

247366

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



247366



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การสร้าง cDNA library และการวิเคราะห์ expressed sequence tag
ของพยาธิใบไม้ตับ

Construction cDNA library of *Opisthorchis viverrini* and Analysis of its Expressed Sequence
Tags (ESTs)

โดย

รศ. เทวราช หล้าหา

คณะแพทยศาสตร์

ผศ. พรทิพย์ ปิ่นละอ

คณะเทคนิคการแพทย์

รศ. บรรจบ ศรีภา

คณะแพทยศาสตร์

รศ. ศศิธร แก้วเกษ

คณะแพทยศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

มหาวิทยาลัยขอนแก่น



247366



รายงานการวิจัย

เรื่อง



การสร้าง cDNA library และการวิเคราะห์ expressed sequence tag
ของพยาธิใบไม้ตับ

Construction cDNA library of *Opisthorchis viverrini* and Analysis of its Expressed Sequence
Tags (ESTs)

โดย

รศ. เทวราช หล้าหา

คณะแพทยศาสตร์

ผศ. พรทิพย์ ปิ่นละออ

คณะเทคนิคการแพทย์

รศ. บรรจบ ศรีภา

คณะแพทยศาสตร์

รศ. ศศิธร แก้วเกษ

คณะแพทยศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีเนื่องมาจากการได้รับการสนับสนุนงบประมาณสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549 ฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาประสัตวินยา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยโรคเขตร้อน เจ้าหน้าที่หน่วยสัตวทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำงาน

คณะผู้วิจัย

ชื่อเรื่อง การสร้าง cDNA library และการวิเคราะห์ expressed sequence tag ของ พยาธิใบไม้ตับ

บทคัดย่อ

247366

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* แบบเรื้อรังเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่ง International Agency for Research on Cancer ได้จัดให้พยาธิ *Opisthorchis viverrini* เป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง แต่ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับข้อมูลทางพันธุกรรมของพยาธิชนิดนี้มีน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทำสร้างห้องสมุดยีนของพยาธิระยะตัวเต็มวัยและทำการสุ่มแยกโคลนจำนวน 5,000 โคลนเพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ วิเคราะห์ชนิดและหน้าที่ของยีน ผลการทดลองพบว่าได้แยกสกัดยีนของพยาธิใบไม้ตับจำนวน 1,932 ยีน โดยสามารถวิเคราะห์หาหน้าที่ของยีนเหล่านี้ได้จำนวนประมาณ 20 เปอร์เซนต์ของทั้งหมด ซึ่งพบว่ายีนเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญต่อพยาธิโดยเกี่ยวข้องในกลไกการดำรงชีพแบบปรสิตเช่นการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน การสืบพันธุ์ การล้างพิษ การคงสภาพของผนังลำตัว และการกินอาหาร โดยพบว่ายีนของพยาธิใบไม้ตับส่วนใหญ่ (105 ยีน) มีความเหมือนกันกับพยาธิใบไม้ที่เป็นปรสิต เช่น พยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis* พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma japonicum* แต่จะแตกต่างกับพยาธิใบไม้ *Schmidtea mediterranea* ที่ดำรงชีวิตอิสระ และพบว่ามียีนจำนวน 164 ยีนที่สามารถวิเคราะห์พบ signal peptide ซึ่งยีนเหล่านี้จะเป็นยีนที่สามารถสร้างโปรตีนที่ตัวพยาธิคัดหลั่งออกมาภายนอกลำตัว ซึ่งอาจจะเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพในท่อน้ำดีที่พยาธิอาศัยอยู่ โปรตีนดังกล่าว รวมถึงอาจเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง ข้อมูลต่างๆ ของโมเลกุลเหล่านี้ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการค้นหายากำจัดพยาธิ วัคซีนป้องกันพยาธิ ได้อีกด้วย

Title: Construction cDNA library of *Opisthorchis viverrini* and Analysis of its Expressed Sequence Tags (ESTs)

Abstract

247366

Cholangiocarcinoma (CCA) – cancer of the bile ducts – is associated with chronic infection with the liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. Despite being the only eukaryote that is designated as a ‘class I carcinogen’ by the International Agency for Research on Cancer, little is known about its genome.

Approximately 5,000 randomly selected cDNAs from the adult stage of *O. viverrini* were characterized and accounted for 1,932 contigs, representing ~14% of the entire transcriptome, and, presently, the largest sequence dataset for any species of liver fluke. Twenty percent of contigs were assigned GO classifications. Abundantly represented protein families included those involved in physiological functions that are essential to parasitism, such as anaerobic respiration, reproduction, detoxification, surface maintenance and feeding. GO assignments were well conserved in relation to other parasitic flukes, however, some categories were over-represented in *O. viverrini*, such as structural and motor proteins. An assessment of evolutionary relationships showed that *O. viverrini* was more similar to other parasitic (*Clonorchis sinensis* and *Schistosoma japonicum*) than to free-living (*Schmidtea mediterranea*) flatworms, and 105 sequences had close homologues in both parasitic species but not in *S. mediterranea*. A total of 164 *O. viverrini* contigs contained ORFs with signal sequences, many of which were platyhelminth-specific. Examples of convergent evolution between host and parasite secreted/membrane proteins were identified as were homologues of vaccine antigens from other helminths. Finally, ORFs representing secreted proteins with known roles in tumorigenesis were identified, and these might play roles in the pathogenesis of *O. viverrini*-induced CCA.

This gene discovery effort for *O. viverrini* should expedite molecular studies of cholangiocarcinogenesis and accelerate research focused on developing new interventions, drugs and vaccines, to control *O. viverrini* and related flukes.

คำสำคัญ (Keyword): *Opisthorchis viverrini*, cholangiocarcinoma, Expressed Sequence Tags (ESTs)

สารบัญ

หน้า

ปกใน	I
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อภาษาไทย	III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IV
สารบัญ	V
สารบัญรูปภาพ	VI
สารบัญตาราง	VII
1. ความสำคัญของหัวข้อการวิจัย และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
2. วิธีดำเนินการวิจัย	10
3. ผลการทดลอง	10
4. อภิปรายผล	16
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	20
1. รายชื่อคณะผู้วิจัยและสถานที่ทำงาน	20
2. การเผยแพร่ผลงาน	20

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 สมมติฐานกลไกการเกิดโรคพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี	8
รูปที่ 2 cDNA phage library ของพยาธิใบไม้ตับ <i>O.viverrini</i> ที่สร้างจาก total RNA (Titer = 10^9)	11

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงลักษณะของ <i>Opisthorchis viverrini</i> EST	12
ตารางที่ 2 ตารางแสดงชนิดของยีนที่มีการแสดงออกมากที่สุด 10 อันดับแรก	14
ตารางที่ 3 ตารางแสดงยีนที่จำแนกได้จากพยาธิใบไม้ตับที่สามารถสร้างโปรตีนที่ตัวพยาธิคัดหลั่งออกมาภายนอกลำตัว โดยการวิเคราะห์พบ signal peptide	15
ตารางที่ 4 ตารางแสดงยีนของพยาธิใบไม้ตับที่จำแนกได้จาก expressed sequence tags และมีความเหมือนกับโมเลกุลของพยาธิชนิดอื่นที่นำไปใช้ในการพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันการติดเชื้อพยาธิ	16