



การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของโปรตีนลิวซิมินอะมิโนเปปไทเดสจากพยาธิใบไม้เลือด

Schistosoma mekongi

โดย

นางสาวปิยนุช สุงสุวรรณ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสจากพยาธิใบไม้เลือด

Schistosoma mekongi



โดย
นางสาวปิยนุช สูงสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LEUCINE AMINOPEPTIDASE
FROM *SCHISTOSOMA MEKONGI*



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (Animal Science)
Silpakorn University
Academic Year 2022
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของโปรตีนลิพซินอะมีโนเปปทิเดสจากพยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma mekongi</i>
โดย	นางสาวปิยนุช สูงสุวรรณ
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรินทร์ ปรียวิษณุภักดี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. จรุงโรจน์ โชติวิวัฒน์กุล

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....
(อาจารย์ ดร. วัชรภรณ์ รามธรรม) คณบดีคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จารุณี เกษรพิกุล) ประธานกรรมการ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรินทร์ ปรียวิษณุภักดี) อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. จรุงโรจน์ โชติวิวัฒน์กุล) อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไกร มีมล) ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

61751201 : สัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*, โปรตีนลิซีนอะมิโนเปปติเดส (LAP), โรคพยาธิใบไม้เลือด Schistosomiasis

นางสาว ปิยนุช สุขสุวรรณ: การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของโปรตีนลิซีนอะมิโนเปปติเดสจากพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรินทร์ ปริยวิชัยภักดิ์

โรคพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* เป็นโรคพยาธิที่พบการระบาดในพื้นที่ลุ่มแม่น้ำโขงในประเทศสาธารณรัฐประชาชนลาวและทางตอนเหนือของกัมพูชา แม้ว่าในประเทศไทยยังไม่พบการติดเชื้อ แต่เนื่องด้วยแม่น้ำมูลจังหวัดอุบลราชธานี เป็นแหล่งอาศัยของหอยซึ่งสามารถเป็นโฮสต์ตัวกลางสำหรับการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ ประเทศไทยจึงมีความเสี่ยงของโอกาสที่จะเกิดการระบาดของโรคได้ วัคซีนเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ เนื่องจากยา Praziquantel ที่ใช้รักษาพยาธิใบไม้เลือด Schistosomiasis กันอย่างแพร่หลาย เริ่มมีรายงานการตีพิมพ์เกิดขึ้น งานวิจัยนี้มีเป้าหมายศึกษาโปรตีนลิซีนอะมิโนเปปติเดส (Leucine aminopeptidase, LAP) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม metalloexopeptidases ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยสลายตัดหมู่อะมิโน ที่โปรตีนส่วนปลาย N-terminal (ปลายฝั่งที่มีหมู่อะมิโน) LAP มีหน้าที่ในขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย การควบคุมการเปลี่ยนหมุนเวียนของโปรตีนภายใน การศึกษาครั้งนี้ทำการโคลนยีน การบ่งบอกคุณลักษณะ และการทำนายตำแหน่งกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโมเลกุล LAP ของ *S. mekongi* และศึกษาการกระจายตัวของ LAP บนเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค In Situ Hybridization Hybridization This จากการศึกษาพบว่า ยีน LAP จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มี 1166 นิวคลีโอไทด์ โปรตีน LAP มี 388 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 41.68 กิโลดาลตัน โดยมีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ LAP ของ *S. japonicum* มากที่สุด มีความเหมือนอยู่ที่ 96.39% LAP จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีลำดับกรดอะมิโน “NTDAEGRN” ที่บ่งบอกว่าเป็น LAP ในกลุ่มของ M17 โดยมีตำแหน่ง 243-GRVWHIDY-250 เป็นตำแหน่งที่ถูกทำนายว่าเป็นอีพิโทป (epitope) ที่มีความสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ที่สามารถพัฒนาเป็นวัคซีนหรือชุดตรวจต่อไปในอนาคต การศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ LAP ด้วยเทคนิค In Situ Hybridization พบว่าเนื้อเยื่อพยาธิทั้ง 3 ระยะ มีการแสดงออกของ mRNA ที่ทางเดินอาหารและ Tegument ของพยาธิ



61751201 : Major (Animal Science)

Keyword : Schistosomiasis, Leucine aminopeptidase, *Schistosoma mekongi*

MISS Piyonoot SUNGSUWAN : Identification and Characterization of Leucine Aminopeptidase from *Schistosoma mekongi* Thesis advisor : Assistant Professor Narin Preyavichyapugdee, Ph.D.

Mekong schistosomiasis which caused by *Schistosoma mekongi* is widespread in Cambodia and Lao in the lower Mekong basin. Even though there was no infection in Thailand, there was an intermediate host snail in Moon River in Ubon Ratchathani province. So this is a risk factor for emerging of schistosomiasis in Thailand. Vaccine development is an alternative strategy to control schistosomiasis, due to there was drug resistance report in Praziquantel, which is the common drug for treating schistosomiasis mekongi. research was aim to study Leucine aminopeptidase (LAP), a metalloexopeptidases protein, which performs proteolytic activities in catalyzing the removal of N-terminal leucine residues from polypeptide or protein substrates. LAP functions are involved in the processing, catabolism, degradation and regular turnover of intracellular proteins. In the present study, we cloned, characterized and predicted immunogenic epitope of LAP from *Schistosoma mekongi* (SmekLAP). The partial of SmekLAP contains 1,166 bp nucleotides and, and its open reading frame encoded for 388 amino acid. The alignment of the deduced SmekLAP amino acid sequences showed a highest degree of identity with *S. japonicum* at 96.39%. There was a region "NTDAEGRN" which defined this protein is M17 family. This predicted immunogenic epitope regions 243-GRVWHIDY-250 could be target for diagnostic and vaccine development against *S. mekongi* in the future. The mRNA of SmekLAP were located in gut lumen and tegument stage of the parasite.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นรินทร์ ปรียวิษณุภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ รองศาสตราจารย์ ดร. จรุงโรจน์ โชติวิวัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและมอบความรู้ทางวิชาการ รวมไปถึงคำแนะนำในระหว่างการทำโครงการทดลอง ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย ตลอดจนการตรวจสอบและแก้ไข ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร และเจ้าหน้าที่บุคลากรทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ประสพการณ์อันมีค่าที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย รวมทั้งช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้สารเคมี และอุปกรณ์การวิจัยต่างๆ ตลอดระยะเวลาการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าของหนังสือ เอกสาร วารสาร และวิทยานิพนธ์ทุกฉบับ ที่มีส่วนช่วยทำให้มีความเข้าใจ และทำให้เนื้อหาภายในวิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์

ขอขอบคุณ นางสาวมะนาว แสงเพ็ญ นักศึกษาระดับปริญญาเอก คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านความรู้ทางวิชาการตลอดการดำเนินงานทดลอง แนะนำการดำเนินงานทดลอง และคอย ให้คำปรึกษาเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ คณะสัตวศาสตร์และ เทคโนโลยีการเกษตรที่ให้คำแนะนำและกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ นางสาวนิตา สันติมานะวงศ์ และพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคนในห้อง K458 หน่วยวิจัย เพื่อ ความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) มหาวิทยาลัยมหิดล ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และ ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยให้ความสนับสนุน และคอยให้กำลังใจ รวมทั้งเป็นแรงผลักดันที่ดีเยี่ยมจนสามารถดำเนินงานทดลองและทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นางสาว ปิยนุช สุงสุวรรณ

