



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ  
โปรตีนของ *Fasciola gigantica* ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม  
เพื่อพัฒนาชุดตรวจ

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

ผศ.ดร.นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๖๙๑๕๗๖

สัญญาเลขที่ ๒๑๐/๒๕๖๑

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ  
โปรตีนของ *Fasciola gigantica* ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม  
เพื่อพัฒนาชุดตรวจ

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

ผศ.ดร.นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ

สาขาวิชาพยาธิวิทยากายวิภาค

คณะสหเวชศาสตร์

สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๖๒

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 210/2561

### Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 210/2561).

## บทคัดย่อ

*Fasciola gigantica* Glutathione peroxidase (FgGPx) จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและน่าจะมีความสำคัญในการพัฒนาเป็นโปรตีนเป้าหมายในการวินิจฉัยและวัคซีนโรค fasciolosis ในการศึกษาครั้งนี้ เรามุ่งมั่นที่จะโคลน ศึกษาคุณลักษณะ และศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนตัวนี้ FgGPx ถูกโคลนด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) จาก สารพันธุกรรมของพยาธิตัวเต็มวัย (cDNA) ซึ่ง FgGPx DNA ประกอบด้วย 582 เบส และประกอบด้วยกรดอะมิโน 168 ตัวซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 19 กิโลดาลตัน โปรตีน recombinant FgGPx (rFgGPx) ถูกแสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3) และนำโปรตีน rFgGPx ไปกระตุ้นให้หนูสร้างภูมิคุ้มกัน (แอนติบอดี) ต่อโปรตีน rFgGPx ชนิดโพลีโคลนอล (anti-rFgGPx) หลังจากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้ไปทดสอบด้วยวิธี immunoblotting กับ rFgGPx โปรตีนที่สกัดจากตัวพยาธิ (WB) โปรตีนที่สกัดจากผิว (TA) และโปรตีนที่พยาธิหลั่งออกมาจากทางเดินอาหาร (ES) พบว่ามีการให้ผลบวกกับโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 19 กิโลดาลตันเฉพาะ rFgGPx WB และ TA เท่านั้น ไม่พบการแสดงออกใน ES รวมถึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FgGPx ของพยาธิไปไม้ตับ *F. gigantica* จะนวน 5 ระยะ คือ egg metacercariae, NEJ, 4 week-old juveniles และตัวเต็มวัยด้วยวิธี immunoblotting พบว่ายีน FgGPx มีการแสดงออกทุกระยะและมีการแสดงออกสูงในระยะไข่และตัวเต็มวัย และได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน GPx ในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน FgGPx ระดับสูงใน ผิวของพยาธิ (tegument) vitelline และไข่ นอกจากนี้ยังพบว่า แอนติบอดี (anti-rFgGPx) ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจน (GPx) กับพยาธิไปไม้ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Eurytrema pancreaticum*, *Cotylophoron cotylophorum*, *Fischoederius cobboldi*, *gastrothylax crumenifer*, *Paramphistomum cervi* และ *Setaria labiato papillosa* จึงได้พัฒนาการวินิจฉัยโรคนี้ให้ดีขึ้น โดยการตรวจหาพยาธิ *F.gigantica* ด้วยวิธีการผลิต Monoclonal Antibody (MoAb) ต่อโปรตีน GPx ที่มีความจำเพาะสูงในการวินิจฉัยโรคพยาธิไปไม้ตับจากการติดเชื้อ *F.gigantica* โดยวิธี Hybridoma Technique จากการนำม้ามของหนูที่ผ่านการ immunization ด้วย FgGPx (Ag) มาทำการ Fusion กับ Myeloma แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยง (Cell culture) ศึกษาปริมาณ MoAb ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) แล้ววัดความเข้มข้นของ Ab ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จึงทำการเช็คชนิด (isotype) ของ MoAb (clone 7B8) ต่อ recombinant *Fasciola gigantica* GPx (rFgGPx) พบว่าเป็นชนิด immunoglobulin (Ig) G1 with K light chain ศึกษาความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ต่อโปรตีน tegument antigen (TA), whole body (WB) และ excretory-secretory (ES) ด้วย indirect western blot พบว่าโปรตีน FgGPx มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่ผิว (TA) และโปรตีนที่สกัดจากทั้งตัว(WB) ของพยาธิ *F.gigantica* ทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 19 kDa ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Paramphistomum cervi*, *Gigantocotyle explanatum*, *Cotylophoron cotylophorum*, *Gastrothylax crumenifer*, *Setaria labiatopapillosa*, *Eurytrema pancreaticum* และ *Fischoederius cobboldi* และศึกษาการแสดงออกของโปรตีน FgGPx ด้วยวิธี Immunohistochemistry ระยะ metacercariae ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GPx แต่ในระยะ 3 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ และตัวเต็มวัย

(Adult) พบว่ามีการแสดงออกของ GPx ที่ผิว (tegument) ของพยาธิ *F.gigantica* ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการผลิต MoAb ต่อ rFgGPx เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจในการวินิจฉัยเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F.gigantica* ต่อไปในอนาคต รวมถึงได้ผลิตและศึกษาคุณลักษณะของ Monoclonal antibody (MoAb) ต่อโปรตีน thioredoxin-related Protein 14 kDa (FgTRP14) ของพยาธิใบไม้ตับ *F.gigantica* ด้วยเพื่อนำ monoclonal antibody ที่ได้มาพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *F.gigantica* ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำ Hybridoma cell มาเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน hybridoma cells และปริมาณแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำ culture fluid มาทดสอบหาปริมาณของ MoAb แล้วนำ MoAb ที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงมาทำการตรวจสอบชนิดของ MoAb ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามี heavy chain เป็นชนิด IgM และมี light chain เป็นชนิด Lambda ทั้งหมด 5 clone ได้แก่ 1B2-2, 2D2, 4F3, 5G8 และ 5G8-2 จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถของ MoAb ในการจับ TRP14 ด้วยวิธี western blot โดยใช้ polyclonal antibody (PoAb) เป็น positive control และใช้ myeloma cell เป็น negative control พบว่า MoAb 4 clone ได้แก่ 2D2, 5G8, 4F3 และ 1B2-2 มีความจำเพาะต่อ TRP14 ที่ 14 kDa และทำการศึกษา MoAb clone 2D2 ต่อ *Fasciola gigantica* whole blood Fg (WB), excretory-secretory (ES) และ tegumental antigens (TA) พบว่ามีความจำเพาะต่อ Fg (WB) และ ES ที่ 14 kDa แต่ไม่มีความจำเพาะต่อ TA และทำการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reaction) กับโปรตีนของพยาธิชนิดต่างๆ *Fasciola gigantica* (Fg), *Schistosoma mansoni* (Sm), *Opisthorchis viverrini* (Ov), *Cotylophoron cotylophorum* (Cc), *Seratia labiatopapillosa* (Si), *Paramphistomum cervi* (Pc), *Gastrothylax crumenifer* (Gc), *Eurytrema pancreaticum* (Ep), *Giganocytle explanum* (Ge) พบว่า MoAb ทั้ง 4 clone ไม่มีการเกิด cross reaction กับพยาธิชนิดอื่นๆ โดยผลที่ได้สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *F.gigantica* ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อได้ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ rFgGPx และ rFgTRP14 เพื่อเป็นโปรตีนเป้าหมายในการวินิจฉัยโรคและหรือวัคซีนสำหรับโรค fasciolosis ในสัตว์เศรษฐกิจและมนุษย์ในอนาคต

## Abstract

*Fasciola gigantica* Glutathione peroxidase (FgGPx) belongs to a family of antioxidant enzymes, and it has diagnostic as well as vaccine potentials against fasciolosis. In this study, we aim first to clone, characterize and detected the expression of this gene and protein. FgGPx was cloned by polymerase chain reaction (PCR) from adult complementary DNA (cDNA), and its sequence was composed of 582 bp. Its putative peptide had no signal sequence and comprised of 168 amino acids, with a molecular weight of 19 kDa, and a conserved sequence of NVACKUG, FPCNQFGGQ and WNF. The expression of FgGPx mRNA was quantified using q-PCR in the all stages of *F. gigantica* (egg, metacercariae, NEJ, 4-week old juveniles, and adult) with high expression in egg and adult. A recombinant FgGPx (rFgGPx) was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and used for immunizing mouse to obtain polyclonal antibodies (anti-rFgGPx). This mouse anti-rFgGPx reacted with the native FgGPx at a molecular weight of 19 kDa in adult WB and TA by immunoblotting. The FgGPx protein was expressed at high level in tegument, vitelline and egg of the parasite. Anti-rFgGPx exhibited no cross reactivity with the other parasites' antigens, including *Eurytrema pancreaticum*, *Cotylophoron cotylophorum*, *Fischoederius cobboldi*, *Gastrothylax crumenifer*, *Paramphistomum cervi*, and *Setaria labiato papillosa*.

monoclonal antibody (MoAb) against recombinant *F. gigantica* glutathione peroxidase (rFgGPx) and recombinant thioredoxin-related Protein 14 kDa (rFgTRP14) were produced by hybridoma technique using spleen cells from BALB/c mice immunized with rFgGPx. MoAb against rFgGPx (named 7B8) and MoAb against rFgTRP14 are IgG1 with kappa light chains and IgM with lamda light chain, respectively. MoAb against rFgGPx reacted specifically with rFgGPx at a molecular weight (MW) 19 kDa as shown by immunoblotting, and reacted with the native FgGPx in the extracts of whole body (WB), metacercariae, newly excysted juvenile (NEJ), 4 week-old juveniles and adult *F. gigantica*. In the same way, MoAb against rFgTRP14 reacted specifically with rFgTRP14 at a molecular weight (MW) 14 kDa as shown by immunoblotting, and reacted with the native FgTRP14 in the extracts of adult whole body (WB) a excretory-secretory antigen (ES) of adult *F. gigantica*. Both MoAb against rFgGPx and MoAb against rFgTRP14 did not cross react with antigens in WB fractions from other parasites, including *Gigantocotyle explanatum*, *Paramphistomum cervi*, *Gastrothylax crumenifer*, *Eurytrema pancreaticum*, *Setaria labiato-papillosa* and *Fischoederius cobboldi*. By immunolocalization, MoAb against rFgGPx reacted with the native protein in the tegument, vitelline cells, and eggs of adult *F. gigantica*. On the other hand, MoAb against rFgTRP14

reacted with the native protein in the ceecal epithelial cells. This finding indicated that FgGPx and FgTRP14 are an abundantly expressed parasite protein that is released into the TA and ES, therefore, FgGPx and FgTRP14 and their MoAb may be used for immunodiagnosis of both early and late fasciolosis in ruminants and humans.

Keywords : immunodiagnosis, liver fluke, *Fasciola gigantica*, glutathione peroxidase, thioredoxin-related protein

## สารบัญเนื้อเรื่อง (Table of Contents)

|  | หน้า |
|--|------|
| บทนำ   | 1    |
| เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน                                  | 1    |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหา  | 2    |
| วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย  | 4    |
| วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี   | 4    |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ  | 4    |
| เนื้อเรื่อง  | 5    |
| รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย  | 5    |
| การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ                                    | 5    |
| การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย <i>L. ollula</i>                                  | 5    |
| การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ      | 5    |
| การโคลนยีนและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน  | 6    |
| การโคลนยีนที่สร้างแอนติบอดี  | 6    |
| การสังเคราะห์ recombinant antigen และ recombinant monoclonal antibody        | 6    |
| การพัฒนาและทดสอบวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ                                 | 6    |
| การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb)  | 6    |
| การผลิตรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนัลแอนติบอดี (rMoAb)                               | 7    |
| การตรวจคุณสมบัติของ rMoAb ด้วยวิธี immunoblotting                            | 9    |
| การสกัดโปรตีนแอนติเจนจากส่วนต่างๆของพยาธิเพื่อนำมาทดสอบกับ rMoAb             | 9    |
| การแยกโปรตีนโดยใช้ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis  | 9    |
| การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blotting                                  | 9    |
| การนำ rMoAb และ recombinant proteins ไปพัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อพยาธิ      | 10   |
| การพัฒนาวิธีตรวจแบบ sandwich ELISA   | 10   |
| การพัฒนาวิธีตรวจแบบ immune-chromatography (Immunochromatographic strip test) | 11   |
| วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล   | 12   |
| ผลการวิจัย   | 13   |
| การโคลน cDNA ของ FgGPx   | 13   |
| การสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน  | 15   |
| การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของ rFgGPx ด้วยการทดสอบ DNA nicking assay          | 16   |
| การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน rFgGPx โดยวิธี immunoblot                         | 17   |
| การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgGPx               | 20   |



|  |    |
|--|----|
| การวิเคราะห์ปริมาณ polyclonal antibody FgGPx ด้วยวิธี indirect ELISA                   | 20 |
| การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน FgGPx  | 21 |
| การศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดมาจาก <i>F. gigantea</i> ด้วยวิธี Lawry method      | 21 |
| การวิเคราะห์ความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ต่อโปรตีน TA, WB และ ES                          | 22 |
| การวิเคราะห์ความจำเพาะของโปรตีน rFgGPx โดยการทดสอบ cross reaction                      | 23 |
| การวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีน FgGPx ใน <i>F. gigantea</i> ด้วยวิธี immunohistochemistry | 24 |
| การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgTRP14                       | 27 |
| การตรวจสอบชนิดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA                             | 27 |
| การศึกษาคุณลักษณะของโมโนโคลนัลแอนติบอดีโดยวิธี western blot                            | 29 |
| การวิเคราะห์ความจำเพาะของโปรตีน rFgTRP14 โดยการทดสอบ cross reaction                    | 32 |
| อภิปรายและวิจารณ์  | 37 |
| สรุปผลการวิจัยและเสนอแนะ   | 41 |
| ผลผลิต   | 41 |
| รายงานการเงิน  | 42 |
| บรรณานุกรม   | 43 |
| ภาคผนวก  | 48 |
| ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ  | 49 |
| ประวัตินักวิจัย  | 60 |

## สารบัญตาราง (List of Table)

|   | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FgGPx และค่าดูดกลืนแสง OD <sub>450</sub> | 20   |
| ตารางที่ 2 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของ MoAb ชนิดต่างๆ                | 27   |
| ตารางที่ 3 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของ MoAb ชนิด IgM                 | 31   |

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

|   | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับอะมิโนของยีน GPx จาก <i>F. gigantea</i> กับสิ่งมีชีวิตอื่น    | 13   |
| รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของยีน GPx จาก <i>F. gigantea</i> กับสิ่งมีชีวิตอื่น                   | 14   |
| รูปที่ 3 แสดงผลการศึกษาขนาดของโปรตีน FgGPx โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE                                | 15   |
| รูปที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ฟังก์ชันของโปรตีน rFgGPx โดยใช้เทคนิค Agarose Gel Electrophoresis    | 16   |
| รูปที่ 5 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยากับ <i>F. gigantea</i> ระยะต่างๆ โดยใช้เทคนิค Immunoblot        | 17   |
| รูปที่ 6 แสดงผลการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน FgGPx ใน TA, WB และ ES ของ <i>F. gigantea</i>        | 18   |
| รูปที่ 7 การแสดงออกของโปรตีน FgGPx ในเนื้อเยื่อของ <i>F. gigantea</i> ระยะตัวเต็มวัย            | 19   |
| รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FgGPx และค่าดูดกลืนแสง OD <sub>450</sub>     | 21   |
| รูปที่ 9 แสดงความจำเพาะของโปรตีน rFgGPx ต่อโปรตีน TA, WB และ ES ด้วยเทคนิค Immunoblot           | 22   |
| รูปที่ 10 แสดงความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ด้วยเทคนิค Indirect western blot                        | 23   |
| รูปที่ 11 แสดงการตรวจหาตำแหน่งของโปรตีน FgGPx ในเนื้อเยื่อของ <i>F. gigantea</i> ระยะติดเชื้อ   | 25   |
| รูปที่ 12 แสดงการตรวจหาตำแหน่งของโปรตีน FgGPx ในเนื้อเยื่อของ <i>F. gigantea</i> ระยะตัวเต็มวัย | 26   |
| รูปที่ 13 กราฟแสดงชนิด isotype ของ MoAb ที่วัดโดยใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร   | 28   |
| รูปที่ 14 แสดงขนาดของ MoAb ของ <i>F. gigantea</i>   | 29   |
| รูปที่ 15 แสดงขนาดของ MoAb (2D2) ต่อโปรตีน TA, WB และ ES ด้วยเทคนิค Immunoblot                  | 30   |
| รูปที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ MoAb ชนิด IgM กับโปรตีน TA, WB และ ES                         | 32   |
| รูปที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ MoAb ชนิด IgM กับแอนติเจนของพยาธิชนิดต่างๆ                    | 33   |
| รูปที่ 18 การแสดงออกของโปรตีน FgTRP14 ในกระเพาะอาหารและ parenchyma ของ <i>F. gigantea</i>       | 34   |
| รูปที่ 19 การแสดงออกของโปรตีน FgTRP14 ในกระเพาะอาหารและ parenchyma ของ <i>F. gigantea</i>       | 34   |
| รูปที่ 20 การแสดงออกของโปรตีน FgTRP14 ในกระเพาะอาหาร ของ <i>F. gigantea</i>                     | 35   |
| รูปที่ 21 การแสดงออกของโปรตีน FgTRP14 ในกระเพาะอาหาร ของ <i>F. gigantea</i>                     | 35   |
| รูปที่ 22 การแสดงออกของโปรตีน FgTRP14 ในกระเพาะอาหาร ของ <i>F. gigantea</i>                     | 36   |
| รูปที่ 23 การแสดงออกของโปรตีน FgTRP14 ในกระเพาะอาหาร ของ <i>F. gigantea</i>                     | 36   |

## สารบัญแผนภาพ

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

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 สรุปวิธี sandwich ELISA

หน้า

11

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

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

## บทนำ (Introduction)

### เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

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

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

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

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

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

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

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



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

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

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

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

ในการวิจัยพัฒนาชุดตรวจที่ผ่านมานั้นใช้แอนติบอดีที่เป็นโมโนโคลนอลและโพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีข้อเสียในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมในด้านคุณภาพของชุดตรวจ เนื่องจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตไม่สามารถควบคุมคุณภาพได้เพราะการตอบสนองของสัตว์แต่ละตัวแต่ละรอบที่ผลิตไม่เหมือนกัน ส่วนโมโนโคลน

แอนติบอดีนั้นเป็นแบบเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำให้ไม่มีความเสถียรในการสร้างแอนติบอดีและเมื่อเลี้ยงไปนานๆ จะทำให้การสร้างแอนติบอดีลดลง จึงเป็นปัญหาในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม

ดังนั้นคณะวิจัยซึ่งได้เห็นแนวโน้มที่จะสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรค fasciolosis ด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีแทนเพื่อให้การสร้างแอนติบอดีมีความคงตัว จึงคิดที่จะต่อยอดงานวิจัยให้เป็นนวัตกรรมที่สร้างขึ้นจากคนไทย ซึ่งจะสามารถแก้ไขปัญหาโรคพยาธิใบไม้ตับประเทศได้

### วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

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

### วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

เป็นการวิจัยต่อยอดจากผลงานวิจัยที่ได้ทำวิจัยไปแล้วคือ การโคลนยีน การศึกษาคุณสมบัติของยีน การแสดงออกของยีน และการทดสอบศักยภาพการเป็นชุดตรวจของแต่ละแอนติบอดีคือ CatB, CatL และ SAP และ 28.5 kDa ซึ่งสามารถตรวจการติดเชื้อ *F. gigantica* ได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องการต่อยอดพัฒนาปรับปรุงชุดตรวจเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรวจหาการติดเชื้อ *F. gigantica* และ *F. hepatica* ให้มีความแม่นยำและความจำเพาะมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการผลิตชุดตรวจโดยใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีเข้ามาร่วมด้วยในการการผลิต เพื่อลดต้นทุนในการผลิตและเก็บไว้ได้นาน โดยคณะวิจัยได้แบ่งการศึกษาวินิจฉัยออกเป็น 4 ขั้นตอนหลัก

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

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

#### การเผยแพร่ในวาร

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

## หน่วยงานที่สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

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

## เนื้อเรื่อง (Main body)

### รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

#### การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ

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

#### การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย *L. ollula*

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

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

#### การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercariae) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ

จากการศึกษาพบว่า ตัวอ่อนพยาธิใช้เวลาในการเจริญในหอยประมาณ 6 สัปดาห์ จึงจะได้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) ซึ่งจะออกจากหอยมาว่ายอยู่ในน้ำ หลังการติดเชื้อได้สัปดาห์ที่ 5 จึงเริ่มตรวจสอบหอยที่ติดเชื้อไว้ และแยกหอยที่ติดเชื้อออกมาเลี้ยงรวมกันในที่ซึ่งพรางแสง เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียออกมาจากหอย

สำหรับการเก็บตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียดำเนินการดังต่อไปนี้

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

### การโคลนยีนและผลิตรีคอมบรินันท์โปรตีน

#### การโคลนยีนที่สร้างแอนติบอดี

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

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

#### การสังเคราะห์ recombinant antigen และ recombinant monoclonal antibody

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

### การพัฒนาและทดสอบวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ

#### การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb)

นำ recombinant proteins ฉีดเข้าช่องท้องของหนูทดลอง (intraperitoneal injection) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนในหนูทดลองสร้างและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในม้าม โดยการฉีดกระตุ้นจำนวน 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะฉีดห่างกัน 3 สัปดาห์ จากนั้นทำการฉีดเข้าเส้นเลือดบริเวณ หาง

(tail vein) ก่อนทำการแยกเซลล์ม้าม 3 วัน เมื่อครบกำหนดทำการแยกเซลล์ม้ามที่ได้จากหนูที่มีการฉีดกระตุ้นเพื่อใช้สำหรับเชื่อมกับเซลล์ myeloma

นำเซลล์ myeloma และเซลล์ม้ามมาทำการเชื่อมต่อกันด้วย polyethyleneglycol (PEG) นำเซลล์ hybridoma ที่ได้หยอดลงใน 96 well plate แล้วนำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมปริมาณ CO<sub>2</sub> ที่ร้อยละ 5 และทำการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี limiting dilution หลังจากนั้นจึงคัดเลือกโคลนด้วย enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และ enzyme linked immunoelectrotransfer blot (EITB) ทำการตรวจหา class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Immunopure Monoclonal Antibody Isotyping kit (HRP/ABTS) (PIERCE) ซึ่งใช้หลักการ sandwich ELISA

