ Cathepsin (Cat) ซึ่งประกอบด้วย Cat L, B, H, I และ S (30) โดย Cat B, H และ L พบได้มากในส่วนของไลโซโซมและยังกระจายอยู่ทั่วไปตามอวัยวะต่าง ๆ บริเวณเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก (31-33) พยาธิใบไม้ตับสามารถหลั่งเอนไซม์เหล่านี้มาย่อยแอนติบอดีชนิด IgG ของ host บริเวณ hinge region ได้เป็น Fab และ Fc fragment เป็นผลให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ antibody mediated cytotoxicity reaction ของ host ลดลง ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิได้ (34-36) นอกจากนี้จากการศึกษาความสามารถในการเป็นวัคซีนของ Cat L พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ในแกะได้ 69 % และสามารถลดการติดเชื้อในโคได้ดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับ haemoglobin หรือ leucine aminopeptidase

Metalloprotease เป็นเอนไซม์ที่มีไอออนโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลในการทำปฏิกิริยา ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ leucine aminopeptidase (LAP) จากการศึกษพบว่า LAP เป็น exopeptidase ซึ่งตัด amino acid ทางด้าน amino terminal LAP มีความจำเพาะเจาะจงในการตัด leucine amino acid residue ออกจาก polypeptide นอกจากนี้ยังสามารถตัด amino acid อื่น ๆ ได้

อีกยกเว้น arginine, lysine และ proline (37) LAP เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ (38) พบทั้งบน cell surface ไชโตพลาสซึม ของเซลล์หลายชนิดในร่างกาย (38) จากการศึกษาพบว่าสามารถพบ LAP ได้ใน รก ตับ เลนส์ ลำไส้ สมอง ไต และ adipocyte หน้าที่ของ LAP จะมีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดซึ่งมีดังนี้คือ 1. ใช้ในการ metabolize secreted regulatory molecule ได้แก่ hormone, neurotransmitter และสารอาหาร (38, 39-42) 2. ใช้ในการย่อยอาหารในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (43) 3. Modulate cell-cell interaction (44) 4. Regulating plasmid stability (45) และ 5. เป็นเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของแมลงหลายชนิด (46-48)

Bovine lens LAP (3.4.11.1) เป็น LAP ตัวแรกที่มีการค้นพบ (49) และมีการศึกษาคุณสมบัติในแง่ต่าง ๆ กันค่อนข้างมาก (37) bovine lens LAP มี molecular weight ประมาณ 324 kDa ประกอบด้วย 15 alpha helix, 11 beta sheet และอยู่ด้วยกันเป็น hexamer LAP แต่ละ subunit มี molecular weight ประมาณ 52 kDa ประกอบด้วย 487 amino acid (36) ในขณะที่ porcine kidney LAP มี molecular weight ประมาณ 255 kDa และประกอบด้วย 4 subunit (tetramer) (50) ส่วน porcine liver LAP มี molecular weight ประมาณ 326 kDa (51) จะเห็นว่า LAP เป็นโปรตีนที่ค่อนข้างมีความหลากหลาย อย่างไรก็ตาม LAP แต่ละชนิดมีลักษณะที่เหมือนกันคือมีตำแหน่งบนโมเลกุลที่ทำหน้าที่จับกับโลหะหนักอยู่ 2 ตำแหน่ง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสังกะสี (Zn) จากการศึกษาโมเลกุลของ LAP พบว่าตำแหน่งที่ทำหน้าที่ในการจับกับ Zn อยู่ใกล้กับบริเวณส่วนปลายของโมเลกุลทางด้าน C-terminus Zn ตัวที่หนึ่งจับอยู่กับ amino acid Asp-255, Asp-332 และ Glu-334 (52) Zn ตัวที่สองจับโดย carboxylate oxygen atom ของ Asp-255, Asp-273 และ Glu-334 (52) โดย active site อยู่ที่ Lys-250 และ Arg-336 (52) Zn ในตำแหน่งที่ 1 จะจับกับ amino acid ได้ไม่ค่อยแข็งแรง เพราะฉะนั้นทำให้โลหะหนักตัวอื่น ๆ เข้ามาแย่งจับได้ ได้แก่ Mg Mn และ Co (37) ซึ่งการจับของ Mg ที่ตำแหน่งที่ 1 นี้จะเป็นการ activate การทำงานของ enzyme ชนิดนี้ (37) ส่วน Zn ที่ตำแหน่งที่ 2 จะสามารถจับกับ amino acid ได้อย่างดี (37) การทำงานของ enzyme ชนิดนี้จะถูก inhibit โดย phenanthroline (53), amastarin, bestatin และ leupeptin (54)

การศึกษาตำแหน่งของและการกระจายของ LAP ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า amino-peptidase เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในรูป membrane-bound (55-59) cytoplasmic (60-62) และ secretory protein ใน blood circulation (50, 63, 64)

การสังเคราะห์ cDNA ของ LAP ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า bovine kidney LAP cDNA ที่ถูก screen จาก cDNA library ประกอบด้วย 2050 nucleotide โดยมี 5'-untranslated region 134 bp และ 3'-untranslated region 377 bp รวมถึง poly A tail coding region มีความยาวทั้งหมด 1539 bp ซึ่งแปลรหัสเป็น amino acid 153 ตัว (38) ในขณะที่ cDNA ของ placental LAP (P-LAP, oxytocinase) ที่สกัดได้จากคนมี open reading frame ทั้งหมด 2832 bp และแปลรหัสเป็น amino acid ทั้งหมด 944 ตัว ซึ่งจะให้ molecular weight ประมาณ 108 kDa (65) จากการศึกษาลักษณะ



โมเลกุลของ P-LAP พบว่ามี N-glycosylation site ทั้งหมด 18 site กระจายอยู่ทั่วทั้งโมเลกุล (65) นอกจากนี้โมเลกุลของ P-LAP ยังมี hydrophobic region อยู่ทางด้าน N-terminus ซึ่งทำให้สามารถทำนายได้ว่า P-LAP เป็น type II integral membrane protein (65) โมเลกุลส่วน extracellular domain มี consensus sequence (HEXXH) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ enzyme กลุ่ม Zn metalloproteinase family โดยตำแหน่งนี้เป็นบริเวณที่มี Zn มาจับ แต่ไม่มีตำแหน่งที่เป็นที่จับของ glycosaminoglycans (SGXG) (65)

การศึกษาในพยาธิตัวกลมพบ LAP ในพยาธิไส้เดือน *Caenorhabditis elegans* ซึ่งประกอบด้วย 2 isotypes คือ LAP-1 ซึ่งเป็น membrane-bound protein และ LAP-2 ซึ่งเป็น cytosolic protein จากการศึกษา cDNA ของ LAP-1 พบว่ามีทั้งหมด 1441 bp ซึ่งแปลรหัสเป็น amino acid แล้วมี molecular weight ประมาณ 54 kDa (66) จากการ localization พบ LAP กระจายอยู่ใน gut epithelium ของ *C. elegans* ในทุกระยะของการพัฒนา ซึ่ง *C. elegans* น่าจะใช้ LAP ในการกระบวนการลอกคราบและ/หรือในการย่อยอาหาร อย่างไรก็ตามหน้าที่ของ LAP ใน *C. elegans* ยังคงไม่แน่นอน (66)

มีการตรวจพบ LAP ใน *Schistosoma mansoni* ในระยะต่าง ๆ ได้แก่ schistosomula, 20 day old และตัวเต็มวัย (67) นอกจากนี้ยังสามารถพบ activity ของ LAP ใน crude extract ของไข่ (eggs), miracidia, cercaria และพยาธิตัวเต็มวัย (68, 69) รวมถึง membrane extract ของพยาธิในทุกระยะ (68) จากการศึกษา specific activity ของ LAP ใน membrane fraction พบว่ามีมากที่สุดใน soluble egg antigen และ hatching fluid (68) เมื่อทำการ extract membrane associated LAP ออกมาจากไข่ของพยาธิ *Schistosoma mansoni* พบว่าเป็นโปรตีนที่มี carbohydrate บรรจุอยู่ซึ่งทำให้มี molecular weight ในสภาวะธรรมชาติมากกว่า 654 kDa แต่จะมี molecular weight ประมาณ 140 kDa เมื่อศึกษาด้วย SDS-PAGE (70)

จากการ extract LAP ของ *F. hepatica* ตัวเต็มวัยด้วย deoxycholic acid พบว่า LAP สามารถย่อย Leu-NHMeC ได้และมี molecular weight ประมาณ 240 kDa ในสภาวะธรรมชาติ อย่างไรก็ตามหลังจากการศึกษาด้วย non-reducing SDS-PAGE จะให้ molecular weight ประมาณ 65 kDa ซึ่งพบว่า LAP น่าจะเป็น high molecular weight complex (71) เป็นที่น่าสังเกตว่า LAP ที่สกัดได้จาก *F. hepatica* ไม่สามารถจับกับ Con A affinity column chromatography ได้ แสดงว่า LAP ของ *F. hepatica* ไม่มี mannose residue นอกจากนี้พบว่าไม่สามารถตรวจพบ activity ของ LAP ใน excretory-secretory (ES) product ของพยาธิ *F. hepatica* ตัวเต็มวัยเลย (71)

จาก histochemical localization ของ LAP ในพยาธิ *S. rodhaini* พบว่ามี LAP อยู่มากบริเวณ dorsal และ lateral tegument ของพยาธิตัวเต็มวัยเพศผู้แต่พบได้น้อยในเพศเมีย (72) โดยพยาธิน่าจะใช้ LAP ซึ่งเป็น membrane-bound enzyme ในการ emerge ออกจากไข่ (70) และอาจจะทำหน้าที่ในการย่อย Ig ของ host ที่มาเกาะที่บริเวณชั้นผิวหนังด้านนอก (66) จากการศึกษาด้วยวิธี

histochemical localization ใน *F. hepatica* ตัวเต็มวัยพบ LAP ปริมาณมากในเยื่อบุผิวลำไส้ และพบ LAP ปริมาณปานกลางในเซลล์ชั้นผิวทางด้าน dorsal surface (71)

ได้มีการศึกษาความสามารถในการเป็น vaccine ของ LAP ของพยาธิ *F. hepatica* โดยการ immunize LAP ผสมกับ Freund's adjuvant ในแกะ พบว่าแกะสามารถสร้าง antibody ที่ต้านต่อ LAP ที่ฉีดเข้าไปได้ เมื่อ infect ด้วย metacercaria และมีตรวจนับจำนวนพยาธิในตับพบว่า worm burden มีจำนวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ซึ่งให้ผลการ protection ประมาณ 89 % และจะให้ผลการ protection ประมาณ 78 % เมื่อ immunization เป็น cocktail vaccine กับ cathepsin L 1 และ cathepsin L 2 (73)

จากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่า LAP เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อพยาธิและมีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังเป็นโปรตีนที่มีศักยภาพสูงในการเป็น vaccine ตัวเล็ก เพราะฉะนั้นน่าจะมีการพัฒนา LAP ให้เป็น vaccine ที่ใช้ประโยชน์ได้จริงในอนาคต อย่างไรก็ตามข้อมูลพื้นฐานในด้านต่าง ๆ ของ LAP มีการศึกษาค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพยาธิ *F. gigantica* เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่เป็น vaccine ตัวเล็กชนิดอื่น ๆ เช่น Glutathione S-transferase, fatty acid binding protein และ cathepsin L จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของ LAP เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาไปเป็น vaccine ต่อไปในอนาคต เพราะฉะนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของ LAP ในพยาธิ *F. gigantica* ในระยะต่าง ๆ ของการพัฒนาเพื่อให้ทราบถึง profile ของ LAP ในแง่ของ isotype, molecular weight ปริมาณสัมพัทธ์ และรวมถึงเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ในการผลิตแอนติบอดีชนิดนี้

#### 4. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อแอนติเจน leucine aminopeptidase
- เพื่อศึกษาลักษณะพื้นฐานของ leucine aminopeptidase ของพยาธิ *F. gigantica* โดยวิธี western immunoblotting
- เพื่อศึกษาดำแหน่งและการกระจายของ leucine aminopeptidase ในพยาธิ *F. gigantica* โดยวิธี immunoperoxidase

#### 5. การดำเนินงานวิจัย

##### 5.1 การเก็บตัวอย่างพยาธิ *F. gigantica*

##### ระยะไข่ (eggs)

เก็บไข่พยาธิจาก *F. gigantica* ตัวเต็มวัยและจากถุงน้ำดีของโคที่มีการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* โดยนำพยาธิตัวเต็มวัยที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์มาแช่ในสารละลาย normal saline เพื่อให้พยาธิตัวเต็มวัยปล่อยไข่ออกมา หลังจากนั้นนำ normal saline ที่มีไข่พยาธิปะปนอยู่ หรือน้ำดีของโคที่มีการติดเชื้อพยาธิมาตั้งทิ้งไว้ให้ไข่พยาธิตกตะกอน แล้วล้างไข่พยาธิด้วย normal saline

จนกว่าสารละลาย normal saline ใส หลังจากนั้นนำไปกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วยแสงนาน 2 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะตรวจพบตัวอ่อนระยะ miracidium เจริญอยู่ภายในไข่และมีการฟักออกจากไข่บางส่วน นำไข่พยาธิล้างด้วยน้ำเกลือหลาย ๆ ครั้ง centrifuge แล้วนำไปใช้ทำการทดลองต่อไป

#### ระยะตัวอ่อน 4 สัปดาห์ (4 week-old juvenile)

ป้อนตัวอ่อนพยาธิ *F. gigantica* ระยะ metacercaria จำนวน 20 ตัว ที่ผสมกับ normal saline 0.5 ml ให้หนู mice เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ โดยใช้ feeding tube วันที่ 28 หลังการ infection ทำการสลบหนูด้วย diethyl ether แล้วเก็บพยาธิระยะตัวอ่อนจากตับ ล้างพยาธิที่ได้ด้วยสารละลาย normal saline แล้วนำไปทำการทดลองต่อไป

#### ระยะตัวเต็มวัย

เก็บพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยจากถุงน้ำดีและท่อน้ำดีของตับโคที่ติดเชื้อ และถูกฆ่าจากโรงฆ่าสัตว์ นำพยาธิที่ได้มาล้างด้วยสารละลาย normal saline จนกว่าจะไม่มีเลือด และน้ำดีติดอยู่ที่ตัวพยาธิ แล้วนำไปทำการทดลองต่อไป

### 5.2 การเตรียมแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*

#### Whole body antigen (ตัวเต็มวัย = WB, ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ = Ju, ไข่ = Eg)

นำพยาธิระยะต่าง ๆ ได้แก่ ไข่ ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ และตัวเต็มวัยมาแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมา homogenize ด้วย homogenizer ใน homogenization buffer ที่เย็น (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X 100, 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM ethylenediaminetetra acetic acid) แล้วนำไป sonicate ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที และ rotate ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ 10,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง นำ supernatant ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

#### Tegumental (TA) antigen

นำพยาธิตัวเต็มวัยมาล้างด้วยสารละลาย Hank's balance salt solution หลังจากนั้นนำพยาธิตัวเต็มวัยไปแช่ในสารละลาย Tegument extraction buffer (1% Triton-X 100, 50 mM Tris buffer pH 8.0, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl) นานประมาณ 10 นาที เก็บสารละลายมา centrifuge ที่ 100,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลาย tegumental antigen ใน 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 นำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

#### Excretory-secretory (ES) antigen

นำพยาธิตัวเต็มวัยมาแช่ในสารละลาย Hank's balance salt solution ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไป centrifuge ที่ 10,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง เก็บ supernatant แล้วกรองด้วย 0.2 ไมครอน Millipore filter นำสารละลายที่ได้ไป lyophilized แล้ววัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford เก็บ ES ที่อุณหภูมิ -20°C

### 5.3 การผลิต Polyclonal antibody ที่ต้านต่อ leucine aminopeptidase

#### 5.3.1 การ Immunization หนู rat ด้วย leucine aminopeptidase

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

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

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

##### Titration ELISA

เป็นการทำ ELISA เพื่อตรวจสอบว่ามีการสร้าง antibody ต้านต่อ LAP ที่ฉีดเข้าไปหรือไม่ และหลังจากที่มีการฉีด LAP ในแต่ละครั้งปริมาณสัมพัทธ์ของ antibody ที่สร้างขึ้นมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร ทำการทดลองโดยการละลาย LAP ใน coating buffer (sodium carbonate 0.318%, sodium hydrogen carbonate 0.586%) แล้วนำไป coat polystyrene microtiterplate ปริมาตร 2.5 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}/\text{well}$  ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง ล้าง LAP ส่วนเกิน ด้วย 10 mM PBS pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง block nonspecific binding ของ antibody ด้วย 5% skim milk + 0.05% Tween 20 ใน PBS จำนวน 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้ว incubate ด้วย primary antibody (rat sera) ที่เก็บ ณ วันที่ 0, 12, 26 และ 35 หลังจาก first immunization โดยละลาย primary antibody ด้วย 1% skim milk + 0.05% Tween 20 ใน PBS ที่ dilution ต่าง ๆ ได้แก่ 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200 dilution ละ 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  incubate ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง หลังจากนั้นแช่ด้วย HRP-conjugated goat anti-rat immunoglobulin ที่ละลายใน 1% skim milk + 0.05% Tween 20 ใน PBS ปริมาตร 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง สุดท้ายแช่ด้วย OPD + 0.012 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  ปริมาตร 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  ที่ 37°C นาน 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 6 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ปริมาตร 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  นำไปวัดค่า OD ด้วย Microtiter Plate Reader ที่ความ

ยาวคลื่น 492 nm นำค่า OD ของ serum จากหนูแต่ละตัวไป plot กราฟกับค่า dilution factor ต่าง ๆ แล้วเปรียบเทียบกับค่า titer ของ serum โดยค่า titer ได้จาก dilution factor ที่มากที่สุดที่ทำให้ preimmunized sera มีค่า OD ต่ำกว่า 0.3 และ immunized sera มีค่ามากกว่า 1

#### Checker board titration ELISA

เป็นการทำ ELISA เพื่อหาค่า dilution factor ของ primary และ secondary antibodies ที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยาซึ่งจะต้องนำไปใช้ในขั้นตอน western immunoblotting ทำการทดลองโดยการ coat polystyrene microtiterplate ด้วย porcine kidney LAP 2.5µg/50µl/well เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 นอกจากนี้เพื่อศึกษาว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มี cross reactivity กับ LAP ของ *F. gigantica* หรือไม่โดยการ coat microtiter plate ด้วย WB ของพยาธิตัวเต็มวัยปริมาณ 2.5, 10 และ 20 µg/50 µl/well ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น block ด้วย 5% skim milk ปริมาตร 100 µl นาน 1 ชั่วโมง แล้ว incubate ด้วย serum ของหนูที่มีค่า titer สูงสุด (จากข้อ 3.2.1) ปริมาตร 100 µl ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ซึ่งละลายที่ dilution ต่าง ๆ ได้แก่ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800 สำหรับการ coat ด้วย LAP และ 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 สำหรับการ coat ด้วย WB แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง หลังจากนั้น incubate ด้วย secondary antibody ที่ dilution ต่าง ๆ คือ 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 และ 1:6000 ปริมาตร 100 µl ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้ว incubate ด้วย OPD ปริมาตร 100 µl นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ปริมาตร 100 µl นำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง Microtiter Plate reader ที่ความยาวคลื่น 492 nm นำค่า OD ที่ได้มาหาค่า dilution factor ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาโดยพิจารณาจาก dilution ของ primary และ secondary antibody ที่มากที่สุดที่ทำให้ preimmunized sera มีค่า OD ต่ำกว่า 0.3 และ immunized sera มีค่า OD สูงกว่า 1

#### 5.4 การศึกษา leucine aminopeptidase ด้วยวิธี sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE) และ western immunoblotting

การศึกษา antigens ต่าง ๆ ของ *F. gigantica* ทำโดยใช้วิธี reducing SDS-PAGE หลังจากนั้นนำ antigen ย้ายลงแผ่น polyvinylidene fluoride (PVDF) โดยวิธี semidry western blotting นำแผ่น blotting ที่ได้ไปทำ immunostaining โดยใช้ polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากข้อ 3 เป็น primary antibody เพื่อให้ทราบว่า LAP ใน fraction ต่าง ๆ หรือไม่ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่าไร และในระยะต่าง ๆ ของการพัฒนามีปริมาณสัมพันธ์ของ LAP แตกต่างกันหรือไม่

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

SDS-PAGE ที่ใช้แยก antigens ในการทดลองนี้มีความเข้มข้นของ separating gel 12.5% และ stacking gel 4% เตรียม antigens โดยการละลาย antigens แต่ละชนิด (พยาธิระยะไข่ ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ WB, TA และ ES) ใน reducing sample buffer (350 mM HCl, 10% sodium dodesyl sulphate, 30% glycerol, 9.3% dithiothreitol (DTT) และ 1.2 mg bromophenol

blue) ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปต้มประมาณ 5 นาที centrifuge แล้วนำไป load ใน gel ปริมาณ antigen 1.5  $\mu\text{g}/\text{well}$  โดยใช้ standard marker เป็น reference ของ molecular weight และใช้ 25 mM Tris, 192 mM glycine และ 0.1% SDS เป็น running buffer ทำการแยก antigens ในสภาวะ constant current กระแสไฟฟ้า 20 mA, 250 V จากขั้ว cathode ไปยัง anode เมื่อ bromophenol blue marker เคลื่อนมาถึงขอบด้านล่างของแผ่น gel นำแผ่น gel ไปย้อมสี silver staining เพื่อศึกษาแถบโปรตีนต่าง ๆ ที่มีอยู่ใน antigen แต่ละ fraction

#### Silver staining

นำแผ่น gel แช่ใน 25% ethanol + 7% acetic acid นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 10% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 7 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 7 นาที นำ gel ไปแช่ใน 0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DTT ที่ละลายในน้ำกลั่น นาน 20 นาที แล้วแช่ใน 0.15% silver nitrate ในน้ำกลั่น นาน 20 นาที ล้างแผ่น gel ด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แช่แผ่น gel ใน developer (3% sodium carbonate + 0.05% formaldehyd) เขย่าช้า ๆ จนปรากฏแถบโปรตีน และมีความเข้มที่ต้องการ หยุดปฏิกิริยาโดยเติมผง citric acid จนกว่าไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น ล้างแผ่น gel ด้วยน้ำกลั่น นำมาคำนวณ molecular weight ของ antigens แต่ละแถบที่ปรากฏในแต่ละ fraction โดยใช้โปรแกรม Gene Tool (SynGene) และใช้ standard molecular weight marker เป็น reference และเปรียบเทียบปริมาณสัมพัทธ์ของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นโดยดูจากค่า raw volume ซึ่งแถบโปรตีนที่มีปริมาณมากมีค่า raw volume มากกว่า 100,000 แถบโปรตีนที่มีปริมาณปานกลางมีค่า raw volume ตั้งแต่ 50,000 ถึง 100,000 และ แถบโปรตีนที่มีปริมาณน้อยมีค่า raw volume น้อยกว่า 50,000

#### 5.4.2 Western Blotting

นำแผ่น gel ที่ผ่านการแยกโดย SDS-PAGE จากข้อ 5.4.1 และยังไม่ได้ย้อมสี silver staining มาย้ายโปรตีนลงแผ่น PVDF ด้วยวิธี semidry western blotting โดยนำแผ่น PVDF แช่ใน methyl alcohol 2 นาทีและน้ำกลั่น 5 นาที หลังจากนั้นแช่ PVDF แผ่นกระดาษกรองและแผ่น gel ใน transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine และ 20% methanol) นำกระดาษกรอง 6 แผ่น วางบน blotting cassette ตามด้วยแผ่น PVDF และแผ่น gel ไล่อากาศออกให้หมดแล้ววางแผ่นกระดาษกรองอีก 6 แผ่น โดยให้แผ่น gel อยู่ทางด้านขั้ว cathode และแผ่น PVDF อยู่ทางด้านขั้ว anode หลังจากนั้นทำการ transfer ที่ constant voltage 0.8-1.0  $\text{mA}/\text{cm}^2$  ของพื้นที่ gel นาน 60 นาที นำแผ่น PVDF ที่ได้ออกมาย้อมด้วยสี 0.1% Ponceau S ใน 5% acetic acid อย่างรวดเร็ว แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้เห็นแถบโปรตีนที่แยกได้ แล้วนำไปทำ immunostaining ต่อไป

#### 5.4.3 Immunostaining

นำแผ่น PVDF แช่ใน 5% skimmed milk ที่ละลายใน 10 mM Tris buffer saline, TBS (10 mM Tris-HCl + 150 mM NaCl) + 0.05% Tween 20 ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เพื่อ block nonspecific binding แช่แผ่น PVDF ใน primary antibody (rat sera ที่ผลิตได้ในข้อ 3) ที่ละลายใน 1% skimmed milk (dilution ได้จากข้อ 3.2.2) นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย TBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง แช่ใน secondary antibody (HRP-conjugated goat anti rat IgG) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-Tween 20 หลังจากนั้นแช่แผ่น PVDF ใน diaminobenzidine (DAB) + 0.054%  $\text{H}_2\text{O}_2$

ประมาณ 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่น PVDF ด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งแล้วนำไปคำนวณ molecular weight ของแต่ละแถบโปรตีนที่ปรากฏโดยใช้ standard molecular weight marker เป็น reference และเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นตามวิธีในข้อ 5.4.1

### 5.5 การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ leucine aminopeptidase ในเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantica* ระยะต่าง ๆ ด้วยวิธี Immunoperoxidase

นำพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ทุกระยะ (unembryonated eggs, embryonated eggs ตัวอ่อน 4 สัปดาห์และตัวเต็มวัย) มา fixed ด้วย 4% paraformaldehyde และ 0.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำเนื้อเยื่อพยาธิฝังใน paraffin ตัด section หนาประมาณ 5 ไมครอน นำ sections วางบนสไลด์ที่เคลือบด้วย 1% gelatin-chromalum ตาก slide ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

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

## 6. ผลการวิจัย

### 6.1 การ Screening antibody ที่ต้านต่อ LAP ด้วยวิธี ELISA

#### 6.1.1 titration ELISA ของ serum

ผลการทดลองพบว่าค่า OD ของ preimmunized sera มีค่าน้อยกว่าค่า OD ของ serum หลังจากการ priming, first boosting และ second boosting อย่างชัดเจน (ภาพที่ 1 ตารางที่ 1) นอกจากนี้พบว่า OD ของ serum หลังการ priming มีค่าน้อยกว่า serum หลังการ first boosting และ second boosting (ภาพที่ 1 ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามค่า OD ของ serum ของหนูแต่ละตัวก็มีค่าแตกต่างกันออกไป เช่น หนูตัวที่ 2 preimmunized serum ที่ dilution ตั้งแต่ 1/51200 ถึง 1/25 มี

ค่า OD อยู่ระหว่าง 0.053-0.185 serum หลังจาก priming มีค่า OD อยู่ระหว่าง 2.521-3.597 serum หลังจาก first boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 2.371-3.336 และ serum หลังจาก second boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.088-2.699 หนูตัวที่ 3 preimmunized serum ที่ dilution ตั้งแต่ 1/51200 ถึง 1/25 มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.056-0.167 serum หลังจาก priming มีค่า OD อยู่ระหว่าง 1.447-3.438 serum หลังจาก first boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 2.079-3.482 และ serum หลังจาก second boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.110-2.943 หนูตัวที่ 5 preimmunized serum ที่ dilution ตั้งแต่ 1/51200 ถึง 1/25 มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.050-0.155 serum หลังจาก priming มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.898-3.462 serum หลังจาก first boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 1.126-3.493 และ serum หลังจาก second boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.074-2.683 หนูตัวที่ 6 preimmunized serum ที่ dilution ตั้งแต่ 1/51200 ถึง 1/25 มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.046-0.239 serum หลังจาก priming มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.820-3.405 serum หลังจาก first boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 2.046-3.277 และ serum หลังจาก second boosting มีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.093-2.806 (ตารางที่ 1)

