บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5580052

ชื่อโครงการ : การโคลนและศึกษาคุณลักษณะของลิวซีนอะมิโนเปบติเดสของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิ

ชื่อนักวิจัย : นางสาวจิตติยวดี ศรีภา มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

E-mail Address : jittiyawadee.s@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 กรกฎาคม 2555 ถึง 2 กรกฎาคม 2557

ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสซึ่งเป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเมทัลโลโปรติเอส ได้ถูกพบในห้องสมุดซีดีเอ็นเอของระยะตัวเต็มวัยของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิ และจากการวิเคราะห์ยีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความยาวรวม 1,698 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 566 กรดอะมิโน ทำนายน้ำหนักโมเลกุลได้เป็น 60 กิโลดาลตัน ทำนายค่า PI ได้ 6.21 จากการวิเคราะห์หา signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP-NN and SignalP-HMM พบว่า ยีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสไม่มี signal peptide ทางด้าน N-terminus ของสายเปปไทด์ จึงทำนายได้ว่าลิวซีนอะมิโนเปปติเดสเป็นเอ็นไซม์ที่ไม่หลั่งออกนอกเซลล์ ยีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิ มีความคล้ายกับยีนชนิดเดียวกันในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ คือ มี metal binding site ประกอบด้วย Isoleucine, Glycine 2 ตำแหน่งและ Lysine และมี catalytic site ประกอบด้วย Asparagine, Threonine, Aspartic acid, Alanine, Glutamic acid, Glycine และ Arginine. จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ พบว่าพบว่า ยีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิชนิดนี้มีความสัมพันธ์ร่วมกลุ่มกับพยาธิใบไม้ด้วยกันโดยมีวิวัฒนาการใกล้ชิดที่สุดกับพยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis* ต่อมาเมื่อนำวิธี Reverse transcriptase-PCR มาใช้เพื่อตรวจการแสดงออกของ ยีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิ พบว่ามีการแสดงออกของยีนนี้ในระยะ ไข่ เมตาเซอร์คาเรีย ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย รีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิถูกสร้างขึ้นเป็นปริมาณมากในรูป soluble form ด้วยเซลล์ของแบคทีเรียโดยมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 60 กิโลดาลตัน ยีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิถูกนำไปใช้ในการกระตุ้นหนูเม้าส์ให้มีการสร้างแอนติบอดี ได้นำแอนติบอดีจากหนูเม้าส์นี้ไปใช้ตรวจหาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสบนเนื้อเยื่อของพยาธิระยะตัวเต็มวัยพบว่าโปรตีนนี้อยู่ที่ parenchymal cells, เปลือกไข่ในมดลูก, ผิวลำตัว, ผิวลำตัวชั้นใน, อัณฑะ, ต่อม Mehlis และอวัยวะเกาะดูด เอ็นไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิต้องการเมทัลไอออนที่มีประจุ 2+ ในการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ Ca^{2+} และ Co^{2+} และสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา คือ สภาวะที่เป็นด่างเล็กน้อย ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสเป็นเอ็นไซม์หนึ่งที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิ การยับยั้งการ

แสดงออกและการทำงานของยีนชนิดนี้ร่วมกับยีนหรือโมเลกุลอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของพยาธิ จะช่วยให้สามารถยับยั้งการกิน การสังเคราะห์โปรตีน การเกิดเมแทบอลิสมและในที่สุดจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพยาธิได้

คำหลัก : ออร์พิสทอร์คิส วิเวอร์รินิ, ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส, โคลน, การศึกษาคุณลักษณะ

Abstract

Project Code : MRG5580052

Project Title : Cloning and characterization of *Opisthorchis viverrini* leucine aminopeptidase

Investigator : Miss Jittiyawadee Sripa Ubon Ratchathani University

E-mail Address :jittiyawadee.s@gmail.com

Project Period : 2 July 2012 to 2 July 2014

Leucine aminopeptidase (LAP), classified as a metalloprotease, was identified from cDNA library of adult *Opisthorchis viverrini*. The contig of nucleotide sequences of *O. viverrini* leucine aminopeptidase (*Ov*LAP) was assembled to the full length DNA that was comprised of 1,698 bp, encoding 566 amino acids, and a calculated molecular mass of 60 kDa with predicted PI of 6.21. Analysis of signal peptide using SignalP-NN and SignalP-HMM prediction indicated that *Ov*LAP was a non-secretory protein by the absence of a cleavage site at the N-terminus of the amino acid sequence. Similar to LAP in other organisms, the *Ov*LAP sequence contains the hallmark of the LAP protein sequence with the conserved metal binding site: Isoleucine, 2 of Glycine and Lysine and catalytic site: Asparagine, Threonine, Aspartic acid, Alanine, Glutamic acid, Glycine and Arginine. Phylogenetic analysis based on the amino acid sequence of *Ov*LAP revealed a close relationship with the liver fluke *Clonorchis sinensis*. Reverse transcriptase-PCR indicated that the *Ov*LAP was expressed in egg, metacercaria, juvenile, and adult stages. Recombinant *Ov*LAP was expressed in bacterial cells as a soluble form and its molecular weight appeared as a single band at 60 kDa. The recombinant protein of *Ov*LAP was used to immunize mice to produce polyclonal antibodies. The immmunohistochemical for tissue localization of *Ov*LAP in adult worms by the use of polyclonal antibodies demonstrated the presence of *Ov*LAP in parenchymal cells, eggs shell in the uterus, tegument, sub-tegumant, testis, Mehlis gland and in ventral suckers of adult worms. *Ov*LAP was required divalent metal ions; Ca^{2+} and Co^{2+} to assist in catalytic activity. The optimal activity of *Ov*LAP was observed at slightly alkaline condition. *Ov*LAP was present as essential molecule for maintain *O. viverrini* life cycle. *Ov*LAP was attractive for vaccine candidate and target for gene knock down by combine

with other *O. viverrini* crucial molecules. The specific combine inhibition for multiple enzymes/molecule may impair protein hydrolysis, nutrient uptake, protein synthesis and cytoplasmic metabolism and finally impair parasite survival.

Keywords: *Opisthorchis viverrini*, Leucine aminopeptidase, Cloning, Characterization