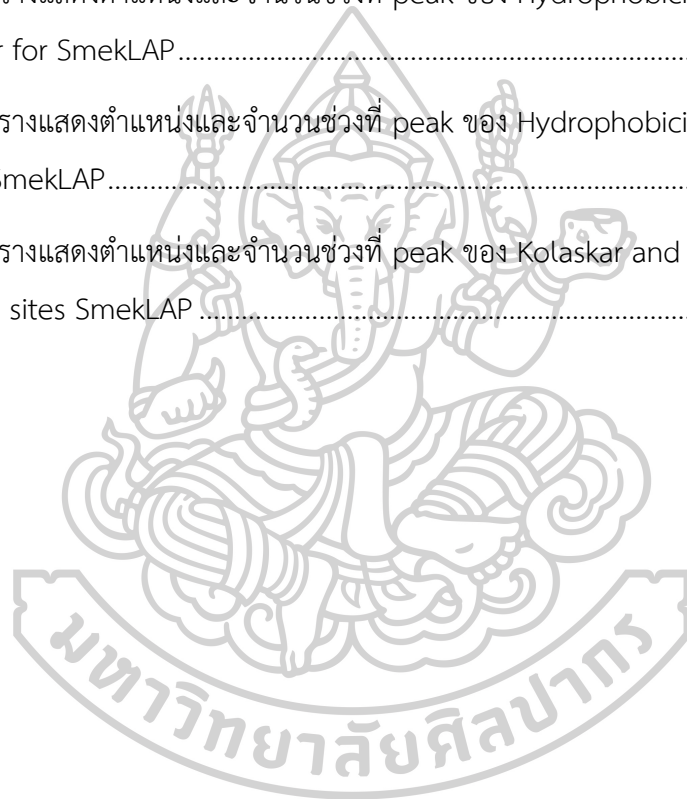
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
3. สมมติฐานของการศึกษา.....	3
4. ขอบเขตของการศึกษา.....	4
บทที่ 2.....	5
1. โรคพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomiasis).....	5
2. พยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma mekongi</i>	10
3. การตรวจและวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด.....	11
4. เอนไซม์ลิวซีน อะมิโนเปปติเดส (Leucine aminopeptidase).....	13
5. การประยุกต์ใช้โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสในการเป็นวัคซีนและการตรวจวินิจฉัยทางซีรัม วิทยาและการศึกษาตำแหน่งที่พบโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสในเนื้อเยื่อ.....	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
1. อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	21

2. วิธีการทดลอง.....	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	28
1. ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekLAP	28
2. ผลการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ Identity	29
3. ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	32
4. การทำนายสายโพลีเปปไทด์ Peptides	33
5. ผลการศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของเมสเซนเจอร์ ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส บนเนื้อเยื่อ พยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma mekongi</i> โดยวิธี <i>In Situ</i> Hybridization	39
5.1 พยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะ 3 สัปดาห์	39
5.2 พยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะ 5 สัปดาห์	39
5.3 พยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ระยะตัวเต็มวัย	39
6. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	43
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	45
1. ลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekLAP	45
2. การทำนายสายโพลีเปปไทด์ Peptides	45
3. ผลการศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของเมสเซนเจอร์ ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส บนเนื้อเยื่อ พยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma mekongi</i> โดยวิธี <i>In Situ</i> Hybridization	46
รายการอ้างอิง	47
ภาคผนวก.....	51
ภาคผนวก ก	52
ภาคผนวก ข	54
ภาคผนวก ค	59
ประวัติผู้เขียน	64

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Schistosoma mekongi กับปรสิตชนิดอื่นๆ	31
ตารางที่ 2 ตารางแสดงตำแหน่งและจำนวนช่วงที่ peak ของ Hydrophobicity plot of Hopp & Woods for SmekLAP	34
ตารางที่ 3 ตารางแสดงตำแหน่งและจำนวนช่วงที่ peak ของ Hydrophobicity plot of HPLC/Parker for SmekLAP	35
ตารางที่ 4 ตารางแสดงตำแหน่งและจำนวนช่วงที่ peak ของ Hydrophobicity plot of Welling and al .for SmekLAP	36
ตารางที่ 5 ตารางแสดงตำแหน่งและจำนวนช่วงที่ peak ของ Kolaskar and Tongaonkar antigenecity sites SmekLAP	38



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmekLAP ของพยาธิใบไม้เลือด S. mekongi	28
ภาพที่ 2 ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน SmekLAP จากพยาธิใบไม้เลือด S. mekongi กับ LAP ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆและโฮสต์	30
ภาพที่ 3 Phylogenetic ผลการทำเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มของโปรตีน LAP ของพยาธิใบไม้เลือด S. mekongi กับพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์ โดยโปรแกรม MEGA-X	32
ภาพที่ 4 Hydrophobicity plot of Hopp & Woods for SmekLAP	33
ภาพที่ 5 Hydrophobicity plot of HPLC/Parker for SmekLAP	34
ภาพที่ 6 Hydrophobicity plot of Welling and al . for SmekLAP	36
ภาพที่ 7 Kolaskar and Tongaonkar antigenicity sites for SmekLAP	37
ภาพที่ 8 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือดS. Mekongi ระยะ 5 สัปดาห์กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekLAP ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด S. mekongi ระยะ 3 สัปดาห์	40
ภาพที่ 9 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือดS. Mekongi ระยะ 5 สัปดาห์ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin (H&E) กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekLAP ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด S. mekongi ระยะ 5 สัปดาห์	41
ภาพที่ 10 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือดS. Mekongi ระยะ 5 สัปดาห์ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin (H&E) กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekLAP ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด S. mekongi ระยะ 3 สัปดาห์	42

บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomiasis) เป็นโรคปรสิตที่สำคัญโรคหนึ่ง โดยสาเหตุของการเกิดโรคนั้นเกิดจากการติดเชื้อของหนอนพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma spp.* เช่น *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, และ *S. mekongi* ซึ่งสามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและในสัตว์ (Jiraungkoorskul, Sahaphong, Sobhon, Riengrojpitak, & Kangwanrangsang, 2005; Maggioli et al., 2018a; Wei et al., 2008) วงจรชีวิตของ schistosome เกิดขึ้นใน โฮสต์ 2 ระยะ คือ หอยน้ำจืด (snail) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammals) การสืบพันธุ์ขึ้นอยู่กับ ประเภทของโฮสต์ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นในหอยน้ำจืด พัฒนา miracidia เป็น sporocyst และเติบโตเป็น cercariae การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของปรสิตเกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงมนุษย์ หนูและสุนัข (Mouahid et al., 2018; Viana, Faust, Haydon, Webster, & Lamberton, 2018) ปรสิตจะเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย (adult) ผสมพันธุ์และผลิตไข่ (Braun, Grimes, & Templeton, 2018) โรคพยาธิใบไม้เลือด ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เริ่มตั้งแต่ปี พ. ศ. 2507 เมื่อ Vic-Dupont และคณะบรรยายถึงกรณีของ โรคพยาธิใบไม้เลือด (ในตับ) ในโรงพยาบาล Saint Joseph ในกรุงปารีส (Sinuon et al., 2010) ซึ่งต่อมาในปี พ.ศ. 2508 พบผู้ป่วยชาย ชาวลาวอายุ 18 ปี เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการช็อค หลังจากเกิดอาการตกเลือดอย่างรุนแรง เมื่อทำการวินิจฉัยและเปรียบเทียบอาการของโรคที่เกิดขึ้นไปสอดคล้องกันกับ โรคพยาธิใบไม้เลือด (ในตับ) ที่มีรายงานลักษณะอาการก่อนหน้านี้ใน พ.ศ.2507 ดังนั้นจึงเป็นการพบสายพันธุ์ใหม่ของโรคพยาธิใบไม้ ซึ่งเกิดความสนใจเป็นอย่างมากรวมถึงองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) (Barbier, 1966, 1967)