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

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

### 6.1.2 Checker board titration ELISA (CBT)

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



dilution ของ primary antibody เท่ากับ 1/12800 และ dilution ของ secondary antibody เท่ากับ 1/6400 ซึ่ง OD ของ immunized sera มีค่าประมาณ 3.418 ในขณะที่ OD ของ preimmune sera มีค่าประมาณ 0.058

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

เมื่อเพิ่ม WB ให้มีปริมาณที่มากเกินไป โดยการ coat plate ด้วย WB ปริมาณ 10 และ 20  $\mu\text{g}/\text{well}$  (ภาพที่ 7) ผลการทดลองพบว่า immunized sera มีค่า OD ที่แตกต่างจากกลุ่ม preimmune อย่างชัดเจน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่า OD ระหว่างการ coat plate ด้วย 10  $\mu\text{g}/\text{well}$  (ตารางที่ 4) และ 20  $\mu\text{g}/\text{well}$  (ตารางที่ 5) พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่ง dilution ของ immunized sera หรือ preimmunized sera ที่เหมาะสม คือที่ 1/400 ส่วน dilution ของ HRP-conjugated secondary antibody ที่เหมาะสมคือ 1/3000 ซึ่งการ coat plate ด้วย 10  $\mu\text{g}/\text{well}$  และใช้ immunized sera เป็น primary antibody ให้ค่า OD ประมาณ 1.114 และ preimmunized sera ให้ค่า OD ประมาณ 0.346 (ตารางที่ 4) ในขณะที่การ coat plate ด้วย 20  $\mu\text{g}/\text{well}$  immunized sera ให้ค่า OD ประมาณ 1.128 และ preimmunized sera ให้ค่า OD ประมาณ 0.271 (ตารางที่ 5)

## 6.2 SDS-PAGE, Western immunoblotting และ Immunostaining

### 6.2.1 reducing SDS-PAGE

นำแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมได้ข้างต้นมาวิเคราะห์โดยใช้ reducing SDS-PAGE ที่ความเข้มข้น 12.5 % โดยใช้แอนติเจนประมาณ 1  $\mu\text{g}/\text{lane}$  แล้วย้อมแผ่น gel ด้วยวิธี Silver Staining

พบว่า (ภาพที่ 8) ในแต่ละ fraction ของแอนติเจนพบแถบโปรตีนหลายแถบ ซึ่งเมื่อพิจารณาในแต่ละ fraction พบว่า

**Porcine kidney LAP** (ภาพที่ 8, lane 1, LAP) ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 44, 56 และ 66 kDa

**Egg antigen** (ภาพที่ 8, lane 2, EG) พบโปรตีนทั้งหมด 23 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 10 ถึง 270 kDa โดยแถบที่เข้มที่สุดคือที่น้ำหนักโมเลกุล 25, 26 และ 26.5 kDa แถบโปรตีนเข้มปานกลางคือ 14.5, 23, 24, 45, 46.5 และ 270 kDa

**พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์** (ภาพที่ 8, lane 3, JU) พบโปรตีนทั้งหมด 59 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 10 ถึง 350 kDa โดยแถบที่เข้มที่สุดคือที่น้ำหนักโมเลกุล 13, 13.5, 28, 35 และ 43.5 kDa แถบโปรตีนเข้มปานกลางคือ 10.5, 24, 25, 26, 27, 27.5, 29.5, 33.5, 34.5, 36, 41, 41.5, 46, 49, 51, 53, 54, 55.5 และ 71 kDa

พยาธิตัวเต็มวัย (ภาพที่ 8, lane 4, WB) พบโปรตีนเด่นทั้งหมด 62 แถบ น้ำหนักโมเลกุล อยู่ระหว่าง 10 ถึง 350 kDa โดยแถบที่เข้มที่สุดคือที่น้ำหนักโมเลกุล 13.5, 24, 25, 26, 28, 35 และ 49 kDa แถบโปรตีนเข้มปานกลางคือ 10.5, 12, 13, 14, 15, 23, 29.5, 33, 34, 35.5, 36.5, 43.5, 45.5, 50.5, 71, 97 kDa

**Tegumental antigen** (ภาพที่ 8, lane 5, TA) พบโปรตีนทั้งหมด 66 แถบ น้ำหนักโมเลกุล อยู่ระหว่าง 10 ถึง 250 kDa โดยแถบที่เข้มที่สุดคือที่น้ำหนักโมเลกุล 13, 13.5, 24, 25, 35 และ 49 kDa แถบโปรตีนเข้มปานกลางคือ 10.5, 12, 15.5, 26, 27, 27.5, 33.5, 36, 36.5, 37, 43.5, 45.5, 61, 68, 71 และ 86 kDa

**Excretory-secretory antigen** (ภาพที่ 8, lane 6, ES) พบโปรตีนเด่นทั้งหมด 25 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 10 ถึง 350 kDa โดยแถบที่เข้มที่สุดคือที่น้ำหนักโมเลกุล 25 และ 26 kDa แถบโปรตีนเข้มปานกลางคือ 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 13, 13.5, 16 kDa

## 6.2.2 Western immunoblotting

### 6.2.2.1 Rat sera anti FgLAP เป็น primary antigen

พบว่าแผ่น PVDF เกิดแถบที่ให้ผลเป็นบวกกับ primary antibody ในพยาธิทุกระยะที่นำมา ศึกษา (ภาพที่ 9) ดังนี้

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

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

พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 9, lane 3, JU) พบโปรตีนที่ให้ผลบวกทั้งหมด 3 แถบ ได้แก่ที่น้ำหนักโมเลกุล 24, 26.5, และ 33 kDa โดยทั้ง 3 แถบติดสีค่อนข้างน้อย

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

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

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

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของการติดสีของแถบโปรตีนระหว่างแอนติเจนแต่ละชนิดโดย พิจารณาที่น้ำหนักโมเลกุลเดียวกันพบว่า ES พบแถบโปรตีนที่มีความเข้มมากที่สุด รองลงมาคือ EG JU WB และ TA ตามลำดับ

### 6.2.2.2 Non immunized rat serum เป็น primary antibody

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

**6.3 การศึกษาคำแหน่งและการกระจายของ LAP ภายในพยาธิ *F. gigantica* ระยะ unembryonated eggs, embryonated eggs, พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์และตัวเต็มวัยด้วยวิธี Immunoperoxidase**

### 6.3.1 ระยะ unembryonated egg

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

### 6.3.2 ระยะ embryonated egg

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

### 6.3.3 พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์

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

#### 6.3.3.1 ระบบทางเดินอาหาร

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

#### 6.3.3.2 ระบบขับถ่าย

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

### 6.3.4 ระยะตัวเต็มวัย

ตำแหน่งและการกระจายของ LAP ในพยาธิระยะตัวเต็มวัยสามารถแบ่งตามระบบต่าง ๆ ได้ดังนี้

#### 6.3.4.1 ระบบทางเดินอาหาร

ระบบทางเดินอาหารของพยาธิ *F. gigantica* แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนต้นประกอบด้วย oral sucker pharynx esophagus และ caecal bifurcation ซึ่งไม่พบ positive reaction ของ LAP ภายในอวัยวะดังกล่าว (ภาพที่ 17A, B) แต่พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มใน caecum ซึ่งเป็นทางเดินอาหารส่วนปลาย เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ positive reaction

ของ LAP สีแดงเข้มบริเวณ luminal projection ของเซลล์เยื่อบุผิว caecum นอกจากนี้ยังพบ positive reaction ลักษณะเป็นจุดสีแดงภายใน cytoplasm (ภาพที่ 17, 18) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของ positive reaction ระหว่าง caecum แต่ละบริเวณ พบว่ามีความแตกต่างกันคือ main caecum และแขนง proximal ที่แตกแขนงมาจาก main caecum ซึ่งพบอยู่บริเวณกลางลำตัว (ภาพที่ 17F, 18B, D) รวมทั้งแขนง recurrent ซึ่งพบบริเวณส่วน oral cone (ภาพที่ 17C, D) มี positive reaction สีแดงเข้มปานกลางบริเวณ luminal projection ในขณะที่ภายใน cytoplasm พบ positive reaction ค่อนข้างน้อย ส่วนแขนง distal ของ caecum ซึ่งพบด้านข้างของลำตัวมี positive reaction เข้มมากทั้งบริเวณ luminal projection และภายใน cytoplasm (ภาพที่ 17E, 18A, C)

#### 6.3.4.2 ระบบขับถ่าย

การกระจายของ LAP ในระบบขับถ่ายของพยาธิตัวเต็มวัยคล้ายกับพยาธิตัวอ่อน 4 สัปดาห์ โดยพบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มสม่ำเสมอบริเวณ luminal projection และภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิว bladder (ภาพที่ 18E, F) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของ positive reaction ระหว่าง bladder แต่ละบริเวณพบว่าไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า positive reaction ใน bladder จะเข้มกว่าใน caecum

#### 6.3.4.3 ระบบสืบพันธุ์

##### ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย

**Vitelline gland** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มภายในเซลล์ vitelline ที่เจริญเต็มที่ ในขณะที่เซลล์ vitelline ในระยะอื่น ๆ ไม่พบ positive reaction เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction ภายใน cytoplasm แต่ไม่ปรากฏใน egg shell globules และ nucleus (ภาพที่ 19A-C) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ vitelline ที่อยู่ภายใน vitelline duct ก็พบ positive reaction เช่นกัน

**Ovary** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงบริเวณ mature oocyte ( $Oc_4$ ) ซึ่งอยู่บริเวณตอนกลางของ ovary (ภาพที่ 19D-F) เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ positive reaction บริเวณ subplasmalema ของ  $Oc_4$  แต่ไปพบ positive reaction ใน oocyte ระยะอื่น ๆ (ภาพที่ 19F)

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

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

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

#### ระบบสืบพันธุ์เพศผู้

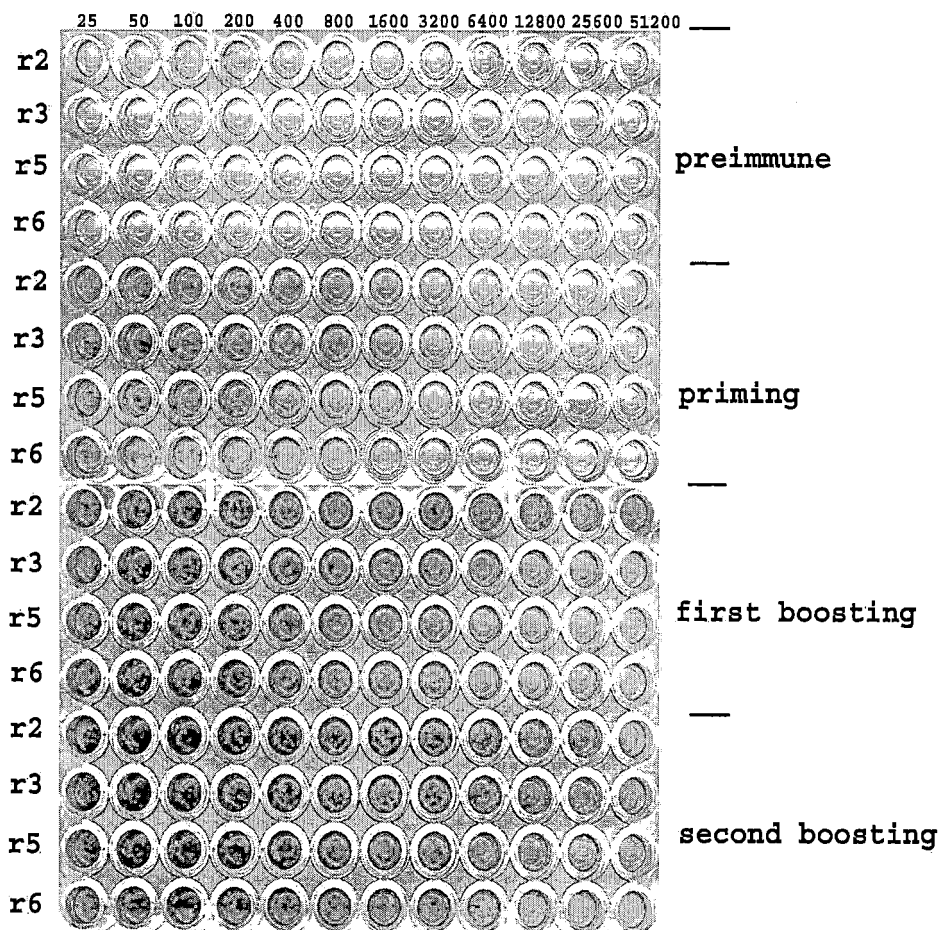
ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ที่พบการกระจายของ LAP ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่

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

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

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

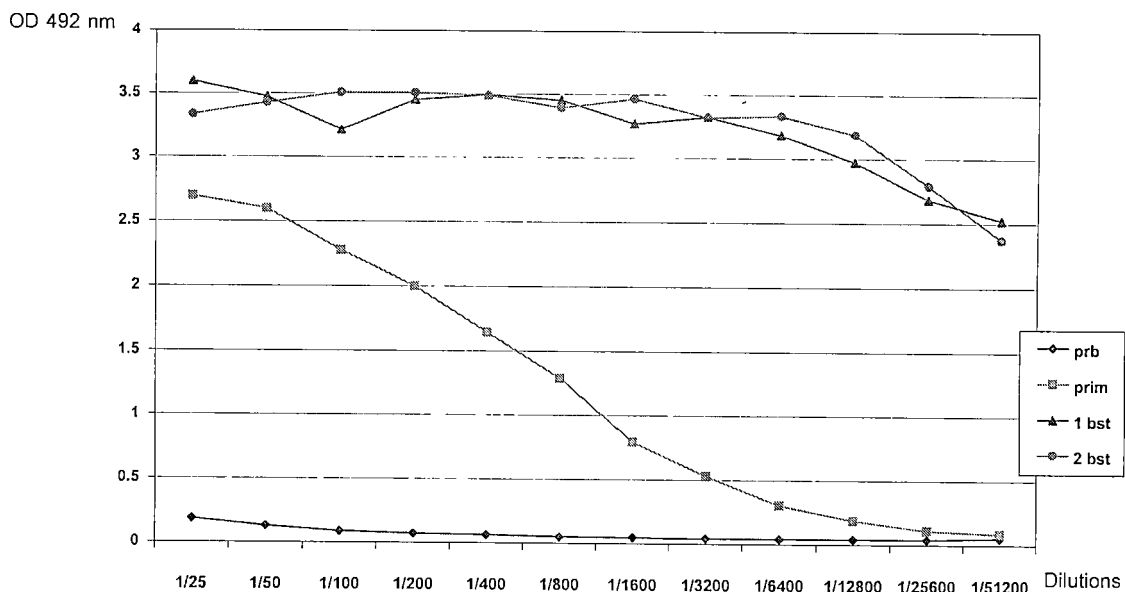
**Prostate gland** พบ positive reaction ของ LAP ลักษณะเป็นจุดสีแดงเข้มใน prostate gland cell (PgC) ทั่วทั้ง gland โดยพบ positive reaction ภายใน cytoplasm ของเซลล์ แต่ความหนาแน่นของ LAP ในเซลล์แต่ละเซลล์อาจไม่เท่ากัน (ภาพที่ 21F, G)



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

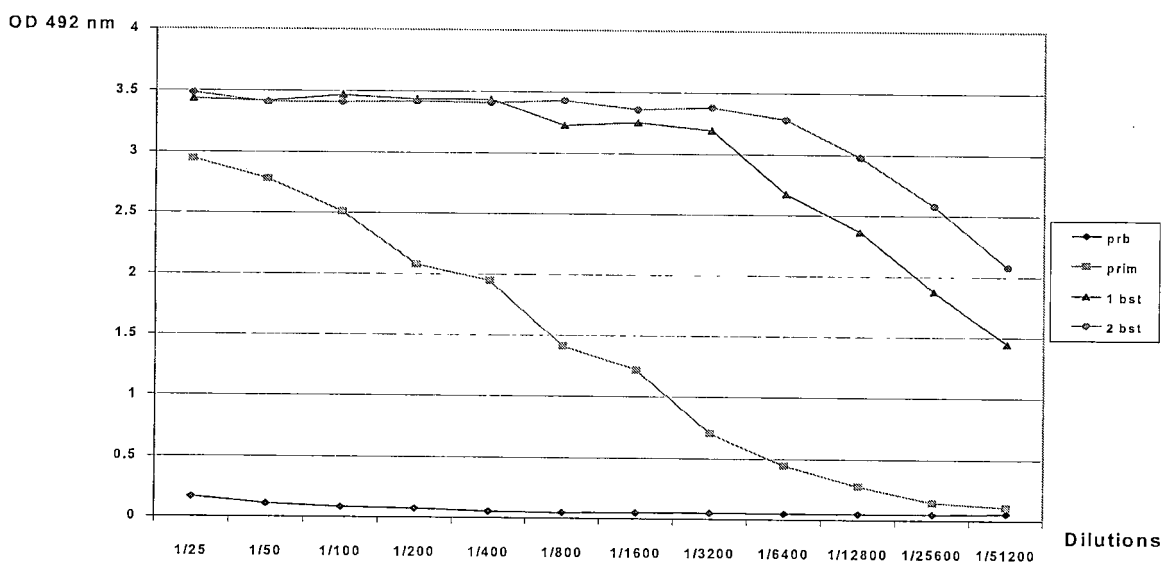
Dilution	Animals																							
	Rat No.2						Rat No.3						Rat No.5						Rat No.6					
	Pre-immunize	Prim-ing	1st boost	2nd boost	Pre-immunize	Prim-ing	1st boost	2nd boost	Pre-immunize	Prim-ing	1st boost	2nd boost	Pre-immunize	Prim-ing	1st boost	2nd boost	Pre-immunize	Prim-ing	1st boost	2nd boost				
1/25	0.185	2.699	3.597	3.336	0.167	2.943	3.438	3.482	0.155	2.683	3.462	3.493	0.239	2.806	3.405	3.277	0.239	2.806	3.405	3.277				
1/50	0.127	2.600	3.473	3.428	0.109	2.778	3.419	3.409	0.105	2.385	3.317	3.767	0.219	2.568	3.405	3.290	0.219	2.568	3.405	3.290				
1/100	0.089	2.277	3.215	3.508	0.084	2.511	3.468	3.409	0.082	2.305	3.462	3.460	0.119	2.245	2.956	3.396	0.119	2.245	2.956	3.396				
1/200	0.070	2.000	3.453	3.508	0.073	2.078	3.438	3.420	0.072	2.072	3.526	3.516	0.088	2.035	3.281	3.351	0.088	2.035	3.281	3.351				
1/400	0.062	1.646	3.493	3.487	0.054	1.947	3.438	3.409	0.055	1.181	3.380	3.460	0.068	2.166	3.358	3.290	0.068	2.166	3.358	3.290				
1/800	0.050	1.287	3.453	3.393	0.046	1.411	3.230	3.431	0.046	1.003	3.317	3.493	0.057	1.328	3.071	3.309	0.057	1.328	3.071	3.309				
1/1600	0.047	0.793	3.271	3.466	0.049	1.219	3.256	3.359	0.047	0.764	3.051	3.364	0.058	1.003	3.150	3.309	0.058	1.003	3.150	3.309				
1/3200	0.041	0.529	3.327	3.321	0.052	0.705	3.194	3.379	0.042	0.485	2.636	3.166	0.052	0.780	2.898	3.290	0.052	0.780	2.898	3.290				
1/6400	0.042	0.305	3.180	3.336	0.049	0.444	2.674	3.284	0.044	0.297	2.271	2.638	0.055	0.374	2.191	3.207	0.055	0.374	2.191	3.207				
1/12800	0.042	0.188	2.970	3.186	0.049	0.277	2.365	2.978	0.044	0.181	1.783	2.084	0.073	0.253	1.724	2.975	0.073	0.253	1.724	2.975				
1/25600	0.040	0.112	2.684	2.790	0.049	0.148	1.879	2.578	0.047	0.093	1.128	0.834	0.045	0.147	1.203	2.679	0.045	0.147	1.203	2.679				
1/51200	0.053	0.088	2.521	2.371	0.056	0.110	1.447	2.079	0.050	0.074	0.898	1.126	0.046	0.093	0.820	2.046	0.046	0.093	0.820	2.046				

ตารางที่ 1 แสดงค่า OD ของ titration ELISA ของ sera หนูตัวที่ 2, 3, 5, และ 6



ภาพที่ 2 กราฟเส้นแสดง Titer of the rat sera number 2

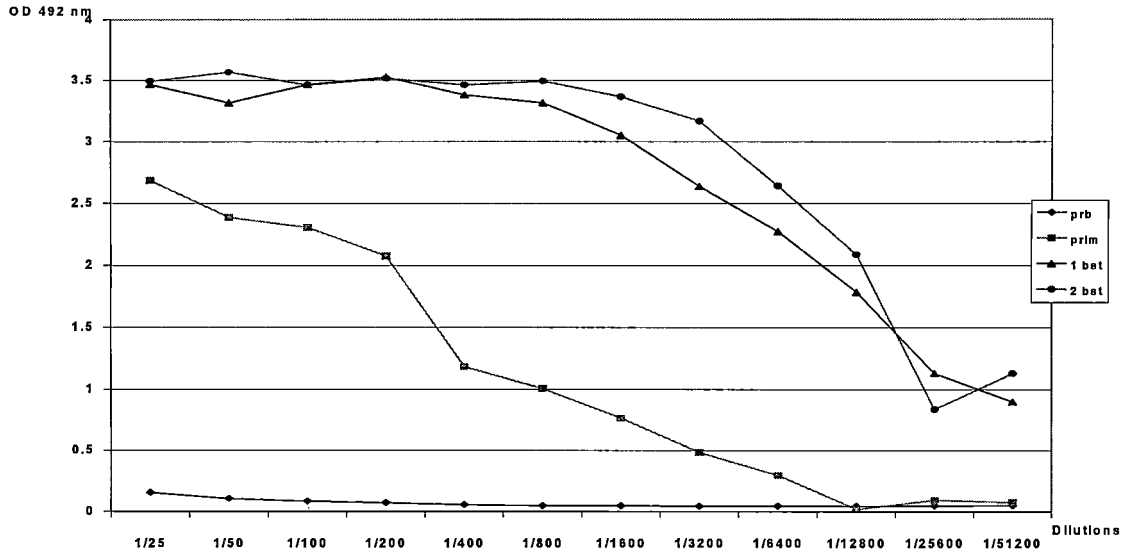
prb = preimmunized, prim = priming, 1 bst = first boosting, 2 bst = second boosting



ภาพที่ 3 กราฟเส้นแสดง Titer of the rat sera number 3

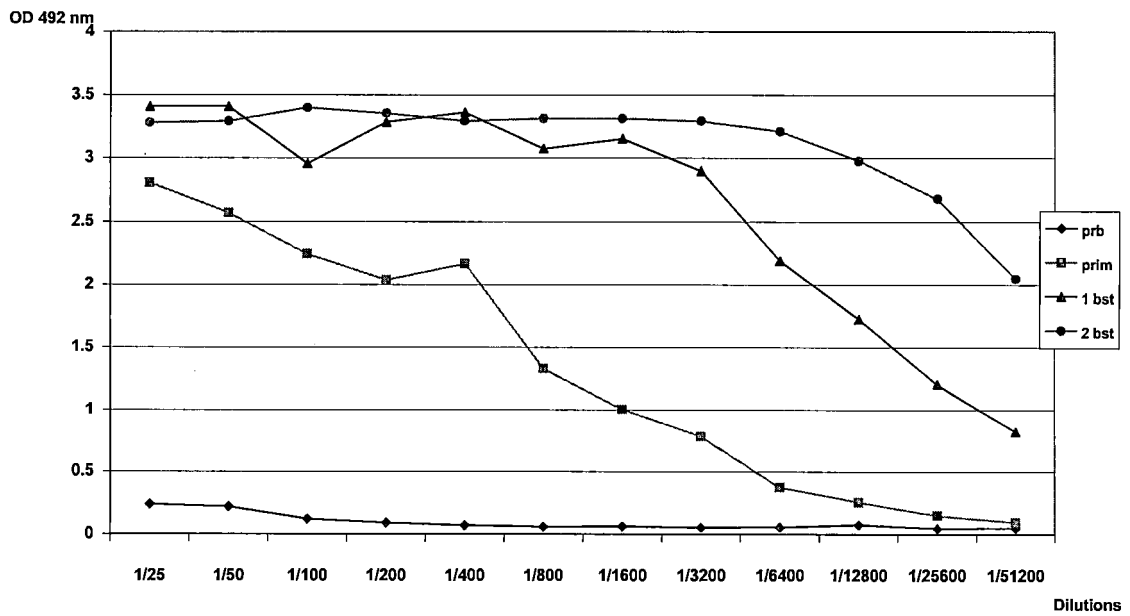
prb = preimmunized, prim = priming, 1 bst = first boosting, 2 bst = second boosting