### **การผลิตรีคอมบิแนนท์โมโนโคลนอลแอนติบอดี (rMoAb)**

การโคลนยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาวและสายสั้นเข้าสู่ pGEM-T vector นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีน ES ของพยาธิ *F. gigantica* มาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด Gencatch™ total RNA miniprep (Epoch life sciences) จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA ของโมเลกุลแอนติบอดีสายยาวด้วย MulgCHgamma reverse primer (5'-CTGGACAGGG ATCCAGAGTTCCA-3') และ cDNA ของโมเลกุลแอนติบอดีสายสั้นด้วย MulgCLKappa reverse primer (5'-CTCATTCTGTTGAAGCTCTTGAC-3') จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีสายยาวและสายสั้นด้วยเทคนิค RACE-PCR โดยนำ cDNA ของโมเลกุลสายยาวและสายสั้นที่สังเคราะห์ขึ้นมาเติม homopolymeric dG ที่บริเวณปลาย 5' โดยใช้เอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ RACE dCTP forward primer และ MulgCHgammaNested reverse primer (5'-TARCCYTTGACMAGGCATCC-3') สำหรับยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาว ส่วนยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายสั้นนั้นจะใช้ RACE dCTP forward primer (5'-CAAGGAATTCCCCCCCCCCCC-3') และ MulgCLKappa Nested reverse primer (5'-CGTTCAC T GCCATCAATC-3') นำชิ้นยีนโมเลกุลสายยาวและสายสั้นที่ได้มาเติม singledA ที่บริเวณปลาย 3' ด้วยเอนไซม์ Ex taq DNA polymerase จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยเทคนิค heat shock transformation และทำการคัดเลือก transformant บนอาหารที่จำเพาะ โดยสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวมาตรวจสอบ recombinant clone ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ T7 promoter forward primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') และ MulgCHgammaNested reverse primer สำหรับยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาว ส่วนยีนที่ใช้สร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายสั้นนั้นจะใช้ T7 promoter forward primer และ MulgCLKappaNested reverse primer จากนั้นนำ recombinant clone ที่มีชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลสายยาวและสายสั้นมาเพาะเลี้ยงและสกัด recombinant plasmid ด้วยชุดสกัด Gencatch™ plus plasmid DNA miniprep (Epoch life sciences) นำ recombinant plasmid ที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR sequencing โดยใช้ T7 promoter forward primer จากนั้นนำ PCR products ที่ได้มาอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 310 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems) แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดี (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและโมเลกุลสายสั้นสำหรับนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนส่วน variable region ต่อไป การโคลนยีนส่วน variable region เข้าสู่ mammalian expression vector นำ recombinant plasmid ที่บรรจุชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีมาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนส่วน variable region ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ HB3VH forward primer (5'-CTGCTTAAGGG CGTCCAATGCGAAGTGAACTGGTGGAGTCT-3') คู่กับ HB3VH reverse primer (5'-ACTAGGGCCCTT TGTGCTAGAGGAGACTGTGAGAGTGGT-3') สำหรับโมเลกุลสายยาวซึ่งออกแบบให้มี AflII restriction site ที่ปลาย 5' ของ forward primer และ PspOMI restriction site ที่ปลาย 3' ของ reverse primer ส่วนโมเลกุลสายสั้นจะใช้ HB3VL forward primer (5'-ACCACCGCCGACATTGTGATGACCCAGTCT-3') คู่กับ HB3VL reverse primer (5'-TTCCAGCTTTGTCCCACCGCCGAA-3') จากนั้นนำยีนส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและเวกเตอร์ pcDNA3.4-CHY ที่บรรจุยีนส่วน constant region ชนิด gamma ของมนุษย์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ AflII และ PspOMI แล้วจึงเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับเวกเตอร์สำหรับยีนส่วน variable region ของโมเลกุลสายสั้นนั้นจะนำมาเติมหมู่ฟอสเฟตที่บริเวณปลาย 5' โดยใช้เอนไซม์ T4 polynucleotide kinase แล้วจึงนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pcDNA3.4-CLK ที่บรรจุชิ้นยีนส่วน constant region ชนิด kappa ของมนุษย์ที่นำหมู่ฟอสเฟตที่บริเวณปลาย 5' ออก จากนั้นนำเวกเตอร์ที่เชื่อมต่อกับชิ้นยีนแล้วเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยเทคนิค heat shock transformation และทำการคัดเลือก transformant บนอาหาร 2XYT-AG agar หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารมาตรวจสอบ recombinant clone ที่มีชิ้นยีนที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีโมเลกุลในส่วน variable region ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ XbaIKozHuHleader forward primer (5'-GACTCTAGAGGATCGAACCCCTGCCGCCACCATGGAGTTCGGA-3') คู่กับ pcDNA3.4 reverse primer (5'-CAACATAGTTAAGAATACCAGTC-3') สำหรับตรวจสอบโมเลกุลสายยาว และ XbaIKozHuKleader forward primer (5'-GACTCTAGAGGATCGAACCCCTGCCGCCACCATGGAGA CTCCA-3') คู่กับ pcDNA3.4 reverse primer สำหรับโมเลกุลสายสั้น จากนั้นนำ recombinant clone ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2XYT-A broth และสกัด recombinant plasmid มาทำปฏิกิริยา PCR sequencing โดยใช้ CMVpSeq forward primer (5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3') และนำ PCR products ที่ได้มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน variable region ของโมเลกุลสายยาวและสายสั้น เพื่อคัดเลือก recombinant plasmid ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องเพื่อนำไปใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีต่อไป

การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีและการทำแอนติบอดีให้มีความบริสุทธิ์นำ heavy chain recombinant plasmid และ light chain recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์ human embryonic kidney 293-F (invitrogen) โดยใช้ Gencarrier-1™ transfection reagent (Epoch life sciences) จากนั้นนำ transfected เซลล์ไปเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วันจึงเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาแยกรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค affinity chromatography โดยใช้โปรตีน A sepharose™ (GE

Healthcare) หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่ได้มาตรวจสอบคุณลักษณะเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ western blot ตามลำดับการวิเคราะห์ค่า antibody titer และ sensitivity ในการตรวจหาการติดเชื้อ Fasciolosis ด้วยเทคนิค sandwich ELISA และ Dot-ELISA ดังกล่าวมาข้างต้น และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความไวและ ความจำเพาะต่อ Fasciolosis โดยใช้สูตรคำนวณของ Lalkhen และ McCluskey (2008)

### **การตรวจคุณลักษณะของ rMoAb ด้วยวิธี immunoblotting**

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

### **การสกัดโปรตีนแอนติเจนจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิเพื่อนำมาทดสอบกับ rMoAb**

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

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

นำ supernates ที่ได้ข้างต้น และ recombinant proteins มาทำการแยกโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE ด้วยวิธีของ Laemmli, 1970 โดยนำ supernate ที่มีปริมาณโปรตีน 25 µg มาแยกในส่วน SDS-polyacrylamide mini-slab gel ที่มี 10% acrylamide separating gel และ 3% acrylamide stacking gel ทำการ electrophoresis ใน running buffer ที่มี 25 mM Tris, 192 mM glycine และ 0.1% SDS, pH 8.3 โดยใช้ ที่ความต่างศักย์ 200 V ที่อุณหภูมิ 10-15° เซลเซียส

### **Western blotting**

หลังจากทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้ว ทำการย้ายโปรตีนจาก gel สู่ PVDF membrane ใน transferring buffer ที่มี 40 mM Tris, pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 2 mM

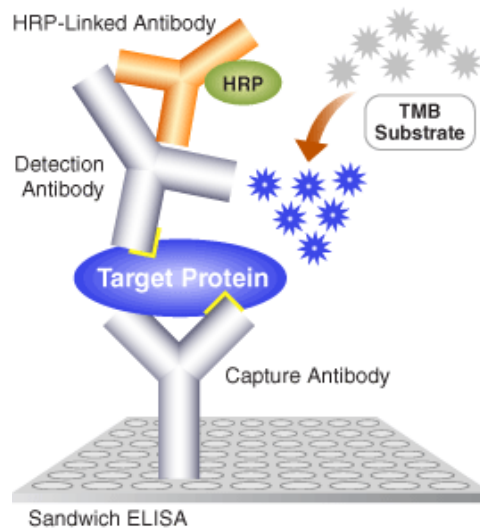
ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 20% (v/v) methanol, และ 0.05% SDS ทำการย้ายโปรตีนโดยใช้ constant voltage ที่ 10 v, อุณหภูมิ 10-15° เซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (over-night) ใช้ Mini Trans-Blot<sup>R</sup> transfertank

นำแผ่น PVDF membrane ที่ได้มา block ด้วย 3% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween-20 ใน 1XPBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย PBST (ประกอบด้วย PBS pH 7.4 ที่มี 0.1% (v/v) Tween-20) นำแผ่น membrane ที่ถูก block แล้วมาทำการตรวจหาโปรตีนที่เป็นแอนติเจนเป้าหมาย โดยใช้ monoclonal antibodies ที่จำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย 1XPBS-Tween นานครั้งละ 10 นาที ทำการตรวจปฏิกิริยาการจับระหว่าง antigen และ antibody ที่เกิดขึ้น โดยใช้ horseradish peroxidase – conjugated secondary antibody บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. ล้าง 3 ครั้งด้วย 1XPBS-Tween เติม peroxidase substrate solution ที่มี 1.3 mM diaminobenzidine (DAB), 0.02% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ใน PBS pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่น membrane แช่ในน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง แล้วนำมาวิเคราะห์ผล ในการทำ SDS-PAGE ใช้ pre-stained protein markers เป็น molecular weight control

**การนำ rMoAb และ recombinant proteins ไปพัฒนาวิธีตรวจการติดเชื้อพยาธิ**

**การพัฒนาวิธีตรวจแบบ sandwich ELISA**

เป็นวิธีที่มี sensitivity สูงใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจนจากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ขั้นตอนในการตรวจหาแอนติเจนดังกล่าวแสดงโดยย่อ โดยแผนผังและภาพประกอบ ดังนี้



แผนภาพที่ 1 ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA



เคลือบ ELISA plate ด้วย แอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนเป้าหมาย

↓  
ใส่โมโนโคลนัลแอนติบอดี (capture antibody) ลงในหลุมของ ELISA plate

↓  
ใส่ skim milk เพื่อ block non specific binding

↓  
ใส่ซีรัมสัตว์ที่ติดเชื้อลงในหลุมของ ELISA plate

↓  
ใส่ rMoAb ต่อแอนติเจนเป้าหมายที่เชื่อมกับ biotin (detection antibody)

↓  
ใส่ streptavidin-HRP ลงในหลุมของ ELISA plate

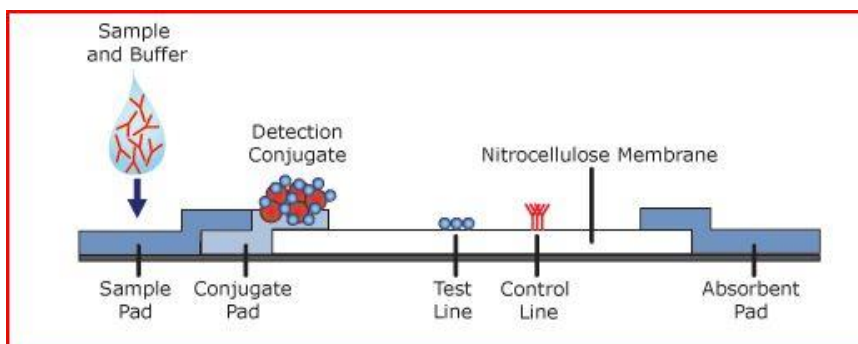
↓  
ใส่ TMB substrate ลงในหลุมของ ELISA plate

↓  
หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N HCL แล้วอ่าน OD

แผนภูมิที่ 1 ภาพสรุปวิธี sandwich ELISA

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

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



แผนภาพที่ 2 แสดงชุดตรวจแบบ ICS

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

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

#### **การแปลผลการทดสอบของ ICS test**

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

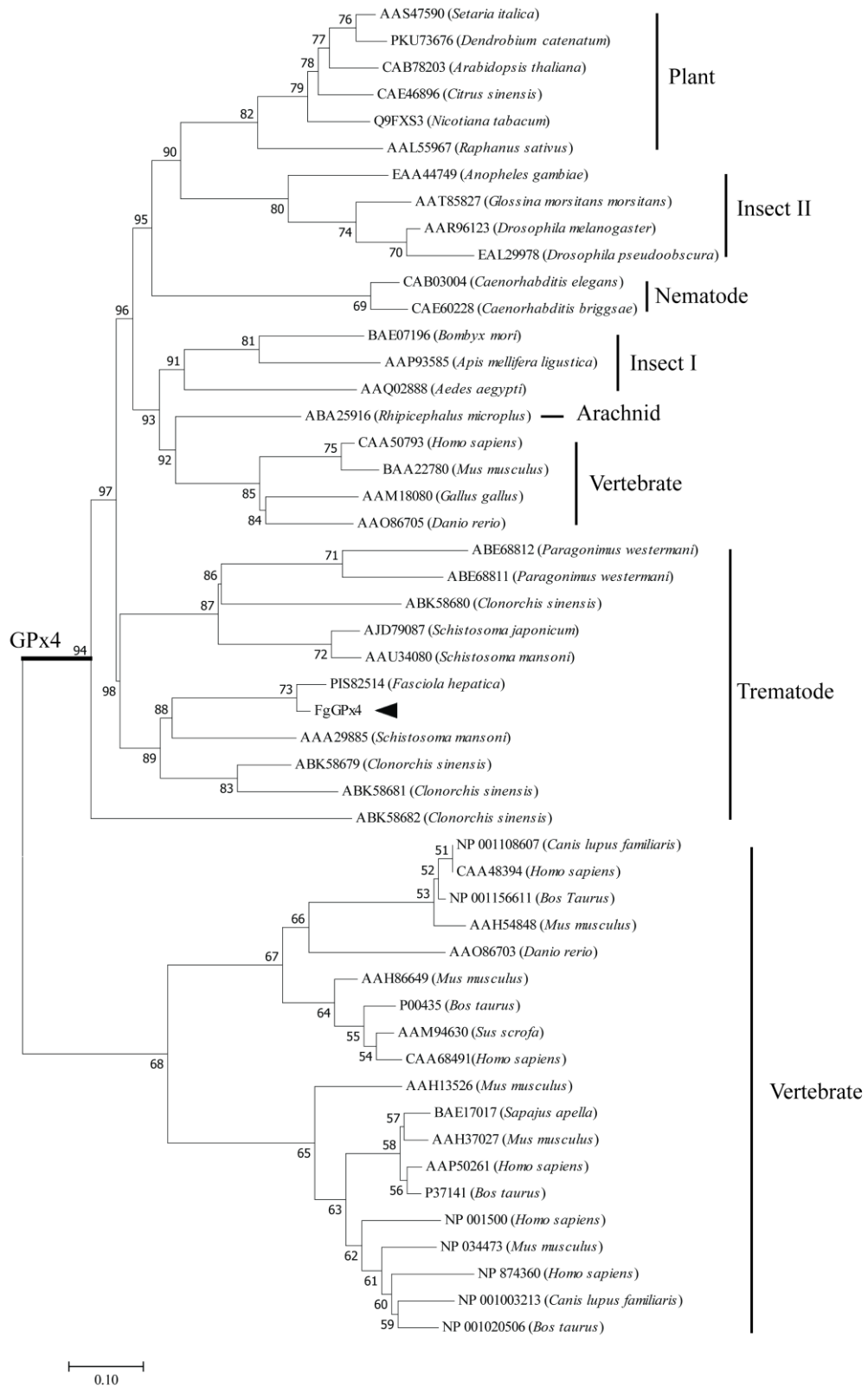
## ผลการวิจัย (Results)

### การ clone cDNA ของ FgGPx

ได้ทำการโคลนยีน FgGPx โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งใช้ cDNA libraries จาก *F.gigantica* เป็น template หลังจากนั้นได้ทำการผลิต recombinant DNA โดย ligate ยีนที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วทำการวิเคราะห์หาลำดับ DNA โดย Macrogen Inc (South Korea) หลังจากนั้นวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยโปรแกรม BLAST (The National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) และ SignalP 3.0 (Bendtsen et al. 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (รูปที่ 1) และทำการความสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม Maga X (รูปที่ 2)

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| HsGPx4 | MSLGRLCRLKLPALLCGALAAPGLAGTMCASRDDWRCARSMHEFSAKIDIGHMVNLDKYR  | 60  |
| BtGPx4 | MSFSRLYLRLKLPALLCGALAAPGLASTMCASRDDWRCARSMHEFSAKIDGRMVNLDKYR  | 60  |
| FhGPx4 | -MFGLCRRSGGASILRYALA-LPFTGMAT----SGGTDGTIYGFSATTIDGHEVTKLDKY- | 53  |
| SjGPx4 | -----MITGSSAMSS----SSRSGSSIYDFTAKDIDGVDVSLSKYR                | 37  |
| CsGPx4 | -MRGLLVRA---ACLGYTFVGPRLSMMAA----SPTEPANIFHFSKIDGQEISLQKYE    | 52  |
| FgGPx  | -----MAT----SGGNDGTIYGFSARNIDGHEVTKLDKYR                      | 30  |
|        | . . . * : * * * * : * . **                                    |     |
| <br>   |   |     |
| HsGPx4 | GFVCIVTNVASQXGKTEVNYTQLVDLHARYAECGLRILAFPCNQFGKQEPGSNEEIKEFA  | 120 |
| BtGPx4 | GHVCIVTNVASQUGKTVDNYTQLVDLHARYAECGLRILAFPCNQFGRQEPGSNAEIKEFA  | 120 |
| FhGPx4 | -----RILAFPCNQFGGQEPWPEAEIKQYV                                | 78  |
| SjGPx4 | GYVCLIVNVACKUGATDKNYRQLQKMHMTQLVGDGLRILAFPCNQFLGQEPWPEAEIKKQV | 97  |
| CsGPx4 | GYVTLIVNVACKUGLTDKNYRQLQDLHTRLGKGLRILAFPCNQFGNQEPWPEAEIKRWV   | 112 |
| FgGPx  | GRVCLIVNVACKUGLTDKNYRQLQELHTRLGKGLSILAFPCNQFGGQEPWPEAEIKQYV   | 90  |
|        | ***** ** : ***.:.:  |     |
| <br>   |   |     |
| HsGPx4 | -AGYNVKFDMFSKICVNGDDAHPLWKWKIQQPKGKILGNAIKWNFTKFLIDKNGCVVKR   | 179 |
| BtGPx4 | -AGYNVKFDLFSKICVNGDDAHPLWKWKVQPKGRGMLGNAIKWNFTKFLIDKNGCVVKR   | 179 |
| FhGPx4 | TEKYNVQFDMFSKINVNGSDTHPLFSFLKSEL--KGTLLINAIKWNFAKFLVDREGVPRKR | 136 |
| SjGPx4 | SETYGVQFDMFSKINVNGPNAHPLYEFLKSEL--GGALMSAIKWNFSKFLIDRKQPVKR   | 155 |
| CsGPx4 | SEKFVGTDFMFSKIDVNGNNAHPLFKYLKKEQ--HGFLIDAIKWFGKFLVDRTGKPRKR   | 170 |
| FgGPx  | TEKYNVQFDMFSKINVNGSDTHPLFSFLKSNL--KGTLLINAIKWNFAKFLVDREGVPRKR | 148 |
|        | : . * ** : : *** ** * : : * : * : * : * * * : * * * : * * *   |     |
| <br>   |   |     |
| HsGPx4 | YGPMEEPLVIEKDLPHYF-----                                       | 197 |
| BtGPx4 | YGPMEEPLVIEKDLPCYL-----                                       | 197 |
| FhGPx4 | YSPQTEPLSHVIIMLWYLPPQQLHQSSEQKDMTNGMFGGN                      | 176 |
| SjGPx4 | YSPTTAPNEILDDIMELLKQK-----                                    | 176 |
| CsGPx4 | YSPQTDPLDIEKDIVELLE-----                                      | 190 |
| FgGPx  | YSPQTEPLDIEKDIIGLLKQ-----                                     | 168 |

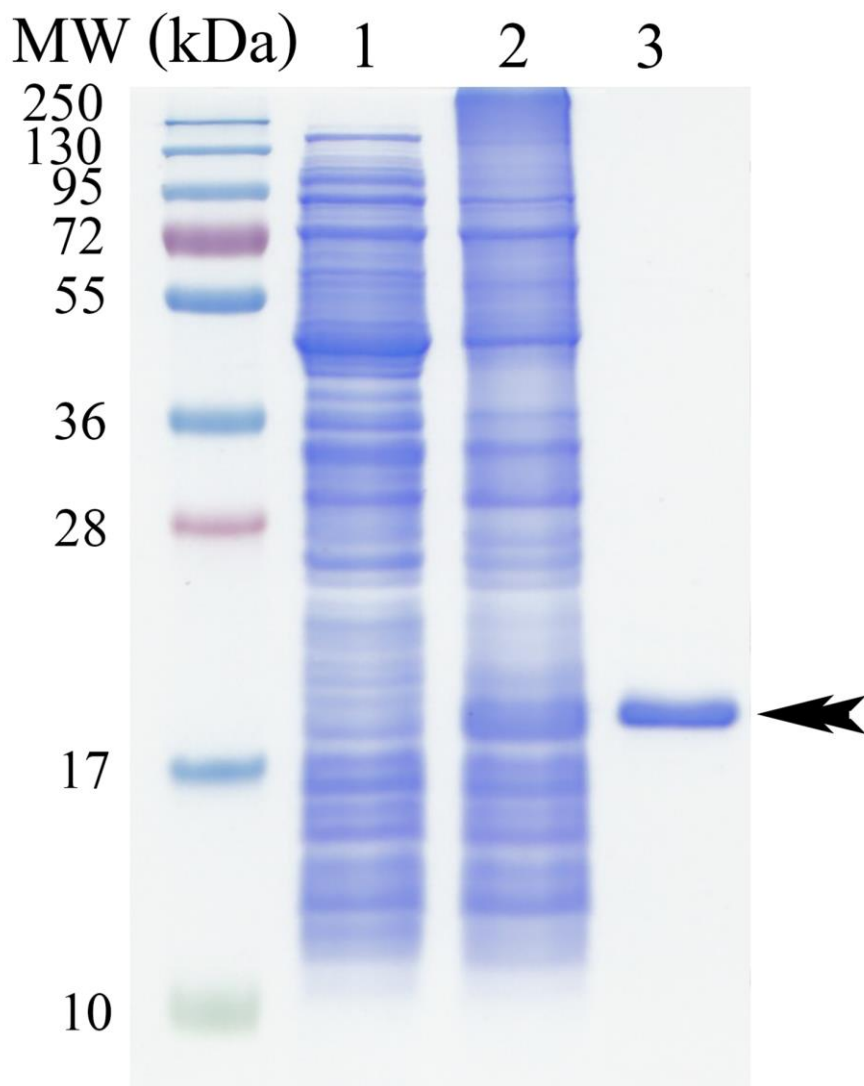
รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับอะมิโนของยีน GPx จาก *F. gigantea* กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ของยีน GPx จาก *F. gigantica* กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