โรคพยาธิใบไม้เลือด เป็นโรคพยาธิที่สำคัญที่มีผลกระทบต่อผู้คนมากกว่า 200 ล้านคน โดยมีคน 600 ล้านคนที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อทั่วโลก (Wei et al., 2008) โดยพบว่า การระบาดของโรคนี้ จะพบในแถบทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้ และเอเชีย (Moraes, Nascimento, Yamaguchi, Kato, &

Nakano, 2012) โดยประเทศไทยยังไม่มีเกิดการเกิดของโรคหรือการแพร่ระบาดของโรคนี้ แต่มีความเสี่ยงที่เป็นไปได้ในการเกิดโรค เนื่องจากพบการระบาดในประเทศลาว และกัมพูชา ซึ่งเป็นประเทศที่มีพรมแดนติดกับประเทศไทย (Fukuhara et al., 2011) โดยมีพาหะกึ่งกลางของโรคคือหอย *Neotricula aperta* ซึ่งหอยพาหะของ *S. mekongi* พบในกัมพูชาลาวและไทย ซึ่งมีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์แกมมา (gamma) สายพันธุ์แอลฟา (alpha) สองสายพันธุ์นี้พบในแม่น้ำโขง และ สายพันธุ์เบต้า (beta) พบในแม่น้ำมูล (Attwood, Fatih, Campbell, & Upatham, 2008; Jiraungkoorskul et al., 2005) พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีถิ่นกำเนิดตามแถบลุ่มแม่น้ำโขงตอนล่าง มีลักษณะส่วนใหญ่ใกล้เคียงกับ *S. japonicum* มากที่สุด (McManus et al., 2010; Zhou et al., 2010) มีผู้คนประมาณ 140,000 คนตกอยู่ในความเสี่ยงสำหรับการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยประมาณ 80,000 คนในกัมพูชาและ 60,000 คนในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (สปป. ลาว) (Urbani et al., 2002) พบการระบาดในจังหวัดทางใต้ของ สปป. ลาว ซึ่งมีความเสี่ยงในการระบาดเข้ามาสู่ประเทศไทย (Harinasuta, 1984)

ยาถ่ายพยาธิ (anthelmintics) มักใช้ในการรักษาโรคพยาธิใบไม้เลือด ยาที่ใช้กับการป้องกันพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* คือ Praziquantel เป็นยาทางเลือกสำหรับเคมีบำบัดเป็นยาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดและมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย (Attwood, 2001; Vale et al., 2017; Zwang & Olliaro, 2014) แต่มีรายงานว่ามีการดื้อยา (Chatree et al., 2013) ส่วนในเรื่องของการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือดที่ใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยคือ การตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระ เรียกเทคนิคนี้ว่า The Kato-Katz method แต่เทคนิคนี้ถึงจะเป็นเทคนิคที่เป็นมาตรฐานและใช้กันมาอย่างแพร่หลาย แต่มีความไวในการตรวจวินิจฉัยโรคต่ำ และไม่เหมาะสมกับพื้นที่ที่มีการระบาดต่ำและในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดในจำนวนที่น้อย (Bergquist et al., 2009) อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยยาไม่สามารถรักษาการควบคุมการติดเชื้อและการแพร่เชื้อได้เนื่องจากการติดเชื้อซ้ำจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหลังการรักษา (Crellen et al., 2016) นอกจากนี้โรคพยาธิใบไม้เลือด หากเกิดการระบาดขึ้นจะส่งผลกระทบต่อสัตว์เศรษฐกิจและสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นกลุ่มที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อหากเกิดการระบาดขึ้นจะส่งผลกระทบต่อสัตว์เศรษฐกิจและสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นกลุ่มที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนจึงมีความจำเป็นในการป้องกันและควบคุมโรคพยาธิใบไม้เลือด (Dai et al., 2013) ทำให้มีการพัฒนาการจัดการควบคุมโรคนี้โดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อป้องกันโรคพยาธิใบไม้เลือดอย่างต่อเนื่อง โดยศึกษาแอนติเจนที่น่าสนใจที่สามารถใช้เป็นวัคซีนแอนติเจนในการป้องกันโรค

โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส Leucine aminopeptidase (LAP) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปภายในตัวพยาธิ และเริ่มสร้างตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโต มีบทบาทในการเป็น Catabolizing peptides เป็นเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่ต้องอาศัยไอออนเป็นโคแฟกเตอร์ในการตัดโปรตีนที่ปลาย N-terminal (ปลายฝั่งที่มีหมู่อะมิโน) ให้เป็นกรดอะมิโน ในพยาธิใช้เอนไซม์นี้ สำหรับย่อยสลายอีโมโกลบินของโฮสต์สุดท้ายเพื่อให้ได้สารอาหาร (Changklungmoa et al., 2013; Maggioli et al., 2018a) LAP ในพยาธิระยะ miracidium มีบทบาทสำคัญในการฟักตัวของ miracidium จากไข่พยาธิ schistosome (Rinaldi et al., 2009) มีรายงานว่า LAP สามารถใช้ในการป้องกันโรคพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* spp. ได้โดยมีการลดของจำนวนพยาธิที่ 89% (Piacenza, Acosta, Basmadjian, Dalton, & Carmona, 1999) ทั้งนี้ LAP เป็นหนึ่งในแอนติเจนของวัคซีนที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการควบคุมโรคพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ในกระต่าย แสดงให้เห็นถึงการลดลงของปรสิตได้มากถึง 78% (Acosta et al., 2008) และด้วยการพัฒนาเพิ่มเติมโดยให้ LAP ร่วมกับการใช้สารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) ทำให้มีการลดลงของพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ที่ 50-80% (Maggioli et al., 2011) เนื่องจากพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* spp. เป็นพยาธิใบไม้เช่นเดียวกับ *Schistosoma* spp. และยังมีจีโนมคล้ายกัน ดังนั้นอาจใช้ LAP เพื่อป้องกันโรคพยาธิใบไม้เลือดที่เกิดจาก *Schistosoma* spp. ได้

2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

2.1 เพื่อศึกษาคูณลักษณะยีนและโปรตีน LAP ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

2.2 เพื่อศึกษาดำแหน่ง mRNA ของ LAP ในเนื้อเยื่อระยะต่าง ๆ ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

3. สมมติฐานของการศึกษา

โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* เป็นโปรตีนที่มีความจำเป็นต่อการอยู่รอดของพยาธิ จึงได้มีการศึกษาคูณลักษณะของยีนและโปรตีน รวมไปถึงการกระจายตัวบนตัวบนเนื้อเยื่อพยาธิ และการนำมาเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรค เพื่อพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด

4. ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของ LAP ในพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* การศึกษาการกระจายตัวของ LAP บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ในเลือด *S. mekongi* และศึกษาดำแหน่ง mRNA ของ LAP ในระยะหรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการของคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศ เพชรบุรี



บทที่ 2

ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomiasis)