ภาพที่ 4 กราฟเส้นแสดง Titer of rat sera number 5

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

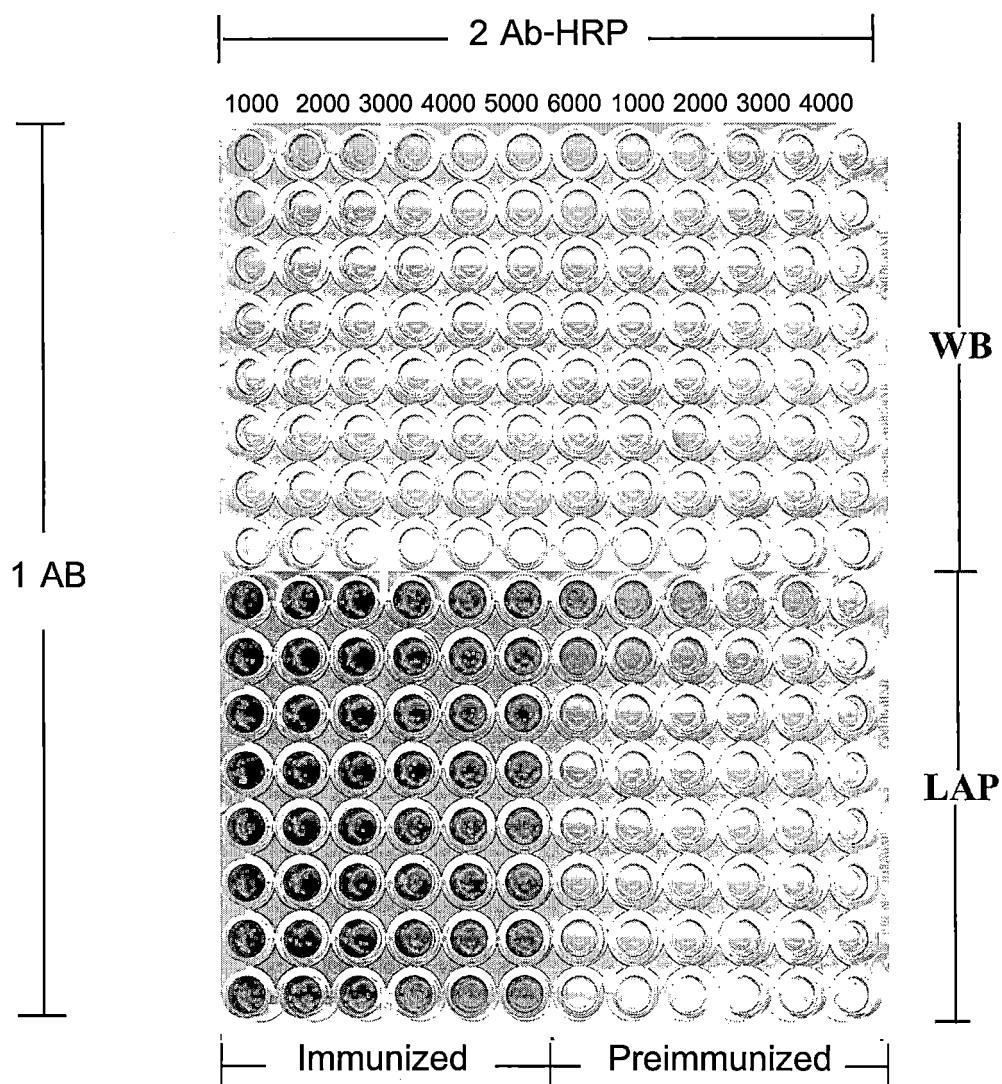


ภาพที่ 5 กราฟเส้นแสดง Titer of rat sera number 6

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

26 004 2

๕๙๒.๔๕  
 ๗๕๙๖๗



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

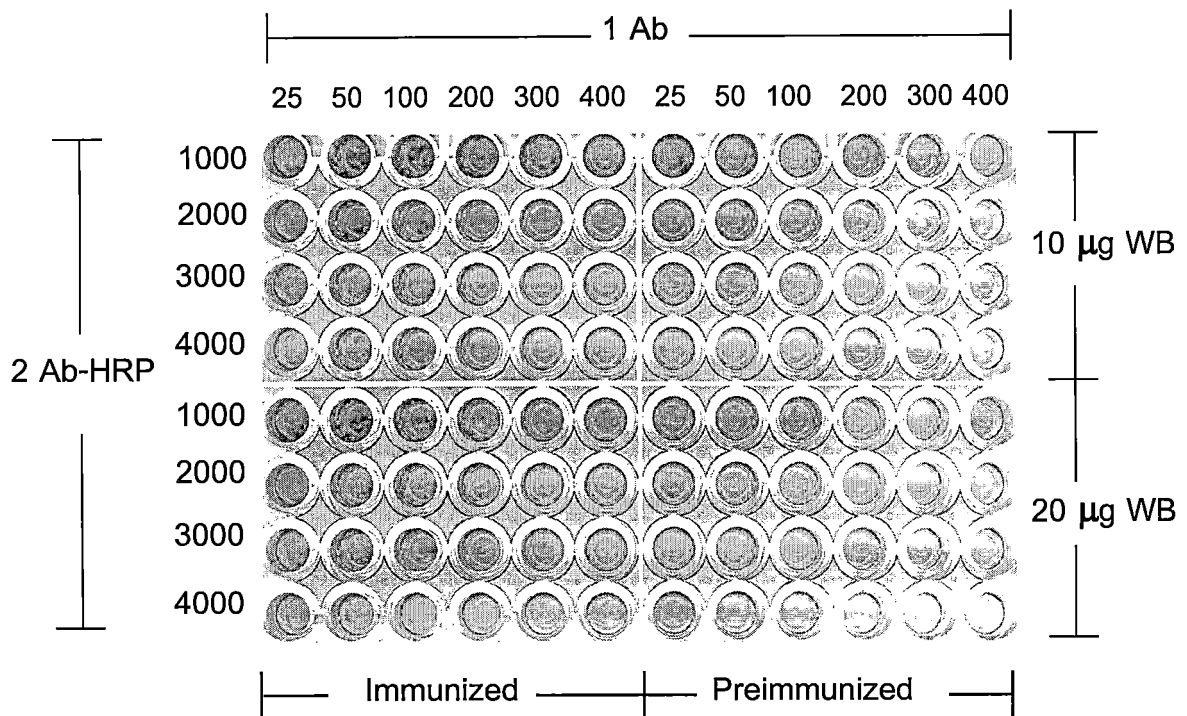
1 Ab = primary antibody, 2 Ab-HRP = HRP-conjugated secondary antibody, WB = whole body antigen, LAP = porcine kidney LAP

2 Ab- HRP	Immunized sera										Preimmunized sera									
	1 Ab										1 Ab									
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800				
Dilution	3.514	3.491	3.563	3.600	3.611	3.652	3.370	3.168	3.420	0.474	0.232	0.157	0.435	0.121	0.169					
1000	3.541	3.491	3.614	3.460	3.693	3.592	3.453	2.300	2.064	0.180	0.151	0.191	0.209	0.059	0.016					
2000	3.541	3.470	3.516	2.990	3.524	3.458	3.418	2.941	1.230	0.118	0.105	0.119	0.067	0.060	0.070					
3000	3.590	3.470	3.494	2.998	3.148	3.380	3.472	0.343	0.422	0.074	0.067	0.067	0.064	0.049	0.073					
4000	3.437	3.420	3.108	3.499	3.460	3.475	3.334	0.959	0.351	0.135	0.089	0.110	0.075	0.059	0.060					
5000	3.565	3.470	3.539	3.441	3.014	3.567	3.418	0.282	0.088	0.244	0.097	0.118	0.062	0.053	0.058					
6000																				

ตารางที่ 2 แสดงค่า OD ของ checker board titration ELISA ของ serum หนูตัวที่ 2 coat plate ด้วย LAP ปริมาตร 2.5 µg/well

2 Ab- HRP	Immunized sera														Preimmunized sera													
	1 Ab														1 Ab													
	Dilution	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800											
1000	1.159	0.817	0.485	0.362	0.234	0.200	0.187	0.125	0.759	0.488	0.286	0.192	0.132	0.109	0.095	0.087												
2000	0.738	0.425	0.267	0.162	0.121	0.099	0.072	0.078	0.355	0.213	0.133	0.100	0.072	0.065	0.064	0.059												
3000	0.059	0.358	0.223	0.148	0.108	0.084	0.089	0.068	0.270	0.184	0.121	0.088	0.068	0.112	0.055	0.058												
4000	0.405	0.271	0.165	0.115	0.090	0.076	0.066	0.068	0.212	0.121	0.089	0.071	0.057	0.061	0.051	0.048												
5000	0.267	0.202	0.112	0.089	0.080	0.071	0.070	0.062	0.146	0.098	0.072	0.059	0.055	0.057	0.047	0.047												
6000	0.316	0.018	0.137	0.098	0.075	0.073	0.057	0.068	0.121	0.098	0.072	0.057	0.057/0.05	0.047	0.041													
		7											4															

ตารางที่ 3 แสดงค่า OD ของ checker board titration ELISA ของ serum หมายเลขที่ 2 coat plate ด้วย WB ปริมาณ 2.5 µg/well



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

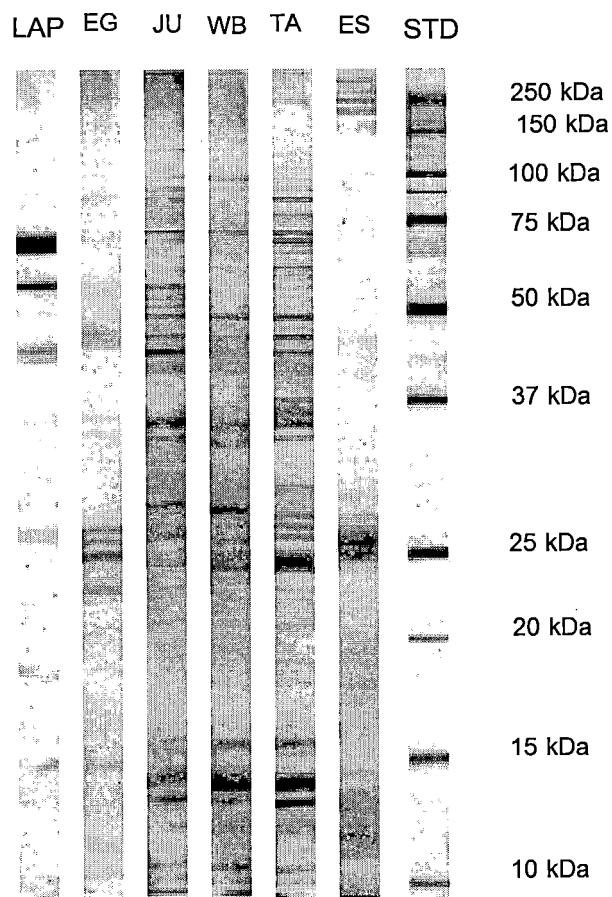
1 Ab = primary antibody, 2 Ab = secondary antibody, WB = whole body antigen

2 Ab- HRP	Preimmunized sera								Immunized sera							
	1 Ab								1 Ab							
	25	50	100	200	300	400	25	50	100	200	300	400				
dilution	2.281	1.919	1.424	1.102	0.685	0.723	2.564	2.537	2.470	2.318	2.241	2.028				
2000	1.554	1.081	0.880	0.618	0.335	0.391	2.285	2.144	1.953	1.627	1.333	1.258				
3000	1.425	1.149	0.743	0.0516	0.084	0.346	2.204	2.161	1.874	1.564	1.296	1.114				
4000	0.985	0.602	0.490	0.336	0.184	0.226	1.653	1.584	1.379	1.044	0.756	0.754				

ตารางที่ 4 แสดงค่า OD ของ checker board titration ELISA ของ serum หนูตัวที่ 2 coat plate ด้วย WB ปริมาตร 10 µg/well

2 Ab- HRP	Preimmunized sera								Immunized sera									
	1 Ab								1 Ab									
dilutio n	25	50	100	200	300	400	25	50	100	200	300	400	25	50	100	200	300	400
1000	2.226	1.797	1.372	0.967	0.538	0.629	2.632	2.598	2.462	2.276	2.145	1.973	2.632	2.598	2.462	2.276	2.145	1.973
2000	1.388	0.966	0.730	0.513	0.285	0.319	2.336	2.177	1.971	1.659	1.281	1.181	2.336	2.177	1.971	1.659	1.281	1.181
3000	1.347	0.974	0.662	0.456	0.267	0.271	2.174	2.146	1.844	1.583	1.294	1.128	2.174	2.146	1.844	1.583	1.294	1.128
4000	0.919	0.561	0.435	0.287	0.171	0.201	1.667	1.529	1.340	1.041	0.737	0.690	1.667	1.529	1.340	1.041	0.737	0.690

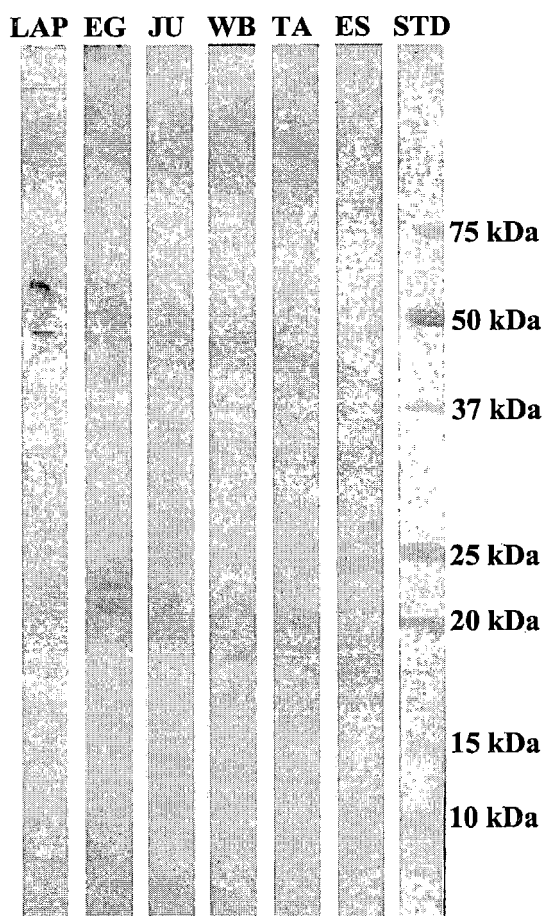
ตารางที่ 5 แสดงค่า OD ของ checker board titration ELISA ของ serum หนูตัวที่ 2 coat plate ด้วย WB ปริมาตร 20 µg/well



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

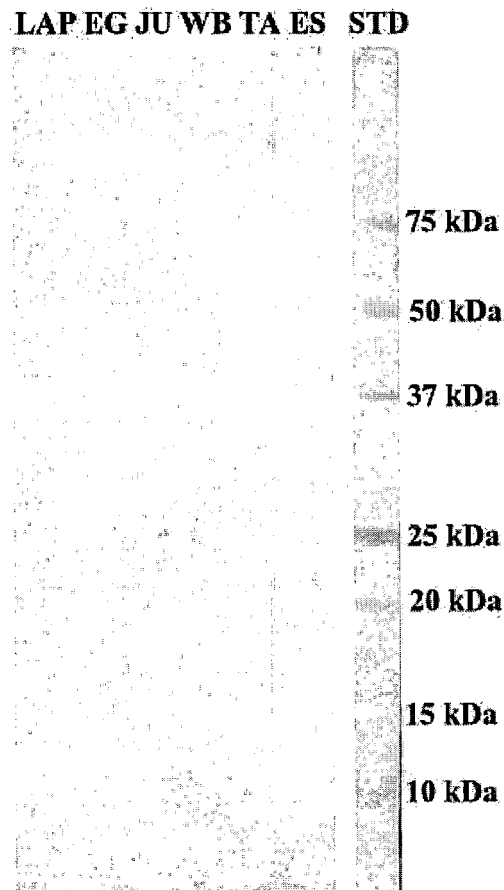
LAP = porcine kidney LAP, EG = soluble egg antigens, JU = crude antigen ของ 4-week old juvenile, WB = crude antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, TA = tegumental antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย, ES = excretory-secretory antigens ของพยาธิตัวเต็มวัย, STD = standard molecular weight marker





**ภาพที่ 9** แสดงแถบโปรตีนแอนติเจน fraction ต่าง ๆ ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE และ western immunoblotting โดยใช้ rat anti LAP เป็น primary antibody

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



ภาพที่ 10 แสดงแถบโปรตีนของแอนติเจน fraction ต่าง ๆ ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE และ western immunoblotting โดยใช้ normal rat serum เป็น primary antibody

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

- ภาพที่ 4-1 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของไข่พยาธิ *F. gigantica*
- A – B ภาพกำลังขยายปานกลาง ที่ย้อมด้วยสี H&E แสดงโครงสร้างภายในไข่พยาธิระยะ unembryonated egg (Eg) ภายใน uterus (Ut)
  - C ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงโครงสร้างภายในไข่พยาธิระยะ unembryonated egg (Eg) ซึ่งเป็นตัวอย่างสด พบกลุ่มของ vitelline cell (Vc) ภายในไข่พยาธิ
  - D – F ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงโครงสร้างภายในของไข่พยาธิระยะ embryonated egg พบ miracidium (M) และ vitelline cell (Vc)

(EgS = egg shell, UtE = uterine epithelium)

**E**



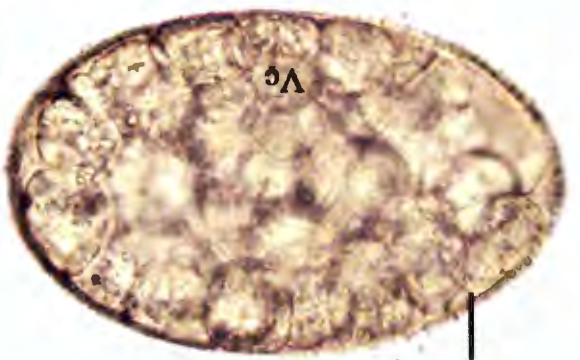
30 µm

**F**



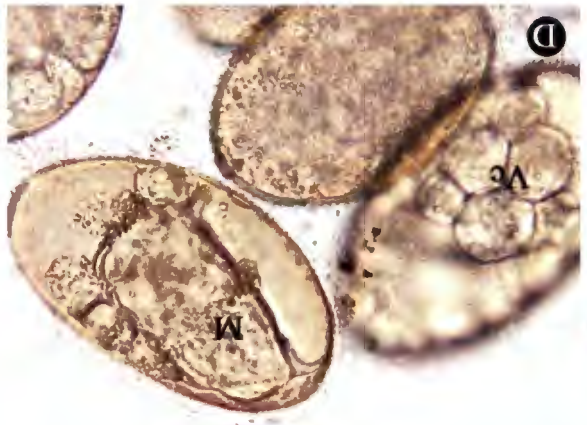
30 µm

**C**



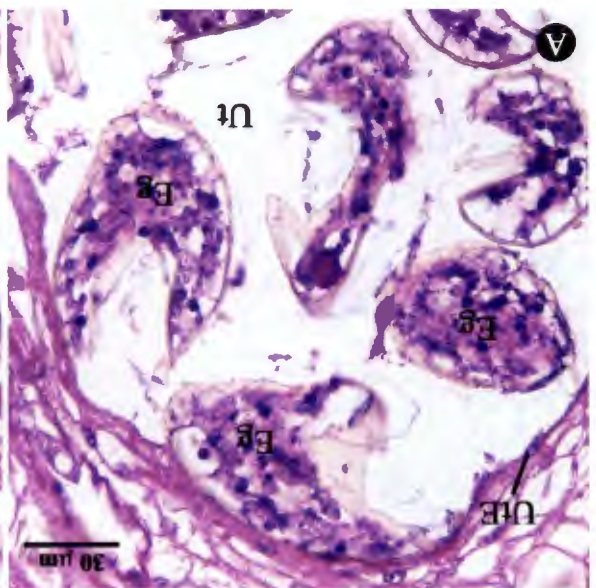
15 µm

**D**



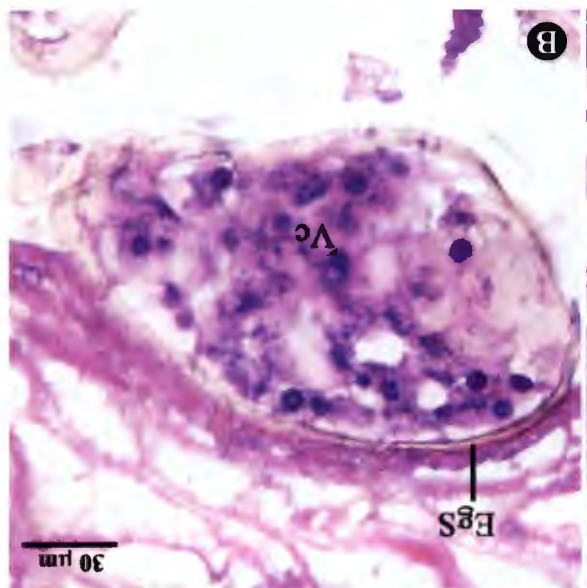
30 µm

**A**



30 µm

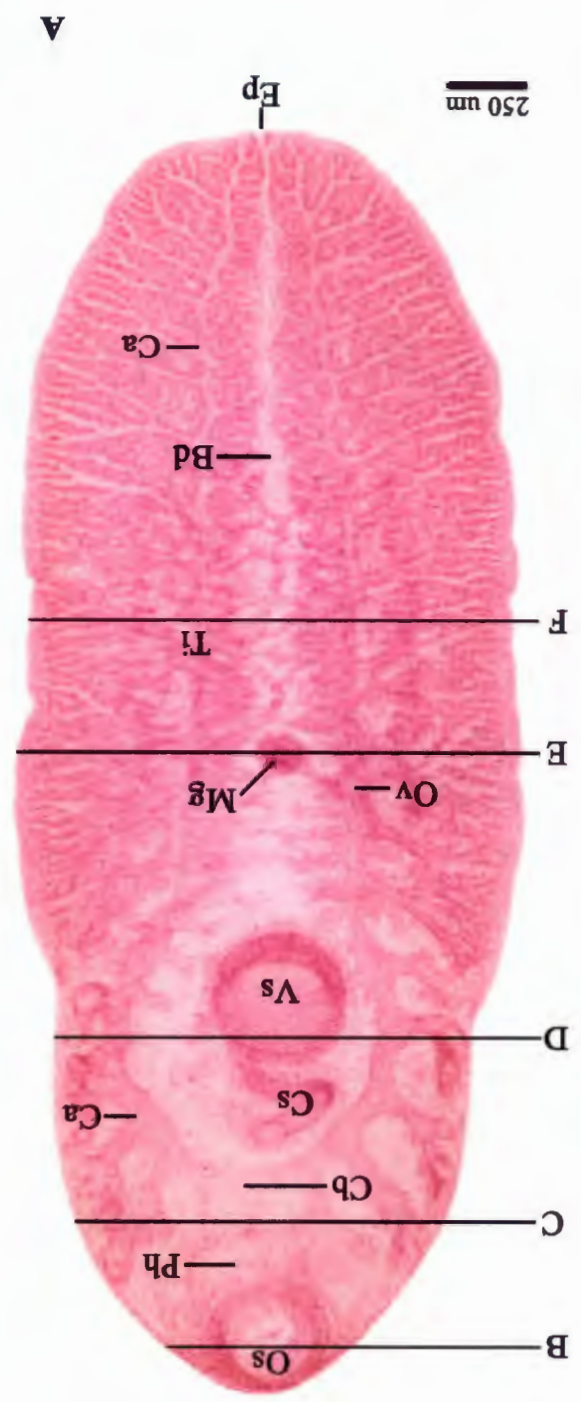
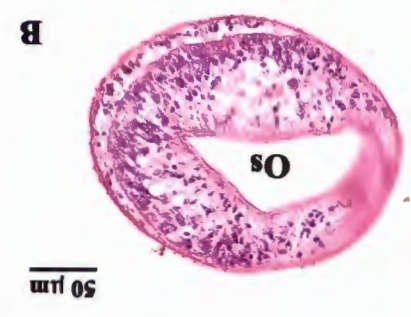
**B**



30 µm

ภาพที่ 4-2

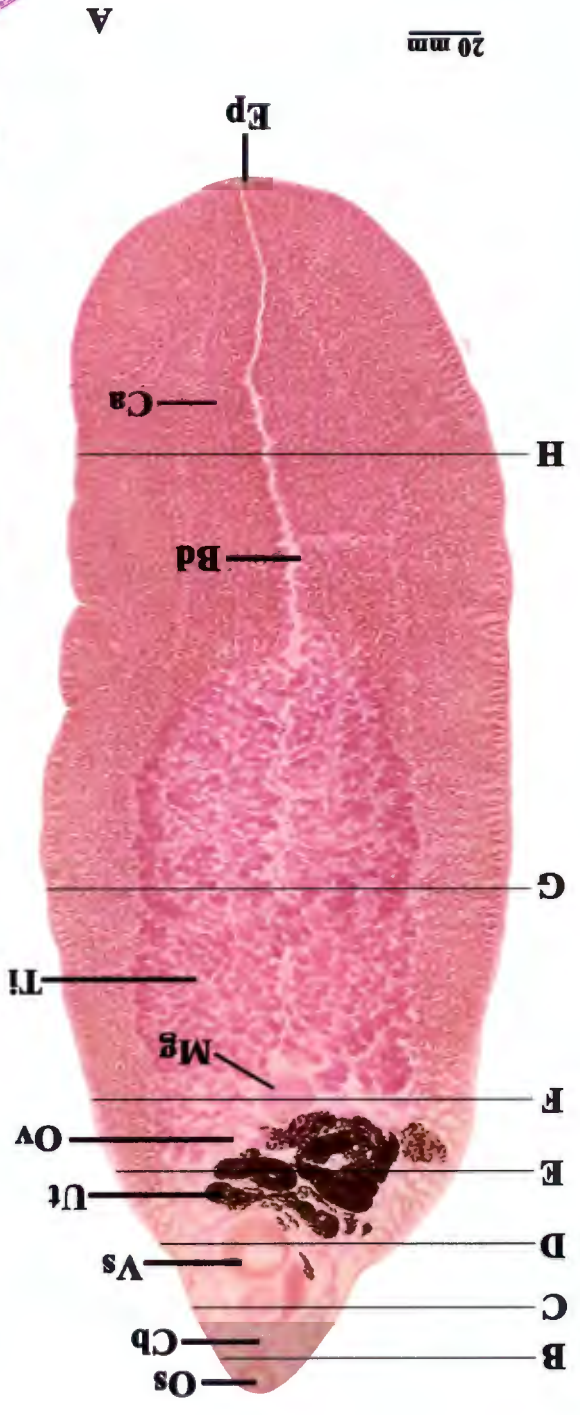
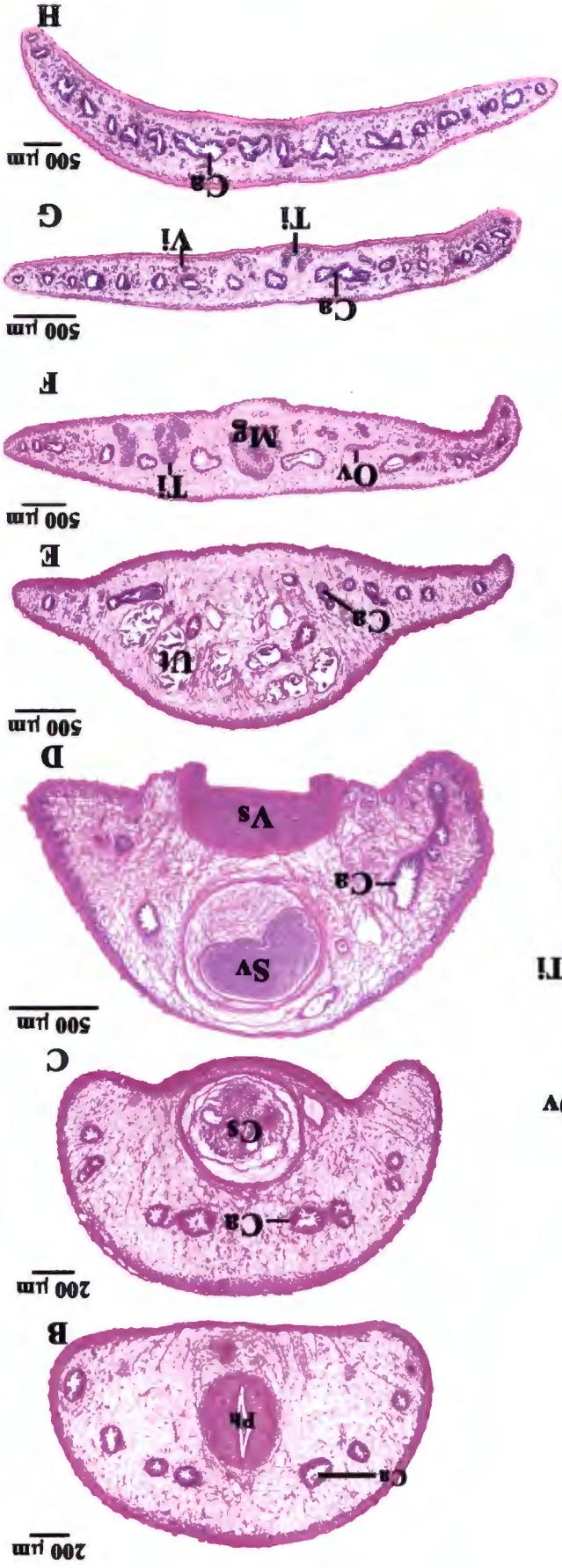
- A ภาพกำลังขยายต่ำ ย้อมด้วยสี carmine แสดงโครงสร้างและอวัยวะของพยาธิ ประกอบด้วย oral sucker (Os) ซึ่งล้อมรอบช่องปากบริเวณส่วนหัว caeca (Ca) เป็นส่วนที่ต่อมาจาก pharynx (Ph) และ esophagus (Es) ซึ่งเริ่มตั้งแต่บริเวณ caecal bifercation (Cb) โดย caeca จะแตกออกเป็น 2 แขนงทอดไปทางด้านข้าง ลำตัวทั้งสองข้างตลอดความยาวของพยาธิ ventral sucker (Vs) บริเวณแนวกลางลำตัวของพยาธิ และด้านบนต่อ ventral sucker พบ cirrus sac (Cs) ซึ่งเป็นอวัยวะของระบบสืบพันธุ์เพศผู้โดยจะส่งท่อมาเปิดที่ genital pore ใกล้เคียงกับ ventral sucker Mehlis' gland (Mg) ลักษณะเป็นก้อนกลมบริเวณกึ่งกลางลำตัวของพยาธิ โดยด้านข้างพบ ovary (Ov) ลักษณะเป็นท่อขดไปมา testis (Ti) ลักษณะเป็นท่อแตกแขนงจำนวนมากด้านข้าง ลำตัวทั้งสองข้างได้ต่อ Mehlis' gland bladder (Bd) ลักษณะเป็นท่อแตกแขนงจำนวนมาก โดยมีท่อใหญ่อยู่แนวกลางลำตัว ส่วนท่อแขนงจะทอดไปทางด้านข้างของลำตัว และส่วนท้ายสุดเป็น excretory pore (Ep) เป็นรูเปิดสำหรับขับถ่ายของเสียออกจากตัวพยาธิ
- B - F ภาพตัดขวางกำลังขยายต่ำของพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวอ่อน 4 สัปดาห์ ย้อมด้วยสี H&E
- B แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน oral sucker (Os) ซึ่งล้อมรอบช่องปากของพยาธิ
- C แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน pharynx (Ph)
- D แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน ventral sucker (Vs) และ cirrus sac (Cs)
- E แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน Mehlis gland (Mg)
- F แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่านส่วนหางของพยาธิ