### สังเคราะห์ recombinant protein

การสังเคราะห์ recombinant proteins (FgGPx) ทำโดยการ ligate cDNA ของจีนเป้าหมายกับ expression vector ของระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย (prokaryotic system) คือ pET-30b หลังจากนั้นจึงนำ vector เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งเป็นเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของจีนโดยใช้ isopropyl- $\beta$ -D- thiogalactoside (IPTG) และทำให้เซลล์แบคทีเรียสลายและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA หลังจากนั้นศึกษาขนาดของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue โดยขนาด (molecular weight) ของ FgGPx ที่ 19 kDa (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 SDS-PAGE วิเคราะห์ purification ของ FgGPx จากการ express ใน *E. coli* ภายใต้ Native condition โดยใช้สี Coomassie blue ย้อม

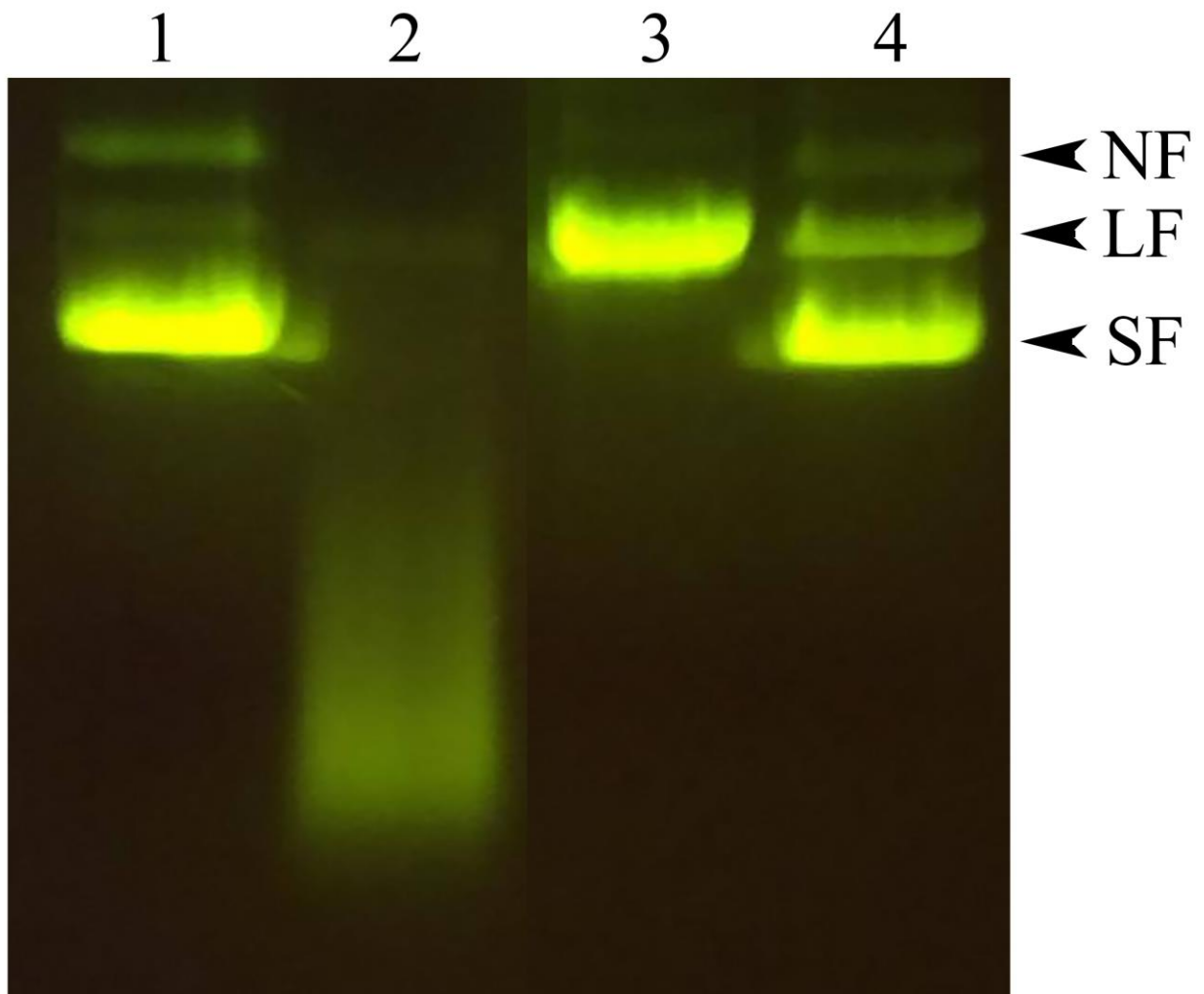
Lane 1 : non induce with IPTG

Lane 2 : induce with IPTG

Lane 3 : purified rFgGPx

## ทดสอบการทำงานของ rFgGPx

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของ rFgGPx ด้วยการทดสอบ DNA nicking assay



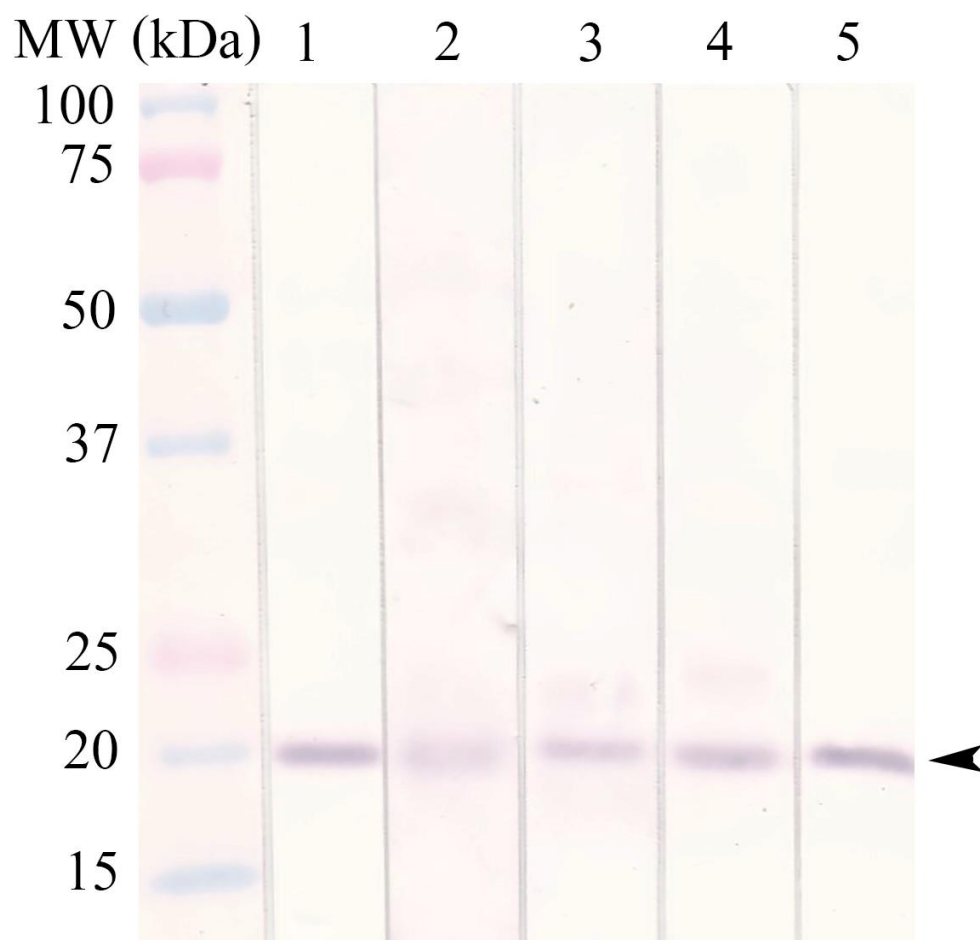
รูปที่ 4 Agarose gel วิเคราะห์ function ของ rFgGPx (antioxidant activity) (NF=nicked form, LF=linear form, SF=supercoiled form)

Lane 1 : positive control

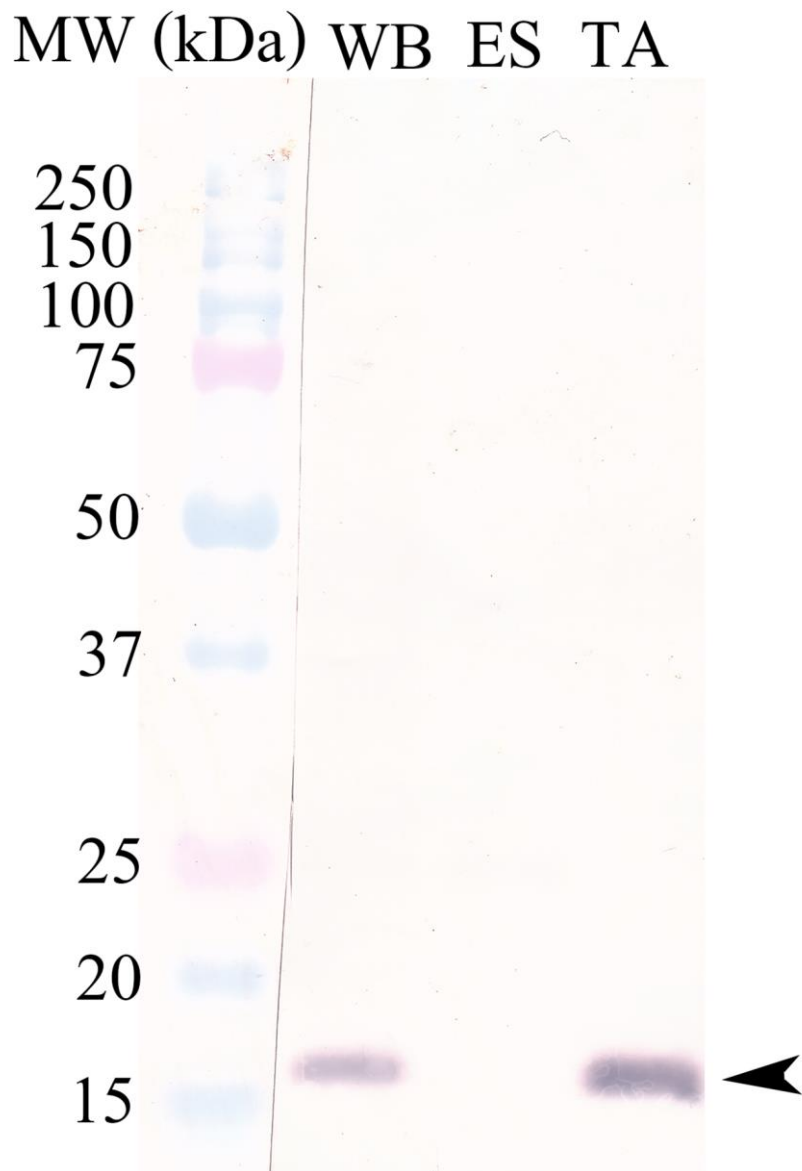
Lane 2: negative control

Lane 3: rFgGPx 25 µg/ml

Lane 4: rFgGPx 50 µg/ml



รูปที่ 5 ผลทำการทำ western blot โดยทดสอบการทำปฏิกิริยากับกับ *F. gigantica* ระยะต่างๆ ดังนี้ egg (lane 1), metacercariae (lane 2), NEJs (lane 3), 4 week-old juveniles (lane 4), adult (lane 5)



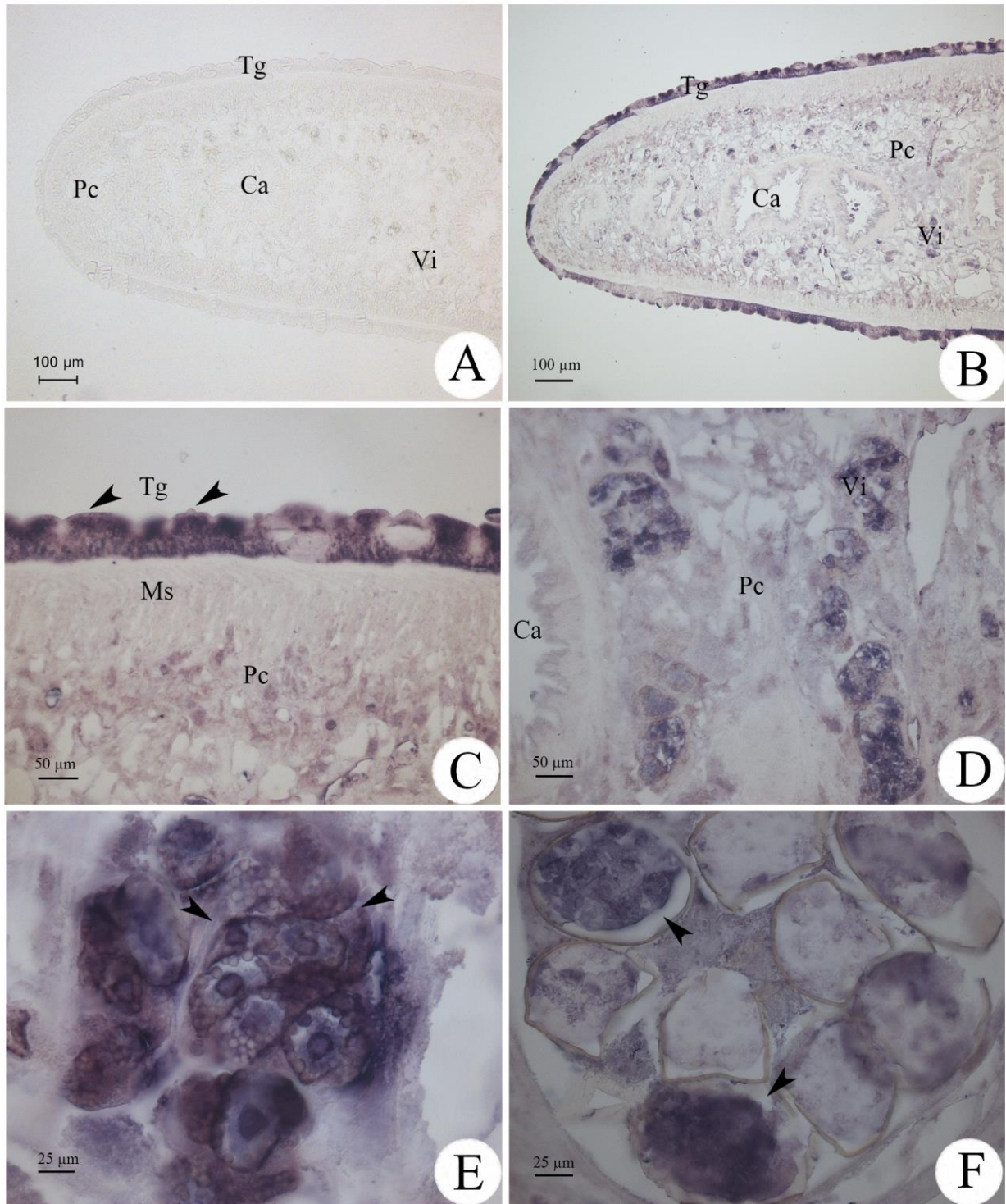
รูปที่ 6 ผลทำการทำ western blot โดยทดสอบการแสดงออกของโปรตีน FgGPx ใน WB, ES, TA ของพยาธิ  
ใบไม้ตัว *F.gigantica*

Lane 1: WB

Lane 2: ES

Lane 3: TA





รูปที่ 7 การแสดงออกของโปรตีน FgGPx ในเนื้อเยื่อของพยาธิในไม้ตับ *F.gigantica* ระยะตัวเต็มวัย พบว่ามี การแสดงออกของโปรตีนบริเวณผิว (tegument; Tg), vitelline (Vi), egg (B-F) โดยไม่มีการ แสดงออกบริเวณอื่นของพยาธิ

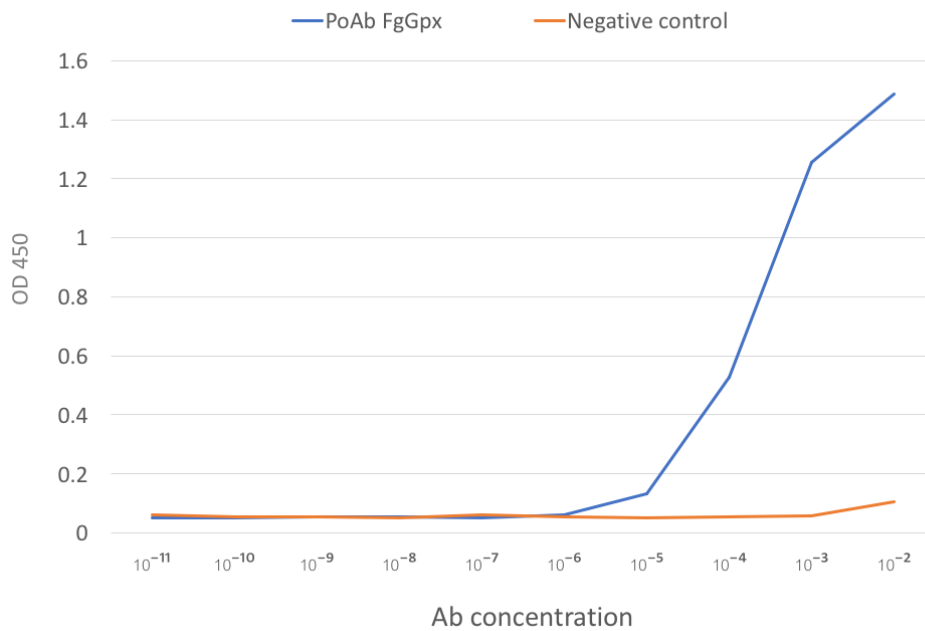
## 7. การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgGPx

### การวิเคราะห์ปริมาณ Polyclonal Antibody FgGPx ด้วยวิธี Indirect ELISA

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

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FgGPx และค่าดูดกลืนแสง OD<sub>450</sub>

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



ภาพที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FgGPx และค่าดูดกลืนแสง OD<sub>450</sub> พบว่าตำแหน่ง titer ~10<sup>-6</sup> พบปริมาณของ Ab ที่สร้างขึ้นต่อโปรตีน GPx ต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้

#### การผลิต Monoclonal antibody ต่อ FgGPx

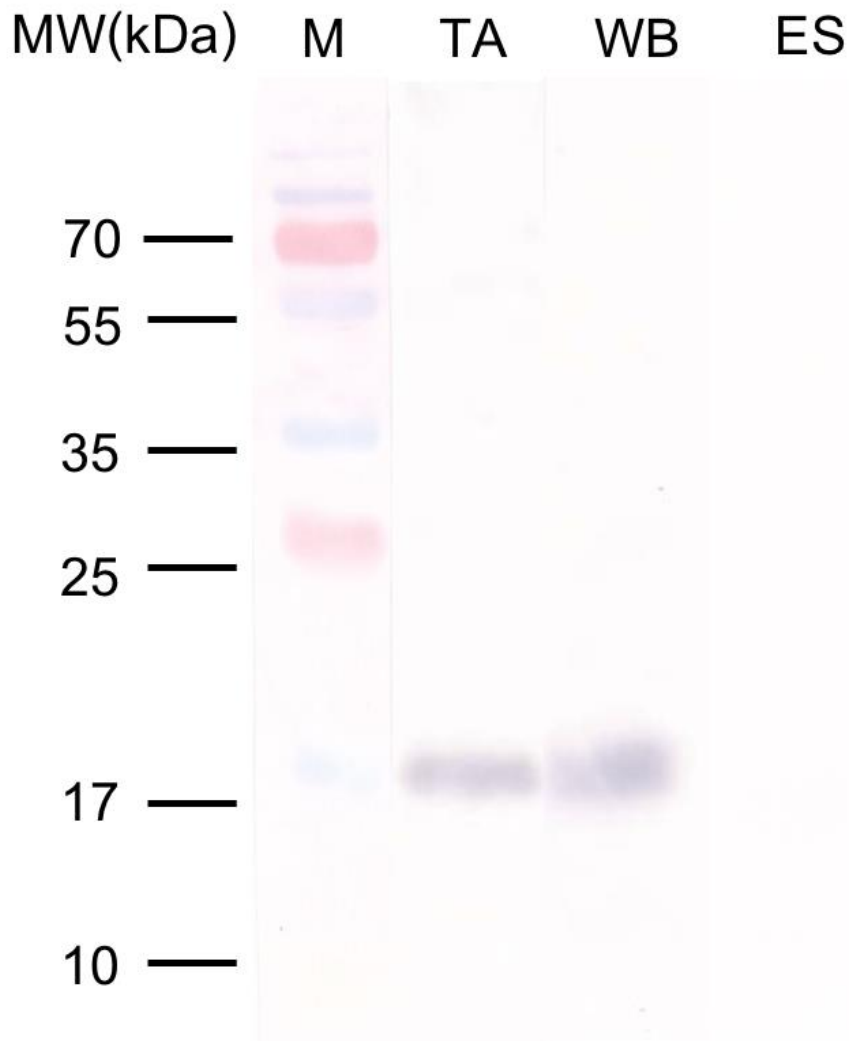
จากผลการทดลอง ELISA ได้เลือก culture fluid จาก Hybridoma clone ชื่อ 7B8 ทำการหาค่าชนิด (isotype) ของ MoAb พบว่า heavy chain เป็นชนิด IgG1 และ light chain เป็นชนิด K ดังนั้นจึงนำ clone นี้มาใช้ในการทดลองต่อไป

#### ศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดมาจากพยาธิ *F.gigantica* ด้วยวิธี Lawry method

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

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

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



ภาพที่ 9 แสดงความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ต่อ โปรตีน TA, WB และ ES ด้วยวิธี indirect western blot ให้ผล positive กับ TA และ WB และให้ผล negative กับ ES

Lane 1 Protein Ladder Marker (M)

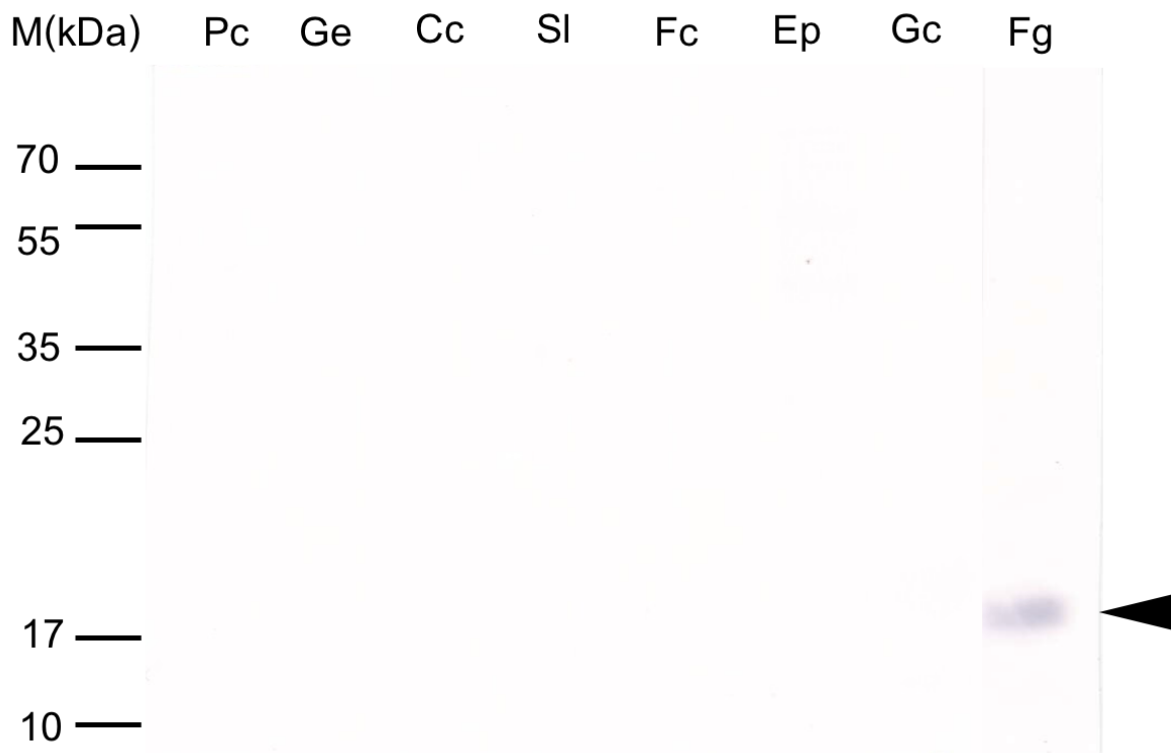
Lane 2 Protein Tegument (TA) ของ *F. gigantea* แสดงน้ำหนักโมเลกุล 18 kDa

Lane 3 Protein Whole body (WB) ของ *F. gigantea* แสดงน้ำหนักโมเลกุล 18 kDa

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

วิเคราะห์ความจำเพาะของโปรตีน FgGPx โดยการทดสอบ Cross reaction กับพยาธิชนิดอื่น ๆ ด้วยวิธี Indirect western blot

หลังจากที่ทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE โปรตีนของพยาธิชนิดอื่น 8 ชนิด ได้แก่ *Paramphistomum cervi* (Pc), *Gigantocotyle explanatum* (Ge), *Cotylophoron cotylophorum* (Cc), *Setaria labiatopapillosa* (Sl), *Fischoederius cobboldi* (Fc), *Eurytrema pancreaticum* (Ep), *Gastrothylax crumenifer* (Gc) และ *Fasciola gigantica* (Fg) เพื่อทำการแยกขนาดโมเลกุลของโปรตีน จากนั้นทำการ transfer มายัง แผ่น membrane และทดสอบ cross-reaction ด้วยวิธี Indirect western blot โดยใช้ mouse anti-GPx (7B8) เป็น primary antibody โดยการอ่านผล positive สังเกตจากลักษณะ แถบสีที่ปรากฏบนแผ่น membrane จากการทดสอบพบว่า MoAb ต่อ GPx ไม่มีการทำปฏิกิริยาข้ามกับ โปรตีนของพยาธิชนิด *Paramphistomum cervi*, *Gigantocotyle explanatum*, *Cotylophoron cotylophorum*, *Setaria labiatopapillosa*, *Fischoederius cobboldi*, *Eurytrema pancreaticum* และ *Gastrothylax crumenifer* มีแต่เพียงโปรตีนของ *F. gigantica* ที่ปรากฏลักษณะแถบสี (band) เนื่องจากมีความจำเพาะต่อโปรตีน GPx มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 18 k Da ดังภาพที่ 16

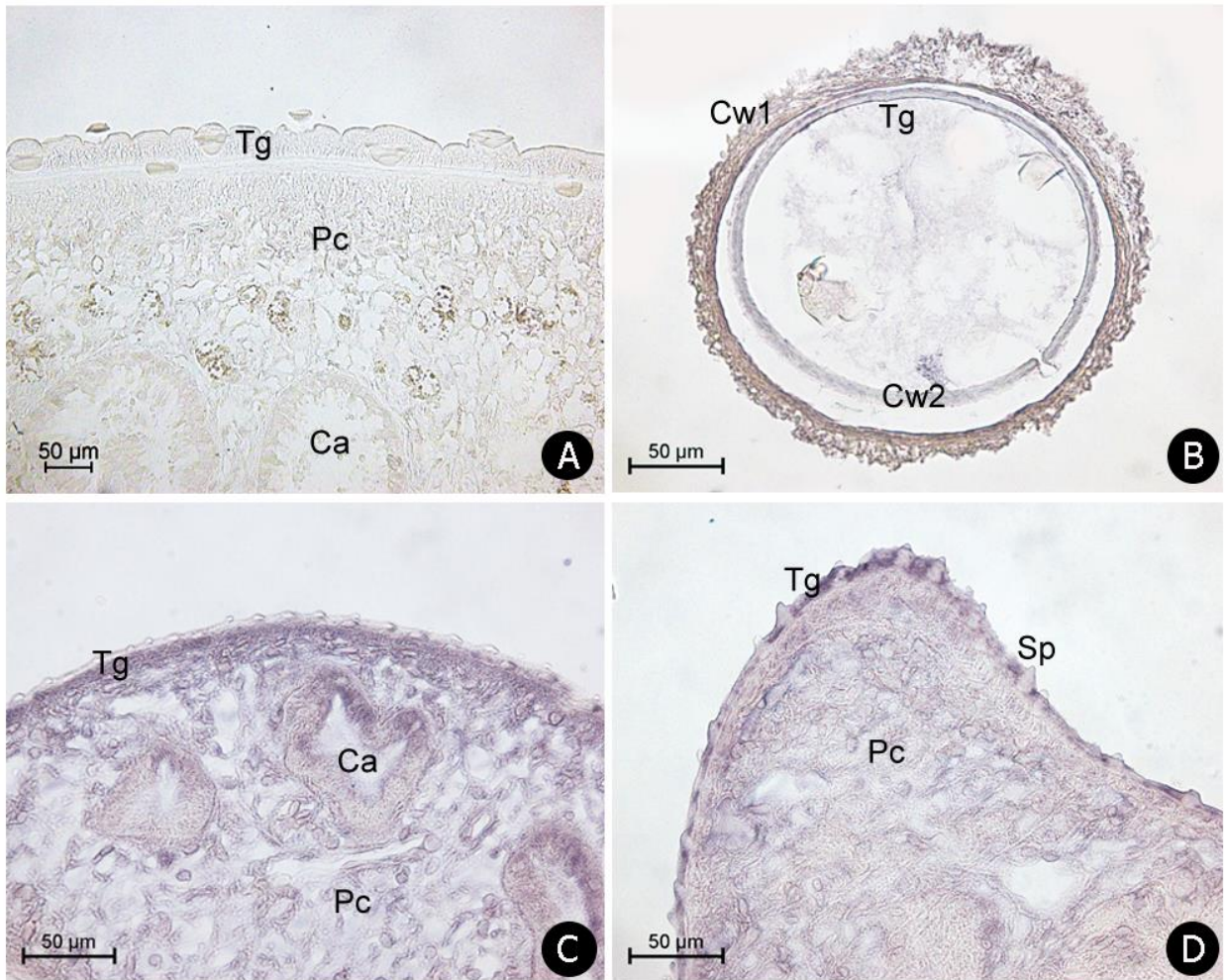


ภาพที่ 10 แสดงความจำเพาะของโปรตีน FgGPx ด้วยวิธี Indirect western blot และในแถบสุดท้าย ปรากฏลักษณะของแถบสี (band) แสดงถึงความจำเพาะของ FgGPx แต่เพียงแต่ โปรตีน adult whole body ของ *F. gigantica*

## การวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีน FgGPx ในพยาธิ *F.gigantica* ด้วยวิธี Immunohistochemistry

ทำการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีน GPx ด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้ mouse anti-GPx (7B8) เป็น primary antibody และในส่วนของ negative control ใช้ myeloma เป็น primary antibody ผลการย้อมเนื้อเยื่อพยาธิ *F.gigantica* ในระยะพยาธิตัวเต็มวัย (Adult) เป็น negative control (ภาพ A) และระยะ metacercaria, 3 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ ที่กำลังขยาย 40X (จากภาพ B-D) ดังภาพที่ 17 พบว่าในระยะ metacercaria ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GPx แต่ในระยะ 3 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ พบว่ามีการแสดงออกของ GPx ที่ผิว (tegument) ของพยาธิ *F.gigantica* และไม่มีการแสดงออกที่เปลือกหุ้มด้านนอก (Cw1= outer cyst wall) ,เปลือกหุ้มด้านใน (Cw2= inner cyst wall), caecum (Ca), parenchymal cell (Pc) และ spine (Sp)

ผลการย้อมเนื้อเยื่อพยาธิ *F.gigantica* ในระยะพยาธิตัวเต็มวัย (Adult) เป็น negative control (ภาพ A) และระยะ adult (จากภาพ B-D) จากกำลังขยายต่ำไปกำลังขยายสูง ดังภาพที่ 18 พบว่าย้อมติดสีบริเวณผิว (tegument) ของพยาธิ *F.gigantica* และไม่มีการแสดงออกที่ caecum (Ca), parenchymal cell (Pc) และ spine (Sp)

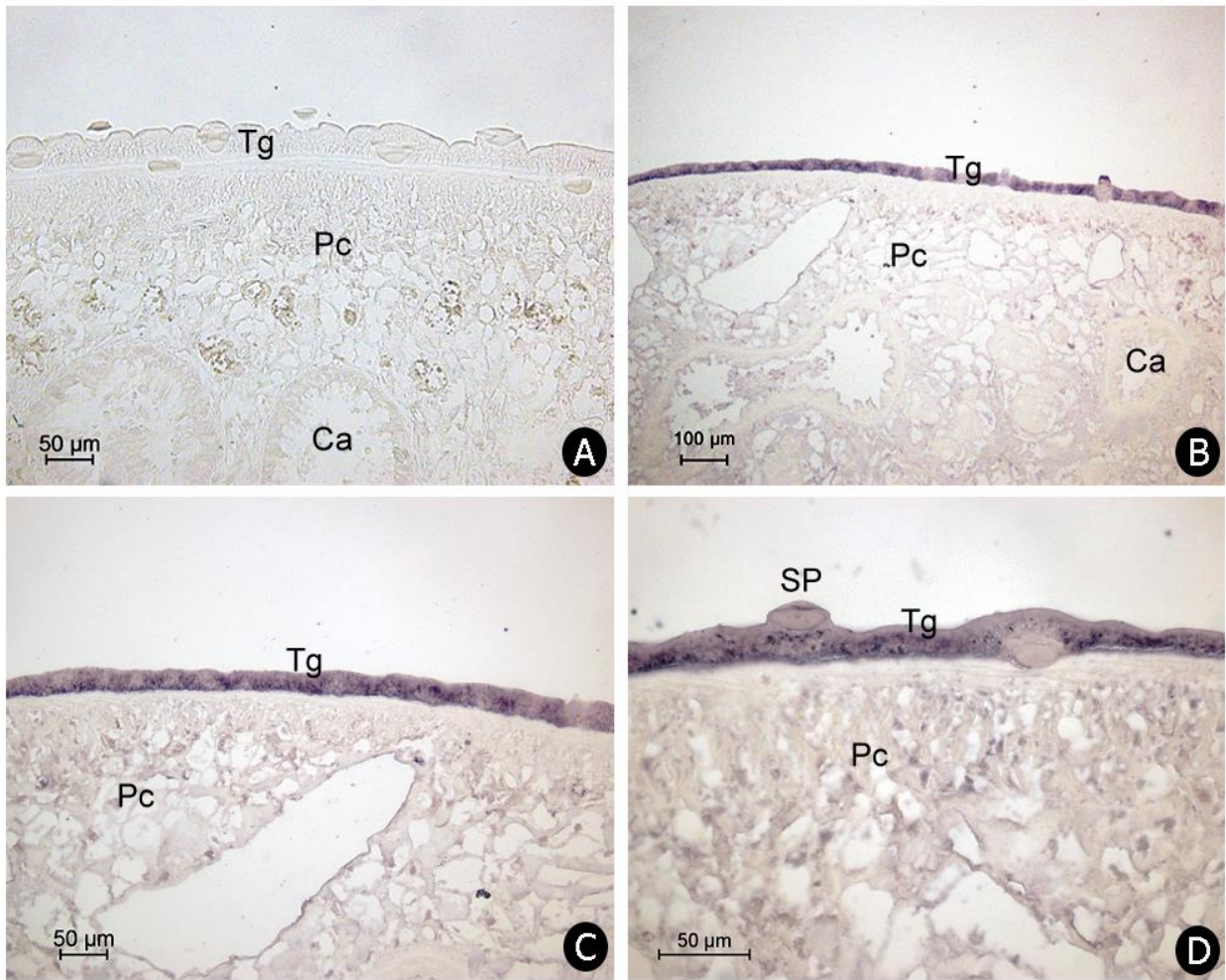


ภาพที่ 11 แสดงการตรวจหาตำแหน่งของโปรตีน GPx ในเนื้อเยื่อของ *F. gigantica* ในระยะ metacercaria , 3 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ด้วยวิธี Immunohistochemistry ซึ่งใช้ culture fluid (7B8) เป็น primary antibody

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

ภาพ B ภาพกำลังขยายสูงของพยาธิระยะ metacercariae แสดงถึง ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GPx ใน เปลือกหุ้มด้านนอก(Cw1= outer cyst wall) และเปลือกหุ้มด้านใน (Cw2= inner cyst wall)

ภาพ C และ D ภาพกำลังขยายสูงพยาธิระยะ 3 และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ แสดงถึงตำแหน่งที่มีการแสดงออกของโปรตีน GPx (positive reaction) ในบริเวณผิว (Tg=tegument) ลักษณะเป็นสีม่วงๆที่ชั้นผิว แต่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GPx ใน caecum(Ca),parenchymal cell (Pc) และ spine(Sp)



ภาพที่ 12 แสดงการตรวจหาตำแหน่งของโปรตีน GPx ในเนื้อเยื่อของ *F. gigantica* ในระยะพยาธิตัวเต็มวัย ด้วยวิธี Immunohistochemistry ซึ่งใช้ culture fluid (7B8) เป็น primary antibody

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

ภาพ B-D ภาพกำลังขยายต่ำ(B),กลาง(C) และสูง(D) ในพยาธิระยะตัวเต็มวัย(Adult) แสดงถึงตำแหน่งที่มีการแสดงออกของโปรตีน GPx (positive reaction) ในบริเวณผิว (Tg=tegument) ลักษณะเป็นสีม่วงๆที่ชั้นผิว แต่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน GPx ใน caecum(Ca), parenchymal cell(Pc) และ spine(Sp)



## การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgTRP14

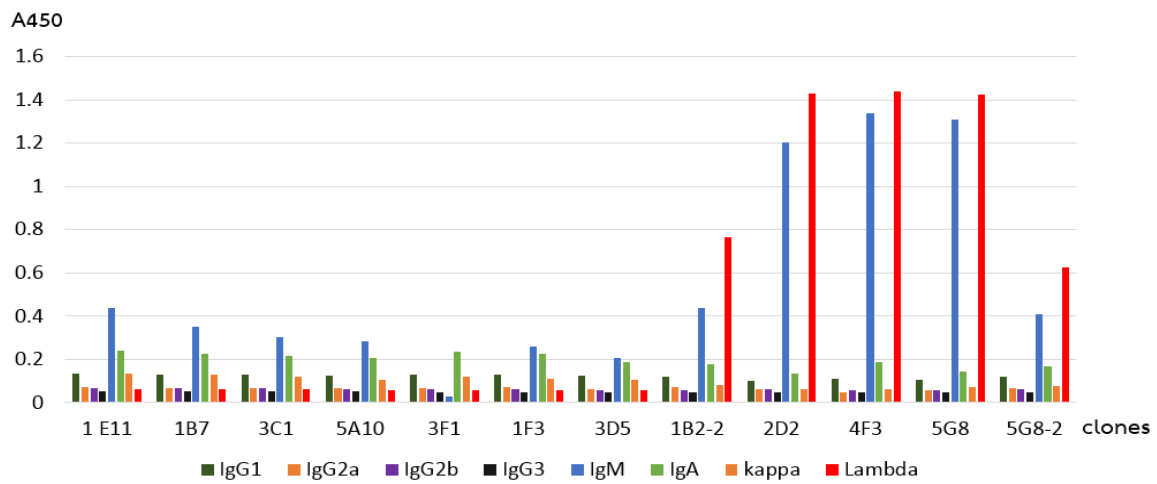
### การตรวจสอบชนิดของ monoclonal antibody โดยวิธี indirect ELISA

ผลการตรวจสอบ MoAb ที่ได้จาก hybridoma clone ที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด 12 clone ได้แก่ 1E11, 1B7, 3C1, 5A10, 3F1, 1F3, 3D5, 1B2-2, 2D2, 4F3, 5G8, 5G8-2 มาทำการตรวจสอบชนิดของ MoAb ด้วยวิธี indirect ELISA กับ heavy chain 6 ชนิด (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM และ IgA) และ light chain 2 ชนิด (kappa และ Lambda) พบว่า MoAb ที่ผลิตได้ทั้ง 5 clone (1B2-2, 2D2, 4F3, 5G8, 5G8-2) เป็น IgM, Lambda light chain ผลตามตาราง ดังนี้

### ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของ MoAb ชนิดต่างๆด้วยวิธี ELISA

| ชนิดของ Ab | OD    |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 1E11  | 1B7   | 3C1   | 5A10  | 3F1   | 1F3   | 3D5   | 1B2-2 | 2D2   | 4F3   | 5G8   | 5G8-2 |
| IgG1       | 0.133 | 0.130 | 0.128 | 0.126 | 0.130 | 0.130 | 0.123 | 0.119 | 0.102 | 0.108 | 0.103 | 0.121 |
| IgG2a      | 0.071 | 0.068 | 0.065 | 0.065 | 0.067 | 0.069 | 0.060 | 0.069 | 0.060 | 0.047 | 0.059 | 0.065 |
| IgG2b      | 0.066 | 0.065 | 0.065 | 0.062 | 0.061 | 0.061 | 0.059 | 0.057 | 0.063 | 0.058 | 0.058 | 0.062 |
| IgG3       | 0.050 | 0.050 | 0.050 | 0.050 | 0.049 | 0.049 | 0.048 | 0.046 | 0.047 | 0.048 | 0.049 | 0.049 |
| IgM        | 0.439 | 0.349 | 0.304 | 0.282 | 0.025 | 0.257 | 0.205 | 0.435 | 1.202 | 1.340 | 1.310 | 0.407 |
| IgA        | 0.241 | 0.223 | 0.214 | 0.205 | 0.234 | 0.223 | 0.187 | 0.179 | 0.135 | 0.186 | 0.145 | 0.168 |
| Kappa      | 0.132 | 0.130 | 0.119 | 0.106 | 0.120 | 0.112 | 0.105 | 0.079 | 0.061 | 0.061 | 0.069 | 0.077 |
| Lambda     | 0.060 | 0.063 | 0.062 | 0.058 | 0.059 | 0.058 | 0.057 | 0.765 | 1.431 | 1.441 | 1.427 | 0.624 |

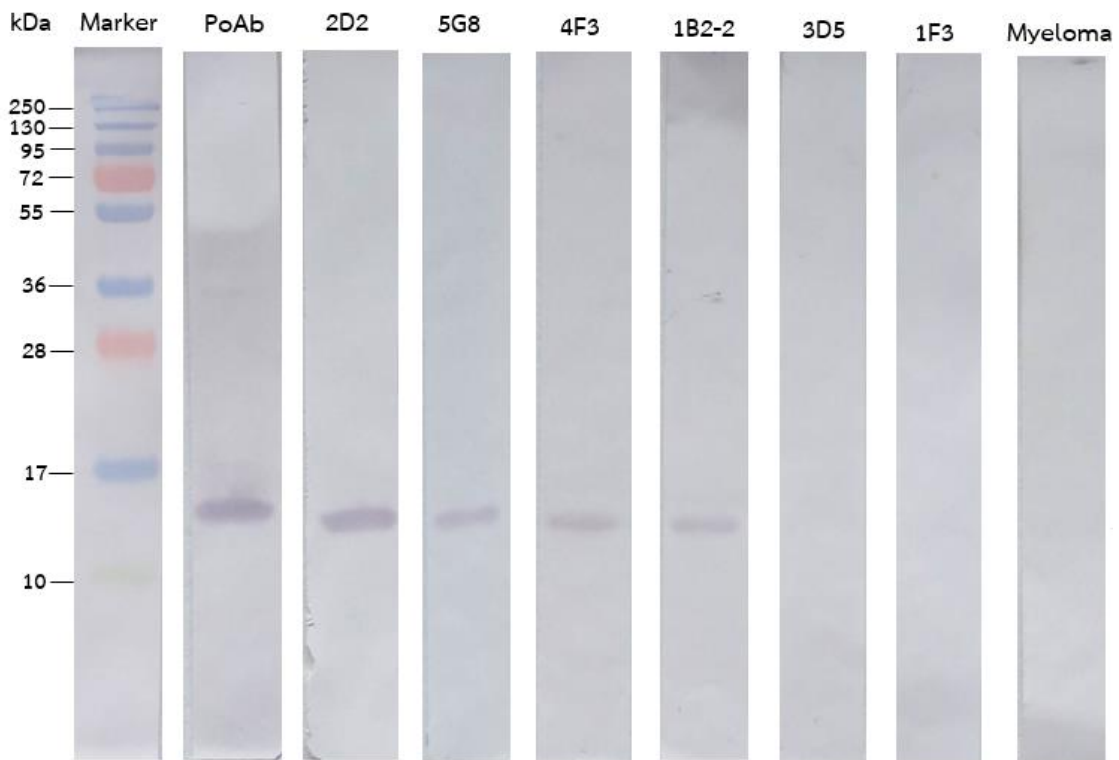
โดยค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ใช้ antigen เป็นโปรตีน TRP14 ที่พบในพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica*