โรคพยาธิใบไม้ในเลือด (Schistosomiasis) รู้จักกันในชื่ออื่นๆ ว่า บิลฮาร์เซีย (Bilharzia), ไข้หอยทาก (Snail fever) และ ไข้กาตายามา (Katayama fever) (Nelwan, 2019; Vale et al., 2017) โดยสาเหตุของการเกิดโรคพยาธิใบไม้เลือด คือ การติดเชื้อหนอนพยาธิชนิด *Schistosoma* spp. เช่น *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, และ *S. mekongi*. ซึ่งจัดอยู่ใน Superfamily Schistosomatoidea และ Family Schistosomatidae สามารถติดเชื้อได้ทั้งในคนและในสัตว์ เป็นปรสิตของสัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์เศรษฐกิจ ซึ่งหากเกิดการติดเชื้อหรือการแพร่ระบาดของโรคพยาธิใบไม้เลือดจะส่งผลทำให้เกิดความเสียหายอย่างมาก ความเสียหายด้านสุขภาพของคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อ และความเสียหายทางด้านอุตสาหกรรมและเศรษฐกิจที่เกี่ยวข้อง พยาธิใบไม้ตับส่งผลที่รุนแรงต่อสัตว์เศรษฐกิจ โดยเฉพาะ โค กระบือ แพะ และแกะ การติดเชื้อจะมีผลกระทบต่อผลผลิตโดยเฉพาะเนื้อมลดลง โดยเฉพาะผลผลิตด้าน เนื้อ นม ขนและอื่นๆถ้ามีการติดเชื้อในสัตว์ที่มีอายุน้อยจะทำให้สัตว์ตายได้ (จิฑูรย์ ไวยนันท์ และ พิรพรรณ ตันอารีย์, 2546; ชโลบล วงศ์สวัสดิ์, 2555)

1.1 การแบ่งกลุ่มของพยาธิใบไม้เลือด แหล่งที่พบ รูปร่างลักษณะโดยทั่วไป และการก่อโรค สามารถแบ่งได้ดังนี้

1.1.1 *Schistosoma japonicum* พบในประเทศลาว กัมพูชา ใต้หวัน เวียดนาม ฟิลิปปินส์อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น (เกาะฮอนชูและคิวชู) และจีน (ตามกลุ่มแม่น้ำเหลือง) โดย รูปร่างลักษณะ ตัวเต็มวัยของเพศเมียมีขนาด 12-28 × 0.3 มิลลิเมตร ส่วนรังไข่จะอยู่กลางลำตัว มดลูกยาว มีไข่บรรจุอยู่ 50-100 ฟอง ไข่มีลักษณะกลมหรือรี ขนาด 65-103 × 50-72 ไมโครเมตร ไม่มีฝาปิด มีหนามเล็กๆ อยู่ด้านข้าง (rudimentary spine) แนบติดเปลือกไข่ เปลือกสีโปร่งใสถึงเหลืองอ่อน ภายในไข่มีตัวอ่อนเจริญอยู่ เรียกว่า ไมราซีเดียมตัวเต็มวัยของเพศผู้มีขนาด 12-20 × 0.3 มิลลิเมตร ลักษณะผิวจะเรียบ (non-tuberculated cuticle) มี intestinal reunion อยู่ส่วนท้ายของลำตัว มีอวัยวะ 6-7 อัน เรียงเป็นแถวเดียวกัน

1.1.2 *Schistosoma mekongi* พบในกลุ่มแม่น้ำโขง ประเทศลาว และกัมพูชา รูปร่าง ลักษณะตัวเต็มวัยของเพศเมียมีขนาด 14-20 × 0.3 มิลลิเมตร โดยรังไข่จะอยู่กลางลำตัว

มดลูกยาว มีไข่บรรจุอยู่ 120-130 ฟอง ไข่มีลักษณะเช่นเดียวกับ *S. japonicum* แต่จะค่อนข้างกลม และเล็กกว่า ขนาด $62-97 \times 50-76$ ไมโครเมตร มีหนามเล็กๆ อยู่ด้านข้าง ภายในไข่มีตัวอ่อนเจริญ อยู่เรียกว่า ไมราซีเดียม ตัวเต็มวัยของเพศผู้มีขนาด $10-18 \times 0.5-0.55$ มิลลิเมตร ลักษณะผิวเรียบ มี อดันตะ 6-7 อัน เรียงเป็นแถวเดียวกัน มี intestinal reunion อยู่ส่วนล่างของลำตัว

1.1.3 *Schistosoma haematobium* พบในแถบทวีปแอฟริกา ตะวันออกกลาง เกาะมาดากัสการ์ มอริเชียส และอินเดีย รูปร่างลักษณะตัวเต็มวัยของเพศเมียมีขนาด $20-26 \times 0.25$ มิลลิเมตร ส่วนของรังไข่จะอยู่ส่วนล่างของลำตัว มดลูกยาว มีไข่มีลักษณะยาวรี ขนาด $83-187 \times 40-70$ ไมโครเมตร ไข่บรรจุอยู่ 10-50 ฟอง มีหนาม หนึ่งอันอยู่ที่ปลายข้างหนึ่ง (terminal spine) เปลือกสีน้ำตาลอ่อน ภายในไข่จะมีตัวอ่อนเจริญอยู่ เรียกว่า ไมราซีเดียม (miracidium) ตัวเต็มวัยของเพศผู้มีขนาด $10-15 \times 0.75-1$ มิลลิเมตร ลักษณะผิวเป็นตุ่ม ละเอียด (finely tuberculated) มี อดันตะ 4-5 อัน เรียงกันเป็นกลุ่ม มี intestinal reunion อยู่บริเวณกลางลำตัว

1.1.4 *Schistosoma mansoni* พบในบราซิล ชูदान ลิเบีย อียิปต์ ทวีปแอฟริกา และหมู่เกาะในทะเลแคริบเบียน รูปร่างลักษณะตัวเต็มวัยของเพศเมียมีขนาด $7-17 \times 0.25$ มิลลิเมตร โดยรังไข่จะอยู่ส่วนบน ของลำตัว มีมดลูกสั้น มีไข่บรรจุอยู่ 1-4 ฟอง ไข่มีลักษณะยาวรี ขนาด $115-175 \times 45-70$ ไมโครเมตร มีหนามขนาดใหญ่หนึ่งอันอยู่ด้านข้าง (lateral spine) เปลือกสีน้ำตาล แกมเหลือง ภายในไข่มีตัวอ่อนเจริญอยู่เรียกว่า ไมราซีเดียม ตัวเต็มวัยของเพศผู้มีขนาด $6-13 \times 1$ มิลลิเมตร ลักษณะผิว เป็นตุ่มหยาบ (grossly tuberculated) มี อดันตะ 6-9 อัน เรียงกันเป็นกลุ่ม มี intestinal reunion อยู่ส่วนหน้าของลำตัว (มนะว แสงเฟื่อง, 2558; ดวงเดือน ไกรลาศ, 2560) ทั้ง 4 ชนิดนี้ มีพยาธิกำเนิด , พยาธิสภาพตลอดจนลักษณะทาง คลินิกคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันที่แหล่ง แพร่กระจายคือ การแพร่กระจาย (Geographical distribution)

1.2 การแยกชนิดตามลักษณะสำคัญที่แตกต่างของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma spp.*

1.2.1 เพศเมีย แยกได้จากตำแหน่งของรังไข่ จำนวนไข่ ลักษณะของไข่ในมดลูก และ ความยาวของมดลูก

1.2.2 เพศผู้ แยกได้จากลักษณะของ tubercle ที่ผิวหนังของพยาธิ จำนวนและ arrangement ของ อดันตะ และตำแหน่งของ reunion ของลำไส้

1.2.3 ขนาดของไข่

<i>S. haematobium</i>	ขนาด 150 × 60 ไมครอน
<i>S. mansoni</i>	ขนาด 150 × 60 ไมครอน
<i>S. japonicum</i>	ขนาด 90 × 65 ไมครอน
<i>S. mekongi</i>	ขนาด 45 × 40 ไมครอน

1.2.4 ไข่ไม่มีฝาปิด (non-operculated egg) สามารถแยกได้จากลักษณะของไข่ และตำแหน่งของหนาม (spine)

1.3 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp.