## ภาพที่ 4-3

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย

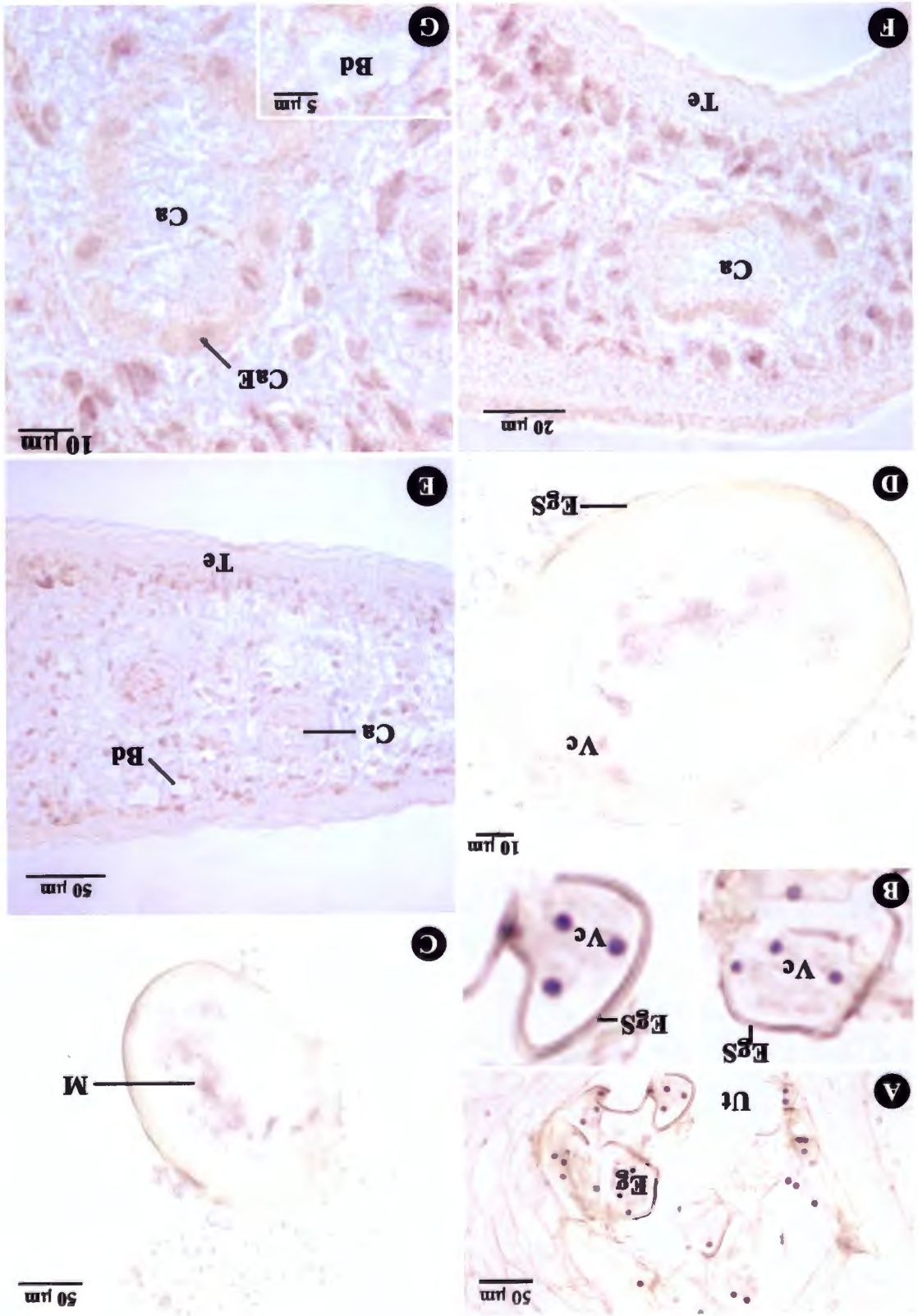
- A ภาพกำลังขยายต่ำ ย้อมด้วยสี carmine แสดงโครงสร้างและอวัยวะของพยาธิ ประกอบด้วย oral sucker (Os) ซึ่งล้อมรอบช่องปากบริเวณส่วนหัว caeca (Ca) เป็นส่วนที่ต่อมาจาก pharynx (Ph) และ esophagus (Es) ซึ่งเริ่มตั้งแต่บริเวณ caecal bifercation (Cb) โดย caeca จะแตกออกเป็น 2 แขนงทอดไปทางด้านข้าง ลำตัวทั้งสองข้างตลอดความยาวของพยาธิ ventral sucker (Vs) บริเวณแนวกลางลำตัวของพยาธิ และด้านบนต่อ ventral sucker พบ cirrus sac (Cs) ซึ่งเป็นอวัยวะของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ โดยจะส่งท่อมาเปิดที่ genital pore ใกล้กับ ventral sucker Mehlis' gland (Mg) ลักษณะเป็นก้อนกลมบริเวณกลางลำตัวของพยาธิ โดยด้านข้างพบ ovary (Ov) ลักษณะเป็นท่อขดไปมา testis (Ti) ลักษณะเป็นท่อแตกแขนงจำนวนมากด้านข้างลำตัวทั้งสองข้างใต้ต่อ Mehlis' gland bladder (Bd) ลักษณะเป็นท่อแตกแขนงจำนวนมาก โดยมีท่อใหญ่อยู่แนวกลางลำตัว ส่วนท่อแขนงจะทอดไปทางด้านข้างของลำตัวและส่วนท้ายสุดเป็น excretory pore (Ep) เป็นรูเปิดสำหรับขับถ่ายของเสียออกจากตัวพยาธิ
- B - G ภาพตัดขวางกำลังขยายต่ำของพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย ย้อมด้วยสี H&E
- B แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน pharynx (Ph)
- C แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน cirrus sac (Cs)
- D แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน ventral sucker (Vs) และ seminal vesicle (Sv)
- E แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน uterus (Ut)
- F แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่าน testis (Ti) และ vitelline gland (Vi)
- F แสดงลักษณะเนื้อเยื่อที่ตัดผ่านส่วนหางของพยาธิ





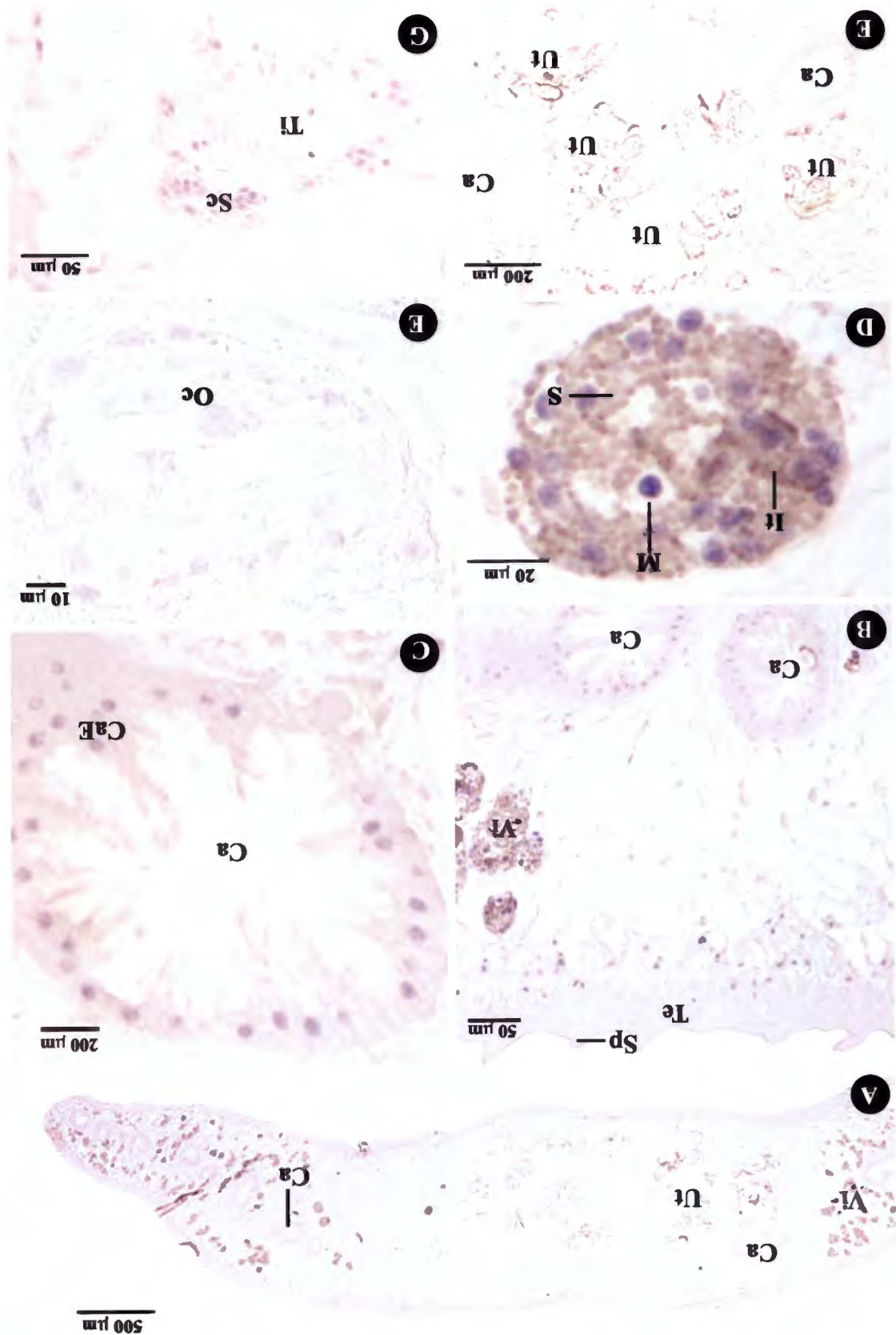
- ภาพที่ 11      ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของพยาธิระยะ unembryonated egg, embryonated egg และพยาธิตัวอ่อน 4 สัปดาห์ กลุ่มควบคุมที่ย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin แสดง negative staining ของแอนไซม์ LAP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ
- A – B      ภาพกำลังขยายปานกลาง unembryonated egg (Eg) ภายใน uterus (Ut)
- C – D      ภาพกำลังขยายปานกลาง (C) และภาพกำลังขยายสูง (D) ของ embryonated egg และ miracidium (M) อยู่ภายในไข่พยาธิ
- E          ภาพกำลังขยายปานกลาง ของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์
- F – G      ภาพกำลังขยายสูง แสดง caecum (Ca) และ bladder (Bd)

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



- ภาพที่ 12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงโครงสร้างของพยาธิระยะตัวเต็มวัยกลุ่มควบคุม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxin แสดง negative staining ของเอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAP) ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ
- A – B ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงโครงสร้างของภายในของพยาธิที่ตัดผ่าน uterus
  - C ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง caecum (Ca)
  - D ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง vitelline gland (Vi)
  - E ภาพกำลังขยายสูง แสดง oocyte (Oc) ภายใน ovary (Ov)
  - F ภาพกำลังขยายต่ำ แสดง uterus (Ut)
  - G ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง testis (Ti) ซึ่งพบ spermatoocyte (Sc) อยู่ภายใน

(CaE = caecal epithelium, It = intermedaite cell, M = mature vitelline cell, S = shell globule, Sp = spine)



- ภาพที่ 13      ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของแอนไซม์ LAP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพยาธิระยะ unembryonated egg, embryonated egg และพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin
- A – B      ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงตำแหน่งและการกระจายของแอนไซม์ LAP ใน unembryonated egg (uEg) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงอย่างสม่ำเสมอภายในของเหลวในภายใน egg และ vitelline cell (Vc) โดยไม่พบบริเวณเปลือกไข่ (ES)
- C – D      ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงตำแหน่งและการกระจายของแอนไซม์ LAP ใน embryonated egg (Eg) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงอย่างสม่ำเสมอภายใน hatching fluid (ลูกศร) และ miracidium (M) ภายในไข่ โดยไม่พบที่เปลือกไข่
- E, F, H      ภาพกำลังขยายต่ำ (E) และภาพกำลังขยายสูง (F, H) แสดงตำแหน่งและการกระจายของแอนไซม์ LAP ในพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงบริเวณ luminal projection และเซลล์เยื่อบุผิวทั้ง caecum และ bladder
- G      ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงผล negative ต่อ LAP ภายใน tegument (Te)

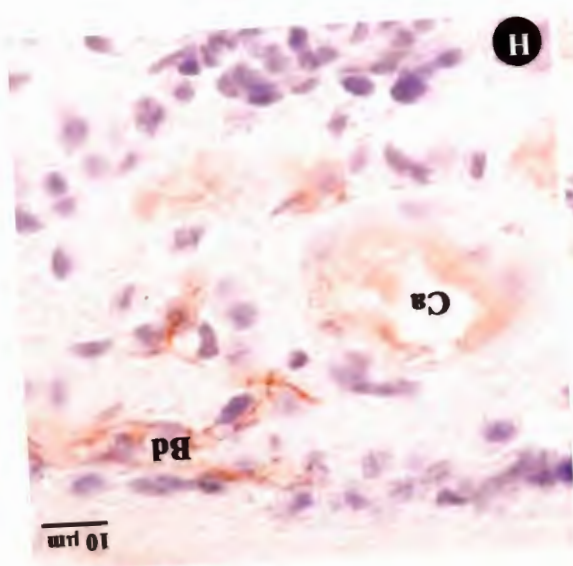
**G**



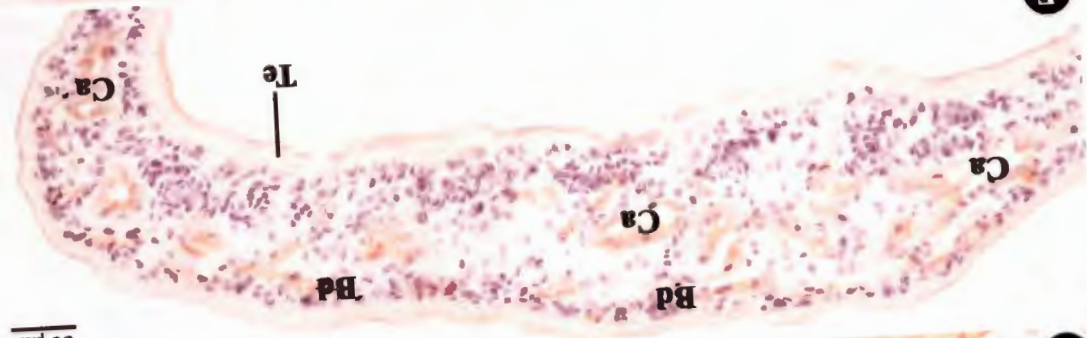
**F**



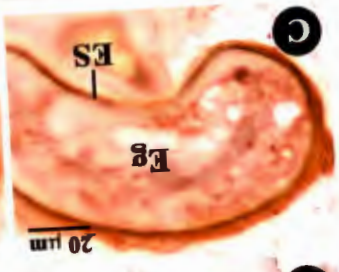
**H**



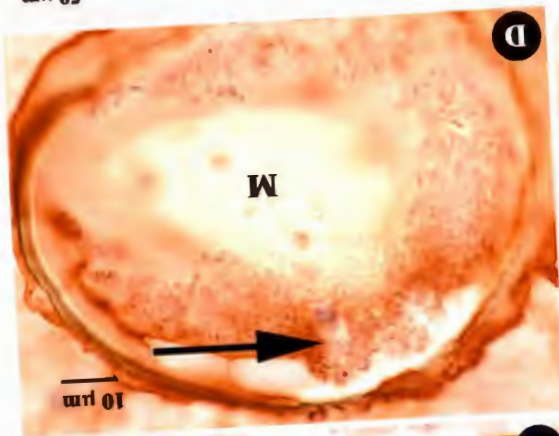
**E**



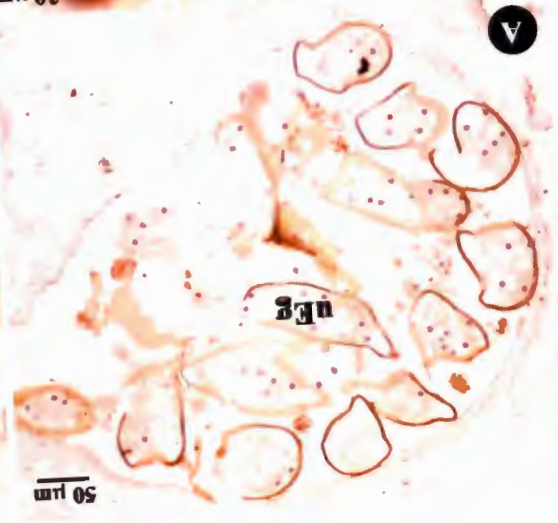
**C**



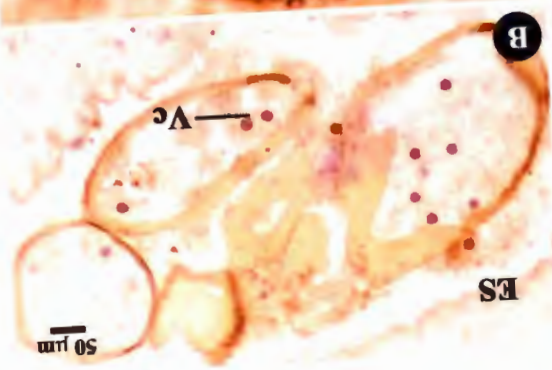
**D**



**A**

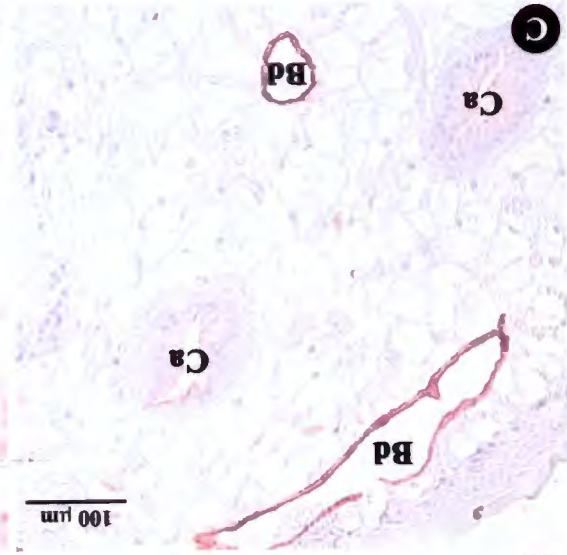
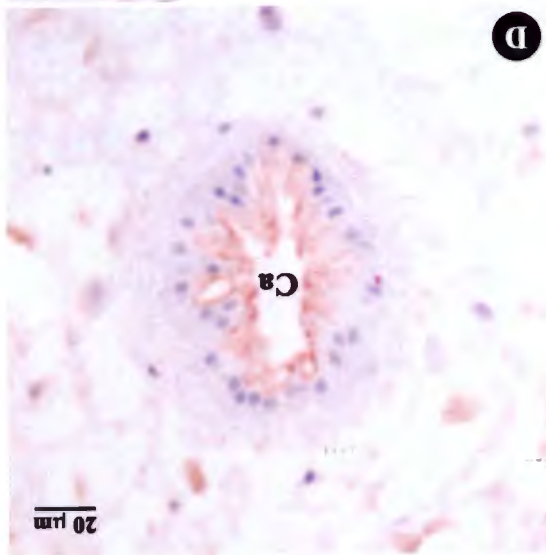
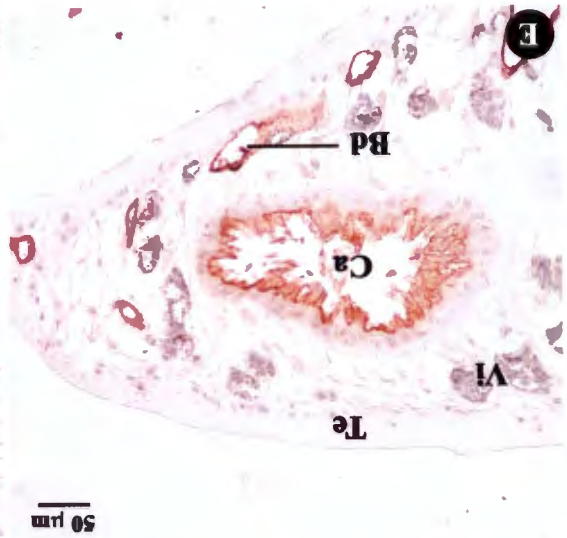
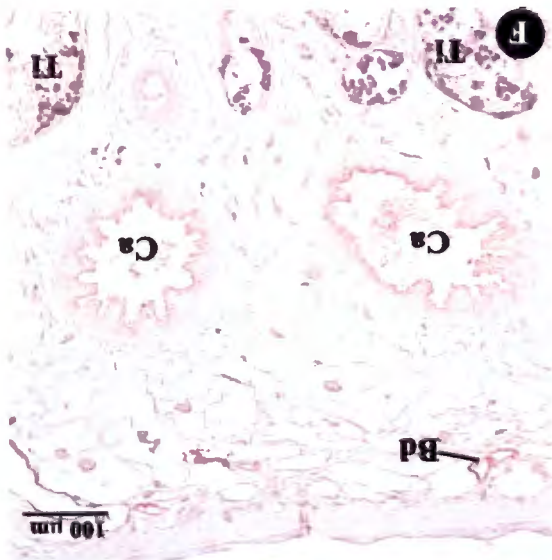


**B**



- ภาพที่ 14 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน caeca (Ca) พยาธิระยะตัวเต็ม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin
- A – B ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และปานกลาง (B) แสดงเซลล์เยื่อบุผิว esophagus (Es) ซึ่งไม่พบ การกระจายของเอนไซม์ LAP
- C – D ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ในแขนง recurrent branch ของ caecum (Ca) บริเวณส่วนหัวของพยาธิ ลักษณะสีแดงอย่างสม่ำเสมอบริเวณ luminal projection ส่วน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุ caecum มี LAP ค่อนข้างน้อย
- E ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ในในแขนง lateral branch ของ caecum (Ca) บริเวณด้านข้างลำตัวของพยาธิ ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มมากภายใน luminal projection และ cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุ caecum
- F ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ในแขนง medial branch ของ caecum บริเวณแนวกลางลำตัวของพยาธิ ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มปานกลางภายใน luminal projection และ cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุ caecum ซึ่งเหมือนกับใน แขนง recurrent branch ของ caecum

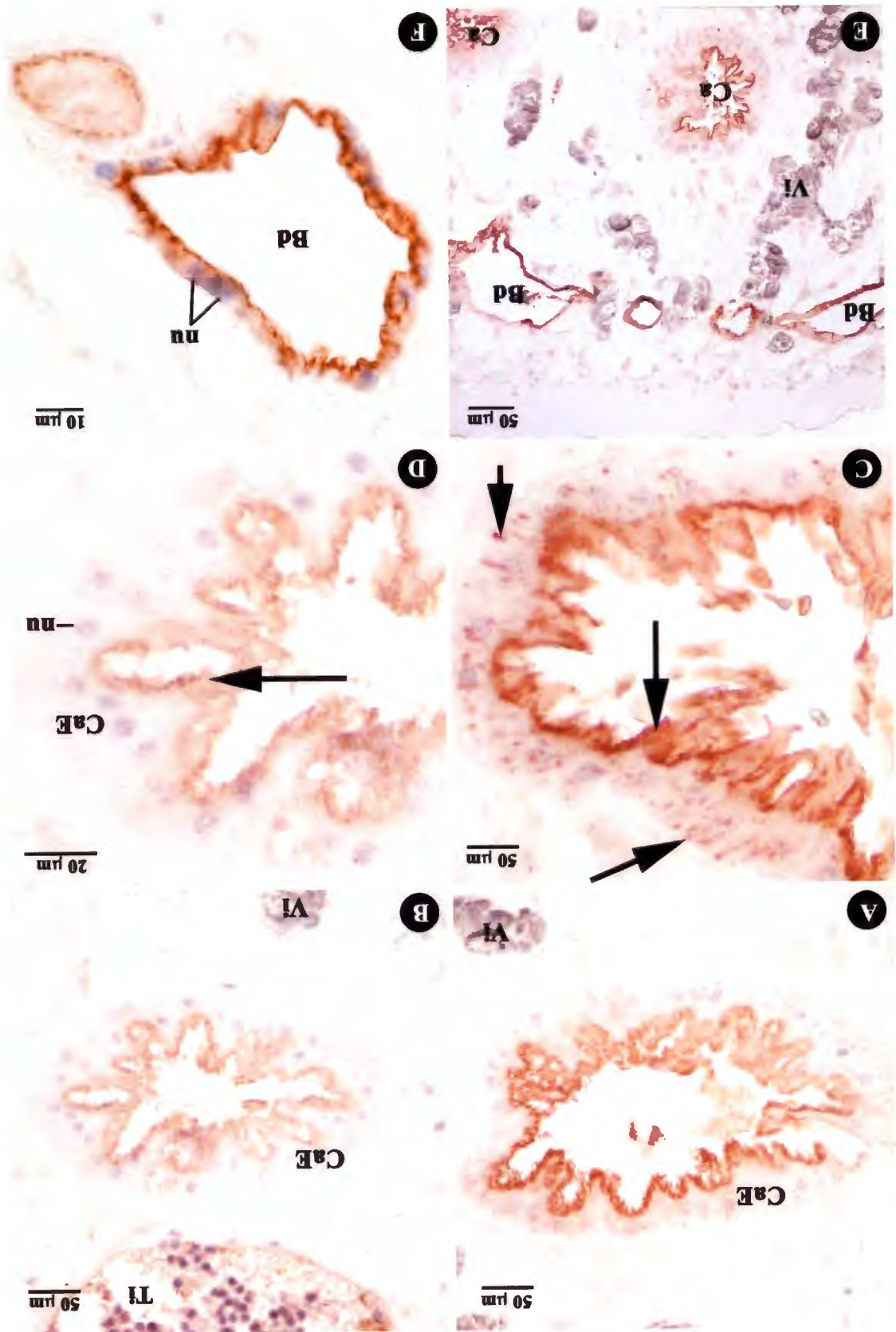
(Bd = bladder, Te = tegument และ Vi = vitelline gland)





