

construction kit (SMART cDNA kit, BD Bioscience) แล้วทำการเลือกโคลนที่ได้แบบสุ่มจำนวนอย่างน้อย 400 โคลน นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสของสาย ดี เอ็น เอ ของแต่ละโคลนแล้วการวิเคราะห์ชนิดของยีนโดยการ ทำ similarity search กับข้อมูลที่มีอยู่ใน Gen Bank ทำนายหน้าที่ของยีนที่พบโดยวิธี GO analysis และ submit ข้อมูลที่ได้ใน EST database

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การสร้าง Complimentary DNA library (cDNA library) ของพยาธิใบไม้ตับ

2.1.1 การสกัด RNA

เตรียมตัวเต็มวัยพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* โดยทำการป้อนหนูด้วยระยะติดต่อของพยาธิ ซึ่งได้มาจากปลาขาวในแหล่งน้ำธรรมชาติ จำนวน 50 metacercaria ต่อแฮมสเตอร์ 1 ตัว เลี้ยงแฮมสเตอร์ ไว้เป็นเวลา 3 เดือน แล้วเก็บตัวเต็มวัยจากตับแฮมสเตอร์ นำตัวเต็มวัยของพยาธิที่ยังสดไปสกัด total RNA ด้วยสาร Trizol (Invitrogen) โดยใส่ trizol 500 μ l ลงในพยาธิแล้วบดให้ละเอียดด้วย glass tissue homogenizer แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วใส่ trizol เพิ่มอีก 500 μ l เติมน้ำ 200 μ l เติมน้ำ chloroform 200 μ l. เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนใสที่มี RNA ใส่หลอดใหม่แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศา 10 นาที เติมน้ำ Isopropanol alcohol 500 μ l. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g 10 นาที เทส่วนน้ำออกแล้วทิ้งให้ตะกอนแห้ง (~20-30 นาที) เติมน้ำ alcohol 70 % 1 ml. เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน ก่อนนำมาใช้ ให้ละลายแล้วปั่นตกตะกอน ที่ 12,000 g 5 นาที เติมน้ำ RNase free water 1 ml นำไปวัด O.D ที่ 260/280

2.1.2 การสร้าง cDNA library โดยใช้ cDNA construction kit (SMART cDNA kit, BD Bioscience)

นำ total RNA ที่ได้จาก 2.1.1 มาสร้าง cDNA library ด้วยชุดสร้าง cDNA library สำเร็จรูป BDSMART cDNA library construction kit (BD Biosciences) ตามขั้นตอนมาตรฐานที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด โดยชิ้นส่วนของ cDNA clone ที่อยู่ใน plasmid vector pTriplex2 จะถูกนำไปบรรจุใน lambda phage โดยใช้ Phage packaging system ของ Gigapack III (Stratagene) ตามวิธีการมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิต

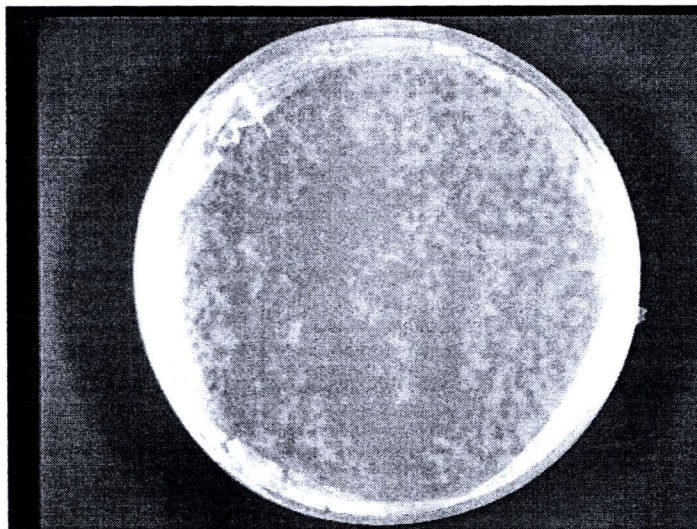
2.1.3 การวิเคราะห์ลำดับ DNA

Positive clones จะถูกนำมาทำ *in vivo* excision เพื่อแยก recombinant plasmid ตามวิธีของ BD SMART kit โดยใช้แบคทีเรีย *Escherichia coli* strain BM25.8 เป็น host cell เพื่อแยกเอา recombinant plasmid แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide ของ positive recombinant clone โดยการทำการ DNA sequencing ลำดับ nucleotide ของ positive clone จะถูกวิเคราะห์หาความเหมือนโดยเปรียบเทียบกับยีนที่รายงานอยู่ใน public database ด้วยวิธี Blast search เพื่อวิเคราะห์หน้าที่ของยีนนั้น รวมทั้งโครงสร้างและหน้าที่ของยีน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่คัดเลือกได้จะถูกนำมาถอดรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน และทำการวิเคราะห์หา open reading frame ทำการวิเคราะห์ signal peptide (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) เพื่อตรวจสอบว่าเป็น secreted protein หรือไม่

3. ผลการทดลอง (Results)

3.1 การสร้าง cDNA library ของพยาธิใบไม้ตับ

งานวิจัยนี้ได้ทำการสร้าง cDNA library จากระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* จำนวน 1 ชุดโดยใช้ชุดสร้าง SMART cDNA Library construction kit (BD Biosciences) คุณภาพและปริมาณที่ได้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (10^5 - 10^9 pfu) ในการนำไปใช้ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 cDNA phage library ของพยาธิใบไม้ตับ *O.viverrini* ที่สร้างจาก total RNA (Titer = 10^9)

3.2 ลักษณะและคุณภาพของ expressed sequence tags ของพยาธิใบไม้ตับที่แยกสกัดได้

เมื่อนำ cDNA phage library มาทำการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของพลาสมิดและสุ่มเลือกโคลนทั้งหมดจำนวน 5,159 โคลน ไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของสาย ดี เอ็น เอ ด้วยเครื่อง automate DNA sequencer ได้ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ สาย ดี เอ็น เอ จาก cDNA library (expressed sequence tags) ที่มีคุณภาพที่สามารถนำมาแปลผลได้จำนวน 4,241 สาย และเมื่อวิเคราะห์ความซ้ำซ้อนของสายดี เอ็น เอ เหล่านั้นพบว่าเป็นสายดี เอ็น เอ ที่หรือยีนที่ไม่ซ้ำซ้อนกันจำนวนทั้งหมด 1,932 ยีน (ดังแสดงในตารางที่ 1) โดยแบ่งออกเป็นยีนที่แสดงออกเป็นโปรตีนที่ทราบหน้าที่แล้ว (มีความเหมือนมากกว่า 95% ของความยาวไม่ต่ำกว่า 50 กรดอะมิโน) จำนวน 68 ยีน เป็นยีนที่คล้ายคลึงกับโปรตีนที่ทราบหน้าที่แล้ว (จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Blast search analysis) จำนวน 794 ยีน และเป็นยีนที่ไม่เหมือนกับยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูลจำนวน 1,070 ยีน จากยีนทั้งหมดนี้สามารถทำนายหน้าที่ได้ด้วยการวิเคราะห์ Gene ontology จำนวน 383 ยีน (ดังแสดงในตารางที่ 1) ซึ่งข้อมูลทั้งหมดนี้ได้นำเข้าไปเก็บไว้ในฐานข้อมูล estdb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>) ใน GenBank ภายใต้รหัส EL618683-EL620614

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะและคุณภาพของ *Opisthorchis viverrini* expressed sequence tags (EST)

Feature	Number
Initial Sequences	5159
Usable sequences ^a	4241
Contigs	1995 (1632 singletons; 363 clusters)
Contigs after clean-up ^b	1932
Contigs identical to known proteins ^c	68
Contigs similar to other proteins ^d	794
Contigs with gene ontology assignments	383
Novel contigs	1070
Novel contigs with signal sequences	75 (29 signal peptides; 46 signal anchors)
Average insert size	548 bp (ESTs); 660 bp (contigs)
Percentage of recombinant clones	95%
Number of ribosomal seqs	1184 ESTs; 136 clusters

^aUsable sequences were determined using seqclean - sequences that were removed were either non-recombinant, of low complexity and/or quality and those of <100 nt in length.