วงจรชีวิตแบบ *Schistosoma* spp. เกิดขึ้นใน 2 โฮสต์: หอยและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทั้งการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศหรือการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศขึ้นอยู่กับประเภทของโฮสต์ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นในหอยน้ำจืด ในหอยสิ่งนี้เริ่มต้นด้วยการพัฒนาของ miracidia เป็น sporocyst สปอโรซิสต์จะเพิ่มจำนวนและเติบโตเป็น cercariae ในโฮสต์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปรสิตรจะเติบโตจนโตเต็มที่ผสมพันธุ์และสร้างไข่ได้ โฮสต์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมถึงมนุษย์ หู และสุนัข (Mouahid et al., 2018; Viana et al., 2018)

เริ่มต้นวงจรโดยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะปล่อยไข่ออกมากับอุจจาระ ออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกทางอุจจาระหรือปัสสาวะ หรือปัสสาวะลงในน้ำ ที่อุณหภูมิค่อนข้างอุ่น และใส (Geyer et al., 2018; Nelwan, 2019) ในน้ำจืดไข่เหล่านี้จะก่อตัวขึ้น miracidia จะฟักและติดเชื้อหอยน้ำจืด (Geyer et al., 2018; Mouahid et al., 2018) ไข่มี miracidium ที่เจริญเต็มที่แล้ว เมื่อถึงน้ำจะฟักตัวทันที miracidium ออกจากไข่แล้ว ไข่เข้าหอยน้ำจืดที่เป็น 1st intermediate host (มีความจำเพาะ) ถ้า miracidium ไม่พบหอยพยาธิจะตายภายใน 16- 32 ชม. โดย *S. haematobium* หอยน้ำจืดของสกุล *Bulinus* , *S. japonicum* ติดเชื้อหอยน้ำจืดในสกุล *Oncomelania* , *S. mekongi* ติดเชื้อหอยน้ำจืดในสกุล *Neotricula*, *S. mansoni* ติดเชื้อหอยน้ำจืดในสกุล *Biomphalari* (Gurarie, Lo, Ndeffo-Mbah, Durham, & King, 2018; Nelwan, 2019) หลังจากการแทรกซึม miracidium พัฒนาเป็นสปอโรซิสต์ (Gurarie et al., 2018; Mouahid et al., 2018) สปอโรซิสต์จะสร้าง cercaria (cercariogenous sporocysts) หรือ sporocysts หอยน้ำจืดสามารถหลั่ง cercariae ได้ทุกวัน วันละหลายร้อย cercariae ประมาณ 200 cercariae สำหรับ *S.*

haematobium , 15 ถึง 160 cercariae สำหรับ *S. japonicum* และ 250 ถึง 600 cercariae สำหรับ *S. mansoni* (Gurarie et al., 2018; Mouahid et al., 2018) ภายในหอย miracidium จะเจริญเป็น mother sporocyst , daughter sporocyst , redia , cercaria ตามลำดับ cercaria มีลักษณะเป็น forked tail cercaria ใช้เวลาในหอยประมาณ 1-2 เดือน (miracidium พัฒนาเป็น cercaria) จากนั้น cercaria จะออกจากหอยว่ายน้ำไปคอยไซเข้าคนหรือสัตว์ (Mammalian hosts : definitive host)

Cercariae เข้าสู่ผิวหนังของมนุษย์หรือสัตว์และสลัดหางที่คดเคี้ยวสร้าง schistosomula พยาธิระยะ เคลื่อนไปทั่วเนื้อเยื่อของร่างกายผ่านการไหลเวียนของเลือด schistosomula เติบโตเป็น schistosomes และนอนตัวเต็มวัย นอนตัวเต็มวัยเหล่านี้แต่ละตัวมี คูโครโมโซม ZZ ในเพศชาย และโครโมโซม ZW ในเพศหญิง (Chala & Torben, 2018; Gurarie et al., 2018; Nelwan, 2019) นอนตัวเต็มวัยในมนุษย์ อยู่ในอวัยวะที่แตกต่างกันที่เฉพาะเจาะจงของแต่ละสายพันธุ์ *S. haematobium* พบในกระเพาะปัสสาวะและท่อไต แต่ยังสามารถพบอยู่ในหลอดเลือดดำทวารหนัก *S. japonicum* พบอยู่มากขึ้นบ่อยในลำไส้เล็ก *S. mansoni* สามารถมีอยู่ในลำไส้ใหญ่หรือลำไส้เล็ก (Abe et al., 2018; Braun et al., 2018)

1.4. อาการทางคลินิกของ schistosomiasis

อาการทางคลินิกของ schistosomiasis ประกอบด้วยเฉียบพลัน (Katayama syndrome) และอาการเรื้อรัง การฟักตัว ระยะเวลาของโรค Katayama ประมาณ 14 ถึง 84 วัน Katayama อาการของกลุ่มอาการอาจรวมถึงไข้ปวดศีรษะปวดกล้ามเนื้อ และอาการทางเดินหายใจ สำหรับ *S. haematobium* อาการทางคลินิกของโรคเรื้อรังอาจทำให้เกิด dysuria และ hematuria มัน ยังสามารถนำไปสู่การบาดเจ็บของระบบสืบพันธุ์และความอ่อนแอต่อ การติดเชื้ออื่น ๆ การติดเชื้อเรื้อรังอาจทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ อาการทางคลินิกของโรคเรื้อรังคือเลือดในอุจจาระ ท้องผูกและท้องร่วง อาการทางคลินิกเหล่านี้เกิดขึ้นในผู้ป่วย *S. japonicum* และ *S. mansoni* และการอักเสบยังเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่มี *S. japonicum* และ *S. mansoni* อาจทำให้เกิดแผลที่ผนังลำไส้พังผืด hyperplasia, polyposis และความดันโลหิตสูงพอร์ทัล (Nelwan, 2019; Vale et al., 2017)

1.5 การเกิดโรค Schistosomiasis (ชื่อพ้อง Bilharziasis) โดยพยาธิสภาพจะแตกต่างกัน ตามที่ adult ของพยาธิอาศัยอยู่ ทำให้เกิดพยาธิสภาพและอาการทางลำไส้ ,ตับ และม้าม ทำให้เกิด

พยาธิสภาพใน urinary bladder และมีอาการในทางเดินปัสสาวะ แบ่ง Pathologic stage เป็น 3 ระยะ 1) incubation period (prepatent period) 2) ระยะ egg deposition and extrusion เป็นระยะ acute และ 3) tissue proliferation and repair เป็นระยะ chronic