- ภาพที่ 15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ในแขนง recurrent branch และ medial branch ของ caeca และ bladder พยาธิระยะตัวเต็ม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxin
- A, C ภาพกำลังขยายปานกลาง (A) และสูง (C) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน lateral branch ของ caecum (Ca) บริเวณแขนง บริเวณด้านข้างลำตัวของพยาธิ ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มมากภายใน luminal projection และใน granule (ลูกศร) ภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุ caecum (CaE)
- B, D ภาพกำลังขยายปานกลาง (B) และสูง (D) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน recurrent branch ของ caecum (Ca) บริเวณส่วนหัวของพยาธิ และ medial branch บริเวณด้านข้างลำตัวของพยาธิ ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มปานกลางภายใน luminal projection และใน granule (ลูกศร) ภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุ caecum (CaE)
- E - F ภาพกำลังขยายต่ำ (E) และสูง (F) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน bladder (Bd) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มมากบริเวณ luminal projection ซึ่งเข้มกว่าภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิว

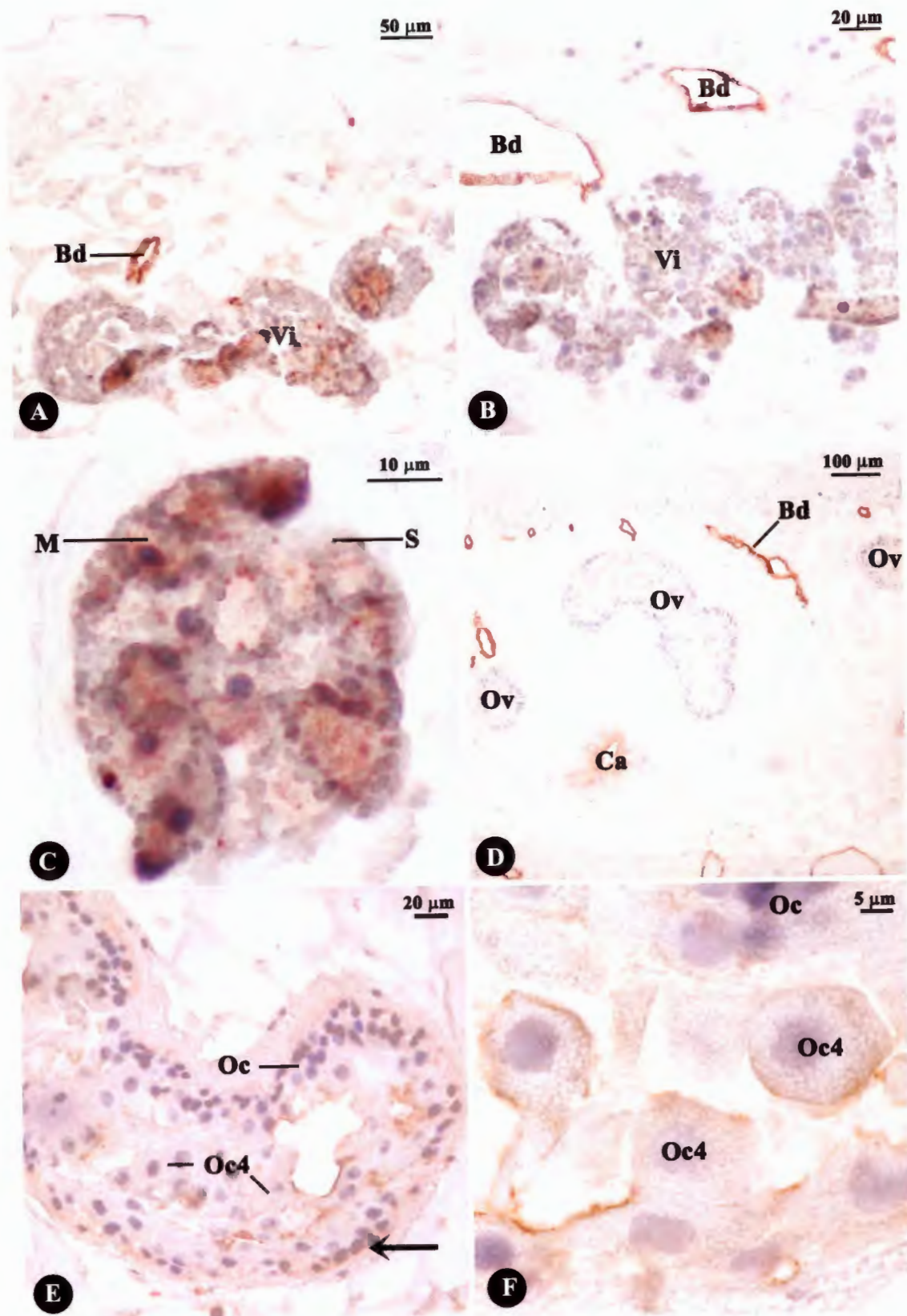
(nu = nucleus และ Vi = vitelline gland)



ภาพที่ 16 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน vitelline gland (Vi) และ ovary (Ov) ของพยาธิตัวเต็ม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin ใน

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

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

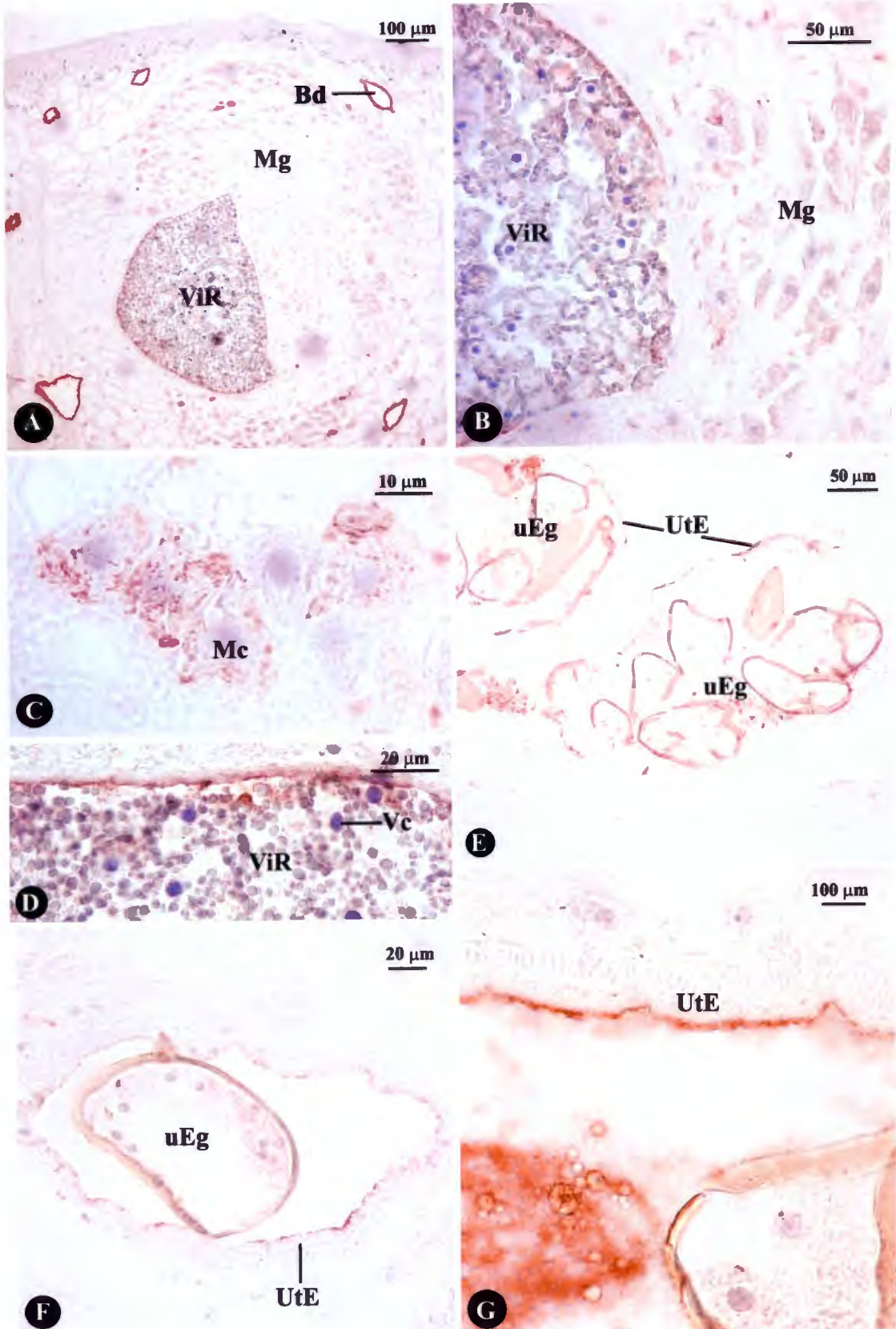


ภาพที่ 17 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน Mehlis' gland, vitelline reservoir และ uterus ของพยาธิระยะตัวเต็ม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin

A - D ภาพกำลังขยายต่ำ (A, B) และสูง (C, D) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP Mehlis' gland (Mg) และ vitelline reservoir (ViR) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มใน cytoplasm ของ Mehlis' gland cell (Mc) และใน mature vitelline cell (Vc)

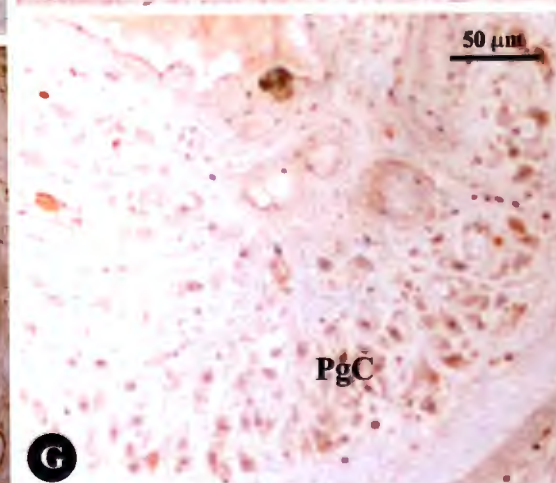
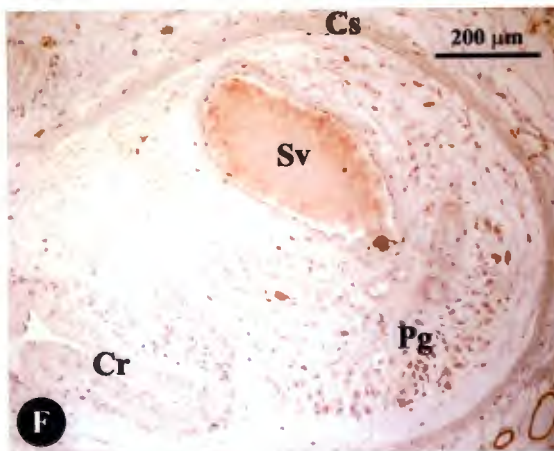
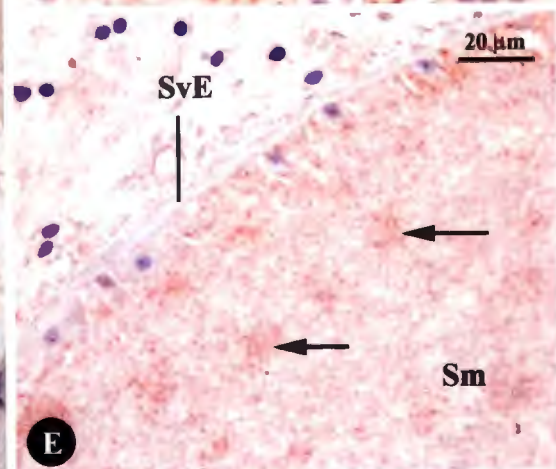
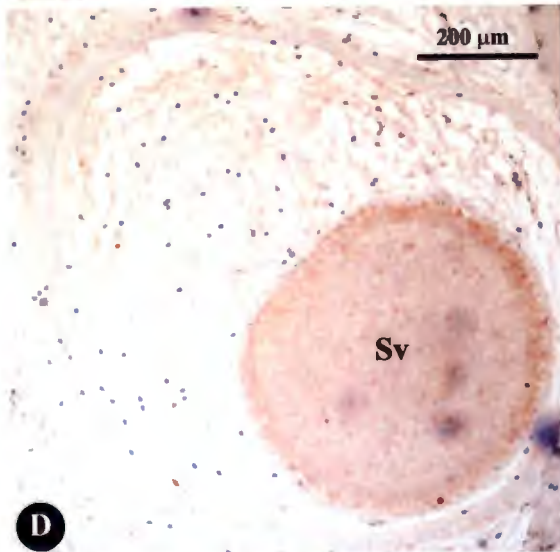
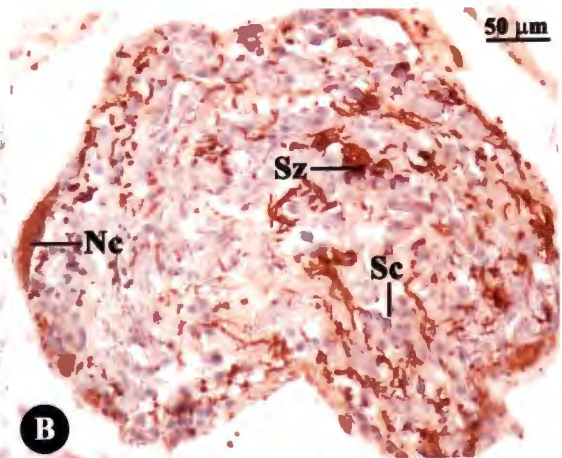
E - F ภาพกำลังขยายปานกลาง (E) และสูง (F) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ลักษณะเป็นแถบสีแดงเข้มบริเวณ luminal projection ของเซลล์เยื่อบุผิว uterus (UtE)

(uEg = unembryonated egg)



- ภาพที่ 18      ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน testis (Ti), seminal vesicle (Sv) และ prostate gland (Pg) ของพยาธิระยะตัวเต็ม และย้อมด้วยสี Mayer's haematoxilin
- A - C   ภาพกำลังขยายปานกลาง (A) และสูง (B, C) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน testis (Ti) ลักษณะเป็นแถบสีแดงเข้มมากบริเวณ spermatozoa (Sz) และภายใน nurse cell (Nc)
- D - E   ภาพกำลังขยายต่ำ (D) และสูง (E) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน seminal vesicle (Sv) ลักษณะเป็นแถบสีแดงเข้มมากบริเวณ spermatozoa (Sz) ภายใน seminal vesicle (Sv) และมีสีค่อนข้างน้อยภายในเยื่อบุผิว seminal vesicle (SvE)
- F - G   ภาพกำลังขยายต่ำ (F) และสูง (G) แสดงตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ LAP ใน prostate gland (Pg) ลักษณะเป็นจุดกลมสีแดงเข้มภายใน cytoplasm ของ prostate gland cell (PgC)

(Cr = cirrus และ Cs = cirrus sac)





## 7. วิจารณ์ผลการวิจัย

### 7.1 การผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ leucine aminopeptidase

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ LAP ขึ้นเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาลักษณะของ LAP ด้วยวิธี western immunoblotting โดยจะ immunized หนู rat ครั้งแรกด้วย porcine kidney LAP ที่ผสมกับ complete Freund's adjuvant (FCA) ทาง subcutaneous หลังจากนั้นอีก 2 และ 4 สัปดาห์ immunized ด้วย porcine kidney LAP ที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant หลังจากการ immunized ครั้งที่ 3 ประมาณ 1 สัปดาห์ เก็บเลือดจากหัวใจหนูจากการทดลองจะเห็นว่าค่า titer ของ serum หลังจาก first boosting และ second boosting ของหนูตัวที่ 2, 3 และ 5 มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักแต่ในหนูตัวที่ 6 จะแตกต่างกันเล็กน้อย และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูเพศเมีย (ตัวที่ 2, 3) กับหนูเพศผู้ (ตัวที่ 4, 5) ค่า titer ที่ได้ในหนูเพศเมียจะมีค่าสูงกว่าหนูเพศผู้เพราะหนูเพศเมียมีประสิทธิภาพในการทำงานของระบบ immune ดีกว่าในหนูเพศผู้ ทั้งนี้เนื่องจากฮอร์โมน estrogen ในหนูเพศเมียมีผลกระตุ้นให้ Th0 cell มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นชนิด Th 2 cell มากกว่า Th1 cell เป็นผลให้มีการสนองแบบ Th2 immune response มากกว่า Th1 immune response ทำให้หนูเพศเมียมีการผลิต antibody ที่ต้านต่อ LAP มากกว่าหนูเพศผู้

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า polyclonal antibody ที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับ porcine kidney LAP นอกจากนี้พบว่ายังมีปฏิกิริยา cross reaction กับ antigen ของ *F. gigantica* ได้ซึ่งน่าจะเป็น LAP เช่นเดียวกัน McCarthy ได้เปรียบเทียบความเหมือนกันของ LAP จากพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mansoni* (SmLAP) กับ LAP จากสิ่งมีชีวิต species อื่น ๆ พบว่า amino acid ทางด้าน C-terminal ของ SmLAP จะมีความเหมือนกับ LAP ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นค่อนข้างมาก ในขณะที่ปลายทางด้าน N-terminal จะค่อนข้างมีความจำเพาะ ซึ่งพบว่าด้าน C-terminal ของ LAP จะมีตำแหน่งของ amino acid ที่สามารถจับกับ Zn ได้ 2 ตำแหน่ง นอกจากนี้ยังมี consensus sequence คือ NTDAEGRAL ซึ่งเป็น active site ที่พบได้ใน LAP ทุกชนิดและน่าจะรวมถึง LAP ของ *F. gigantica* เช่นกัน เพราะฉะนั้น polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากการทดลองครั้งนี้จะมีปฏิกิริยา cross reaction กับบริเวณ C-terminal ของ *F. gigantica* LAP

### 7.2 Western immunoblotting

การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ LAP โดยการย้อมแผ่น PVDF ด้วย immunized rat serum พบว่า porcine kidney LAP ทำปฏิกิริยากับ immunized sera 2 แถบ คือที่น้ำหนักโมเลกุล 44 และ 56 kDa จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า immunized sera สามารถทำปฏิกิริยากับ LAP ของหมูได้ อย่างไรก็ตามแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 kDa ให้ผล negative กับ immunized rat serum ในขณะที่แถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 56 ซึ่งเป็น cytosolic porcine kidney LAP สามารถทำปฏิกิริยากับ immunized serum ได้ อย่างไรก็ตามแถบโปรตีนที่ 44 kDa ก็สามารถทำปฏิกิริยากับ immunized serum ได้เช่นกันน่าจะเนื่องมาจากมีการ degrade ของ LAP ที่น้ำหนักโมเลกุล 56 kDa ทำให้มีขนาดเล็กลง แต่ยังสามารถทำปฏิกิริยากับ immunized sera ได้

นอกจากนี้เมื่อนำ immunized sera ไปทำปฏิกิริยากับ antigen ต่าง ๆ ของ *F. gigantiga* พบแถบโปรตีน 3 แถบ ในระยะไซท์ที่น้ำหนักโมเลกุล 21, 22.5 และ 24 kDa ระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์พบแถบโปรตีน 3 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 24, 26.5 และ 33 kDa ระยะตัวเต็มวัยพบแถบโปรตีน 3 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 21, 22.5 และ 24 kDa TA พบแถบโปรตีน 5 แถบมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 20, 28, 33, 35 และ 46 kDa ES พบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ น้ำหนักโมเลกุล 24 kDa จากการทดลองจะเห็นได้ว่า polyclonal antibody (immunized rat sera) ที่ผลิตได้น่าจะสามารถทำปฏิกิริยากับ LAP ของพยาธิ *F. gigantiga* ได้ อย่างไรก็ตามแถบโปรตีนที่ได้จาก western immunoblotting มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่าการทดลองที่ผ่านมาค่อนข้างมาก ซึ่งการทดลองก่อนหน้าพบ LAP ของ *S. mansoni* ซึ่งสกัดด้วย 1% Triton-X มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 140 kDa ในขณะที่ LAP ของ *F. hepatica* ซึ่งสกัดด้วย deoxycholic acid มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 kDa จะเห็นได้ว่า LAP จากพยาธิทั้ง 2 ชนิด ถูกสกัดด้วย detergent แสดงให้เห็นว่า LAP จากพยาธิทั้ง 2 ชนิดเป็น LAP ที่จับอยู่กับ cell membrane แต่จากการทดลองในครั้งนี้ porcine kidney LAP ที่นำมา immunized หนู rat เป็น cytosolic LAP เพราะฉะนั้น LAP ที่พบจากการทดลองครั้งนี้จะเป็น cytosolic LAP เช่นเดียวกัน ซึ่งน่าจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างจาก membrane bound LAP

จากผลการทดลองพบว่าแถบโปรตีนที่พบในพยาธิทุกระยะมีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้น TA ซึ่งไม่พบแถบโปรตีนที่ 24 kDa และ ES ซึ่งพบเฉพาะแถบโปรตีนที่ 24 kDa เท่านั้น จากผลการทดลองเรื่อง immunolocalization พบว่ามี LAP ค่อนข้างมากภายในเยื่อบุผิวของ caecum และ bladder แต่ไม่พบใน tegument แสดงให้เห็นว่าจากการทดลองในครั้งนี้ น่าจะไม่สามารถตรวจพบ LAP ใน TA antigen ได้ เพราะฉะนั้นแถบโปรตีนที่พบในพยาธิ *F. gigantiga* จากการทดลองในครั้งนี้คือแถบโปรตีนที่ไม่พบใน TA antigen แสดงให้เห็นว่า PoAb จากการทดลองครั้งนี้จะสามารถทำปฏิกิริยากับ LAP ได้หลายค่าที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน จะเห็นว่า LAP ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้เป็น LAP family ซึ่งน่าจะประกอบด้วย LAP หลาย isotype ดังเช่นที่พบใน mammal นอกจากนี้แถบโปรตีนที่ 24 kDa พบได้ในพยาธิทุกระยะ แสดงว่าเป็น isotype ที่มีการสร้างในพยาธิทุกระยะ ส่วนแถบที่ 21 และ 22.5 kDa พบว่ามีความเข้มข้นมากใน antigen ของไซท์หรือ miracidium แต่ในระยะอื่นๆ พบน้อยมาก แสดงว่าแถบโปรตีนทั้งสองน่าจะเป็น miracidium specific LAP

อย่างไรก็ตามจากการทดลองสามารถพบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20, 28, 35 และ 46 kDa ใน TA antigen แต่ไม่พบ fraction อื่น ๆ ทั้งนี้เนื่องจาก TA เป็น antigen ที่ได้จากการ extract ด้วย detergent (Triton-X) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการทดลองใน *F.* และ *S. mansoni* ซึ่ง LAP มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 kDa และ 140 kDa ตามลำดับ เพราะฉะนั้นแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 46 kDa จากการทดลองครั้งนี้จะเป็น LAP ชนิด membrane bound ซึ่งไม่พบใน fraction ที่เป็น water soluble (EG, JU, WB, ES) ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าแตกต่างจากการทดลองเกี่ยวกับ LAP ของ *S. mansoni* ซึ่งพบ LAP ปริมาณมากบริเวณ oral sucker, gut รวมถึง tegument ของพยาธิตัวเต็มวัยและพบในพยาธิเพศเมียมากกว่าเพศผู้ ตำแหน่งของ LAP

ในพยาธิทั้ง 2 ชนิด แตกต่างกันเนื่องมาจาก *S. mansoni* ตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ในหลอดเลือด ซึ่งมีสารอาหารปริมาณมาก LAP ที่ tegument มีหน้าที่ในการย่อยอาหารบริเวณชั้นผิวก่อนที่จะมีการดูดซึมผ่านชั้นผิว ประกอบกับ cacum ของพยาธิกลุ่ม schistosome ไม่มีการแตกแขนงทำให้พื้นที่ผิวในการย่อยบริเวณ membrane ก่อนที่จะมีการดูดซึมมีค่อนข้างน้อย เพราะฉะนั้น tegument จึงเป็นบริเวณหลักที่ใช้ในการดูดซึมและย่อยสารอาหาร ส่วน *F. gigantica* อาศัยอยู่ใน bile duct ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสารอาหารน้อย ดังนั้น tegument จึงไม่จำเป็นในการย่อยอาหารบริเวณ membrane

ES ของ *F. gigantica* พบแถบโปรตีนที่ 24 kDa มีความเข้มมาก จากการทดลองที่ผ่านม พบว่า ES material ส่วนใหญ่จะมีการคัดหลั่งมาจากส่วน caecum tegument และ bladder ของพยาธิ ซึ่งสนับสนุนการทดลองเรื่อง immunolocalization ของการทดลองครั้งนี้ โดยพบ LAP ปริมาณมากในเนื้อเยื่อส่วน cacum และ bladder ของพยาธิ *F. gigantica* โดย LAP ที่หลั่งออกมา น่าจะมีหน้าที่ในการย่อยสารอาหารภายนอกเซลล์ ก่อนที่จะมีการดูดซึมต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนที่ 24 kDa ในพยาธิระยะต่างๆ พบว่า LAP ใน crude extract ของไข่มีความเข้มมากที่สุด รองลงมาคือตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ในขณะที่ WB มีความเข้มน้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่า LAP ถูกสร้างในปริมาณมากตั้งแต่ระยะไข่ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเรื่อง immunolocalization ของการทดลองครั้งนี้ที่พบ LAP ปริมาณมากใน hatching fluid ของ embryonated egg นอกจากนี้การศึกษาใน *S. mansoni* พบว่า hatching fluid ของไข่มี specific activity ของ LAP สูงกว่าระยะอื่น ๆ ของพยาธิเช่นกัน โดย LAP ดังกล่าวน่าจะมีหน้าที่ในการย่อยเปลือกของไข่ ก่อนที่จะมีการ hatching

ในขณะที่ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์มีปริมาณ LAP ลดลง เนื่องจากเมื่อตัวอ่อนของพยาธิเข้าสู่ host แล้ว LAP จะมีหน้าที่เพียงแค่อย่อยเนื้อเยื่อของ host ก่อนจะมีการดูดซึมผ่านทาง cacum เท่านั้น ซึ่งน่าจะทำงานร่วมกับเอนไซม์ตัวอื่น ๆ ที่พบใน caecum ได้แก่ เอนไซม์ Cat L และ Cat B

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอ่อน 4 สัปดาห์ และตัวเต็มวัยพบว่า LAP ในตัวอ่อน 4 สัปดาห์มีปริมาณมากกว่าตัวเต็มวัย เพราะในระยะตัวอ่อนต้องใช้ LAP ย่อยเนื้อเยื่อของ host และต้องการสารอาหารมากเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตในปริมาณมาก จึงต้องมี LAP มากกว่าระยะตัวเต็มวัยที่อาศัยอยู่ใน bile duct ซึ่งมีการย่อยเนื้อเยื่อของ host น้อยลงเมื่อเทียบกับตัวอ่อนที่กำลังพัฒนา

การทดลองในครั้งนี้ยังสรุปข้อมูลของ LAP ได้ไม่มากนักเนื่องจากยังมีข้อมูลบางอย่างที่ยังไม่ชัดเจน เช่น ทำไมน้ำหนักโมเลกุลจากการทดลองในครั้งนี้จึงน้อยกว่าการทดลองที่ผ่านมาก่อนข้างมาก และโปรตีนในสภาวะธรรมชาติมีน้ำหนักโมเลกุลเท่าไร ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้สามารถนำ antibody ที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์ในด้าน immunolocalization เพื่อหาตำแหน่งการกระจายตัวของ LAP ในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ที่ระยะต่าง ๆ ได้ และยังสามารถทำ screening cDNA library เพื่อให้ได้ sequence ของ LAP gene ซึ่งจะเป็นพื้นฐานในการศึกษา LAP ต่อไป

