230991

รหัสโครงการ : MRG4780146

ชื่อโครงการ : การสังเคราะห์ยีนของเอนไซม์ leucine aminopeptidase จากพยาธิใบไม้ตับ (*Fasciola gigantica*)

ชื่อนักวิจัย : ดร.วิทูร ขาวสุข

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

E-mail address: Witoon@Buu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2547 – 30 มิถุนายน 2549

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์ยีนสำหรับเอนไซม์ leucine amino-peptidase (LAP) ในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ซึ่งพยาธิชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรค Fasciolosis ในปศุสัตว์รวมทั้งมนุษย์ ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของตับอย่างรุนแรง ส่งผลเสียต่อสุขภาพของปศุสัตว์ การศึกษาจะแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 คือ การผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ LAP ในสัตว์ทดลอง แล้วนำ polyclonal antibody ที่ได้ไปศึกษาลักษณะของเอนไซม์ LAP ของ *F. gigantica* ด้วยวิธี western immunoblotting และวิธี immunoperoxidase หลังจากนั้นจะนำ polyclonal antibody ไปเป็นเครื่องมือในการ screen หา LAP encoding gene จาก λ Zap II cDNA library ของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย ส่วนที่ 2 จะ ทำการตรวจหา sequence ของ LAP encoding gene ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ specific primmer

ผลการทดลองพบว่า สามารถผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ LAP ได้ และเมื่อนำไปตรวจสอบคุณสมบัติของ LAP พบว่าสามารถตรวจพบ LAP ได้ในทุก fraction ของ antigen โดยจะปรากฏเป็น multiple band อยู่ระหว่าง น้ำหนักโมเลกุล 20-40 kDa โดยจะพบปริมาณสัมพัทธ์ของ LAP มากที่สุดในระยะไข่ ในขณะที่เพื่อพยาธิมีการเจริญเติบโตมากขึ้นจะมีปริมาณ LAP ที่ลดลงตามลำดับ จากการศึกษาด้วยวิธี immunoperoxidase พบว่าในระยะไข่พบ LAP มากบริเวณ fluid รอบ ๆ ตัว miracidium ที่อยู่ภายในไข่ ในขณะที่พยาธิระยะตัวอ่อนพบ LAP มากบริเวณเยื่อบุผิว caecum และเยื่อบุผิว bladder ในขณะที่พยาธิระยะตัวเต็มวัย พบ LAP มากในเยื่อบุผิว caecum bladder เช่นกัน นอกจากนี้ยังปรากฏในระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ ในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ พบได้ใน head ของ spermatozoa เยื่อบุผิวของ seminal vesicle cirrus sac และในเซลล์ของ prostate gland ส่วนระบบสืบพันธุ์เพศเมียพบ LAP ในเซลล์ vitelline ระยะที่ 5 oocyte ระยะที่ 4 เซลล์ Mehlis และบริเวณเยื่อบุผิว uterus

จากการนำ polyclonal antibody ที่ได้ไป screen หา LAP encoding gene จาก cDNA library พบว่าให้ผล negative ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก polyclonal antibody ที่ผลิตได้ไม่สามารถจดจำ LAP ที่ express ภายใน bacteria ได้ และการศึกษาด้วยวิธี RT-PCR พบว่า PCR product ที่ได้ไม่ใช่ LAP encoding gene ไม่ว่าใน condition ใด ๆ ของการศึกษา การศึกษาในครั้งนี้ถึงแม้ว่าจะไม่ประสบความสำเร็จดังที่คาดหวังไว้ แต่ผลการทดลองที่ได้บางส่วนน่าจะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา LAP ของ *F. gigantica* ได้ในอนาคต ทั้งในด้านการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunodiagnosis และการพัฒนา vaccine ต้านโรค fasciolosis ต่อไป

230991

Project Code: MRG4780146

Project Title: Cloning and characterization of leucine aminopeptidase encoding gene of *Fasciola gigantica*

Investigator : Mr. Witoon Khawsuk

Faculty of Allied Health Science, Burapha University, Chonburi, Thailand

E-mail address: Witoon@Buu.ac.th

Project period : 1st July 2004 – 30th June 2006

This research is aimed to synthesize the nucleotide sequences of leucine aminopeptidase (LAP) encoding gene of *Fasciola gigantica*, which is the causative parasite of fasciolosis in the ruminants and human. The infection is leading to the damage of host's liver, the meat and milk productions are limited and resulting in economic loss. The study is divided into 2 parts; first part is the production of polyclonal antibody in the laboratory aminals. The polyclonal antibody is used as a tool for styding the characteristics of *F. gigantic* LAP by using western immunoblottiing and immunoperoxidase techniques. Then the polyclonal antibody is used for screening the LAP encoding gene from the λ Zap II cDNA library of adult *F. gigantica*. The second part is RT-PCR technique which used for produce the PCR product from the total mRNA from the adult *F. gigantica* by using specific primer.

The results found that the polyclonal antibody against LAP can be produced. This antibody can recognize LAP in every antigen fractions of *F. gigantica* as multiple bands at molecular size ranged 20-40 kDa. The expression of LAP in each stage of parasite is different. The highest relative amount of LAP is presented in embryonated egg fraction. Whereas, LAP is lower expressed in juvenile and adult parasites, respectively. The immunolocalization of LAP shows the strongest reaction in the fluid surrounding the miracidium in embryonated eggs. 4 week old-juveniles express LAP in caecal epithelium and bladder epithelium. Whereas, LAP of adult parasites express in the caecal epithelium and bladder epithelium. Moreover, LAP is found in the reproductive tract, that are head of spermatozoa, epithelium of seminal vesicle, epithelium of cirrus sac, the prostate gland' s cells, mature vitelline cell, mature oocyte, Mehlis' gland cells and epithelium of uterus

The cDNA library screening by using this polyclonal antibody is negative. This might be caused by the unable to recognize of protein, which expressed in *E. coli*, by this antibody. The RT-PCR product is not the LAP encoding gene in every condition. This study is a basic knowledge of LAP which use as further study in immunodiagnosis and vaccine development.