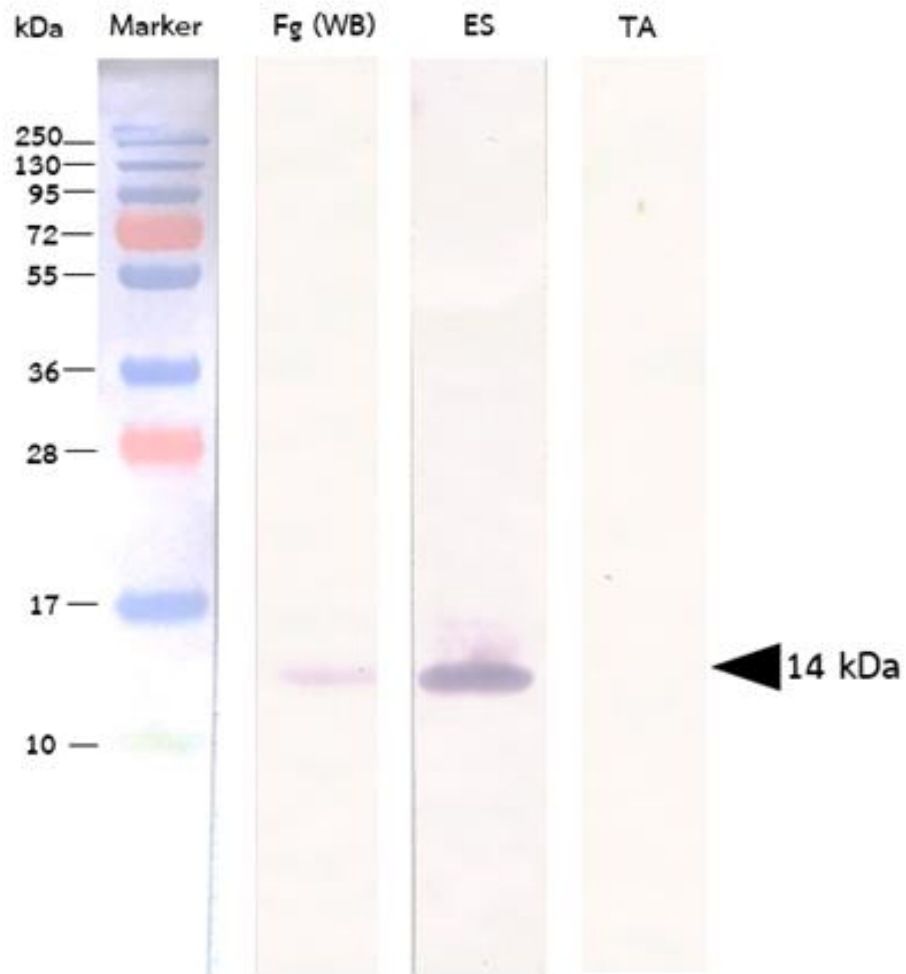
รูปที่ 13 กราฟแสดงชนิดออกของ isotype ของ MoAb เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ MoAb ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่พบในพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica*

## การศึกษาคุณลักษณะของ monoclonal antibody โดยวิธี western blot

การศึกษาคุณลักษณะของ MoAb ต่อ recombinant protein (rFgTRP14) ของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* เพื่อยืนยันผลการทดสอบจากวิธี Indirect ELISA ว่า MoAb ที่ผลิตได้สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับ recombinant (rFgTRP14) protein ของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* พบว่า MoAb clone 2D2, 5G8, 4F3 และ 1B2-2 มีความจำเพาะต่อ rFgTRP14 โดยแสดงผลการทดสอบ และทำการศึกษา MoAb clone 2D2 ต่อ Fg(WB), ES, TA พบว่าความจำเพาะต่อ Fg(WB) และ ES ที่ 14 kDa แต่ไม่มีความจำเพาะต่อ TA โดยแสดงผลการทดสอบ



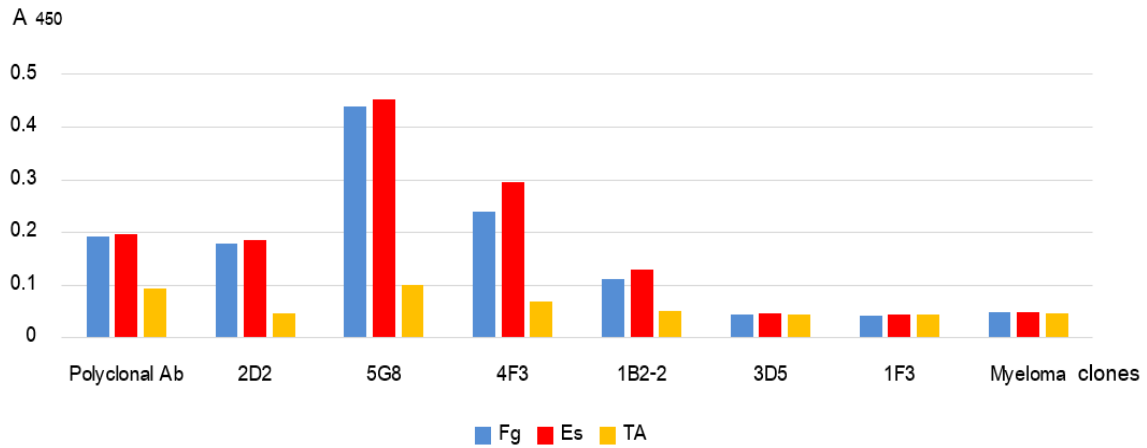
**รูปที่ 14** แสดงขนาดของแถบโปรตีน MoAb ของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* ได้แก่ PoAb (lane1) เป็น positive control, 2D2(lane2) , 5G8(lane3) , 4F3(lane4) , 1B2-2(lane5) , 3D5(lane6) , 1F3(lane7) และใช้ Myeloma cell (lane8) เป็น negative control เทียบตำแหน่งและขนาดของโปรตีนด้วย specific marker (ด้านซ้ายสุด) ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี indirect western blot analysis



รูปที่ 15 แสดงขนาดของแถบโปรตีน MoAb 2D2 ต่อ Fg(WB), ES, TA ของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* ได้แก่ Fg(WB)(lane1) , ES(lane2) , TA(lane3) เทียบตำแหน่งและขนาดของโปรตีนด้วย specific marker (ด้านซ้ายสุด) ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี indirect western blot analysis

ตารางที่ 3 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของ MoAb ชนิด IgM กับ Fg (WB), ES และ TA ของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* ด้วยวิธี indirect ELISA

| ชนิดของ antibody | OD    |       |       |
|------------------|-------|-------|-------|
|                  | Fg    | Es    | TA    |
| PoAb             | 0.193 | 0.198 | 0.093 |
| 2D2              | 0.179 | 0.186 | 0.048 |
| 5G8              | 0.440 | 0.452 | 0.100 |
| 4F3              | 0.240 | 0.296 | 0.069 |
| 1B2-2            | 0.111 | 0.129 | 0.051 |
| 3D5              | 0.044 | 0.046 | 0.044 |
| 1F3              | 0.043 | 0.045 | 0.044 |
| Myeloma          | 0.049 | 0.050 | 0.047 |



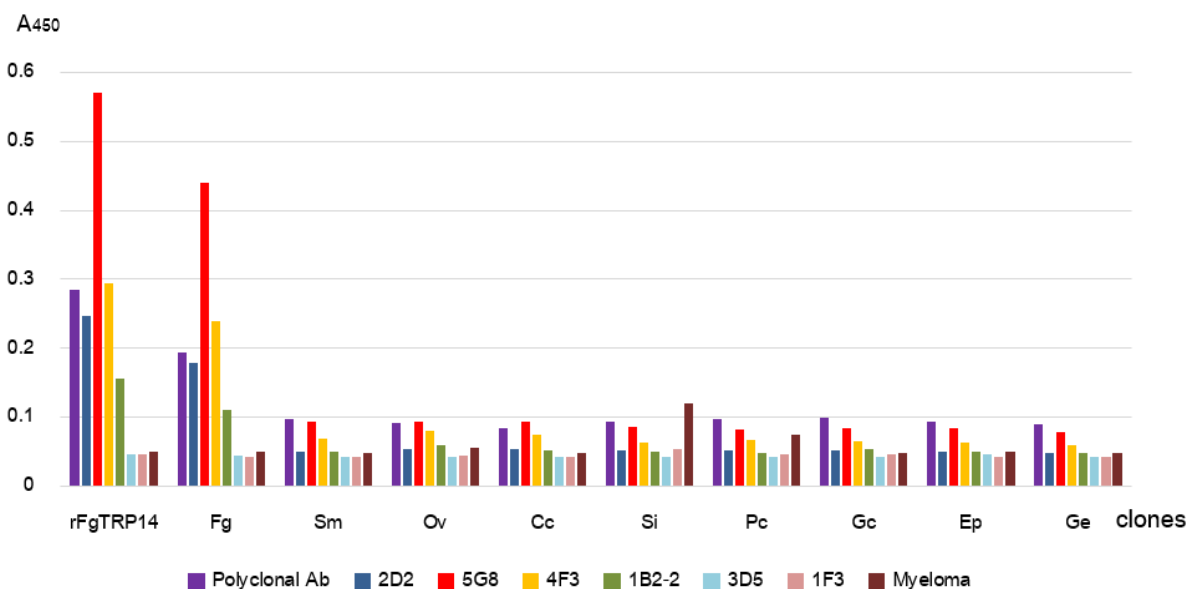
รูปที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ MoAb ชนิด IgM กับ Fg(WB), ES และ TA ของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica*

#### การเกิด cross reaction กับ antigen ของพยาธิแต่ละชนิด โดยวิธี indirect ELISA

การศึกษาคูณลักษณะของ MoAb ที่ผลิตได้ พบว่าเป็นชนิด IgM ที่มีการแสดงออกของ light chain สมบูรณ์ MoAb ที่ผลิตได้มีคุณภาพการจับกับ antigen จึงทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reaction) โดยใช้ antigen (WB) ของพยาธิชนิดต่างๆ ได้แก่ rFgTRP14, Fg, Sm, Ov, Cc, Si, Pc, Gc, Ep, Ge ซึ่งพบว่าไม่มีการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่นๆ โดยแสดงผลตามตาราง ดังนี้

ตารางที่ 4 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของ MoAb ชนิด IgM กับ antigen ของพยาธิชนิดต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA

| ชนิดของ Ab | OD       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | rFgTRP14 | Fg    | Sm    | Ov    | Cc    | Si    | Pc    | Gc    | Ep    | Ge    |
| PoAb       | 0.284    | 0.193 | 0.098 | 0.091 | 0.083 | 0.094 | 0.098 | 0.099 | 0.094 | 0.089 |
| 2D2        | 0.246    | 0.179 | 0.049 | 0.054 | 0.054 | 0.051 | 0.052 | 0.052 | 0.050 | 0.048 |
| 5G8        | 0.570    | 0.440 | 0.094 | 0.094 | 0.093 | 0.086 | 0.081 | 0.083 | 0.084 | 0.079 |
| 4F3        | 0.295    | 0.240 | 0.069 | 0.080 | 0.075 | 0.062 | 0.067 | 0.064 | 0.063 | 0.059 |
| 1B2-2      | 0.155    | 0.111 | 0.050 | 0.059 | 0.052 | 0.049 | 0.048 | 0.054 | 0.050 | 0.048 |
| 3D5        | 0.045    | 0.044 | 0.043 | 0.043 | 0.042 | 0.043 | 0.043 | 0.043 | 0.045 | 0.043 |
| 1F3        | 0.045    | 0.043 | 0.042 | 0.044 | 0.043 | 0.054 | 0.045 | 0.045 | 0.043 | 0.043 |
| Myeloma    | 0.050    | 0.049 | 0.048 | 0.056 | 0.047 | 0.120 | 0.074 | 0.048 | 0.050 | 0.047 |

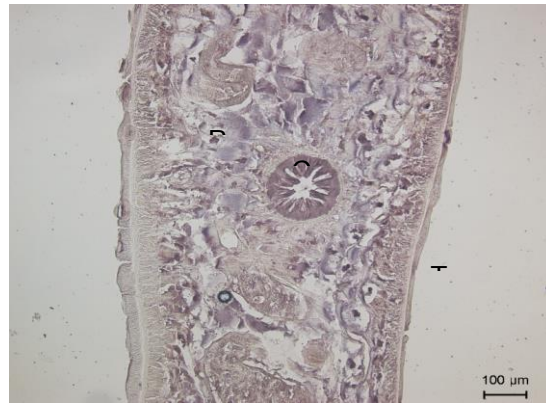


รูปที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ MoAb ชนิด IgM กับ antigen ของพยาธิชนิดต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

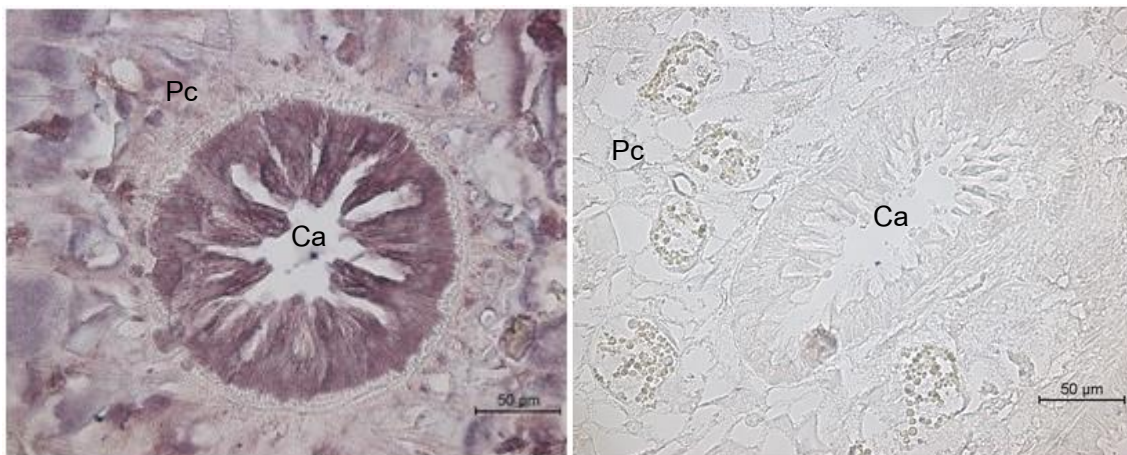
## Immunohistochemistry

จากการศึกษาการแสดงออกของ TRP14 ในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* เพื่อดูความจำเพาะของ MoAb ต่อโปรตีนที่กระเพาะอาหารของพยาธิ โดยอาศัยหลักการ Immunohistochemistry พบว่า MoAb clone 4F3, 2D2 และ 5G8 มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่กระเพาะอาหารต่อพยาธิโดยมีการแสดงออกมากของ TRP14 บริเวณกระเพาะอาหาร และมีการแสดงออกของ TRP14 ในระดับต่ำที่ parenchyma โดยแสดงผลการทดสอบ

### 4F3 Clone



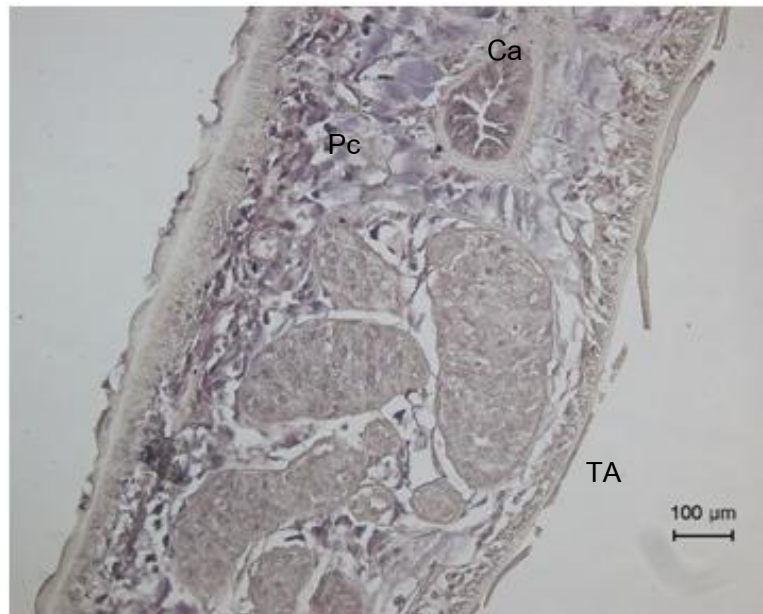
รูปที่ 18 การแสดงออกของ TRP14 ในกระเพาะอาหารและ parenchyma ของพยาธิ *Fasciola gigantica* ที่กำลังขยาย 100 เท่า



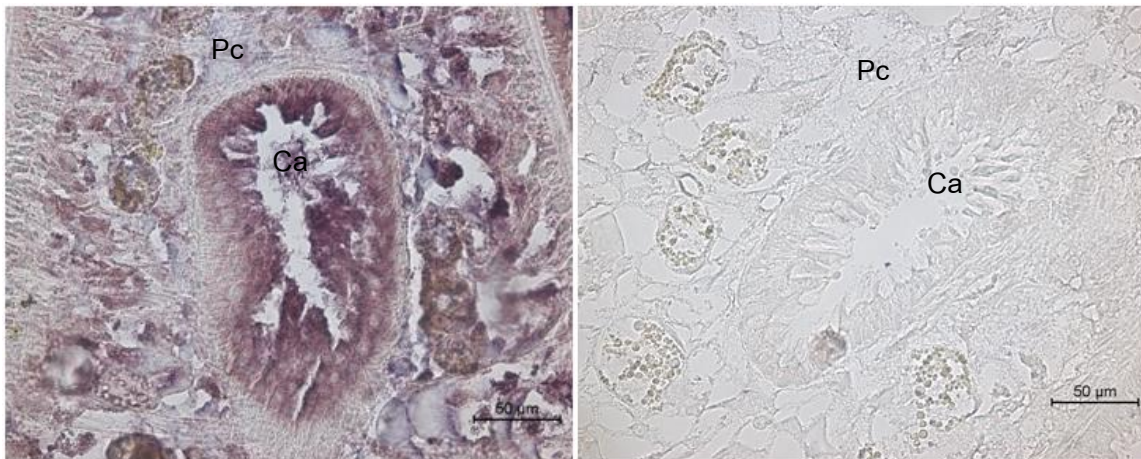
รูปที่ 19 การแสดงออกของ TRP14 ที่กระเพาะอาหารของพยาธิ *Fasciola gigantica* ที่กำลังขยาย 400 เท่า (ภาพซ้าย) MoAb Clone 4F3 และ(ภาพขวา)เป็น Negative control



2D2 Clone

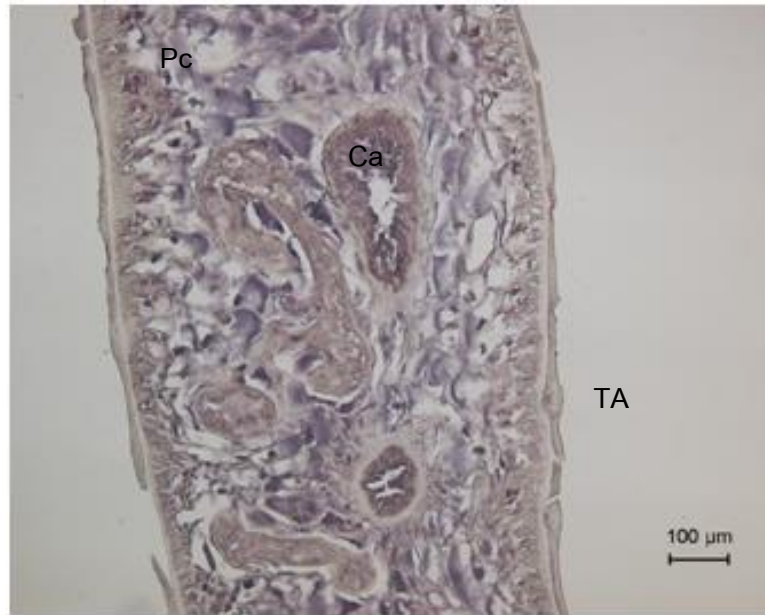


รูปที่ 20 การแสดงออกของ TRP14 ที่กระเพาะอาหารของพยาธิ *Fasciola gigantica* ที่กำลังขยาย 100 เท่า