1.5.1 incubation period (prepatent period) เป็นระยะตั้งแต่ได้รับ infection

จนกระทั่งพยาธิเจริญไปเป็น adult พยาธิสภาพเริ่มจาก cercaria ไซ้เข้าผิวหนัง จะเกิดตุ่มแดง คัน (คล้ายเป็นลมพิษ) ถ้าเกาถูแล้วมี bacteria ผสมด้วยจะเกิดผิวหนังอักเสบเป็น dermatitis cercaria จะอยู่ที่ผิวหนังประมาณ 24 - 36 ชม. จะเข้าสู่กระแสเลือด และผ่านหัวใจห้องขวา ไปเจริญอยู่ที่ ปอด 2-3 วัน กลายเป็น young worms การเดินทางในปอดทำให้เกิดมีการตกเลือด (haemorrhage) และมี eosinophils, epithelioid cell, giant cell มาอยู่รอบ ๆ เส้นเลือด pulmonary ต่อจากนั้น young worms จะเดินทางต่อไปยังตับ และไปเจริญอยู่ที่หลอดเลือด intrahepatic portal blood vessels และทำให้เกิดการอักเสบขึ้น พบว่ามี ผนัง ลำไส้เล็ก จะมีเลือดคั่งด้วย ระยะนี้คนไข้จะมีอาการไอ มีไข้ มีอาการอักเสบของปอดและหลอดลม (ถ้าฟังปอดจะได้ยินเสียงหวีดเบา ๆ) ตรวจเลือดพบ eosinophil สูง ระยะที่เป็นมากอาจพบมีไข่สูงหนาส่วน ปวดศีรษะ ต่อม่าน้ำเหลือง โตโตและม้ามโต อาจมีลมพิษเกิดขึ้นทั้งตัว หน้า และตาบวม พยาธิที่อยู่ในหลอดเลือดที่ตับเจริญเป็นตัวแก่ และแยกเพศอย่างชัดเจน จับคู่กัน จากนั้นจะออกจากตับไปอยู่ในหลอดเลือดดำ (venule) ที่พยาธิชอบอยู่

1.5.2 egg deposition & extrusion เป็นระยะวางไข่และไข่เข้าไปในลำไส้ โดยที่ตัวเมียซึ่งถูกผสมแล้วจะวางไข่ที่ละใบ ในปลายหลอดเลือดดำ(venule) ที่มีนอยู่ ไข่จะถูกปล่อยเรียงออกมาคล้ายแฉกถูกปิดโดยจะถูกขับออกมาใน lumen ของลำไส้หรือ urinary bladder (แล้วแต่ชนิดของพยาธิ) แล้วจะถูกขับออกมาสู่ภายนอกพร้อมอุจจาระหรือปัสสาวะใครบางส่วนจะตกค้างอยู่ในผนังลำไส้หรืออวัยวะอื่น จะมีชีวิตอยู่ได้นานประมาณ 21 วันก็จะตาย เมื่อใครตายและยังค้างอยู่ใน tissue ก็กลายเป็นร่องรอยแผล (focus ทำให้เกิด lesion) รอบๆไข่ต่อไปในระยะที่ 3 ไข่ส่วนอื่นของ Schistosome ที่อยู่ในเส้นเลือด จะถูกกระแสเลือดพัดกลับ เข้ามาติดอยู่ในตับ และถ้าใครมีจำนวนมากๆ จะอุดตัน portal veins ทำให้มีเลือดคั่งในตับ เกิดตับโตและเกิด back pressureไปทำให้ม้ามโตด้วย ถ้าได้รับ infection มากพยาธิออกไข่มาก เข้าก็มีผลไปทำให้ตับโต และม้ามโตมากขึ้นทุกที

1.5.3 tissue proliferation and repair ไข่ที่ค้างอยู่ใน portal vessel จะเรียงตัวผ่านเส้นเลือดไปอยู่รอบ ๆ เส้นเลือด จะมี round cell infiltration รอบ ๆ ไข่ เกิด pseudo-

abscess ซึ่งมีลักษณะที่ประกอบด้วย leukocytes ชนิดต่าง ๆ และเนื่องจากมี toxic product inflammatory cell จากตัวพยาธิก็ทำให้เกิดมี inflammatory cells ในทุกแห่ง ที่มีพยาธิอยู่ ไข่มี โอกาสพลัด (หลง) เข้าสู่สมอง,ปอด, หัวใจ และที่อื่นๆได้ miracidium ที่อยู่ในไข่อายุเกิน 21 วัน จะ ตายและเกิดการมีหินปูนมาสะสม (calcification) ค้างอยู่ใน tissue ภาวะที่ทำให้ไวต่อสิ่งกระตุ้น (toxic sensitization reaction) จะมีงานตลอดชีวิตพยาธิ อาจถึง 25 ปีถ้าผู้ป่วยมีอายุยืน อยู่ต่อไป นอกจากจะเป็น pseudo- abscess ซึ่งมี proliferation ของ round cells เกิดการเปลี่ยนแปลงของ เนื้อเยื่อบริเวณนั้นจนในที่สุด organ จะทำหน้าที่เสื่อมลงระยะสุดท้ายนี้ อยู่ได้นานหลายปีหรือผู้ป่วย อาจ ตาย เสียก่อนด้วยโรคแทรกซ้อน เช่น อาการเกิดเป็น pneumonia หรือ carcinoma ได้

2. พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*

2.1. ประวัติการค้นพบ พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*

Schistosomiasis ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เริ่มตั้งแต่ปีพ. ศ. 2507 เมื่อ Vic-Dupont และคณะบรรยายถึงกรณีของ schistosomiasis (ในตับ) ในโรงพยาบาล Saint Joseph ใน กรุงปารีส (Sinuon et al., 2010) ซึ่งต่อมาในปี พ.ศ. 2508 พบผู้ป่วยชาย ชาวลาวอายุ 18 ปีเข้ารับการ รักษาในโรงพยาบาลด้วยอาการช็อคหลังจากเกิดอาการตกเลือดอย่างรุนแรง เมื่อทำการวินิจฉัย และเปรียบเทียบอาการของโรคที่เกิดขึ้น ไปสอดคล้องกันกับ schistosomiasis (ในตับ) ที่มีรายงาน ลักษณะอาการก่อนหน้านั้นใน พ.ศ.2507 ดังนั้นจึงเป็นการพบสายพันธุ์ใหม่ของโรคพยาธิใบไม้ ซึ่งเกิด ความสนใจเป็นอย่างมากรวมถึง WHO (Barbier, 1966, 1967)

พยาธิใบไม้เลือดมีลักษณะแตกต่างจากพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ หลายอย่างเช่น . รูปร่างคล้ายเรือ (boat shape) ตัวไม่แบนแบบใบไม้ , มีเพศแยกกัน (dioecious) , ไข่ไม่มีฝา(no operculum) , cercaria มีลักษณะพิเศษเป็น forked tail , ไม่มีระยะ metacercaria

จัดจำแนกอนุกรมวิธานของพยาธิ *Schistosoma mekongi* ได้ดังนี้

Kingdom: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Class: Trematoda

Subclass: Digenea

Order: Strigeidida

Family: Schistosomatidae

Genus: Schistosoma

Species: *Schistosoma mekongi*

2.2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *S. mekongi*

2.2.1 ตัวเต็มวัย (Adult) ลักษณะตัวเต็มวัยของเพศเมียมีขนาด 14-20 × 0.3 มิลลิเมตร โดยรังไข่จะอยู่กลางลำตัว มดลูกยาว มีไข่บรรจุ อยู่ 120-130 ฟอง ส่วนตัวเต็มวัยของเพศผู้มีขนาด 10-18 × 0.5-0.55 มิลลิเมตร ลักษณะผิวเรียบ มี intestinal reunion อยู่ส่วนท้ายของลำตัว มีอัมตะ 6-7 อัน เรียงเป็นแถวเดียวกัน ส่วนลักษณะ 10