### 7.3 Immunolocalization

จากผลการทดลองพบว่าไข่พยาธิ *F. gigantica* ระยะ unembryonated eggs มี LAP ใน vitelline cells และบริเวณช่องว่างระหว่าง vitelline cell ส่วนระยะ embryonated eggs พบ LAP ภายใน egg solution รอบ ๆ ตัว miracidium และบริเวณเปลือกไข่ ในขณะที่ภายในตัว miracidium พบ LAP ค่อนข้างน้อย นอกจากนั้นยังพบอีกว่าความหนาแน่นของ LAP ใน fluid ของ embryonated egg มีมากกว่าใน unembryonated egg ทำให้คาดได้ว่า LAP น่าจะถูกปล่อยออกมาจาก miracidium ในปริมาณที่มากกว่าจาก vitelline cell จากการศึกษาเกี่ยวกับ ultrastructure ของ miracidium พบว่า ด้านหน้าสุดของลำตัวพบ apical gland ลักษณะเป็น flask-shaped ขนาดใหญ่ และจะส่งท่อไปเปิดที่ปลายของ apical papilla apical gland และต่อมเล็ก ๆ อีก 4 ต่อมทำหน้าที่สร้างและหลั่ง proteolytic enzyme ซึ่งคาดว่าน่าจะมี LAP เป็นองค์ประกอบ จากการศึกษาในพยาธิ *S. mansoni* พบ LAP มากใน hatching fluid และ egg homogenate โดยพบ LAP ชนิด membrane – bound และ water soluble เชื่อว่า LAP ในไข่พยาธิน่าจะทำหน้าที่ควบคุมความเข้มข้นของ bile salt ที่ผ่านเข้าออกไข่พยาธิในช่วงที่เกิดกระบวนการ hatching และอาจทำหน้าที่ย่อย egg protein ในช่วงการ hatching จากการศึกษาที่ผ่านมา ใช้ bestatin ยับยั้งการทำงานของ LAP พบว่าสามารถยับยั้งการ hatching ของไข่พยาธิ *S. mansoni* ได้ ซึ่ง LAP ที่พบใน vitelline cell และ hatching fluid ของพยาธิ *F. gigantica* นี้ น่าจะมีหน้าที่เช่นเดียวกัน ส่วนภายใน miracidium ที่พบ LAP น้อยมากน่าจะเกิดจาก secretion ที่สร้างจาก apical gland จะถูกหลั่งออกจากต่อมโดยไม่เก็บสะสมภายในต่อม จึงไม่พบ LAP ภายใน miracidium

จากการศึกษาดำแหน่งและการกระจายของ LAP ในทางเดินอาหารของพยาธิ *F. gigantica* พบ LAP ในเยื่อบุผิว caecum ของพยาธิระยะตัวอ่อน 4 สัปดาห์และตัวเต็มวัย ในขณะที่ไม่พบ LAP ในทางเดินอาหารส่วนต้น ได้แก่ oral sucker pharynx esophagus และ caecal bifurcation เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ LAP มีลักษณะเป็นจุดภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิว caecum ซึ่งเชื่อว่าน่าจะอยู่ใน zymogen granule นอกจากนั้นยังพบ LAP ปริมาณมากบริเวณ luminal projection ของเซลล์ ตำแหน่งที่พบ LAP ภายใน caecum สอดคล้องกับตำแหน่งของ LAP ที่พบในพยาธิ *S. mansoni*, *F. hepatica* และ *C. elegans* ซึ่งพบ LAP ภายใน zymogen granule เช่นกัน จึงเชื่อว่า LAP ภายใน zymogen granule จะถูกหลั่งเข้าสู่ caecal lumen ในขณะที่ LAP ที่พบบริเวณ luminal projection น่าจะเป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณ apical plasma membrane จากการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม พบว่า LAP บางชนิดมี ลักษณะเป็น integral membrane glycoprotein ซึ่งพบบริเวณ apical plasma membrane ของ enterocyte, kidney epithelial cell และ bile canaliculi โดย LAP ที่พบบริเวณ luminal projection จะถูกหลั่งเข้าสู่ lumen ทำหน้าที่ในการย่อย dipeptide เป็น mono-peptide ก่อนที่จะถูกดูดซึมเข้าเซลล์เยื่อบุผิว caecum จากการศึกษาเอนไซม์ภายใน zymogen granule พบว่าประกอบด้วย proteolytic enzyme หลายชนิด เช่นเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine protease (Cat L และ B) และเอนไซม์กลุ่ม metalloprotease (LAP) เป็นต้น จากการศึกษา Cat L ในพยาธิ *S. mansoni*, *F. hepatica* และ *F. gigantica* เชื่อว่าทำหน้าที่ย่อย hemoglobin ภายในเม็ดเลือดแดงของ host ย่อยเนื้อเยื่อขณะไชผ่าน host ย่อยอาหาร

เกี่ยวข้องกับ การสร้างเปลือกไข่ เกี่ยวข้องกับ host immune invasion โดยยับยั้งการจับของ antibody จาก eosinophil และจากเซลล์อื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันของ host และทำลาย fibrinogen เพื่อลดการเกิด fibrin clot ในช่วงที่พยาธิไชผ่านเนื้อเยื่อของ host จากการศึกษา Cat B ในพยาธิ *S. mamsoni* ตัวเต็มวัย *F. hepatica* และ *F. gigantica* เชื่อว่าทำหน้าที่ย่อย hemoglobin ของ host เพื่อเป็นอาหาร host-immune invasion ย่อยเนื้อเยื่อของ host เพื่อไชเข้าอวัยวะต่าง ๆ ช่วยในกระบวนการสร้างไข่และ sperm ช่วยสร้างสารตั้งต้นของ egg shell protein และ glycogen ใน vitelline cell และช่วยในการปฏิสนธิเนื่องจาก acrosomal enzyme มี Cat B เป็นส่วนประกอบ

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ LAP ระหว่าง caecum ในแต่ละบริเวณ พบว่า main caecum แขนงส่วนต้นของ main caecum และ caecum บริเวณ oral cone มี LAP น้อยกว่าแขนงส่วนปลาย จากการศึกษา caecum ของพยาธิ *F. hepatica* พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวของแขนง proximal กับ distal ของ caeca แตกต่างกันคือแขนง distal พบ secretory granule ภายใน cytoplasm บริเวณฐานและส่วนยอดของเซลล์จำนวนมากแต่ในแขนง proximal พบ secretory granule ภายใน cytoplasm น้อยกว่า จากความแตกต่างดังกล่าวทำให้หน้าที่ของ caeca ทั้ง 2 บริเวณต่างกัน โดยแขนง proximal ทำหน้าที่หลักในการบีบตัวเพื่อให้อาหารเคลื่อนที่ผ่านไปมา โดยมีการย่อยและ ดูดซึมค่อนข้างน้อย ส่วนแขนง distal จะทำหน้าที่ย่อยและดูดซึมเป็นหลัก ซึ่งพบว่าการย่อยมี 2 แบบ คือ exodigestion คือการย่อยสารอาหารภายใน caecal lumen โดย LAP ที่ luminal surface และ proteolytic enzyme อื่น ๆ ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เยื่อบุผิว caecum เพื่อย่อยอาหารก่อนที่จะดูดซึมเข้าภายในเซลล์เยื่อบุผิว และแบบที่ 2 คือ endodigestion เป็นการย่อยอาหารภายในเซลล์ โดยอาหารจะถูก endocytosis เข้าสู่ cytoplasm ในรูปของ food vesicle ก่อนแล้วรวมกับ lysosome ซึ่งน่าจะมีเอนไซม์ LAP อยู่ภายใน ได้เป็นสารโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถซึมผ่าน vesicle เข้าสู่ cytoplasm ได้

ระบบขับถ่ายของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยและพยาธิตัวอ่อน 4 สัปดาห์ พบ LAP บริเวณ luminal projection และใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิว bladder โดย bladder แต่ละบริเวณพบ LAP หนาแน่นใกล้เคียงกัน จากการศึกษาใน *F. hepatica* พบว่าเซลล์เยื่อบุผิว bladder เป็นชนิด syncytium โดยมี apical lamella ยื่นเข้าภายใน lumen ทำหน้าที่ขับถ่ายของเสียจากกระบวนการ metabolism เช่น ammonia, urea, amino acid และไขมัน รวมทั้งการดูดกลับสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต โดยทั้งกระบวนการขับถ่ายและดูดกลับสารต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ phosphatase ดังนั้น LAP ที่พบในเซลล์เยื่อบุ bladder ของ *F. gigantica* น่าจะอยู่ในรูปของ membrane bound form ซึ่งพบได้บริเวณ luminal projection และ cytosolic form ซึ่งพบภายใน cytoplasm อาจจะทำหน้าที่ในกระบวนการขับถ่ายของเสียหรือดูดกลับสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพยาธิ และอาจทำงานร่วมกับเอนไซม์ acid phosphatase และ alkaline phosphatase

ระบบสืบพันธุ์เพศเมียพบ LAP ได้ในเกือบทุกอวัยวะ ได้แก่ vitelline gland, vitelline reservoir, ovary, Mehlis' gland และ uterus โดยที่ภายใน vitelline cell พบ LAP เฉพาะใน cytoplasm ของเซลล์ในระยะ mature ที่อยู่ใน vitelline gland, vitelline duct, vitelline reservoir และภายใน unembryonated egg แต่ไม่พบใน egg shell globule, nucleus และ vitelline cell ระยะ

อื่น ๆ และจากการศึกษา vitelline gland ของพยาธิ *F. hepatica* พบว่า mature vitelline cell ประกอบด้วย shell protein globule, glycogen granule, yolk material ซึ่ง shell globule จะต้องถูกกระตุ้นจาก Mehlis' gland ให้เกิดการหลั่งสารที่อยู่ภายในออกไปล้อมรอบ ๆ กลุ่มของ ovum และ vitelline cell ขณะมีการสร้างเปลือกไข่และจะถูก modify โดยเอนไซม์ phenol oxidase ที่อยู่ใน globule เอง ทำให้เกิดการ polymerization ของ shell protein ซึ่ง LAP ภายใน cytoplasm อาจจะมีส่วนช่วยในกระบวนการสร้างเปลือกไข่

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

Mehliss' gland พบ LAP ภายใน cytoplasm ของ Mehliss' gland cell ลักษณะเป็นจุดอยู่ภายใน cytoplasm รวมทั้ง process ของเซลล์ที่ยื่นเข้าไปภายใน ootype จากการศึกษา Mehliss' gland cell ในพยาธิ *F. hepatica* พบว่า ประกอบด้วย secretory cell 2 ชนิด โดยเซลล์ชนิดแรกจะสร้าง mucus secretion และเซลล์ชนิดที่ 2 สร้าง serous secretion ซึ่งประกอบด้วย protein เป็นหลัก ดังนั้น LAP ที่พบใน Mehliss' gland cell น่าจะเป็นองค์ประกอบของ secretion ดังกล่าว นอกจากนี้จากการทดลองที่ผ่านมายังสามารถตรวจพบเอนไซม์ Cat L ใน Mehliss' gland cell ซึ่งจะหลั่งเข้าสู่ ootype เช่นกัน secretion ที่หลั่งออกจาก Mehliss' gland cell มีหน้าที่ปรับสภาพ pH ภายใน ootype ให้เป็นเบสเพื่อให้ shell protein globule สามารถรวมตัวกันได้ นอกจากนั้นยังกระตุ้นการหลั่งสารออกจาก shell protein globule และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Cat L และ LAP น่าจะสามารถกระตุ้นกระบวนการ quinone - tanning process โดยทำหน้าที่ cleave-vitelline protein ที่หลั่งจาก vitelline cell

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

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ พบ LAP ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ testis พบ LAP หนาแน่นมากภายใน head ของ spermatozoa แต่ไม่พบในส่วน tail เซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatogonia spermatocyte และ spermatid จากการศึกษายพยาธิ *F. gigantica* พบว่า spermatozoa ไม่มี acrosome

เพราะฉะนั้น LAP น่าจะอยู่ในรูป membrane – bound form ซึ่งน่าจะทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ fertilization โดยอาจจะ modulate protein บริเวณผิว ovum ในช่วง fertilization

Seminal vesicle พบ LAP ภายใน spermatozoa บริเวณ luminal projection และภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อผนัง seminal vesicle จากการศึกษาดังกล่าว seminal vesicle ของพยาธิ *F. hepatica* พบว่าทำหน้าที่สร้างและหลั่ง lucid secretion ในรูปของ lucid secretory granule เข้าสู่ lumen เพื่อเป็นอาหารของ spermatozoa ดังนั้น LAP ที่พบในเซลล์เยื่อผนัง seminal vesicle น่าจะทำหน้าที่ modify secretory granule ก่อนที่จะหลั่งเข้าไปภายใน seminal vesicle นอกจากนี้ยังพบว่า reproductive tract ของพยาธิสามารถ endocytose sperm ที่อ่อนแอเพื่อทำลายภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อผนัง ซึ่ง LAP น่าจะพบใน lysosome ของเซลล์แล้วทำหน้าที่ย่อย sperm ที่อ่อนแอดังกล่าว

Cirrus sac พบ LAP ภายใน cytoplasm ของ parenchymal cell ภายใน cirrus sac จากการศึกษาดังกล่าว cirrus sac ของพยาธิ *F. hepatica* พบว่า parenchymal cell รอบ ๆ cirrus sac จะเชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์เยื่อผนัง seminal vesicle กับ cirrus sac ซึ่งน่าจะพบ LAP อยู่ในรูป cytosolic LAP และอาจทำหน้าที่การขนส่งสารอาหารจาก cirrus sac ไปยัง seminal vesicle และ sperm ต่อไป

Prostate gland พบ LAP ใน cytoplasm ของ prostate gland cell ทั่วทั้ง gland จากการศึกษาดังกล่าว *F. hepatica* พบว่า prostate gland ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดทำหน้าที่สร้างและหลั่ง lucid secretion ในรูปของ lucid secretion granule เพื่อกระตุ้นและเป็นอาหารของ spermatozoa ดังนั้น *F. gigantica* LAP ที่พบใน cytoplasm ของ prostate gland cell น่าจะมีหน้าที่เกี่ยวกับกลไกการ cleave โมเลกุลของสารที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้น sperm หรือสารอาหารของ sperm ที่หลั่งมาจาก prostate gland cell เช่นเดียวกับที่พบใน seminal vesicle

## 8. สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสามารถผลิต polyclonal antibody ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ LAP ของหมู และ LAP ของพยาธิ *F. gigantica* ได้ และเมื่อนำ polyclonal antibody ที่ได้ไปศึกษาลักษณะของ LAP ใน antigen ชนิดต่างๆ ของ *F. gigantica* โดยวิธี western immunoblotting สามารถตรวจสอบ molecular weight ของ LAP ในแต่ละระยะของ *F. gigantica* ได้คือ ใน egg antigen พบโปรตีนที่ให้ผลบวกทั้งหมด 3 แถบ ได้แก่ที่น้ำหนักโมเลกุล 21, 22.5, 24 kDa โดยแถบที่เข้มที่สุดคือที่น้ำหนักโมเลกุล 21 และ 22.5 kDa พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์พบโปรตีนที่ให้ผลบวกทั้งหมด 3 แถบ ได้แก่ที่น้ำหนักโมเลกุล 24, 26.5, และ 33 kDa โดยทั้ง 3 แถบติดสีค่อนข้างน้อย พยาธิตัวเต็มวัยพบโปรตีนที่ให้ผลบวกทั้งหมด 3 แถบ ได้แก่ที่น้ำหนักโมเลกุล 21, 22.5 และ 24 kDa โดยทั้ง 3 แถบติดสีค่อนข้างน้อย tegumental antigen พบโปรตีนที่ให้ผลบวกทั้งหมด 5 แถบ ได้แก่ที่น้ำหนักโมเลกุล 20, 28, 33, 35 และ 46 kDa โดยทั้ง 5 แถบติดสีค่อนข้างน้อย excretory-secretory antigen พบโปรตีนที่ให้ผลบวกเพียง 1 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 24 kDa ซึ่งติดสีเข้มค่อนข้างมาก และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของการติดสีของแถบโปรตีนระหว่างแอนติเจน

แต่ละชนิดโดยพิจารณาที่น้ำหนักโมเลกุลเดียวกันคือที่ 24 kDa พบว่า ES มีโปรตีนมากที่สุด รองลงมาคือ EG JU และ WB ตามลำดับ แต่ไม่พบใน TA

จากผลการศึกษาและบทอภิปรายผลดังกล่าวข้างต้น สรุปได้ว่า LAP ที่พบในพยาธิ *F. gigantica* น่าจะมี 3 แบบ คือ membrane - bound LAP ซึ่งสามารถพบได้บริเวณ luminal projection ของเซลล์เยื่อบุผิว caecum, bladder และ reproductive tract ต่าง ๆ ซึ่งน่าจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการย่อยสลายก่อนทำการดูดซึมเข้าสู่ cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิวของอวัยวะข้างต้น แบบที่ 2 คือ cytosolic LAP สามารถพบได้ใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิว caecum, bladder และ reproductive tract ต่าง ๆ โดยอาจทำหน้าที่ในการ modify โมเลกุลของสารให้อยู่ในรูป active form ก่อนที่จะหลั่งออกจากเซลล์ และแบบที่ 3 คือ vesicular form ซึ่งพบได้ใน lysosome โดยมีหน้าที่เกี่ยวกับการ endocytose หรือหลั่งเข้าไปภายใน lumen อย่างไรก็ตามเพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว จำเป็นต้องทำการศึกษาดำเนินการและการกระจายของ LAP ในระดับ ultrastructure ต่อไป

## 9. เอกสารอ้างอิง

1. Sukhapesna V, Tantasuvan D, Sarataphan N, Imsup K. (1989). A study on the prevalence of liver fluke infection in cattle and buffaloes in Thailand. J Thai Vet Med Assoc; 40(1-2): 13-19 (in Thai).
2. Boray JC. (1988). Flukes of domestic animal. In: Gaafar SM, Howard WE, Marsh RE, editors. Parasites, pests and predators. New York; Elsevier, 179-218.
3. วัฒนา แสงวงกิจ. (2533). Clinical Syndrome of Fascioliasis. ใน : วัฒนากการในโรคระบบทางเดินอาหาร 6. กรุงเทพฯ : กรุงเทพมหานคร, 183-206.
4. Kachintorn, V, Atisook K, Tesjaroen S, Lertakyamanee N, Plengvanit U. (1988). *Fasciola gigantica*: the second case of human infection in Thailand. J Med Assoc Thailand ; 71(8): 451-455.
5. Srihakim S, Pholpark M. (1991). Problem in fascioliasis in animal husbandary in Thailand (review). Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth; 22 suppl: 352-355.
6. Togerson P. Clextion J. (1998). Epidemiology and control. In: Dalton JP editor. Fasciolosis. Cambridge: CABI Publishing; 113-139.
7. วิจิตร สุขเพขน์, ดรุณี ทันทสุวรรณ, นพพร ศรารพันธ์, กิ่งดาว อิมทรัพย์. (2532). การศึกษาอัตราการเกิดพยาธิใบไม้ตับของโคและกระบือในประเทศไทย. สัตวแพทยสาร, 13-19.
8. วันชัย มาลีวงศ์, ผิวพรรณ มาลีวงศ์, นิमित มรกต. (2544). ปรสตีวิทยาทางการแพทย์: โปรโตซัวและหนอนพยาธิ. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คณังนาวิทยา, 198-207.
9. วิฑูรย์ ไวยนันท์. (2540). ปรสตีวิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพฯ : ศักดิ์โสภการพิมพ์ , 257-290.



10. Espino AM, Marcet R and Finlay CM. (1990). Detection of circulating excretory secretory antigens in human with fascioliasis by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 28: 2637-40.
11. Espino AM and Finlay CM. (1994). Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in human with fascioliasis. *J Clin Microbiol*, 32: 190-3.
12. Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, von Orelli M, Sarasin G. (1983). Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infection in sheep with triclabendazole. *Vet Rec*;113:315-7.
13. Sanyal PK. (1995). Kinetic disposition of triclabendazole in buffalo compare to cattle. *J Vet Pharmacol Theraps*; 18: 370-374.
14. Haroun ET, Hillyer GV. (1986). Resistance to fascioliasis. A review. *Vet Parasitol*; 20:63-93.
15. Yoshihara S, Nakagawa M, Suda H. (1985). Protection against *Fasciola gigantica* infection in rats administered metacercarial antigens *Res Vet Sci* ; 39:383-4.
16. Estuningsih SE, Smooker PM, Wiedosati E, Widjajanti S, Vaiano S, Partoutomo S, Spithill TW. (1997) .Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolososis in cattle. *Int J Parasitol*; 27:1419-28.
17. Tendler M, Brito CFA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diago CM, Almeida MS, et al. (1996). A *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc Natl Acad Sci*; 93: 269-73.
18. Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, et al. (1990). Glutathione S-transferase novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol*; 145: 3905-10.
19. Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, et al. (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* ;14(17-18):1603-12.
20. Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, et al. (1994). Vaccination of sheep with purified cystein proteinases of *Fasciola hepatica* decrease worm fecundity. *Exp Parasitol*; 78: 132-48.

21. Spithill TW, Dalton JP. (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol Today* ; 14(6): 224-8.
22. Bennett CE. (1978). The identification of soluble adult antigen on the tegumental surface of juvenile *Fasciola hepatica*, *Parasitol* ,77: 325-32.
23. Behm CA, Sangster NC. (1999). Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Dalton JP, editor. *Fasciolosis*. Cambridge; CABI, 185-217.
24. Sobhon P, Anantavara S, Dangprasert T, Viyanant V, Krailas D, Upatham ES, et al. (1998). *Fasciola gigantica*: studies of the tegument as a basis for the development of immunodiagnosis and vaccine. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth*; 29(2): 387-400.
25. Sobhon P, Dangprasert T, Chuanchaiyakul S, Meepool A, Khawsuk W, Wanichanon C, et al. (2000) . *Fasciola gigantica*: ultrastructure of the adult tegument. *Sci Asia*; 26: 137-48.
26. Sriburee S. (2000). Characterization of epithelial cells and the expression of cathepsin L gene in the digestive tract of *Fasciola gigantica*. [M.Sc. Thesis]. Bangkok: Mahidol University.
27. Dalton JP, Heffernan M. (1989). Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parsitol*; 35: 161-6.
28. McKerrow JH. (1981). Parasite proteases. *Exp Parasitol* ; 68:111-5.
29. Tort J, Brindely PJ, Knox D, Wolfe KH, Dalton JP. (1999). Proteinases and associated genes of parasitic helminthes. *Adv Parasitol*; 43:L161-266.
30. Kirschke H, Langner J, Riemann S, Wiederanders B, Ansorge S, Vaiano S, Bohley p.(1979). Lysosomal cystein proteinases. In: *Protein degradation in health and disease*. Ciba Found Symp ; 75:15-35.
31. Katunuma N, Kominami E. (1983). Structure and function of lysosomal thiol proteinases and their endogenous inhibitors. *Curr Top Cell Regul* ; 22:71-101.
32. Bando Y, Kominami E, Katunuma N. (1986). Purification and tissue distribution of cathepsin L. *J. Biochem*, 100:35-42.
33. Maki J Yanagisawa T. (1989). Demonstration of carboxyl and thiol protease activities in adult *Schistosoma mansoni*, *Dirofilaria immitis*, *Angiostrongylus cantonensis*, and *Ascaris suum*. *J Helminthol* ; 60:131-7.

34. Chapman CB, Mitchell GF. (1982). Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*; 11: 165-78.
35. 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.
36. Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP. (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol*; 62: 9-18.
37. <http://bssv01.lancs.ac.uk/Stuwork/BIOS31698/LeuAmPep/contents.h...>
38. Wallner BP, Hession C, Tizard R, Frey AX, Zuliani A, Mura C, Jahngen-Hodge J and Taylor A. Isolation of bovine kidney leucine aminopeptidase cDNA: comparative with the lens enzyme and tissue-specific expression of two mRNA. *Biochem* 1993; 32: 9296-9031.
39. Ahmad S, Ward PE. Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 643-50.
40. Taylor WL, Dixon JE. Characterization of pyro glutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 1978; 253: 6934-40.
41. Nyberg F, Thornwall M, Hetta J. Aminopeptidase in human CSF which degrades delta-sleep inducing peptide (DSIP). *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 67: 1256-62.
42. Squire CR, Talebian M, Menon JG, Dekryff S, Lee TD, Shively JE, et al. Leucine aminopeptidase-like activity in Aplysia hemolymph rapidly degrades biologically active  $\alpha$ -bag cell peptide fragment. *J Biol Chem* 1991; 266: 22355-62.
43. Botbol V, Scornik OA. Measurement of instant rates of protein degradation in the livers of intact mice by the accumulation of bestatin-induced peptides. *J Biol Chem* 1986; 266: 2151-7.
44. Watt VM, Yip CC. Amino acid sequence deduced from a rat kidney cDNA suggests it encodes the Zn-peptidase aminopeptidase N. *J Biol Chem* 1989; 264: 5480-7.
45. Stirling CJ, Colloms SD, Collin JF, Szatmari G, Sherrat DJ, xer B, an *Escherichia coli* gene required for plasmid ColE1 site-specific recombination, is identical to pep

- A, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens leucine aminopeptidase. *EMBO J* 1989; 8: 1623-7.
46. Lenz CJ, Riu WC, McKintosh AH, Chippendale GM, Schubert KR. Proteinases of larvae of the corn earworm *Heliothis zea*: characterization, distribution and dietary relationships. *Arch Insect Biochem Physiol* 1991; 16: 201-12.
47. Ferreira C, Terra WR. Spatial organization of digestion, secretory mechanisms and digestion properties in *Pheropsis aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae). *Insect Biochem* 1989; 19: 383-7.
48. Houseman JG, Downe AER. Identification and partial characterization of digestive proteinases from *Triatoma phyllsoma pallidipennis* Stal (Hemiptera: Reduviidae). 1981; 29: 141-6.
49. Smith EL and Hill RL. *Enzymes*, 2 ed. 4A 37-62.
50. <http://calzyme.com/catalog/leucamin.html>
51. Ledeme N, Hennon G, Vincent-Fiquet O and Plaquet R. Purification and enzymatic properties of an L-leucine aminopeptidase from swine liver. *Biochim Biophys Acta* 1981; 660: 262-270.
52. Burley SK, David PR, Taylor A and Lipscomb WN. Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6878-6882.
53. Barrett AJ. Classification of peptidases. *Method in Enzymol* 1994; 244: 1-15.
54. Nakanishi Y, Nomura S, Okada M, Ito T, Katsumata Y, Kikkawa F, Hattori A, Tsujimoto M and Mizutani S. Immunoaffinity purification and characterization of native placental leucine aminopeptidase/oxytocinase from human placenta. *Placenta* 2000; 21: 628-634.
55. Ito N, Nomura S, Iwase A, Ito T, Ino K, Nagasaka T, Tsujimoto M, Kobayashi M and Mizutani S. Ultrastructural localization of aminopeptidase A/angiotensinase and placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in chorionic villi of human placenta. *Early Human Development* 2003; 71: 29-37.
56. Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, and Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest* 1989; 83: 1299-1307.