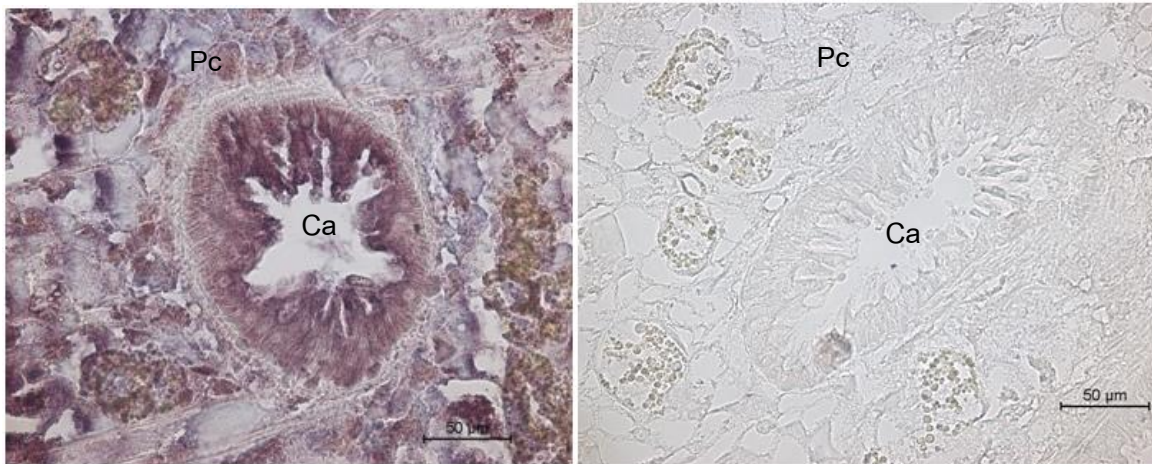


รูปที่ 21 การแสดงออกของ TRP14 ที่กระเพาะอาหารของพยาธิ *Fasciola gigantica* ที่กำลังขยาย 400 เท่า (ภาพซ้าย) MoAb Clone 2D2 และ(ภาพขวา)เป็น Negative control

5G8 Clone



รูปที่ 22 การแสดงออกของ TRP14 ที่กระเพาะอาหารของพยาธิ *Fasciola gigantica* ที่กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 23 การแสดงออกของ TRP14 ที่กระเพาะอาหารของพยาธิ *Fasciola gigantica* ที่กำลังขยาย 400 เท่า (ภาพซ้าย) MoAb Clone 5G8 และ (ภาพขวา) เป็น Negative control

## อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

### สังเคราะห์ โปรตีน rFgGPx

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

### การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของ MoAb ต่อ rFgGPx

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

ผลจากการทำ immunohistochemistry ย้อมเนื้อเยื่อพยาธิ *F.gigantica* ในระยะ metacercaria , 3 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ และพยาธิตัวเต็มวัย(Adult) สามารถยืนยันการทดสอบของ indirect western immunoblot พบว่าระยะ metacercaria ไม่มีการแสดงออกของ GPx เนื่องจากในระยะนี้มี cyst wall หุ้มถึงสองชั้นและยังไม่ได้สัมผัสกับ free radicals แต่ในระยะ 3 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ และพยาธิตัวเต็มวัย(Adult) ย้อมติดสีบริเวณผิว (tegument) ของพยาธิ *F.gigantica* อย่างชัดเจน จึงยืนยันได้ว่าผิวของพยาธิ *F.gigantica* มีการผลิตโปรตีน GPx ออกมาจริง เพราะเมื่อพยาธิ *F.gigantica* บุกรุกเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์ จะต้องการป้องกันตนเองจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และลดความเป็นพิษของ free radicals (neutralizaion) โดยหลั่งสารออกมาหลายชนิดเช่น hydrogen peroxidase , peroxidized lipid รวมถึง Glutathione peroxidase ด้วย (Mei et al.,1996) งานวิจัยก่อนหน้ากล่าวไว้ว่าแอนติเจนตัวเด่นๆที่พยาธิ *F.gigantica* ปล่อยออกมา ได้แก่ glutathione-s-transferase, cysteine, paramyosin และ membrane protein (ศรีรัฐ ภัคศิรณชิต,2553) GPx เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็น Antioxidant เป็นตัวสำคัญต่อร่างกายในการต้านสารอนุมูลอิสระ และช่วยในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ให้กลายเป็นน้ำ (H<sub>2</sub>O) และออกซิเจน (O<sub>2</sub>) รวมถึงกำจัด Organic Hydroperoxide ซึ่งบริเวณที่พบการหลั่งมากคือ บริเวณผิวหนังของพยาธิ *F.gigantica* เนื่องจากบริเวณนั้นถือว่าเป็นบริเวณที่สัมผัสกับ free radicals ในโฮสต์ได้โดยตรง ดังนั้นจึงสามารถนำ MoAb (7B8) ที่ผลิตได้นำมาใช้ในการ immunodiagnosis ในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงเอื้องที่ติดเชื้อจากพยาธิ *F.gigantica* ที่ก่อให้เกิดโรค Fasciolosis เพราะวิธีนี้ถือได้ว่ามีความแม่นยำ (sensitivity) สูงและมีความจำเพาะ (specificity) สูงเช่นกัน นำมาพัฒนาต่อไปเป็นชุดตรวจ วัคซีน และช่วยนารายได้เขาประเทศอย่างสูงอีกด้วย

#### การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของ MoAb ต่อ rFgTRP14

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษาโปรตีนที่หลั่งออกมาจากพยาธิเพื่อตรวจหาการติดเชื้อตั้งแต่ในระยะแรกพบว่าโปรตีน 28.5 kDa tegumental antigen (Anuracpreeda et al., 2009), Cathepsin B3 (Anuracpreeda et al., 2011), Saposin like protein2 (Kueakhai et al., 2013) ซึ่งพบว่าโปรตีนแต่ละชนิดยังไม่สามารถตรวจหาการติดเชื้อพยาธิได้ทุกระยะ และโปรตีน Cathepsin L1 protease 27 kDa สามารถใช้ MoAb ตรวจวินิจฉัยตั้งแต่ 1-35 วัน หลังมีการติดเชื้อของพยาธิ *F. gigantea* พบว่ามีความไวถึงร้อยละ 93 และความจำเพาะร้อยละ 100 โดยวิธี ELISA (Anuracpreeda et al., 2016) แต่เนื่องจากโปรตีนยังมีขนาดใหญ่จึงทำให้การทดสอบต่างๆ เกิดปฏิกิริยาข้ามกว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็ก จึงนำ TRP14 เป็นโปรตีนที่หลั่งออกมาจากพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* เพื่อป้องกันตัวเองจาก ROS ของโฮสต์เป็นโปรตีนที่มีส่วนช่วยป้องกันการอักเสบ โดยพบว่า TRP14 มีการแสดงออกที่ gut และผิวของ metacercariae จนถึงระยะตัวเต็มวัยของพยาธิและสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต (Changklungmoa, 2017 ) โดยโปรตีน TRP14 สามารถหลั่งออกมาใน ซีรัมได้และเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก 14 kDa ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีและเร็วกว่าโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ โดยผู้วิจัยคาดหวังว่าโปรตีน TRP14 จะหลั่งออกมาในซีรัมของโฮสต์มากกว่า Cat L1 และมีความไวมากกว่าจึงนำมาใช้ในการวิจัยในครั้งนี้

ในงานวิจัยนี้ได้นำ hybridoma cell (ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์พรอนันต์ เกื้อไข) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวน hybridoma cells และปริมาณ แอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ (culture fluid) เพื่อนำ MoAb ใน culture fluid มาทดสอบคุณสมบัติ ด้วยวิธี indirect ELISA, western blot และ Immunohistochemistry เพื่อทดสอบหาคุณสมบัติของ MoAb ที่มีความจำเพาะต่อ TRP14 และสามารถนำไปพัฒนาการตรวจวินิจฉัยต่อไปได้

การทดสอบหาปริมาณ MoAb โดยวิธี indirect ELISA พบว่า clone ที่มีการแสดงออกสูงได้แก่ 1E11, 1B7, 3C1, 5A10, 3F1, 1F3, 3D5, 1B2-2, 2D2, 4F3, 5G8 และ 5G8-2 นำไปตรวจสอบชนิดของ แอนติบอดี โดยใช้ MoAb ทั้ง 12 clone เป็น primary antibody และใช้ secondary antibody เป็น antibody ชนิดต่างๆ โดยใช้ทั้งส่วน heavy chain และ light chain ที่ติดฉลากด้วย HRP ได้แก่ IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA, kappa และ lambda เมื่อดูตามตาราง 4-1 พบว่า clone ที่มีการแสดงออกสูงทั้งส่วนของ heavy chain และ light chain โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร สามารถบ่งบอกได้ว่าเป็นแอนติบอดีที่สามารถทำงานได้ดีเนื่องจากมีส่วนของ Fab regions (antigen binding site) ที่ใช้จับแอนติเจนสมบูรณ์ ซึ่งผลการทดลองพบว่า MoAb clone 4F3, 5G8, 2D2, 1B2-2 และ 5G8-2 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าค่า cut off คือ 0.097 ในส่วนของ heavy chain ที่เป็นชนิด IgM และ light chain ที่เป็น ส่วน Lambda จึงสามารถบอกได้ว่า MoAb สามารถทำงานได้และมีความสมบูรณ์ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า IgM มีความไวสูงในการจับกับแอนติเจนที่ coat ลงบนเพลต ELISA จึงสามารถใช้ในการทดลองได้แม้ในซีรัมของผู้ป่วยจะมีปริมาณน้อย ซึ่งจะช่วยลดปริมาณซีรัมที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ได้ (Adungo et al., 2016) แต่ IgM ยังมีข้อเสียคือไม่มีความเสถียร ดังนั้นการที่จะนำไปพัฒนาต่อในการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยต้องเป็น MoAb ที่เป็นชนิด IgG โดยอาจจะต้องทำการเปลี่ยนวิธีการเก็บแอนติบอดีโดยรอให้เกิด class switching ของ IgM เป็นชนิด IgG ก่อน โดยหากเป็นแอนติบอดีที่เป็นชนิด IgM จะมีเพียงการกระตุ้น B-cell จากแอนติเจน B-cell สามารถสร้างแอนติบอดีที่เป็นชนิด IgM ออกมาได้เลย แต่หากมีสัญญาณจาก T-cell ร่วมด้วยก็จะเกิด class switching สร้างเป็น isotype ชนิด IgG (Li et al., 2004; Mix et al., 2006)

จากการศึกษา western blot ของ MoAb ต่อ recombinant protein (TRP 14) เพื่อนำมาใช้ในการยืนยันผลของวิธี indirect ELISA ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลจากทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกัน โดย MoAb ที่มีความจำเพาะต่อ TRP14 ได้แก่ 4F3, 2D2, 5G8 และ 1B2-2 ที่ขนาด 14 kDa ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบการหลังโปรตีน TRP14 จาก metacercariae และ adult stage (Changklungmoa et al., 2017) จากการทดลองสามารถบ่งชี้ความจำเพาะได้จากการแสดงออกที่แถบขนาด 14 kDa และเมื่อนำ MoAb Clone 2D2 ไปทดสอบความจำเพาะต่อ TRP14 ใน Fg(WB), ES และ TA พบว่ามีความจำเพาะต่อ TRP14 ใน Fg (WB) และ ES สามารถบอกได้ว่า MoAb ที่ได้มีความจำเพาะต่อตัวพยาธิ *Fasciola gigantica* และสามารถตรวจวินิจฉัย TRP14 ที่หลังออกมาในซีรัมได้ แต่ไม่มีความจำเพาะต่อ TA เนื่องจาก TRP14 ไม่มีการแสดงออกที่ผิวของพยาธิที่แสดงในภาพที่ 4-3 จะเห็นได้ว่ามีแถบสีเข้มที่ ES มากกว่า Fg (WB) เนื่องจากในส่วนของ Fg (WB) เป็นตัวพยาธิที่มีโปรตีนหลายชนิดมากกว่าส่วนของ ES ที่เป็นส่วนที่เฉพาะมากกว่า โดยหากต้องการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนชนิดต่างๆที่พยาธิหลังออกมาสามารถทำได้โดยใช้หลักการ western blot

โดยใช้ MoAb ที่จำเพาะต่อโปรตีนแต่ละชนิดและเปรียบเทียบโดยดูความเข้มสีที่แสดงออกมาหากมีความเข้มสีมากแสดงถึงโปรตีนชนิดนั้นมีปริมาณมาก หากจะนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัย *Fasciola gigantica* ด้วยวิธี immunodiagnosis ต้องทำการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (Cross reaction) เพื่อดูความจำเพาะของ MoAb ที่ผลิตได้ต่อ TRP14 ที่หลั่งจาก *Fasciola gigantica*

นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการผลิตและศึกษาคุณลักษณะของ MoAb ต่อ FgTRP14 จากการศึกษาคุณลักษณะของ MoAb ที่ผลิตได้ทั้ง 12 clone พบว่าเป็นชนิด IgM ซึ่งมีคุณภาพในการจับกับแอนติเจน จึงทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reaction) ของ MoAb ต่อแอนติเจนของพยาธิแต่ละชนิด โดยใช้แอนติเจนเป็นโปรตีน TRP14 ที่พบในพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* (rFgTRP14) และใช้โปรตีนจากพยาธิชนิดต่างๆ ได้แก่ Fg, Sm, Ov, Cc, Si, Pc, Gc, Ep, Ge มี myeloma cell ใน culture fluid เป็น negative control และมี polyclonal antibody เป็น positive control พบว่า MoAb ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงคือ 5G8, 4F3, 2D2 และ 1B2-2 โดยให้ค่าสูงกับ rFgTRP14 และ Fg แสดงว่า MoAb ทั้ง 4 clone มีความจำเพาะต่อโปรตีน TRP14 ที่หลั่งออกมา ภาวะเพาะอาหารของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* จึงไม่เกิดปฏิกิริยา cross reaction กับแอนติเจนที่เป็นโปรตีนจากพยาธิชนิดอื่น เนื่องจากการจับกันระหว่างแอนติบอดีและ epitope บนแอนติเจนอาศัยความแตกต่างระหว่างกรดอะมิโนของแอนติเจน ดังนั้นการที่ MoAb จะสามารถจับอย่างจำเพาะกับ TRP14 ได้ต้องมีส่วน overlapping domains (Benjamin et al. 1984) คือมีตำแหน่ง Cys<sup>43</sup> และ Cys<sup>46</sup> ที่ตรงกัน และไม่สามารถจับกับแอนติเจนของพยาธิชนิดอื่นได้ เนื่องจากไม่มี epitope ที่เหมือนกับ MoAb

จากการทำการทดสอบชิ้นเนื้อของพยาธิชนิด *Fasciola gigantica* ที่ตัด tissue section ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ 8 clone ได้แก่ 2D2, 5G8, 4F3, 1B2-2, 3D5, 1F3, PoAb และ myeloma พบว่า 2D2, 5G8 และ 4F3 มีการแสดงออกของโปรตีน TRP14 บริเวณเนื้อเยื่อ epithelial cell ที่ภาวะเพาะอาหารและ parenchyma cell ของพยาธิใบไม้ตัว *Fasciola gigantica* โดย 4F3 มีการแสดงออกของโปรตีน TRP14 มากที่สุด ตามด้วย 5G8 และ 2D2 ตามลำดับ แสดงว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะกับแอนติเจนและ Fab region (antigen binding site) ของแอนติบอดีมีประสิทธิภาพในการจับกับแอนติเจนบนผิว epithelial cell ที่ภาวะเพาะอาหารของพยาธิ แต่ 1B2-2 พบการแสดงออกบริเวณผิวเนื้อเยื่อ epithelial cell ที่ภาวะเพาะอาหารของพยาธิ น้อยมาก อาจเนื่องมาจากมีปริมาณแอนติบอดีน้อย หรือแอนติบอดีมีประสิทธิภาพในการจับกับแอนติเจนน้อยจนไม่สามารถตรวจวัดได้หรือมีการแสดงออกของโปรตีน TRP14 น้อยมากจนสังเกตเห็นไม่ชัด และ MoAb clone 3D5 และ 1F3 ไม่พบการติดสีที่ epithelial cell ที่ภาวะเพาะอาหารของพยาธิเนื่องจาก MoAb ไม่มีความจำเพาะต่อโปรตีน TRP14 โดยเปรียบเทียบกับ PoAb และ myeloma ที่เป็น positive control และ negative control ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับปริมาณแอนติบอดีที่ตรวจพบด้วยวิธี ELISA และ Western blot นอกจากการแสดง ออกสูงที่ภาวะเพาะอาหารของพยาธิ *Fasciola gigantica* ยังมีการแสดงออกต่ำบริเวณ perenchyma ของพยาธิอาจเนื่องมาจาก MoAb ที่ผลิตได้เป็นชนิด IgM ซึ่งมีส่วนของ antigen binding site มากทำให้สามารถจับได้กับหลาย epitope ของแอนติเจน นอกจากนี้สาเหตุที่ทำให้เกิดผลบวกปลอมยังมีสาเหตุมาจากเกิดการรั่วของ antigen

ออกมาในเนื้อเยื่อภายนอกกระเพาะอาหารของพยาธิ (Lawrence, 2008) หรืออาจเกิดได้จากการความร้อน, protease และ proteolytic สามารถเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลง epitope ทำให้ antibody ไม่สามารถจับอย่างจำเพาะ สาเหตุที่ไม่มีการแสดงออกที่ TA เนื่องมาจากเป็นส่วนที่พยาธิใช้ในการรักษาสมดุลและป้องกันภูมิคุ้มกันของโฮสต์มาทำลาย (Sobhon et al., 1998) จึงไม่มีการแสดงออกของโปรตีน TRP14 ที่ TA

จากการศึกษาคุณลักษณะของ MoAb พบว่า clone 2D2 มีความจำเพาะต่อโปรตีน TRP14 ที่หลั่งออกมาจากพยาธิ *Fasciola gigantica* ที่สุดและไม่มีการเกิด cross reaction กับพยาธิชนิดอื่น รวมถึงยังมีการแสดงออกของโปรตีน TRP14 ที่กระเพาะอาหารของพยาธิสูง ผู้วิจัยจึงคาดว่าหากจะนำไปพัฒนาควรเลือก MoAb clone 2D2 นำไปสร้างให้เป็นชนิด IgG เพื่อที่จะนำไปพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจวินิจฉัยเช่นหลักการ lateral flow โดยใช้ MoAb ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่พยาธิหลั่งออกมาในซีรัมเพื่อความสะดวกในการวินิจฉัยและสามารถรักษาได้ก่อนการเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรง

### สรุปและเสนอแนะ

จากวิธีการทดสอบและผลการทดลองในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgGPx และ rFgTRP14 โดยเทคนิค hybridoma และศึกษาคุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน rFgGPx และ rFgTRP14 ซึ่งการต่อยอดจากการศึกษานี้คือสามารถนำ hybridoma clones ที่ได้ไปสร้างเป็นรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี และสามารถนำไปพัฒนาและใช้ประโยชน์โดยสร้างเป็น rapid diagnosis kit สำหรับตรวจโรค fasciolosis ต่อไป

### (5) ผลผลิต (Output)

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

1. Changklungmoa, N., Chaithirayanon, K., Cheukamud, W., Chaiwichien, A., Osotprasit, S., Samrit, T., Sobhon, P. & Kueakhai, P. Expression and characterization of glutathione peroxidase of the liver fluke, *Fasciola gigantica*. Parasitol Res 2018; 117: 3487-3495.

(ภาคผนวก)

(5.2) การจดสิทธิบัตร

ไม่มี

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

ไม่มี

(5.4) ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ไม่มี

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 3860100299xxx สัญญาเลขที่ 210/2561

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนของ *Fasciola gigantica* ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพื่อพัฒนาชุดตรวจ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2561

ระยะเวลาดำเนินการ.....1.....ปี.....6.....เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

|                |         |     |                             |         |
|----------------|---------|-----|-----------------------------|---------|
| งวดที่ 1 (50%) | 415,000 | บาท | เมื่อวันที่ 20 เดือน ตุลาคม | ปี 2560 |
| งวดที่ 2 (40%) | 332,000 | บาท | เมื่อวันที่ 27 เดือน มีนาคม | ปี 2561 |
| งวดที่ 3 (10%) |         | บาท | เมื่อวันที่ - เดือน -       | ปี -    |
| รวม            | 747,000 |     |                             |         |

รายจ่าย

| รายการ                                  | งบประมาณที่ตั้งไว้ | งบประมาณที่ใช้จริง | จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน |
|---|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 1. ค่าตอบแทน                            | 72,000             | 72,000             | -                     |
| 2. ค่าจ้าง                              | 120,000            | 120,000            | -                     |
| 3. ค่าวัสดุ                             | 428,000            | 428,000            | -                     |
| 4. ค่าใช้สอย                            | 127,000            | 127,000            | -                     |
| 5. ค่าครุภัณฑ์                          | -                  | -                  | -                     |
| 6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ<br>(ค่าสาธารณูปโภค) | 83,000             | 83,000             | -                     |
| รวม                                     | 830,000            | 830,000            | -                     |

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน



## บรรณานุกรม (Bibliography)

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

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

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

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

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

ภาคผนวก

(Appendix)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

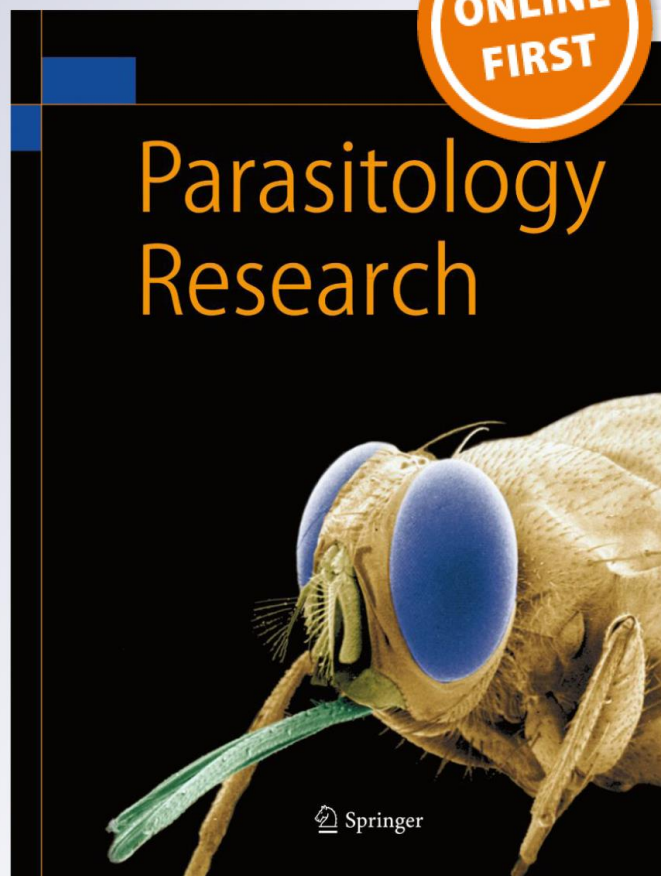
*Expression and characterization of  
glutathione peroxidase of the liver fluke,  
Fasciola gigantica*

**Narin Changklungmoa, Kulathida  
Chaithirayanon, Werachon Cheukamud,  
Athit Chaiwichien, Supawadee  
Osotprasit, Tepparit Samrit, et al**

**Parasitology Research**  
Founded as Zeitschrift für  
Parasitenkunde

ISSN 0932-0113

Parasitol Res  
DOI 10.1007/s00436-018-6046-9



 Springer



## Expression and characterization of glutathione peroxidase of the liver fluke, *Fasciola gigantica*

Narin Changklungmoa<sup>1</sup> · Kulathida Chaithirayanon<sup>2</sup> · Werachon Cheukamud<sup>1</sup> · Athit Chaiwichien<sup>1</sup> · Supawadee Osotprasit<sup>1</sup> · Tepparit Samrit<sup>1</sup> · Prasert Sobhon<sup>1,2</sup> · Pornanan Kueakhai<sup>1</sup>

Received: 17 June 2018 / Accepted: 7 August 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

### Abstract

Glutathione peroxidase (GPx) is a key member of the family of antioxidant enzymes in trematode parasites including *Fasciola* spp. Because of its abundance and central role as an anti-oxidant that helps to protect parasites from damage by free radicals released from the host immune cells, it has both diagnostic as well as vaccine potential against fasciolosis. In this study, we have cloned, characterized, and detected the expression of the GPx protein in *Fasciola gigantica* (Fg). FgGPx (582 bp) was cloned by polymerase chain reaction (PCR) from complementary DNA (cDNA) from an adult fluke. Its putative peptide has no signal sequence and is composed of 168 amino acids, with a molecular weight of 19.1 kDa, and conserved sequences at NVACKUG, FPCNQFGGQ, and WNF. Phylogenetic analysis showed that GPx is present from protozoa to mammals and FgGPx was closely related to *Fasciola hepatica* GPx. A recombinant FgGPx (rFgGPx) was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and used for immunizing mice to obtain polyclonal antibodies (anti-rFgGPx) for immunoblotting and immunolocalization. In immunoblotting analysis, the FgGPx was expressed in all stages of *F. gigantica* (eggs, metacercariae, newly excysted juveniles (NEJ), 4-week-old juveniles, and adults). This mouse anti-rFgGPx reacted with the native FgGPx at a molecular weight of 19.1 kDa in adult whole body (WB) and tegumental antigens (TA) as detected by immunoblotting. The FgGPx protein was expressed at a high level in the tegument, vitelline glands, and eggs of the parasite. Anti-rFgGPx exhibited no cross-reactivity with the other parasite antigens, including *Eurytrema pancreaticum*, *Cotylophoron cotylophorum*, *Fischoederius cobboldi*, *Gastrothylax crumenifer*, *Paramphistomum cervi*, and *Setaria labiato papillosa*. The possibility of using rFgGPx for immunodiagnosis and/or as a vaccine for fasciolosis in animals of economic importance will be explored in the future.