2.2.2 ไข่ (Egg) ไข่มีลักษณะคล้ายกับ *S. japonicum* แต่จะค่อนข้างกลมและเล็กกว่า มีขนาด 62-97 × 50-76 ไมโครเมตร มีหนามเล็กๆอยู่ด้านข้างภายในไข่มีตัวอ่อนเจริญอยู่ เรียกว่าไมราซี เดียม

2.2.3 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีวงจรชีวิตเช่นเดียวกับพยาธิใบไม้เลือดชนิดอื่น แต่พยาธิ ตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ที่ superior mesenteric vein และ portal vein โดยมีหอย *N. aperta* เป็น โฮสต์กลางในการติดต่อสู่มนุษย์ และสัตว์ (Braun et al., 2018)

3. การตรวจและวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด

การตรวจอจจาจะเป็นวิธีการสำคัญที่ใช้ในการวินิจฉัย การติดเชื้อ schistosomiasis สำหรับเทคนิคการตรวจวินิจฉัยการ วัตถุประสงค์มีหลายอย่าง: KatoKatz, การทดสอบการฟักไข่ miracidium (MHT), ความเข้มข้นของ formol-ether เทคนิค (FECT), แอนติเจนแคโทดมุนเวียน (CCA), การทดสอบ (POCT) และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ตามเทคนิค แสดงให้เห็นว่า FECT ใช้เวลานานและต้องใช้ วัสดุหลายชนิด นอกจากนี้ความไวและความจำเพาะของ FECT มีความคล้ายกับเทคนิค Kato-Katz เทคนิค Kato-Katz ทำได้รวดเร็วใช้งานง่ายและใช้เวลาน้อยที่สุด เทคนิคนี้มี

อัตราความไว 87.5% และความจำเพาะ 100% วิธีการดั้งเดิมไม่สามารถตรวจพบ schistosomiasis ในที่การติดเชื้อระดับต่ำ (Alemu, Zigta, & Derby, 2018; Nelwan, 2019; Vale et al., 2017)

3.1. การตรวจอุจจาระโดยกล้องจุลทรรศน์ถ้าแบ่งตามวัตถุประสงค์ของการตรวจอาจจะแบ่งออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆซึ่งได้แก่ การตรวจแยกชนิดพยาธิ (qualitative examination) และการตรวจนับจำนวนพยาธิ (quantitative examination)

3.1.1 การตรวจแยกชนิดพยาธิ เป็นการตรวจว่าสัตว์มีพยาธิชนิดใดบ้างเท่านั้น การตรวจอุจจาระแบบนี้อาจจะแบ่งออกตามประสิทธิภาพหรือความละเอียดของการตรวจออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆซึ่งได้แก่ 1. การตรวจแบบไม่เข้มข้น (unconcentration method) ตัวอย่างของการตรวจแบบนี้ได้แก่การตรวจโดยการละลายอุจจาระในน้ำเกลือ นอร์มัล (normal Saline) บนกระจกสไลด์เตอร์ซึ่งปิดด้วยโรวอร์กลาส (cover glass) วิธีดังกล่าวได้แก่วิธีการป้ายหรือละลายอุจจาระโดยตรง ซึ่งเป็นวิธีที่ทำงานสะดวกรวดเร็วแต่ไม่เข้มข้น ในรายที่มีการติดพยาธิน้อยหรือต่ำ (low infection) 2. การตรวจแบบเข้มข้น (concentration method) การตรวจด้วยวิธีนี้จะละเอียดและมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการตรวจแบบไม่เข้มข้นเพราะใช้จำนวนอุจจาระในการตรวจมากกว่าวิธีการตรวจแบบเข้มข้นเป็นวิธีที่ทำในห้องปฏิบัติการและใช้เครื่องมือในการตรวจจำนวนมากหรือน้อยซึ่งแล้วแต่แต่ละวิธี

3.2.2 การตรวจนับจำนวนพยาธิ เป็นการตรวจหาปริมาณของไข่พยาธิชนิดต่างๆที่พบในอุจจาระหน่วยของการตรวจวัดได้แก่ e. p. g. (eggs per gram of faeces) (ปริมาณของไข่พยาธิในอุจจาระหนัก 1 กรัม) หรือ e. p. ml. (eggs per millilitre of faeces) (ปริมาณของไข่พยาธิในอุจจาระขนาด 1 มิลลิลิตร) ตัวอย่างของวิธีการตรวจอุจจาระเพื่อบันทึกจำนวนไข่ได้แก่ Stoll's dilution egg counting technics และ Mc Master technics เป็นต้น

3.2. การตรวจโดยทางอิมมูโนวิทยา การตรวจตัวทางอิมมูโนวิทยาของโรคพยาธิหรือการตรวจโดยทางซีรั่มวิทยาได้ มีการพัฒนาขึ้นอย่างกว้างขวางในปัจจุบันปัญหาสำคัญของการตรวจโดยวิธีนี้ได้แก่การแยกและทำให้แอนติเจนบริสุทธิ์ แอนติเจนของพยาธิโดยทั่วไปอาจจะแบ่งออกเป็น 2 พวกซึ่งได้แก่ 1. Somatic antigen เป็นแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบหรือโครงสร้างของตัวพยาธิเอง 2. Secretary-Excretory antigen (S-E antigen) เป็นแอนติเจนที่เป็นสารที่พยาธิขับหรือปล่อยออกมา ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ แอนติเจนชนิดนี้เตรียมได้จากการเพาะเลี้ยงพยาธิ แอนติเจนที่ใช้ในการตรวจ

วินิจฉัยโรคทาง ปรสิต ส่วนมากยังได้แก่ somatic antigen เฉพาะสามารถเตรียมได้ง่ายกว่าและเตรียมได้จำนวนมากแอนติเจนอีกชนิดหนึ่ง

การตรวจโรคปรสิตโดยทางอิมมูโนวิทยา หรือซีรัมวิทยามีหลายวิธี การเลือกวิธีใดก็ขึ้นอยู่กับชนิดของพยาธิที่จะตรวจ ในการเลือกวิธีการตรวจโรคปรสิตทางซีรัมวิทยาจะต้องพิจารณาสิ่งที่สำคัญต่อไปนี้ ความไว (sensitivity) และความเฉพาะเจาะจง (specificity) ของวิธีการทดสอบ วิธีการตรวจที่ดีควรมีทั้งความไวและความเฉพาะเจาะจงสูง แต่อย่างไรก็ตามเป็นการยากที่จะหาวิธีการตรวจที่มีคุณสมบัติทั้ง 2 ประการ ที่กล่าวแล้วอย่างครบถ้วนสมบูรณ์ วิธีการตรวจโรคปรสิตทางซีรัมวิทยา วิธีที่นิยมทำได้แก่ วิธี gel-diffusion สำหรับการตรวจพยาธิตัวกลมในกระเพาะอาหารและลำไส้และการตรวจพยาธิใบไม้ตับ วิธี indirect fluorescent antibody test (IFAT) สำหรับการตรวจโปรโตซัวพวก Babesia บางชนิด และวิธี micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) สำหรับการตรวจพวก Trichinella spiralis เป็นต้น นอกจากนี้วิธีอื่นที่อาจใช้ในการตรวจทางซีรัมวิทยา ได้แก่ วิธี complement fixation test immunoelectrophoresis indirect ham agglutination test (IHAT) และ intradermal test เป็นต้น ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากหนอนพยาธิพบว่า นอกจากการตรวจตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการที่กล่าวแล้ว ยังได้มีการผ่าซากตรวจโดยการตรวจจากสัตว์ที่ตายแล้วหรือโดยการสุมสัตว์ที่สงสัยแล้วฆ่าเพื่อหาซากตรวจหาพยาธิตรวจหาพยาธิซึ่งมักพบในการตรวจพยาธิในไก่ที่เลี้ยงเป็นจำนวนมาก (วิฑูรย์ ไวยนนท์ และ พิรพรรณ ตันอารีย์. 2546)