^bclean-up refers to removal of sequences from contaminating sources; eg. *Mycoplasma*

^cidentity determined by $\geq 95\%$ identity over ≥ 50 amino acids.

^dbased on BLASTx and tBLASTx searchers of GenBank nr and dbEST respectively.

3.3 ยีนของพยาธิใบไม้ตับที่นำไปศึกษาและสามารถนำมาใช้ประโยชน์

จากผลการวิเคราะห์ชนิดและหน้าที่ของยีนที่ได้จาก expressed sequence tags ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่จำแนกออกมาจากงานวิจัยนี้จำนวน 1,932 ยีน พบว่ามียีนที่สามารถทำนายหน้าที่ได้จากความเหมือนและคล้ายกันกับโปรตีนในฐานข้อมูล Gen Bank ซึ่งพบว่ายีนเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญต่อพยาธิโดยเกี่ยวข้องในกลไกการดำรงชีพแบบปรสิตเช่นการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน การสืบพันธุ์ การล้างพิษ การคงสภาพของผนังลำตัว และการกินอาหาร โดยพบว่ายีนของพยาธิใบไม้ตับส่วนใหญ่ (105 ยีน) มีความเหมือนกันกับพยาธิใบไม้ที่เป็นปรสิต เช่น พยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis* พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma japonicum* แต่จะแตกต่างกับพยาธิใบไม้ *Schmidtea mediterranea* ที่ดำรงชีวิตอิสระ พบว่ายีนที่มีการแสดงออกมากที่สุด 10 อันดับแรกดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งในกลุ่มยีนการแสดงออกมากที่สุดและสามารถระบุชนิดของยีนได้คือ egg protein และ glutathione s tranferase (ตารางที่ 2) และจากการวิเคราะห์ open reading frame และ signal peptide ซึ่งยีนเหล่านี้จะเป็นยีนที่สามารถสร้างโปรตีนที่ตัวพยาธิคัดหลั่งออกมาภายนอกลำตัว พบว่ามียีนที่วิเคราะห์พบ signal peptide จำนวน 164 ยีน เมื่อเทียบกับยีนที่ได้มีรายงานในพยาธิชนิดอื่นแล้วว่ามีส่วนสำคัญในการดำรงชีวิตของตัวพยาธิรวมทั้งอาจจะเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพในท่อน้ำดีที่พยาธิอาศัยอยู่

รวมถึงอาจเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง ดังแสดงในตารางที่ 3 และโมเลกุลเหล่านี้ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการค้นหายากำจัดพยาธิ วัคซีนป้องกันพยาธิ ดังแสดงในตารางที่ 4



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	
ห้องสมุดงานวิจัย	
วันที่...0...1...๓.๐...2555	247366
เลขทะเบียน.....	
เลขเรียกหนังสือ.....	

ตารางที่ 2 ตารางแสดงชนิดของยีนที่มีการแสดงออกมากที่สุด 10 อันดับแรก (The 10 most abundant contigs^a from the *Opisthorchis viverrini* EST dataset)