**Keywords** *Fasciola gigantica* · Glutathione peroxidase · Cloning · Molecular characteristics · Tissue expression

### Introduction

Fasciolosis is a disease that is caused by infection with *Fasciola* spp., including *F. hepatica* and *F. gigantica*. It is a serious health problem for both domesticated animals and humans in the tropical and subtropical regions. Metacercariae are the infective stage, and after excystation in the duodenum of the definitive host, the

juveniles migrate through the intestinal wall and the peritoneal cavity to reach the liver and eventually the bile ducts. During penetration and migration, juvenile parasites come into contact with and are damaged by reactive oxygen species (ROS) released by the host immune cells, such as macrophages and inflammatory cells. Therefore, the parasites must defend themselves by posing anti-oxidation mechanism. *F. gigantica* possesses and expresses a series of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD, Jaikua et al. 2016), thioredoxin glutathione reductase (TGR, Kalita et al. 2018; Changklungmoa et al. 2015), thioredoxin (Trx, Gupta et al. 2015; Changklungmoa et al. 2014), and peroxiredoxin (Prx, Chaithirayanon and Sobhon 2010; Sangpairaj et al. 2014) to neutralize oxidative stress.

GPx was the first seleno-protein anti-oxidant enzyme being discovered (Rotruck et al. 1973) and functions as an antioxidant by catalyzing the reduction of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a more potent member of ROS, by using selenocysteine

✉ Pornanan Kueakhai  
eam\_patho@hotmail.com; pornanan@buu.ac.th

<sup>1</sup> Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Long-Hard Bangsaen Road, Saen Sook Sub-district, Mueang District, Chonburi 20131, Thailand

<sup>2</sup> Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok 10400, Thailand



(SeCys) residues as the catalytic group (Jiang et al. 2002; Huo et al. 2017). GPx encompasses six distinct families of multiple isoenzymes, including GPx1 (classical cytosolic GPx), GPx2 (gastrointestinal GPx), GPx3 (plasma GPx), GPx4 (phospholipid hydroperoxide GPx, PHGPx), GPx5 (epididymis-specific GPx), and GPx6 (odourant metabolizing GPx) (Arthur 2000; Zhang et al. 2015a). The GPx families share similar structural and enzymatic properties with one another (Arthur 2000; Zhang et al. 2015a, 2015b). Members of the other GPx families, like PHGPx, interfere with lipid peroxidation in concert with a phospholipase, which implies that it is associated with the repair of disrupted biomembranes (Imai and Nakagawa 2003). GPxs have also been reported in humans, especially in individuals with cancer and cardiovascular diseases (Lee et al. 2017; Blankenberg et al. 2003). In a recent report, GPX1 and GPX4 were overexpressed in a nodal metastatic tissue of oral squamous cell carcinoma (Lee et al. 2017). In addition, erythrocyte GPx1 is expressed at a high level in cardiovascular diseases, and the risk of cardiovascular events was inversely correlated with increasing GPx1 activity (Blankenberg et al. 2003). In helminths, GPx3 have been characterized in filarial nematodes including *Brugia pahangi*, *Dirofilaria immitis*, and *Wuchereria bancrofti* (Henkle-Dührsen and Kampkotter 2001), while information on the PHGPx (GPx4) members is obtained from trematodes, such as *Schistosoma mansoni* (Williams et al. 1992; Mei and LoVerde 1995; Mei et al. 1996), *Clonorchis sinensis* (Cai et al. 2008), *Schistosoma japonicum* (Zhang et al. 2015b), and *Paragonimus westermani* (Kim et al. 2009). In *C. sinensis*, *P. westermani*, and *S. mansoni*, PHGPxs were shown to be largely localized in vitellocytes within vitelline follicles and eggs (Zhang et al. 2015b; Cai et al. 2008; Kim et al. 2009; Roche et al. 1996). In the present study, we report the first characterization and investigation of tissue distribution of GPx in *Fasciola* spp.

## Methodology

### Sample preparations

The newly excysted juveniles (NEJ) of *F. gigantica* were obtained from excysted metacercariae as previously described (Sethadavit et al. 2009). The adult *F. gigantica*, *F. cobboldi*, *E. pancreaticum*, *C. cotylophorum*, *G. crumenifer*, *S. labiato papillosa*, and *P. cervi* were collected from the naturally infected cattle slaughtered at a local abattoir in Pathumthanee province, Thailand (Kueakhai et al. 2011). All parasites were washed several times with 0.85% NaCl solution and used immediately in further experiments.

*F. gigantica* egg, metacercariae, NEJ, 4-week-old juveniles and adult whole body (WB) of *F. gigantica*, *C. cotylophorum*, *E. pancreaticum*, *P. cervi*, *F. cobboldi*, *G. crumenifer*, and *S. labiato*

*papillosa* were prepared as previously reported (Kueakhai et al. 2013). Excretory-secretory (ES) antigens and tegumental antigens (TA) from adult *F. gigantica* were prepared as previously described (Changklungmoa et al. 2012). Finally, supernatants containing antigens were collected and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The protein contents in the extracts were determined by Lowry protein assay (Lowry et al. 1951), and bovine serum albumin was used as the standard.

### Screening the adult *F. gigantica* cDNA for the GPx gene

The cDNA of GPx gene was isolated from the adult *F. gigantica* by PCR using the degenerate forward primer (5'-TTT CCA TGT AAT CAA TTC GGT-3') and reverse primer (5'-ACC GAA TTG ATT ACA TGG AAA-3') designed from conserved amino acid sequence of GPx genes. The obtained PCR product was labeled with digoxigenin (DIG) using the RNA DIG labeling kit (Roche, Mannheim, Germany) by following the manufacturer's protocol. The antisense RNA probe was used to isolate the full-length cDNA of GPx from the adult *F. gigantica* cDNAs. DNA sequencing was done by Macrogen Inc., Korea. Sequence analysis was performed by using the BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and BioEdit program (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

### Sequence and phylogenetic analyses

The nucleotide and deduced amino acid sequences were analyzed by using BLAST (The National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), ExPaSy (<http://au.expasy.org/tools/>) and SignalP 3.0 (Bendtsen et al. 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Alignment of multiple homologous sequences from closely related parasites and host species was carried out by using ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/>). A phylogenetic neighbor-joining tree was constructed by using the MEGA7 software with bootstrap resampling with 500 repetitions.

### Expression, purification of recombinant FgGPx (rFgGPx), and production of mouse polyclonal anti-rFgGPx

The opal codon for Sec was converted into a sense codon for cysteine (Cys) and complementary primer pairs (FgGPx-mt-F/R). The mutated plasmid was transformed into competent *E. coli* DH5 cells and verified by sequencing. Then, FgGPx was inserted into the bacterial expression vector, pET-30b (Novagen), which was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The expression of the recombinant protein was induced with IPTG (at 1.0 mM final concentration). The recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity-chromatography under

native conditions. The eluates were dialyzed by using SnakeSkin™ Pleated Dialysis Tubing, 3.5 K MWCO (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), in PBS, pH 7.4, and concentrated by membrane filtration using Amicon Ultra centrifugal filter devices 3000 with nominal molecular weight limit (Millipore, Bedford, MA, USA), and dissolved in PBS, pH 7.4. The soluble cell-free extracts containing the recombinant protein were loaded onto Ni-NTA column (QIAGEN, Germany). Each protein was eluted with 250.0 mM imidazole. The purity of the recombinant protein was analyzed by 12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Polyclonal anti-rFgGPx was produced by immunizing a BLAB/c mouse with approximately 50.0 µg of purified rFgGPx mixed with Freund's adjuvant 3 times at 2-week intervals. Experiments on animals were approved by the Animal Care and Use Committee, Burapha University, Thailand. Serum was collected 14 days after the second boost and the aliquots were stored at -20 °C until use.

### Activity of rFgGPx

A DNA-nicking assay using metal-catalyzed oxidation (MCO) system to generate oxidative damage to DNA was performed as previously described (Lim et al. 1993; Sangpairaj et al. 2014) with some modifications. The reaction containing 0.2 mM FeCl<sub>3</sub>, 2.0 mM DTT, and a varying concentration of rFgGPx protein in a total volume of 100.0 µl was incubated at 37 °C for 5 min. Then, 0.5 µg of pGEM-T Easy supercoiled plasmid DNA (Promega) was added to all samples and further incubated at 37 °C for 30 min. The reaction was analyzed by 0.7% agarose gel electrophoresis and observed under blue light.

### Immunoblotting

A total of 10.0 µg per well of eggs, metacercariae, NEJ, 4-week-old juveniles, adult, and ES and TA of adult parasites were separated by 12.5% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes for immunoblot analysis. The membranes were blocked with 4% skim milk in PBS at room temperature (RT) for 1 h, then incubated with mouse anti-rFgGPx serum diluted 1:100 with PBS at RT for 1 h. The positive bands were visualized using alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluted 1:2000 with PBS at RT for 1 h, washed 3 times with PBST, and incubated in AP buffer for 10 min at RT. The color was developed with nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) substrates (Roche, Mannheim, Germany). Finally, the reaction was stopped by adding a buffer containing 10.0 mM Tris-HCl and 1.0 mM EDTA as previously described (Changklungmoa et al. 2014).

For cross reaction study, the WB of adult *E. pancreaticum*, *C. cotylophorum*, *F. cobboldi*, *G. crumenifer*, *P. cervi*, *G. explanatum*, and *S. labiato papillosa* were separated by 12.5% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes and immunoblotted with mouse anti-rFgGPx serum by the same protocol as mentioned above.

### Immunolocalization

The adult *F. gigantica* were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 4 h at 4 °C with shaking and embedded in paraffin. The sections were cut at 5.0 µm and deparaffinized and rehydrated through serial concentrations of ethyl alcohol (100–70%). The sections were treated with 10.0 mM citrate buffer, pH 6.0, in a microwave oven at 700 W for 15 min, 3 times. The sections were blocked from non-specific binding by incubating for 1 h with 10% skim milk, and then incubated with 1:500 diluted mouse anti-rFgGPx serum in PBS at 4 °C for O/N. After washing 3 times with PBST, the sections were incubated with secondary antibody (goat anti-mouse IgG conjugated with AP) (Roche, Mannheim, Germany) at RT for 1 h, then washed 3 times with PBST, and incubated in AP buffer for 10 min at RT. The signals were developed by NBT/BCIP (Roche, Mannheim, Germany) in the dark. Finally, the reactions were stopped by adding buffer containing 10.0 mM Tris-HCl and 1.0 mM EDTA, pH 8.0; then, the sections were mounted in 90% glycerol, observed for the positive signal and photographed under a light microscope (Olympus BX51).

## Results

### Sequences and multiple alignments

FgGPx was cloned by PCR from adult cDNA, and its sequence was composed of 582 bp. Its putative peptide had no signal sequence and is composed of 168 amino acids (Fig. 1), with a molecular weight of 19.1 kDa, and conserved sequences at NVACKUG, FPCNQFGGQ, and WNF.

The amino acid sequence of FgGPx was used in homology searches with BLAST algorithms from the GenBank database, and several PHGPx-like proteins were retrieved. Alignment of the deduced FgGPx amino acid sequence with those of *F. hepatica*, and other closely related parasites, i.e., *S. japonicum*, *C. sinensis*, as well as two host species *Bos taurus* and *Homo sapiens* showed that FgGPx protein shares high identity with *F. hepatica* (87.9%), and with other parasites (*C. sinensis* 70.8% and *S. japonicum* 68.5%).

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| HsGPx4 | MSLGRLCRLLPALLCGALAAPLAGTMCASRDDWRCARSMHEFSAKIDIGHMVNLDKYR             | 60  |
| BtGPx4 | MSFSRLYRLLKPALLCGALAAPLASTMCASRDDWRCARSMHEFSAKIDIGRMVNLDKYR            | 60  |
| FhGPx4 | -MFGLCRRSGGASILRYALA-LPFTGMAT----SGGTDGTIYGFSAATTIDGHEVVKLDKY-         | 53  |
| SjGPx4 | -----MITGSSAMSS----SSRSGSSIYDFATAKIDIGVDVSLSKYR                        | 37  |
| CsGPx4 | -MRGLLVRA---ACLGYTFVGPRLSMMAA----SPTEPANIHFSAKIDIGQEIISLQKYE           | 52  |
| FgGPx  | -----MAT----SGGNDGTIYGFSAARNIDGHEVVKLDKYR                              | 30  |
|        | . . . * : * * * * : * . * *  |     |
| HsGPx4 | GFVCIIVT <b>NVASQXG</b> KTEVNYTQLVDLHARYAECGLRILAFPCNQFGKQEPGSNEEIKEFA | 120 |
| BtGPx4 | GHVCIIVT <b>NVASQUG</b> KTDVNYTQLVDLHARYAECGLRILAFPCNQFGRQEPGSNAEIKEFA | 120 |
| FhGPx4 | -----RILAFPCNQFGGQEPWPEAEIKQYV   | 78  |
| SjGPx4 | GYVCLIV <b>NVACKUG</b> ATDKNYRQLQKMHTQLVGDGLRILAFPCNQFLGQEPWPEAEIKKFV  | 97  |
| CsGPx4 | GYVTLIV <b>NVACKUG</b> LTDKNYRQLQDLHTRLSGKGLRILAFPCNQFGNQEPWPEAEIKRWV  | 112 |
| FgGPx  | GRVCLIV <b>NVACKUG</b> LTDKNYRQLQELHTRLSGQGLSILAFPCNQFGGQEPWPEAEIKQYV  | 90  |
|        | ***** * * * : * * . . .  |     |
| HsGPx4 | -AGYNVKFDMFSKICVNGDDAHLWKWMKIQPKGKILGNAIK <b>WNF</b> TKFLIDKNGCVVKR    | 179 |
| BtGPx4 | -AGYNVKFDLFSKICVNGDDAHLWKWMKVQPKRGMGNAIK <b>WNF</b> TKFLIDKNGCVVKR     | 179 |
| FhGPx4 | TEKYNVQFDMFSKINVNGSDTHPLFSFLKSEL--KGTLINAIK <b>WNF</b> AKFLVDREGVPRKR  | 136 |
| SjGPx4 | SETYGVQFDMFSKINVNGPNAHPLYEFLKSRL--GGALMSAIK <b>WNF</b> SKFLIDRKGQPVKR  | 155 |
| CsGPx4 | SEKFGVTFDMFSKIDVNGNNAHPLFKYLKKEQ--HGFLIDAIK <b>WNF</b> GKFLVDRGTGKPRKR | 170 |
| FgGPx  | TEKYNVQFDMFSKINVNGSDTHPLFSFLKSNL--KGTLINAIK <b>WNF</b> AKFLVDREGVPRKR  | 148 |
|        | : . * * : * * * * * : * * * . . . * * . * * * * * * * * : * * * *      |     |
| HsGPx4 | YGPMEEPLVIEKDLPHYF-----  | 197 |
| BtGPx4 | YGPMEEPLVIEKDLPCYL-----  | 197 |
| FhGPx4 | YSPQTEPLSHVIMLWYLPQQQLHQSSEQKDMTNGMFGGN                                | 176 |
| SjGPx4 | YSPTTAPNEIILDDIMELLKQK-----  | 176 |
| CsGPx4 | YSPQTDPLDIEKDIIVELLE-----  | 190 |
| FgGPx  | YSPQTEPLDIEKDIIGLLKQ-----  | 168 |

**Fig. 1** Alignment of GPx amino acid sequence from *F. gigantica* with GPx from parasitic species including *F. hepatica* PIS82514, *C. sinensis* ABK58679, *S. japonicum* AJD79086, and GPx from host species including *B. taurus* NP\_777195, *H. sapiens* CAA50793. The symbol

(\*) indicates identical residues, (:) indicates highly conserved residues, (.) indicates moderately conserved residues. The conserved amino acid sequences are shown in bold letters: NVACKUG, FPCNQFGGQ, and WNF

## Phylogenetic tree of GPx

The phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining Method from MEGA7 program showed that FgGPx was most highly related to that of *F. hepatica* (Fig. 2).

## Expression of rFgGPx

In order to express rFgGPx, expression vector pET-FgGPx was constructed and used to transform *E. coli* BL21 (DE3) cells. The extract from *E. coli* transformed with pET-FgGPx and induced with IPTG contained a prominent protein band at 19.1 kDa when analyzed by SDS-PAGE (Fig. 3a), which is in agreement with the predicted molecular mass for the rFgGPx protein fused with His-tag.

## Activity assay of rFgGPx

The activity of rFgGPx was assessed using a DNA-nicking assay. Hydroxyl radicals produced by reactions in the MCO system caused nicking and linearization of supercoiled pGEM-T Easy plasmid DNA (Fig. 3b). In the positive control, supercoiled DNA was not damaged in the presence of pGEM-T Easy + DTT (Fig. 3b, lane 1). Similarly, after incubation with the solutions containing rFgGPx protein at concentrations of

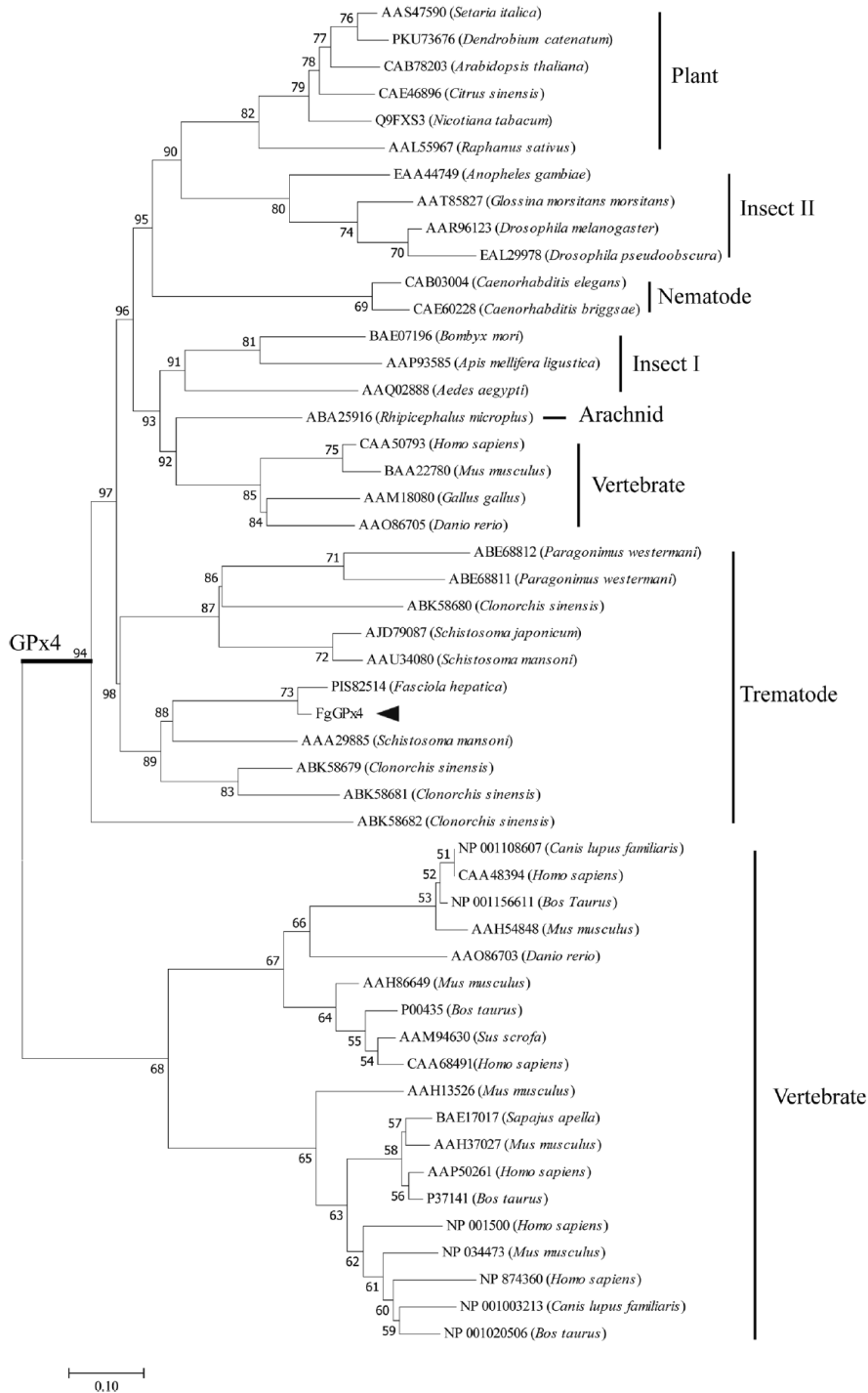
25.0 and 50.0  $\mu$ g/ml, the supercoiled DNA was protected from nicking in a concentration-dependent manner, with increasing amount of supercoiled DNA being preserved as the concentrations of rFgGPx were increased (Fig. 3b, lanes 3 and 4).