57. Olsen J, Cowell GM, Konigsofer E, Danielsen M, Moller J, Laustsen L, Hansen OC, Welinder K, Engberg J, Hunziker W, Spiess M, Sjostrom H, and Noren O. Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. FEBS Lett. 1998;238:307-314.
58. Roman LM and Hubbard AL. A domain-specific marker for the hepatocyte plasma membrane II ultrastructural localization of leucine aminopeptidase to the bile canalicular domain of isolated rat liver plasma membranes. J Cell Biol 1984; 98: 1488-1496.
59. Schauder B, Schomburg L, Kohler J, and Bauer K. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994;91:9534-9538.
60. Costam DB, Tobler AR, Resing-Ehl A, Kemler I, Hersh LB, and Fontana A. Puromycin-sensitive aminopeptidase: sequence analysis, expression, and functional characterization. J Biol Chem 1995;270:26931-26939.
61. Funk CD, Radmark O, Fu JY, Matsumoto T, Jornvall H, Shimizu T, and Samuelsson B. Molecular cloning and amino acid sequence of leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987;84:6677-6681.
62. Oda MN, Scott SV, Hefner-Gravink A, Caffarelli AD, Klionsky DJ. Identification of a cytoplasm to vacuole targeting determinant in aminopeptidase I. J Cell Biol 1996; 132: 999-1010.
63. Cadel S, Foulon T, Viron A, Balogh A, Midol-Monnet S, Noel N and Cohen P. Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:2963-2968.
64. Fukasawa KY, Fukasawa K, Kanai M, Fujii S, and Harada M. Molecular cloning and expression of rat liver aminopeptidase B. J Biol Chem 1996;271: 30731-30735.
65. Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S and Tomoda Y. Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. J Biol Chem 1996; 271: 56-61.
66. Joshua GWP. Functional analysis of leucine aminopeptidase in *Caenorhabditis elegans*. Mol Biochem Parasitol 2001; 113: 223-32.
67. Auriault C, Pierce R, Cesari IM, Capron A. Neutral protease activities at different development stages of *Schistosoma mansoni* in mammalian hosts. Comp Biochem Physiol B 1982; 72: 377-84.

68. Xu YZ, Dresden MH. Leucine aminopeptidase and hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. J Parasitol 1986; 72: 507-11.
69. Cesari IM, Auriault C, Capron A. Aminopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 1983; 69: 280-4.
70. Xu YZ, Shawar SM, Dresden MH. *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of a membrane-associated leucine aminopeptidase. Exp Parasitol 1990; 70: 124-33.
71. Acosta D, Goni F, Carmona C. Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. J Parasitol 1998; 84: 1-7.
72. Fripp PJ. The histochemical localization of leucine aminopeptidase in *Schistosoma rodhani*. Comp Biochem Physiol 1967; 20: 307-309.
73. Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C. (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induce high levels of protection against fasciolosis in sheep. Infect Immunol ; 67: 1954-61.

#### 10. ปัญหาและอุปสรรค

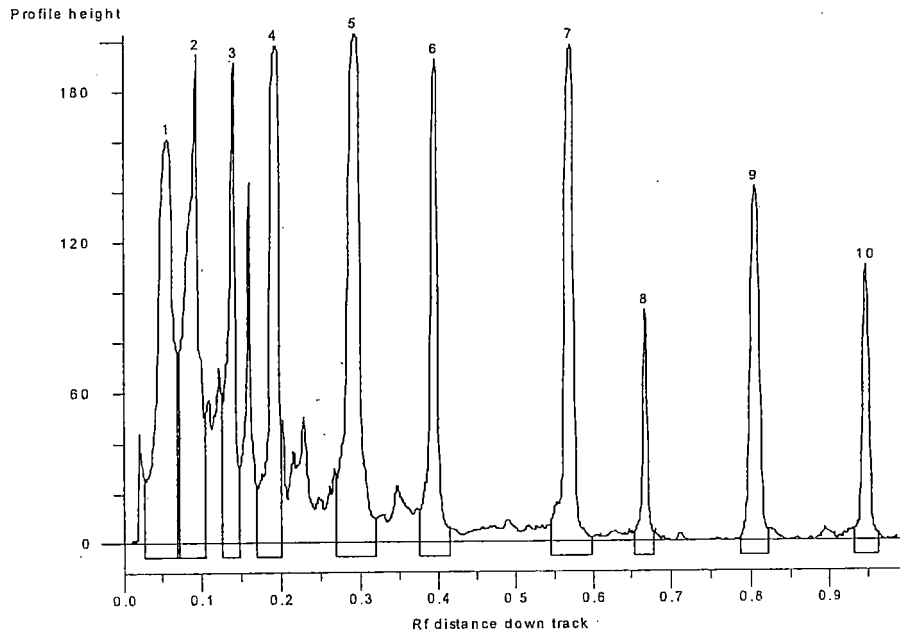
จากโครงการวิจัยในแบบเสนอขอทุนวิจัยประเภทเงินรายได้ ปี 2547 นักวิจัยได้วางแผนทำการทดลองการศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ LAP ในระดับ ultrastructure ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) แต่เนื่องจากตลอดระยะเวลาที่ผ่านมากล้อง TEM ของศูนย์ปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเล็กตรอน คณะวิทยาศาสตร์ ไม่อยู่ในสภาวะที่ให้บริการได้เป็นระยะเวลานาน กอปรกับผู้วิจัยมีภาระงานสอนมากขึ้นตลอดระยะเวลา 2 ปีที่ผ่านมา และเล็งเห็นแล้วว่าผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เพียงพอสำหรับการตีพิมพ์ จึงได้ตัดการทดลองในส่วนการศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ LAP ในระดับ ultrastructure ออกไป อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังคงวางแผนที่จะทำการทดลองในส่วน ultrastructure ต่อไปในอนาคตเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

## ภาคผนวก

1. กราฟและตารางแสดงน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มของแถบโปรตีนที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วย Gene Tools Program

1. SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยวิธี Silver staining

1.1 Standard marker

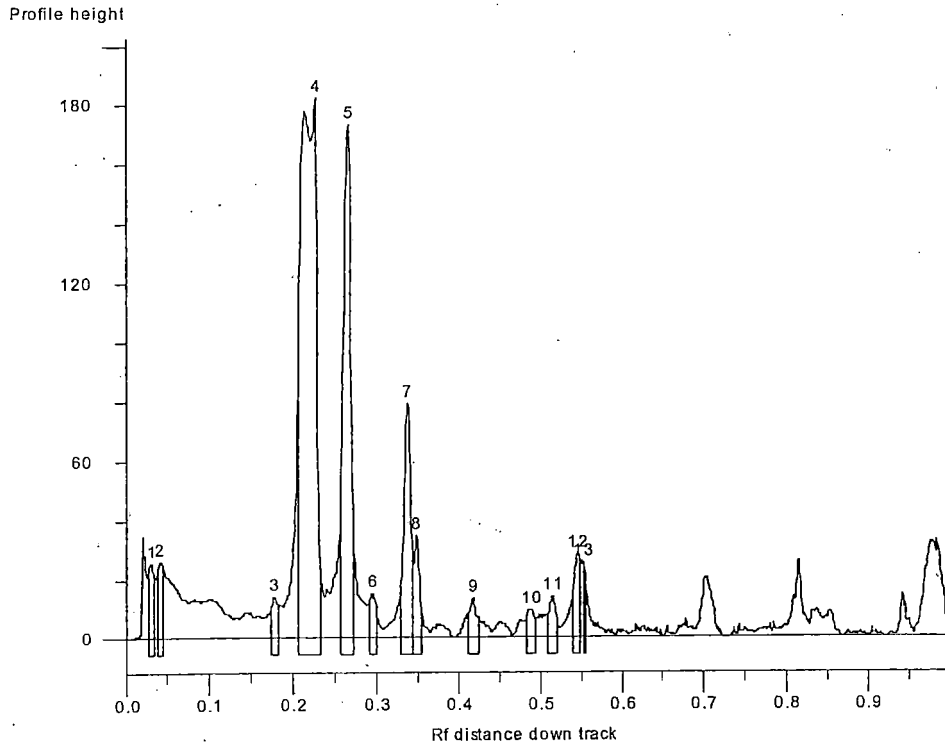


รูปที่ 1 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนที่เกิดจาก Standard marker ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	250.00	161.003	332239.81
2	150.00	194.511	319797.38
3	100.00	191.373	178672.11
4	75.00	198.037	257209.97
5	50.00	203.035	347966.03
6	37.00	192.396	193662.28
7	25.00	198.054	255482.02
8	20.00	92.069	60009.23
9	15.00	141.204	169233.44
10	10.00	109.245	97977.10

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนที่เกิดจาก standard marker ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain

## 1.2 Porcine kidney LAP



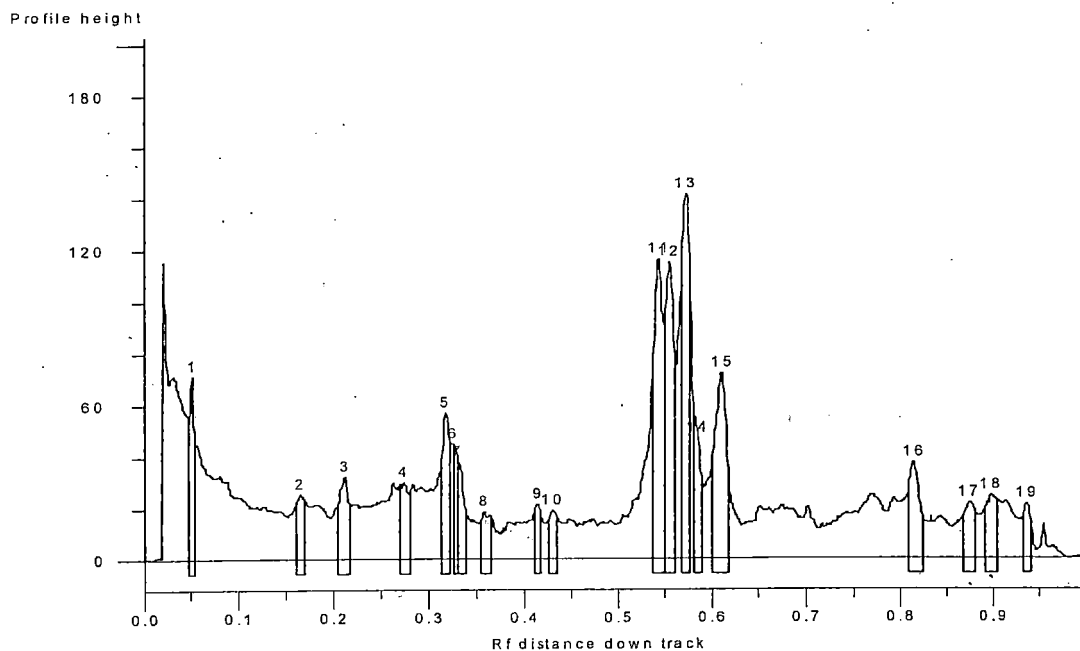
รูปที่ 2 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ Porcine kidney LAP ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	353.99	25.695	15178.79
2	307.34	26.213	17754.55
3	81.48	14.098	9716.94
4	65.59	181.983	346935.69
5	55.73	172.916	149898.31
6	49.55	15.228	10185.26
7	43.80	79.067	65687.24
8	42.43	34.698	21657.46
9	35.28	13.178	11267.41
10	29.93	9.553	8894.45
11	28.29	14.040	9645.62
12	26.36	28.309	19563.06
13	26.04	25.673	7911.20

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีน Porcine kidney LAP ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain



### 1.3 Egg antigen

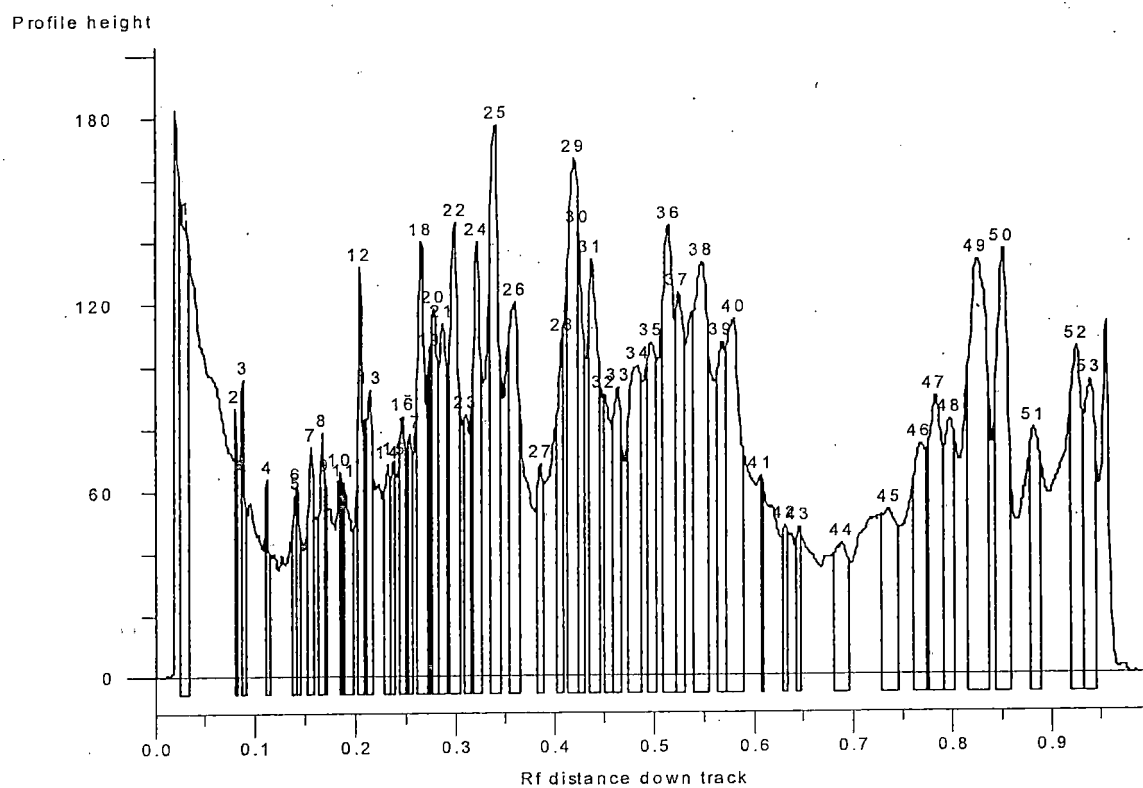


รูปที่ 3 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะ Soluble egg antigen ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	269.76	71.347	32321.90
2	87.74	25.311	20455.47
3	69.25	32.113	31991.39
4	53.98	30.208	25888.86
5	46.37	57.125	38976.53
6	45.23	44.851	20862.89
7	44.61	38.024	20805.08
8	41.28	18.719	15777.45
9	35.46	21.471	14086.34
10	34.17	18.874	13934.27
11	26.55	116.279	114710.38
12	25.85	115.109	101694.57
13	24.82	141.571	111825.89
14(m)	24.11	47.065	33494.35
15	22.75	72.625	86199.51
16	14.57	37.716	42565.75
17	12.32	22.066	22949.35
18	11.50	24.714	24495.48
19	10.32	21.671	13876.03

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะ Soluble egg antigen ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain.

### 1.4 พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์

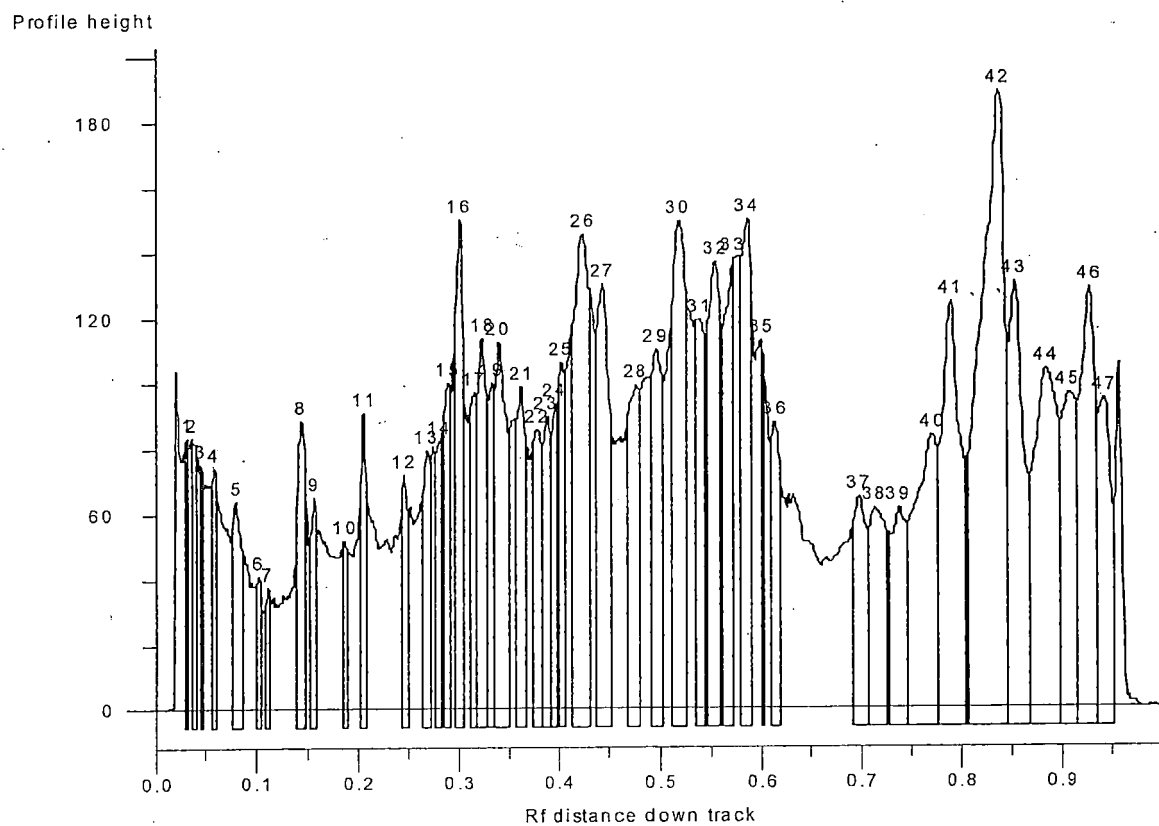


รูปที่ 3 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantea* ระยะพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantea* ระยะพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1(m)	350.16	147.512	103502.96
2(m)	178.49	86.665	22067.33
3(m)	161.86	95.626	34395.82
4	127.54	63.597	22226.16
5	100.00	58.511	15706.30
6	99.13	61.483	24038.42
7	91.65	74.231	36582.41
8	86.23	78.745	32638.11
9	85.48	64.500	21431.77
10(m)	78.00	65.905	13695.09
11	76.65	62.848	42334.19
12	71.27	131.624	52272.41
13	68.59	92.485	43124.11
14(m)	63.73	68.106	35972.61
15(m)	62.12	69.348	28609.20
16	59.98	83.905	45140.78
17(m)	58.47	78.265	26785.94
18	55.56	139.981	105318.24
19	53.81	104.284	27424.83
20	52.79	118.250	69723.63
21	50.97	113.253	82575.60
22	48.98	146.232	106154.06
23	47.34	84.130	52386.81
24	45.95	140.020	93968.03
25	43.41	177.321	151388.73
26	40.91	120.363	110293.01
27	38.03	68.236	36407.37
28	35.97	108.681	48184.16
29	34.97	166.463	163956.08
30	34.66	143.959	61975.05
31	33.63	133.853	119394.06
32(m)	32.70	90.442	66805.70
33	31.67	92.838	62844.82
34	30.31	99.960	109113.09
35	29.36	107.178	88879.07
36	28.29	144.906	141277.41
37	27.65	123.026	107696.94
38	26.22	132.711	175785.80
39	25.09	107.223	66747.30
40	24.37	114.460	152042.44
41(m)	23.00	64.079	13571.84
42	21.70	48.552	13618.71
43	21.04	47.981	19558.13
44	19.13	42.469	54641.23
45	17.32	53.726	79558.48
46	16.19	74.535	85082.88
47	15.68	89.856	105664.72
48	15.20	82.778	83716.81
49	14.16	134.251	237441.77
50	13.16	137.644	159620.56
51	12.02	79.759	85733.34
52	10.64	106.082	122974.27
53	10.22	95.079	100967.70

## 1.5 พยาธิตัวเต็มวัย

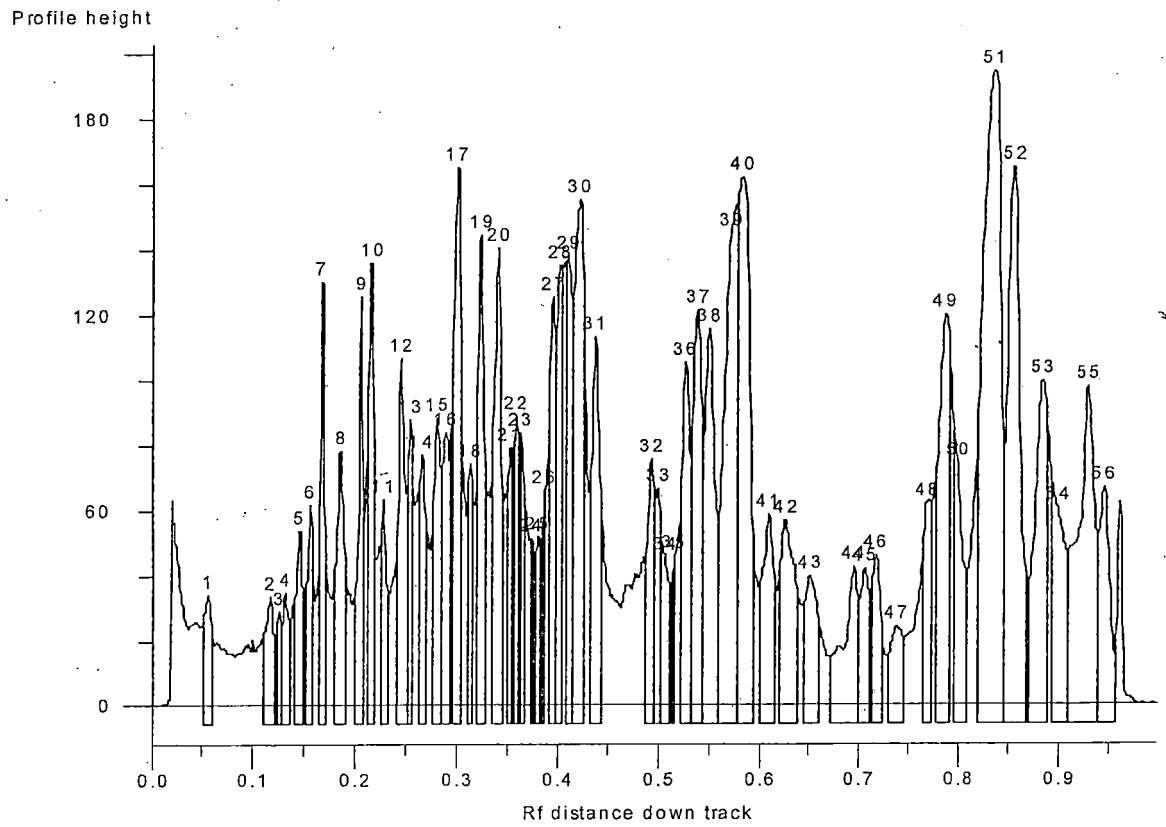


รูปที่ 5 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะพยาธิตัวเต็มวัย ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	353.99	83.036	23156.76
2	328.05	83.183	34644.81
3(m)	287.94	74.964	20505.43
4	241.98	73.968	25209.57
5	182.41	63.672	56331.32
6(m)	138.32	40.781	21723.02
7(m)	128.41	37.606	17460.18
8	97.84	88.356	69367.72
9	91.25	65.139	33853.55
10	77.66	51.701	21624.70
11	71.04	90.778	54840.71
12	60.36	71.906	42139.29
13	55.03	79.252	47978.56
14(m)	52.45	82.239	34466.97
15	50.48	100.034	54489.93
16	48.76	150.173	103677.70
17	46.59	96.859	67297.45
18	45.64	113.697	103013.16
19(m)	44.31	99.613	62376.39
20	43.51	112.176	119680.05
21	40.72	98.710	102740.40
22	38.90	85.420	71062.95
23(m)	37.85	89.642	60975.31
24(m)	36.93	93.702	38338.37
25	36.42	105.946	58275.38
26	34.78	145.485	207817.02
27	33.22	130.109	150909.92
28	30.79	99.083	102423.99
29	29.51	110.372	119850.23
30	28.09	149.410	197469.94
31(m)	26.83	119.175	100456.67
32	25.85	136.851	147041.09
33	24.86	138.125	124316.84
34	24.11	149.958	132107.94
35	23.33	112.860	38559.25
36	22.63	87.716	70590.80
37	18.75	64.986	72843.77
38	18.17	61.215	107405.51
39	17.29	61.639	81396.16
40	16.08	84.056	204807.81
41	15.50	124.716	237533.36
42	13.76	189.472	491903.69
43	13.07	130.980	199776.64
44	11.97	104.583	259132.94
45	11.25	96.908	147406.52
46	10.57	129.392	195724.44
47	10.13	95.160	126798.88

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantea* ระยะพยาธิตัวเต็มวัย ที่  
ย้อมด้วยวิธี silver stain

### 1.6. Tegumental antigen



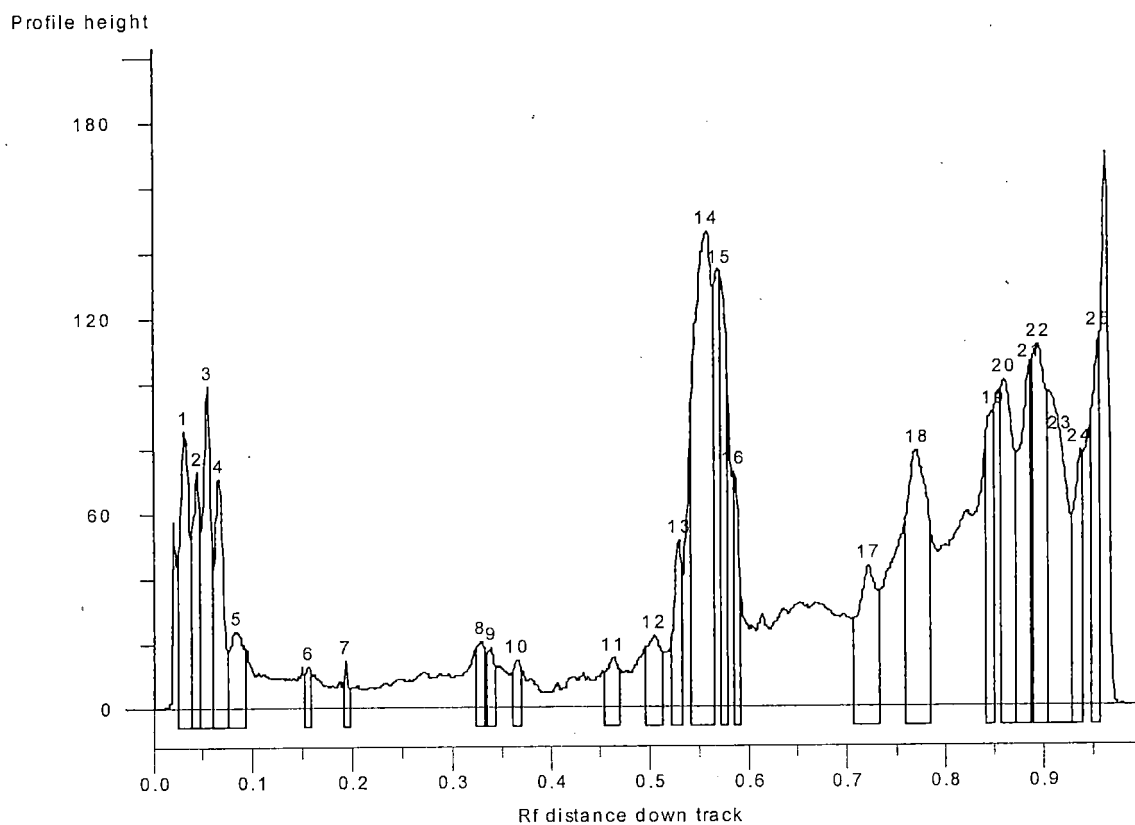
รูปที่ 6 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะเวลาที่ Tegumental antigen ที่  
 ย้อมด้วยวิธี silver stain