No.	Closest homologue in GenBank nr (accession no.)	%identities (no. of aa)	Score (Bits)	Closest homologue in dbEST (accession no.)	%identities (no. of aa)	Score (Bits)
OvAE1587	vitelline B precursor, <i>O. viverrini</i> (AAL23712)	99% (230)	493	<i>C. sinensis</i> cDNA clone CSAD-01-D02 (AT007557)	92% (225)	524
OvAE1588	17 kDa myoglobin, <i>Clonorchis sinensis</i> (AAM18464)	81% (149)	244	<i>C. sinensis</i> cDNA clone CSAD-29-A12 (AT009373)	77% (188)	344
OvAE1585	hypothetical protein, <i>C. sinensis</i> (AAM55183)	84% (90)	156	<i>C. sinensis</i> cDNA clone CS30 (AT006763)	84% (100)	199
OvAE1593	egg protein, <i>C. sinensis</i> (AAN64160)	89% (253)	389	<i>C. sinensis</i> cDNA clone CSAD-20-B05 (AT008604)	82% (237)	477
OvAE1584	hypothetical protein, <i>Macaca fascicularis</i> (BAE73006)	67% (59)	82	SJA_AAF_D11.T3 SJA <i>S. japonicum</i> (CX857852)	85% (94)	183
OvAE1602	histone H1, <i>Schistosoma japonicum</i> (AAP06509)	74% (70)	112	<i>C. sinensis</i> cDNA clone CSAD-25-H03 (AT009091)	85% (177)	302
OvAE1607	egg protein, <i>C. sinensis</i> (AAN64160)	59% (252)	288	<i>C. sinensis</i> cDNA clone CSAD-01-B01 (AT007532)	82% (252)	493
OvAE1595	retrotransposon gag region, <i>Monascus pilosus</i> (ABC24965)	31% (57) ^b	33	NA	NA	NA
OvAE1608	translationally controlled tumor protein, <i>C. sinensis</i> (AAX84199)	98% (169)	306	<i>C. sinensis</i> cDNA clone CSAD-24-E07(AT008979)	92% (122)	228
OvAE1601	glutathione-S-transferase, <i>O. viverrini</i> (AAL23713)	98%(213)	429	<i>C. sinensis</i> cDNA clone CSAD-32-E05 (AT009695)	86% (232)	484

^aNon-ribosomal sequences only were used in this analysis.

^bSequence identity was low but diagnostic motifs of gag were detected over 57 amino acids.

(Selected *Opisthorchis viverrini* contigs that encode families of secreted/membrane proteins that potentially interact with or are exposed to host tissues)

Predicted function	Examples/comments and genera of closest orthologues/paralogues
TGF- β receptor	bone morphogenic protein receptor type I (<i>Sus nr/Macaca est</i>)
Seven transmembrane receptor	DC-STAMP (<i>Strongylocentrotus</i>); laminin receptor (<i>Bos nr/Clonorchis est</i>)
Tetraspanin	stabilize cell membranes – expressed in the tegument of schistosomes (<i>Schistosoma</i>)
C1 family papain-like cysteine protease	cathepsin L (<i>Paragonimus</i>), cathepsin B (<i>Fasciola</i> ; <i>Clonorchis</i>)
C13 family asparaginyl endopeptidase	legumain (<i>O. viverrini</i>)
S1 family serine protease	HtrA-like (<i>Macaca nr/Schistosoma est</i>) and kallikrein-like (<i>Schistosoma</i>) peptidases
A1 family aspartic protease	cathepsin D-like; digestive enzyme in helminths (<i>Clonorchis</i>)
M41 family metalloprotease	mitochondrial membrane proteinase (<i>Schistosoma</i>)
Granulin	mitogen associated with cancer (<i>Bos nr/Clonorchis est</i>)
Aquaporin	water channel protein (<i>Schistosoma</i>)
Tyrosinase	critical for <i>S. mansoni</i> egg shell production (<i>Schistosoma</i>)
Phospholipase A2	similar to vertebrate venom proteins; (<i>Heloderma nr/Clonorchis est</i>)
Thioredoxin peroxidase	immunomodulatory in fasciolosis (<i>Schistosoma</i>)
EF-hand secreted Ca ²⁺ -binding protein	calumenin (<i>Rattus nr/Xenopus est</i>)
Saposin-like protein	pore forming; similar to fluke cytolytins (<i>Clonorchis</i>)
Pathogenesis related protein	similar to helminth venom allergen homologues (<i>Schistosoma</i>)
Glutathione-S-transferase	detoxification of heme and free radicals (<i>Clonorchis</i>)
Synaptobrevin	neurotransmission/vesicular docking – vesicle associated (<i>Schistosoma</i>)
Innexin	integral membrane protein forming gap junctions (<i>Schistosoma</i>)
Fibroblast growth factor (FGF) receptor	host FGF is essential for growth of schistosomes (<i>Schistosoma</i>)
Ly6c	Immune cell differentiation antigen