## Immunoblotting analysis of the natural FgGPx and cross-reactions of the PoAb with corresponding antigens in other parasites

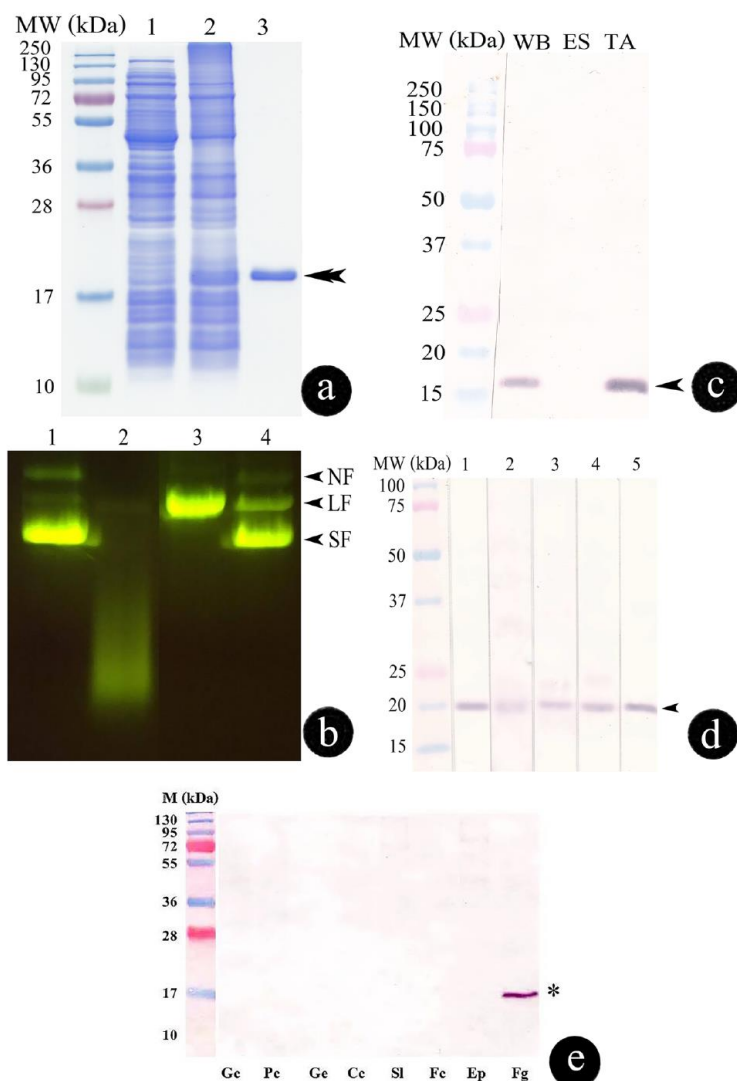
The immunoblotting showed that polyclonal mouse anti-rFgGPx (PoAb) detected a positive band at 19.1 kDa in WB fractions of eggs, metacercariae, NEJ, 4-week-old juveniles, and adult, and TA of the adult stage. No positive bands were detected by this PoAb in adult ES (Fig. 3c, d) and WB of other parasites including *E. pancreaticum*, *C. cotylophorum*, *F. cobboldi*, *G. crumenifer*, *P. cervi*, *G. explanatum*, and *S. labiato papillosa* (Fig. 3e).

## Immunolocalization and tissue distribution of FgGPx

The location and distribution of the native FgGPx in adult *F. gigantica* were probed with mouse anti-rFgGPx. The mouse pre-immune serum was used as a negative control and no staining was observed in the control section, whereas positive staining was detected in the tegument, vitelline cells, and eggs, while caecum and parenchyma showed no staining (Fig. 4b-f).



**Fig. 2** Phylogenetic analysis of GPx. Phylogenetic tree of GPx constructed by Bootstrap-Neighbor Joining method with the bootstrap value equal to 500, showing the relationship between *F. gigantica* and other species



**Fig. 3** **a** Coomassie blue stained 12.5% SDS-PAGE of expressed recombinant FgGPx purified by the Ni-NTA affinity chromatography under the denaturing conditions. Lane 1 whole bacterial lysate from the non-induced condition; lane 2 whole lysate after induction by IPTG; lane 3 purified recombinant FgGPx. MW markers are shown on the left side. **b** Antioxidant activity of rFgGPx protein (lane 3; rFgGPx 25.0  $\mu\text{g/ml}$ , lane 4; rFgGPx 50.0  $\mu\text{g/ml}$ ) shown by DNA nicking assay. Supercoiled (SF), nicked (NF), and linear (LF) forms of pGEM-T Easy plasmid DNA are indicated on the right. Lane 1: positive control, lane 2: negative control. **c** The immunoblot analysis of a native FgGPx protein by probing with mouse anti-rFgGPx: adult WB (lane 1), ES (lane 2), and TA (lane 3). The position of native FgGPx is indicated by a head arrow. MW markers

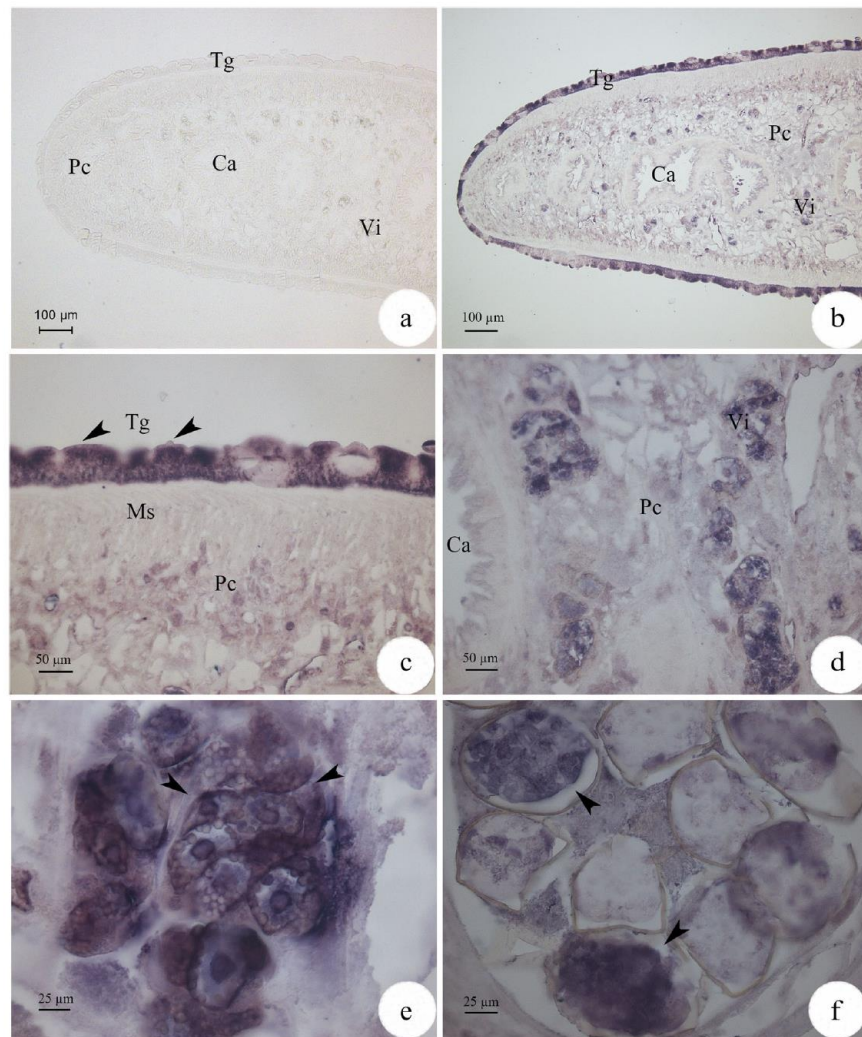
are shown on the left side. **d** Immunoblot analysis with mouse anti-FgGPx detect positive band of the native FgGPx in the whole body extracts (WB) of egg (lane 1), metacercariae (Met-lane 2), NEJs (lane 3), 4-week-old juveniles (lane 4), and adult (lane 5). MW markers are shown on the left side. Head arrow indicates the positive band at 19.1 kDa. **e** Immunoblot analysis of reactivity of mouse anti-rFgGPx with the natural FgGPx in WB extracts of adult *F. gigantica* and other related parasites: WB extracts of *G. crumenifer* (Gc, lane 1), *P. cervi* (Pc, lane 2), *G. explanatum* (Ge, lane 3), *C. cotylophorum* (Cc, lane 4), *S. labiato papilloso* (Sl, lane 5), *F. cobboldi* (Fc, lane 6), *E. pancreaticum* (Ep, lane 7), and *F. gigantica* (Fg, lane 8). Asterisk indicates the positive band at 19.1 kDa. MW markers are shown on the left side

## Discussion

The FgGPx sequence was composed of selenocysteines and showed high conservation with two cysteines at the active site,

indicating that FgGPx gene is a member of the glutathione peroxidase family (Arthur 2000). The full sequence of rFgGPx was composed of 582 bp ORF, 12 bp 5'UTR, and 78 bp 3'UTR, and the putative FgGPx polypeptide was

**Fig. 4** Detection of FgGPx native protein in the tissues of adult *F. gigantica* by immunohistochemistry, using mouse polyclonal antibody against rFgGPx as a probe. **a** Negative control section probed with pre-immune serum. **b** A low magnification showing positive signal in the tegument (Tg) and vitelline (Vi), but not in caecum (Ca) and parenchyma (Pc). **c** A medium magnification showing positive signal in the tegument (Tg), but not in caecum (Ca), muscle (Ms), and parenchyma (Pc). **d** A medium magnification showing positive signal in the vitelline (Vi), but not in caecum (Ca). **e** A high magnification showing positive signal in the vitelline cells (head arrows). **f** A high magnification showing positive signal in the egg (head arrows)



composed of 168 amino acid residues, with a MW of 19.1 kDa, pI 5.9, with no signal peptide; hence, it was not a secreted protein. Multiple alignments of FgGPx putative amino acid sequence with GPx sequences from other related parasites, including *F. hepatica*, *S. japonicum*, and *S. mansoni*, and from the host species including *H. sapiens* and *B. taurus*, exhibited the same conserved sequences at NVACKUG, FPCNQFGGQ, and WNF. Overall, FgGPx protein shares high similarity with GPxs of *F. hepatica* (87.9%), *C. sinensis* (70.8%), and *S. japonicum* (68.5%).

We demonstrated the antioxidant function of rFgGPx protein by showing its ability to protect DNA from oxidative damage. In the MCO system, DTT oxidation catalyzed by  $Fe^{3+}$  generates free radicals due to serial conversions of  $O_2$  to  $H_2O_2$  that causes the breaking of DNA

strands (Netto and Stadtman 1996). The rFgGPx protein was proven to be an active antioxidant enzyme that could protect the supercoiled DNA structure from being damaged by these hydroxyl radicals. We constructed rFgGPx without Sec, by converting Sec into a sense codon for Cys. Even without Sec residue, the FgGPx was still effective in expressing antioxidant activity in protecting the breaking down of DNA. Another *F. gigantica* antioxidant enzyme, FgTrx, has also been shown to protect DNA from breaking by these free radicals (Gupta et al. 2015). As well, similar anti-oxidation activity was reported for rFgPrx-2 earlier by our group (Sangpairaj et al. 2014).

The levels of FgGPx in various developmental stages as demonstrated by immunoblot analysis showed that FgGPx was expressed in eggs, metacercariae, NEJs, 4-week-old

juveniles, and adults which implies that FgGPx may be involved in egg production and embryonic developments in addition to its anti-oxidation role. The FgGPx expression in all developmental stages of *F. gigantica* is similar to that of *S. japonicum*, and GPx in both species do not have a signal sequence (Zhang et al. 2015a). FgGPx was detected by polyclonal antibody against rFgGPx in WB and TA of adult parasites at a molecular weight about of 19.1 kDa, but not in ES antigen, implicating that it is not a secreted protein. Surprisingly, this polyclonal antibody exhibited no cross-reaction with antigens from other parasites of cattle including *E. pancreaticum*, *C. cotylophorum*, *F. cobboldi*, *G. crumenifer*, *P. cervi*, and *S. labiato papillosa*. Therefore, an antibody against rFgGPx could be a good candidate for specific immunodiagnosis of fasciolosis in cattle.

Our immunohistochemical detection showed that the FgGPx was expressed in tegument, vitelline cells, and eggs. The high expression level in the tegument may be related to the contact between the parasites with free radicals from the host's immune cells which are always on-going. The strong expression of FgGPx in *F. gigantica* tegument is similar to the other antioxidant enzymes, including FgTrx (Changklungmoa et al. 2014), FgTGR (Changklungmoa et al. 2015), FgPrx-2 (Sangpairoj et al. 2014), and this pattern of expression may be aimed to neutralize or reduce the free radicals that come into contact with the tegument which is the outermost layer facing the host's immune cells. By contrast, *C. sinensis* showed high expression in vitelline cells and eggs, but not in tegument (Cai et al. 2008) perhaps due to its less invasive migration and existence in the host's bile ducts which contain much fewer immune cells. As well, FgGPx was also highly expressed in vitelline cells and eggs. It is possible that in these tissues, the presence of a set of effective antioxidant enzymes, including GPx, Trx, TGR, and Prx, may be required for the protection from free radicals generated during oogenesis and eggshell formation, as well as during embryonic development while the fertilized eggs are residing and developing in the uterus (Cai et al. 2008; Changklungmoa et al. 2014, 2015).

In conclusion, FgGPx may be a good vaccine candidate to prevent *F. gigantica* infection because it is a key antioxidant enzyme that is expressed at a high level in the tegument. Furthermore, a vaccine using FgGPx combined with other juvenile and adult proteins that are essential for the migration processes, such as cathepsin B2, B3 (Chantree et al. 2012, 2013), and cathepsin L1H (Sansri et al. 2013, 2015), could even be more effective in stopping the parasite's invasion and even killing them. As well, since FgGPx showed high abundance in tegument, it may be released into the blood circulation of infected animals and humans during the tegument turn-over; as a result, it may be a good candidate for immunodiagnosis, which needed to be explored in the future.

**Funding** This research was financially supported by The Thailand Research Fund for New Scholar to Dr. Narin Changklungmoa (Grant no. MRG5980048), a grant from Burapha University as approved by the National Research Council of Thailand to Dr. Narin Changklungmoa (Grant no. 210/2561), a grant from Mahidol University as approved by the National Research Council of Thailand to Associate Professor Dr. Kulathida Chaitirayanon, and a Senior Research Scholar grant from Thailand Research Fund to Professor Dr. Prasert Sobhon.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- Arthur JR (2000) The glutathione peroxidase. *Cell Mol Life Sci* 57:1825–1835
- Benndtsen JD, Nielsen H, Heijne GV, Brunak S (2004) Improved of signal peptide: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783–795
- Blankenberg S, Rupperecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackne KJ (2003) Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 349:17
- Cai GB, Bae YA, Kim SH, Sohn WM, Lee YS, Jiang MS, Kim TS, Kong Y (2008) Vitellocyte-specific expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in *Clonorchis sinensis*. *Int J Parasitol* 38:1613–1623
- Chaitirayanon K, Sobhon P (2010) Molecular cloning and characterization of two genes encoding 2-Cys peroxiredoxins from *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol* 125(2):106–113
- Changklungmoa N, Chaitirayanon K, Kueakhai P, Meemon K, Sobhon P, Riengrojpitak S (2012) Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase from *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol* 131:283–291
- Changklungmoa N, Kueakhai P, Apisawetakan S, Riengrojpitak S, Sobhon P, Chaitirayanon K (2014) Identification and expression of *Fasciola gigantica* thioredoxin. *Parasitol Res* 113:2335–2343
- Changklungmoa N, Kueakhai P, Sangpairoj K, Chaichanasak P, Jaikua W, Riengrojpitak S, Sobhon P, Chaitirayanon K (2015) Molecular cloning and characterization of *Fasciola gigantica* thioredoxin-glutathione reductase. *Parasitol Res* 114:2119–2127
- Chantree P, Wanichanon C, Phatsara M, Meemon K, Sobhon P (2012) Characterization and expression of cathepsin B2 in *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol* 132:249–256
- Chantree P, Phatsara M, Meemon K, Chaichanasak P, Changklungmoa N, Kueakhai P, Lorsuwannarat N, Sangpairoj K, Songkoomkroong S, Wanichanon C, Itagaki T, Sobhon P (2013) Vaccine potential of recombinant cathepsin B against *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol* 135:102–109
- Gupta A, Pandey T, Kumar B, Tripathi T (2015) Preferential regeneration of thioredoxin from parasitic flatworm *Fasciola gigantica* using glutathione system. *Int J Biol Macromol* 81:983–990
- Henkle-Dührsen K, Kampkötter A (2001) Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* 114:129–142
- Huo R, Yang L, Zhang TG, Wei JY (2017) Human selenium-containing single-chain variable fragment with glutathione peroxidase activity protects NIH3T3 fibroblast against oxidative damage. *Mol Biol (Mosk)* 51(3):483–489
- Imai H, Nakagawa Y (2003) Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, free radical. *Biol Med* 34:145–169

- Jaikua W, Kueakhai P, Chaithirayanon K, Tanomrat R, Wongwairot S, Riengrojpitak S, Sobhon P, Changklungmoa N (2016) Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. *Acta Trop* 162:75–82
- Jiang ZH, Mu Y, Li WJ, Yan GL, Luo GM (2002) The progress in mechanism of selenoprotein biosynthesis. *Acta Biochem Biophys Sin* 34:395–399
- Kalita P, Shukla H, Shukla R, Tripathi T (2018) Biochemical and thermodynamic comparison of the selenocysteine containing and non-containing thioredoxin glutathione reductase of *Fasciola gigantica*. *BAA General Subjects* 1862:1306–1316
- Kim SH, Cai GB, Bae YA, Lee EG, Lee YS, Kong Y (2009) Two novel phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes of *Paragonimus westermani* induced by oxidative stress. *Parasitology* 136:553–565
- Kueakhai P, Meemon K, Changklungmoa N, Chaithirayanon K, Riengrojpitak S, Sobhon P (2011) Characterization and localization of saposin-like protein-2 (SAP-2) in *Fasciola gigantica*. *Parasitol Res* 108:1493–1500
- Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaithirayanon K, Songkoomkrong S, Riengrojpitak S, Sobhon P (2013) Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant saposin-like protein 2 of *Fasciola gigantica*. *Acta Trop* 125:157–162
- Lee JR, Roh JL, Lee SM, Park Y, Cho KJ, Choi SH, Nam SY, Kim SY (2017) Overexpression of glutathione peroxidase 1 predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 143:2257–2265
- Lim YS, Cha MK, Kim HK, Uhm TB, Park JW, Kim K, Kim IH (1993) Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 192:273–280
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275
- Mei H, LoVerde PT (1995) *Schistosoma mansoni*: cloning the gene encoding glutathione peroxidase. *Exp Parasitol* 80:319–322
- Mei H, Thakur A, Schwarts J, LoVerde PT (1996) Expression and characterization of glutathione peroxidase activity in the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun* 64:4299–4306
- Netto LE, Stadtman ER (1996) The iron-catalyzed oxidation of dithiothreitol is a biphasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of a free radical chain of reactions. *Arch. Biochem Biophys* 333:233–242
- Roche C, Liu JL, LePresle T, Capron A, Pierce RJ (1996) Tissue localization and stage-specific expression of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 75:187–195
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179:588–590
- Sangpairoj K, Changklungmoa N, Vanichviriyakit R, Sobhon P, Chaithirayanon K (2014) Analysis of the expression and antioxidant activity of 2-Cys peroxiredoxin protein in *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol* 140:24–32
- Sansri V, Meemon K, Changklungmoa N, Kueakhai P, Chantree P, Chaichanasak P, Lorsuwanarat N, Itagaki T, Sobhon P (2015) Protection against *Fasciola gigantica* infection in mice by vaccination with recombinant juvenile-specific cathepsin L. *Vaccine* 33(13):1596–1601
- Sansri V, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Sobhon P, Meemon K (2013) Molecular cloning, characterization and functional analysis of a novel juvenile-specific cathepsin L of *Fasciola gigantica*. *Acta Trop* 128(1):76–84
- Sethadavit M, Meemon K, Jardim A, Spithill TW, Sobhon P (2009) Identification, expression and immunolocalization of cathepsin B3, a stage-specific antigen expressed by juvenile *Fasciola gigantica*. *Acta Trop* 112:164–173
- Williams DL, Pierce RJ, Cookson E, Capron A (1992) Molecular cloning and sequencing of glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 52:127–130
- Zhang Y, He Y, He L, Zong HY, Cai GB (2015a) Molecular cloning and characterization of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from a blood fluke *Schistosoma japonicum*. *Mol Biochem Parasitol* 203(1–2):5–13
- Zhang Y, He Y, He LI, Zong H, Cai G (2015b) Expression and characterization of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene in *Schistosoma japonicum*. *Parasitology* 142(13):1595–1604