ตารางที่ 6 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะ Tegumental antigen ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain



Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	250.00	34.097	26457.23
2	122.47	33.282	26362.52
3(m)	112.93	29.059	9151.58
4(m)	107.72	34.647	18901.11
5	96.99	53.695	29929.38
6	91.65	61.268	28661.46
7	85.85	129.832	54641.51
8	77.66	78.247	51933.08
9	71.04	125.559	59143.91
10	67.93	135.961	79872.79
11(m)	64.76	63.248	21892.82
12	60.56	106.938	69133.02
13(m)	58.09	87.802	44310.04
14	55.56	77.143	48560.27
15	52.45	88.524	60038.34
16	50.64	83.899	55816.65
17	48.76	164.938	107740.89
18	47.01	73.876	38852.42
19	45.64	144.458	82158.93
20	43.31	140.516	98321.95
21(m)	41.85	79.376	32043.80
22(m)	41.19	88.988	29914.69
23	40.72	83.688	36616.91
24(m)	39.44	51.020	14051.53
25(m)	38.55	51.509	21193.94
26	37.85	65.865	16675.39
27	37.08	125.755	58671.19
28(m)	36.42	135.329	72090.92
29	35.72	137.929	84979.53
30	34.84	155.392	148383.52
31	33.63	113.577	84409.20
32	29.72	75.902	51067.75
33	29.25	66.449	35244.15
34(m)	28.79	45.677	31057.93
35	28.19	46.247	14663.75
36	27.50	105.475	86901.56
37	26.83	121.690	115728.05
38	26.13	115.874	114680.51
39(m)	24.91	144.868	206018.27
40	24.20	162.243	187156.50
41	22.79	58.620	69265.08
42	21.98	57.110	71461.00
43	20.78	39.839	48295.91
44	18.88	42.527	64950.64
45(m)	18.47	42.273	32259.43
46	18.02	45.772	41458.87
47(m)	17.23	24.259	30232.56
48(m)	16.16	62.142	45408.19
49	15.53	120.287	116377.70
50(m)	15.17	74.360	70902.18
51	13.76	194.940	374867.53
52	12.99	165.799	212209.83
53	11.97	100.639	135647.17
54(m)	11.47	61.117	78432.88
55	10.50	98.613	185432.56
56	10.07	67.466	66525.78

### 1.7 Excretory-secretory antigen



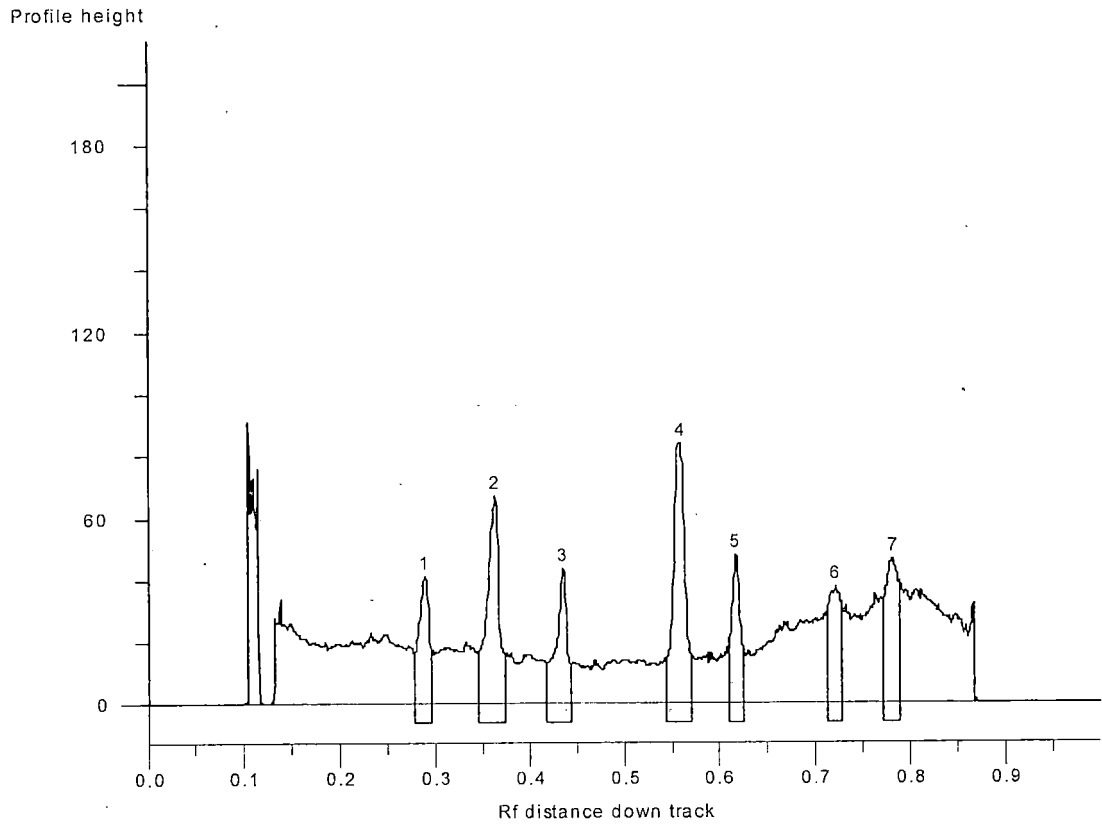
รูปที่ 7 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะ Excretory-secretory antigen ที่  
 ย้อมด้วยวิธี silver stain

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	350.16	85.332	79654.07
2	294.27	73.062	57155.81
3	250.00	99.183	78845.91
4	217.06	70.806	66028.89
5	170.90	23.712	33862.17
6(m)	91.65	12.950	6827.74
7(m)	74.52	14.474	3939.42
8	44.92	20.486	15132.82
9(m)	43.60	18.405	12779.16
10	40.35	14.827	10323.52
11	31.73	15.328	17682.93
12	28.90	21.841	31793.40
13	27.36	51.231	39498.28
14	25.63	145.976	274189.69
15	24.86	134.382	87574.59
16	24.15	72.530	37694.27
17	17.87	43.217	82322.69
18	16.11	78.801	162935.86
19	13.22	90.491	62763.88
20(m)	12.76	100.474	130934.57
21	11.91	104.860	110996.20
22	11.63	111.058	134699.19
23(m)	10.88	82.472	175286.34
24(m)	10.29	78.428	64166.56
25	9.76	114.878	85732.52

ตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantea* ระยะ Excretory-secretory antigen ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain

## 2. western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

### 2.1 Standard marker

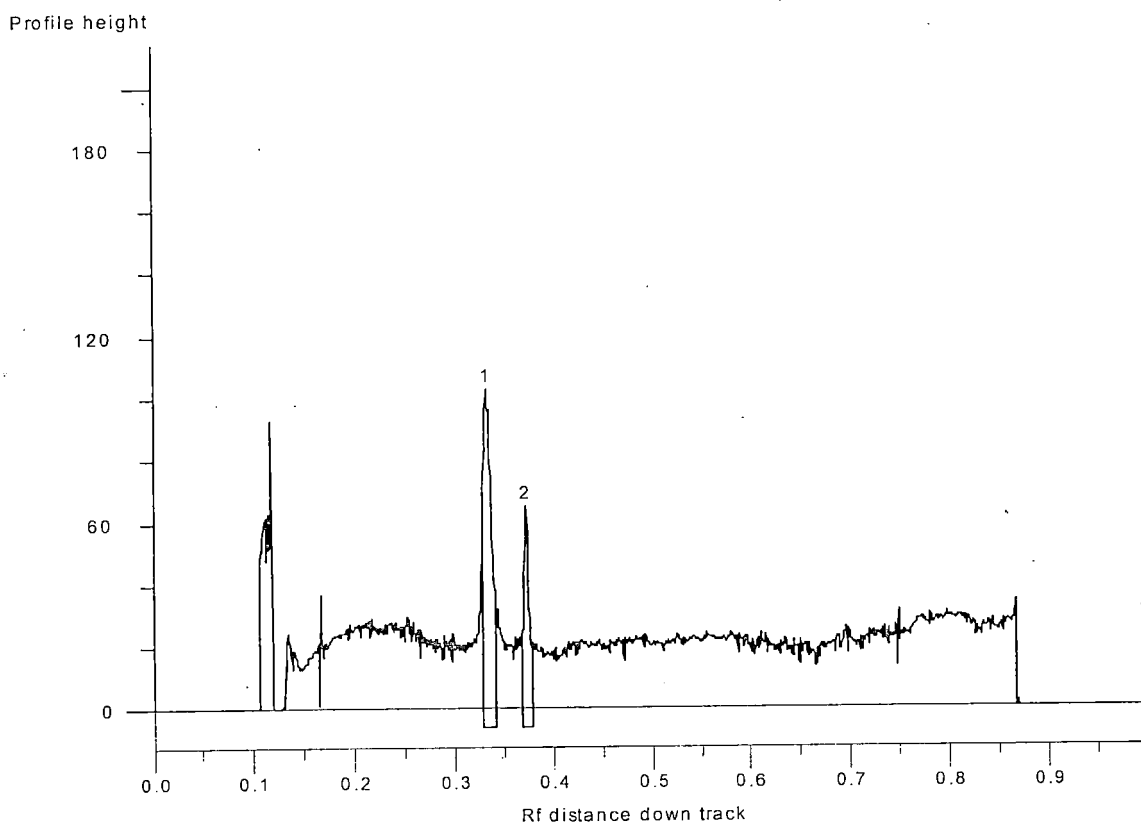


รูปที่ 8 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนที่เกิดจาก Standard marker ที่ย้อมด้วยสี Ponceau S

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	75.00	40.880	73094.50
2	50.00	66.807	143918.50
3	37.00	43.735	82431.00
4	25.00	84.048	172682.00
5	20.00	48.012	73427.50
6	15.00	37.422	74627.00
7	10.00	46.651	102507.50

ตารางที่ 8 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนที่เกิดจาก Standard marker ที่ย้อมด้วยสี Ponceau S

## 2.2 Porcine kidney LAP

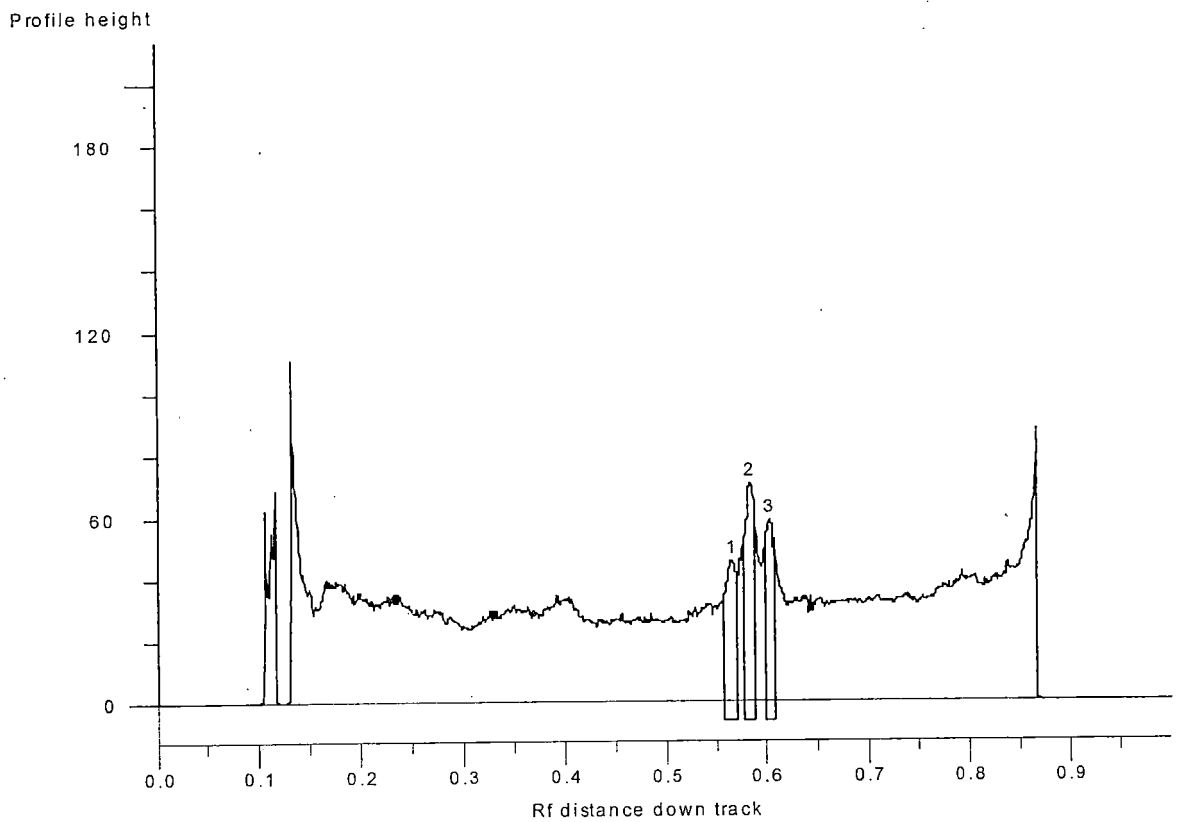


รูปที่ 9 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ Porcine kidney LAP หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	59.10	103.084	136903.00
2	48.14	64.964	55318.00

ตารางที่ 9 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีน Porcine kidney LAP หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

### 2.3 Egg antigen

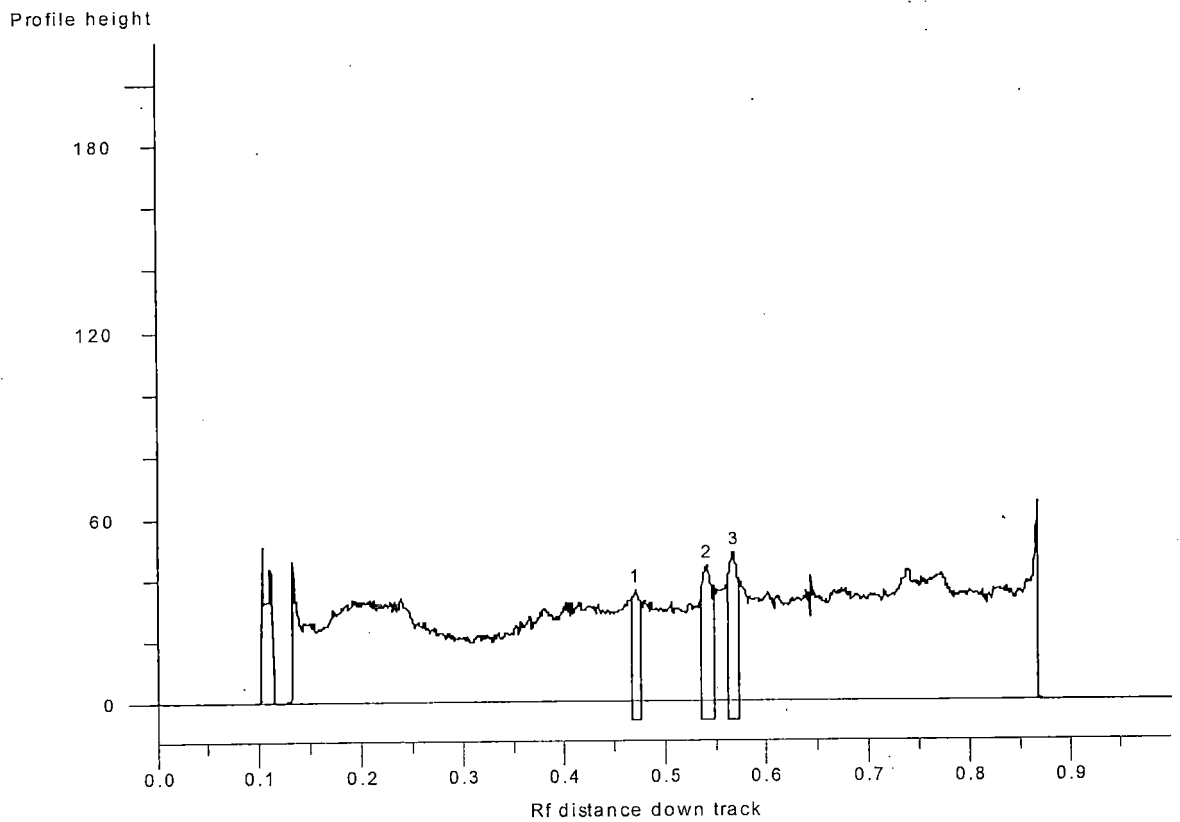


รูปที่ 10 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะ Soluble egg antigen หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	24.41	45.157	68995.50
2	22.66	70.337	114682.50
3	21.17	58.458	68270.50

ตารางที่ 10 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะ Soluble egg antigen หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

## 2.4 พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์

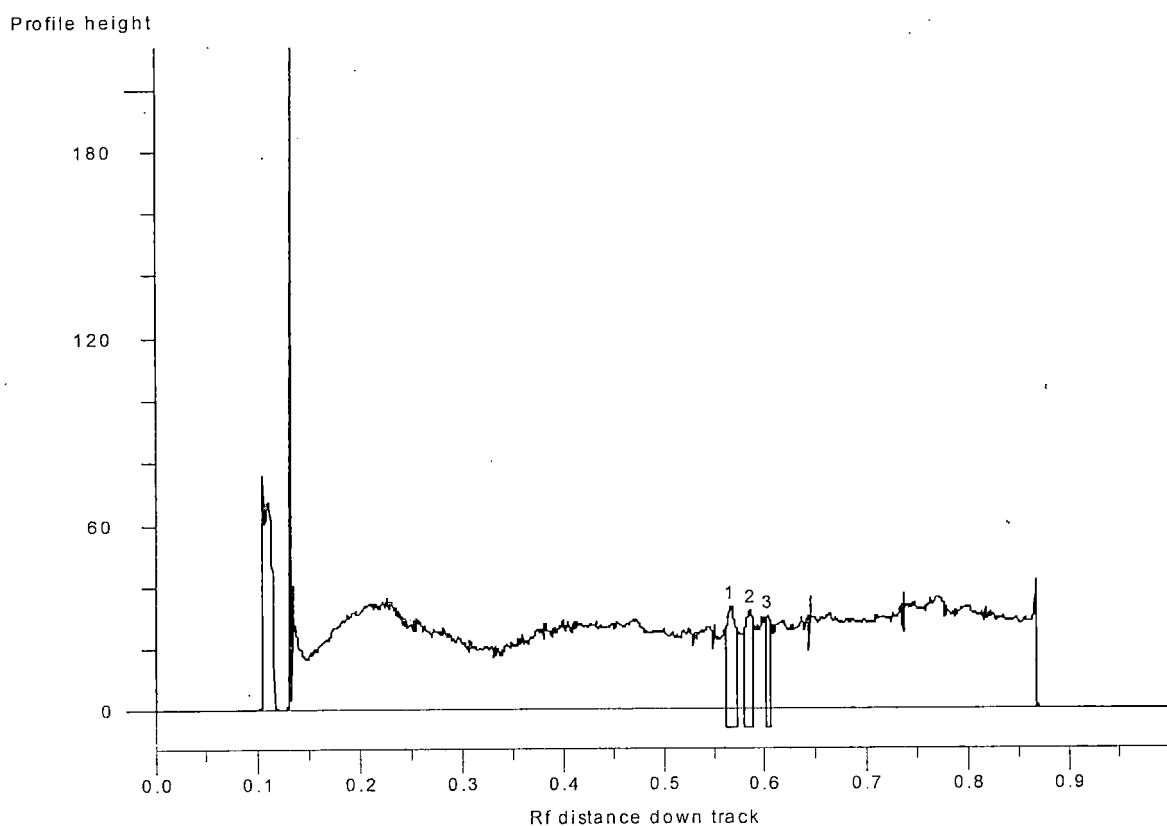


รูปที่ 11 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	32.94	36.398	39834.50
2	26.35	44.096	72396.50
3	24.19	48.651	59410.50

ตารางที่ 11 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

## 2.5 พยาธิตัวเต็มวัย



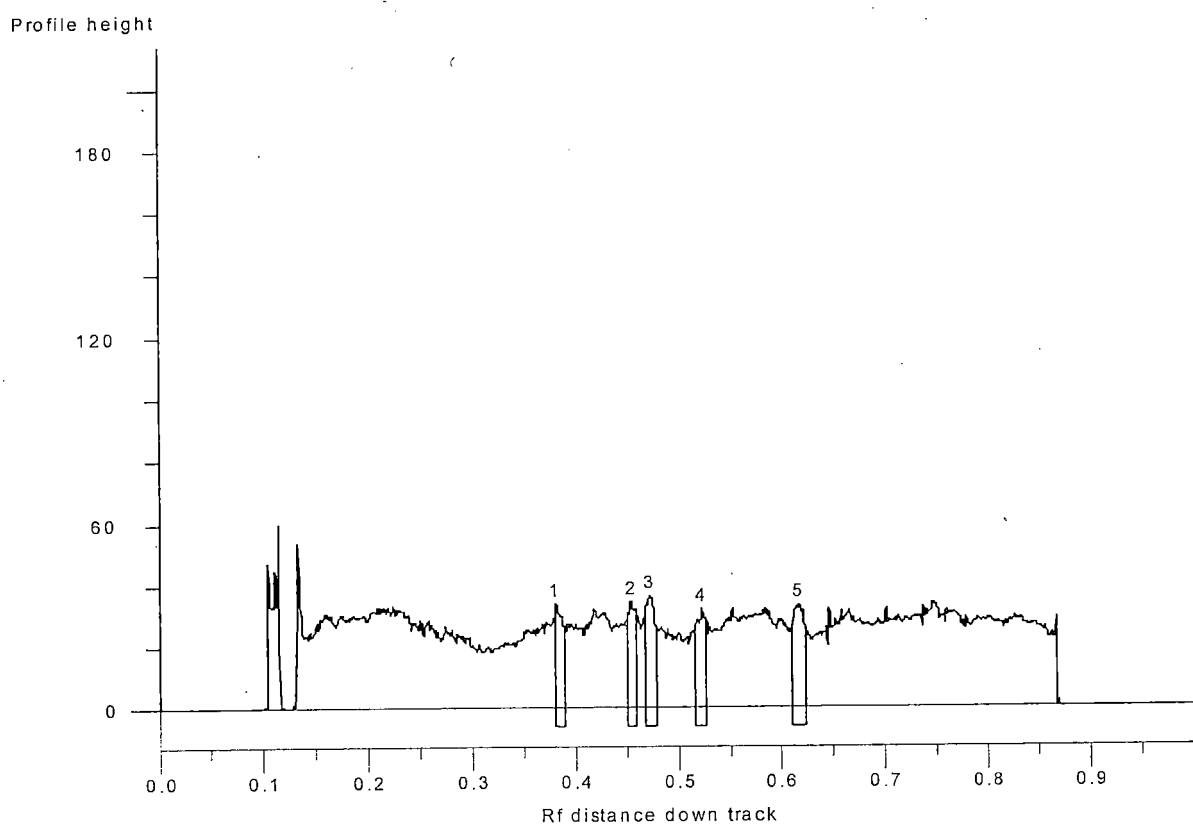
รูปที่ 12 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะพยาธิตัวเต็มวัย หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	24.25	33.602	44272.50
2	22.61	31.976	43629.50
3	21.08	30.530	24386.00

ตารางที่ 12 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะพยาธิตัวเต็มวัย หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen



## 2.6 Tegumental antigen

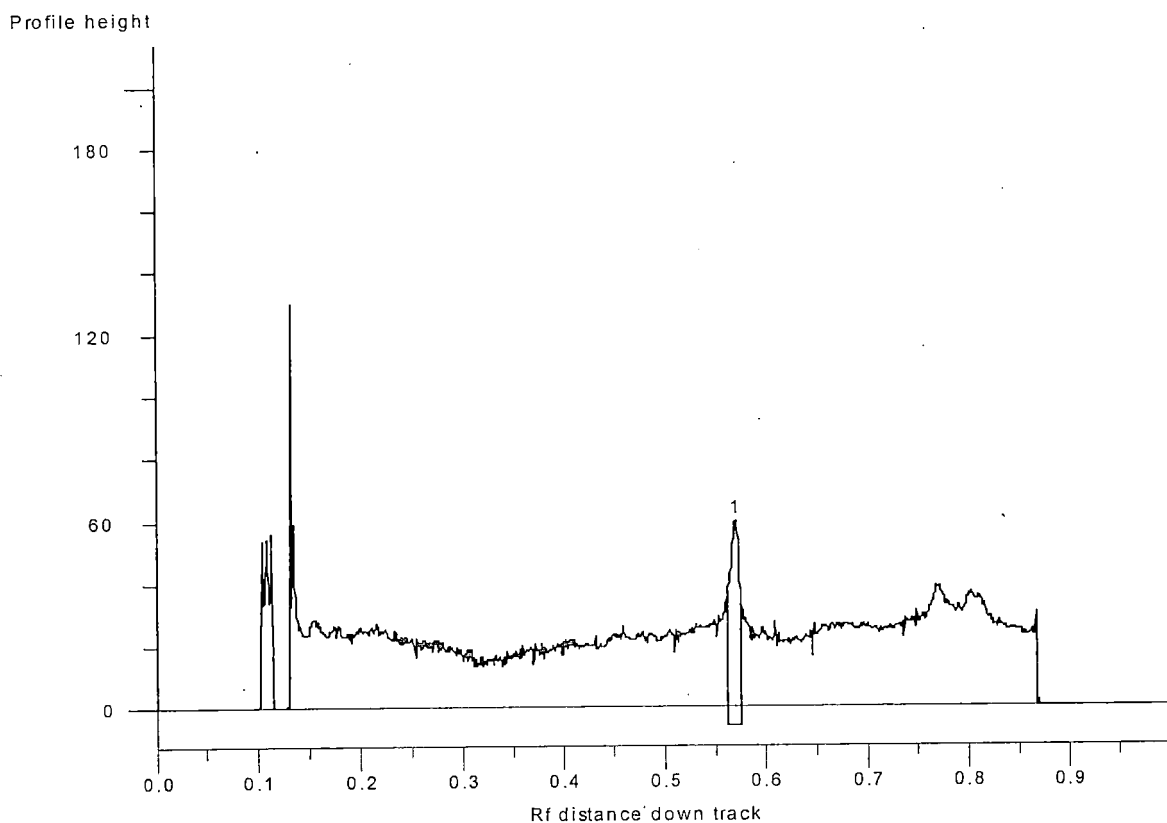


รูปที่ 13 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะ Tegumental antigen หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	46.35	33.892	37760.00
2	34.91	34.410	47636.50
3	32.88	36.410	48955.50
4	28.03	32.060	47386.50
5	20.09	33.120	56161.50

ตารางที่ 13 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะ Tegumental antigen หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

## 2.7 Excretory-secretory antigen



รูปที่ 14 กราฟเส้นแสดงความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะ Excretory-secretory antigen หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen

Number	Mol. weight	Height	Raw vol.
1	23,93	59.855	95602.50

ตารางที่ 14 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความสูงของแถบโปรตีนของ *F. gigantica* ระยะ Excretory-secretory antigen หลังจาก western immunoblotting โดยใช้ Rat anti FgLAP เป็น primary antigen