4. เอนไซม์ลิวซีน อะมิโนเปปติเดส (Leucine aminopeptidase)

Leucine aminopeptidase (LAP) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปภายในตัวพยาธิ และเริ่มสร้างตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโต มีบทบาทในการเป็น Catabolizing peptides เป็นเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่ต้องอาศัยไอออนเป็นโคแฟกเตอร์ในการตัดโปรตีนที่ปลาย N-terminal (ปลายฝั่งที่มีหมู่อะมิโน) ให้เป็นกรดอะมิโน ในพยาธิใช้เอนไซม์นี้ สำหรับย่อยสลายฮีโมโกลบินของโฮสต์สุดท้ายเพื่อให้ได้สารอาหาร (Changklungmoa et al., 2013; Maggioli et al., 2018a) LAP อยู่ในตระกูล M17 peptidase มีความสำคัญต่อพยาธิมีหน้าที่ในการควบคุมสมดุลของ catabolism , anabolism การเจริญเติบโตใน ระยะ ต่าง ๆ ตลอดจน ตัวเต็มวัย (Wu et al., 2018) LAP เป็น metalloexopeptidase ที่สำคัญซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโพลีเปปไทด์และโปรตีนให้ได้เป็นกรดอะมิโนอิสระ โดยการเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม metalloexopeptidase ต้องอาศัยไอออนเป็นโคแฟกเตอร์ หรือสารประกอบไอออนบวก เช่น Mg^{+2} หรือ Mn^{+2} เพื่อเข้าจับกับตำแหน่งที่ทำให้เกิดการ ทำงานของเอนไซม์ LAP (Kraft, Schleberger, Weckesser, & Schulz, 2006; Maggioli et al.,

2018a; Zhang et al., 2018) และ LAP ยังมีบทบาทสำคัญในการฟักไข่พยาธิ ในระยะที่ไม่ราชีเดียมออกจากไซซิสโตโซม (Rinaldi et al., 2009)

การศึกษา LAP ในปี 2004 (McCarthy et al., 2004) โดยได้ทำการศึกษา LAP ใน *S. mansoni* และ LAP ใน *S. japonicum* ทำการเก็บรวบรวมยีน โดยการค้นหาฐานข้อมูลด้วยเปปไทด์ ลำดับ NTDAEGRL บริเวณไซต์ของ aminopeptidases และทำการเปรียบเทียบความเหมือนของยีนที่ต้องการโดยใช้วิธี phylogenetic analyses ยีน ของ LAP ใน *S. mansoni* และ *S. japonicum* มีความคล้ายคลึงกันถึง 85% และความสัมพันธ์ระหว่าง *S. mansoni* และ *S. japonicum* LAPs และสมาชิกอื่น ๆ ในตระกูล M17 ได้รับการตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับในโดเมน C-terminal โดยทั้ง 2 ยีนเป็น เอนไซม์ในตระกูล M 17 SmLAP มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 57.5 kDa โดยติดตามด้วยวิธี Immunoblot โดยนำสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย และ โปรตีนรีคอมบิแนนท์ SmLAP โดยไซต์ที่ได้คือ 57.5 kDa และ SjLAP มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 52 kDa โดยติดตามด้วยวิธี Immunoblot โดยนำสารสกัดพยาธิตัวเต็มวัย และ โปรตีนรีคอมบิแนนท์ SjLAP ไซต์ที่ได้คือ 52 kDa และได้ทำการตรวจสอบ LAP ในระยะ cercaria ของ *S. mansoni* พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล ที่ 57.5 kDa

ผลการศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ LAP พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมที่ 8.25 การวิเคราะห์ไอออนของโลหะ พบว่าแมงกานีส และแมกนีเซียมไอออนช่วยเพิ่มกิจกรรมโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LAP ไอออนของโลหะ ในทางตรงกันข้ามไอออนบวกสังกะสีช่วยลดกิจกรรมของ โปรตีนรีคอมบิแนนท์ LAP ตัวทำละลายโลหะ EDTA , 1,10-phenanthroline และตัวยับยั้ง bestatin aminopeptidase เป็นสารยับยั้งทั้งรีคอมบิแนนท์และเนทีฟ โดยผลการทดลองที่ได้ มีเอนโดโปรตีนของไซซิสโตโซมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารของฮีโมโกลบินของโฮสต์ให้ได้เป็นเปปไทด์ที่ดูดซึมได้ แต่ exoprotease ที่รับผิดชอบในการ catabolising เปปไทด์เหล่านี้เป็นกรดอะมิโนยังไม่สามารถระบุได้ โดยการค้นหาฐานข้อมูลพบการแสดงยีน LAP ของ *S. mansoni* และ *S. japonicum* ที่ ในตระกูล M17 (LAPs) โปรตีน recombinant SmLAP ที่ผลิตในเซลล์มีคุณสมบัติทางชีวเคมีร่วมกันรวมถึง pH ที่เหมาะสมสำหรับ กิจกรรมความจำเพาะของสารตั้งต้นและการฟั่งพาไอออนบวกโลหะสำหรับกิจกรรม การศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันพบว่า *S. mansoni* LAP ถูกสังเคราะห์ในเซลล์ทางเดินอาหารที่อยู่รอบ ๆ ลำไส้เล็ก ดังนั้น เปปไทด์ในลูเมนของลำไส้ schistosome จะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ทางเดินอาหารและถูกแยกออกโดย LAP เพื่อให้ได้เป็น กรดอะมิโนอิสระก่อนที่จะกระจายไปยังเนื้อเยื่อภายในของปรสิต

ในปี 2005 (Nour, Lotfy, El-Kady, El-Shahat, & Doughty, 2005) ได้มีการศึกษาตำแหน่งของ LAP ในไข่พยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* และในเนื้อเยื่อตับของหนูที่ติดเชื้อ การติดเชื้อ *S. mansoni* ทำให้เกิดการสร้างกรานูโลมาในตับและพังผืดในการตอบสนองต่อไข่พยาธิ ได้มีการศึกษา ตำแหน่งของ LAP ในไข่ *S. mansoni* และในส่วนของเนื้อเยื่อตับจากหนูที่ติดเชื้อ ไข่และตับที่ได้จากหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อได้รับการพิสูจน์และย้อมสีด้วยสารตั้งต้นของ L-leucine-7-amino-trifluoromethyl- coumarin L-arginine-7-amino-trifluoro- methylcoumarin และ Bestatin (leucine aminopeptidase inhibitor) ถูกใช้เพื่อทดสอบความจำเพาะและความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของสารตั้งต้น LAP รูปแบบการย้อมสีของแอนไซม์ในไข่และเนื้อเยื่อตับสะท้อนให้เห็นว่า LAP เป็นสารสำคัญของไข่ที่กระจายอยู่ในไข่เกือบทั้งหมดยกเว้นส่วนของพื้นผิวหนาม (spine) สรุปได้ว่าแอนไซม์ LAP เป็นแอนติเจนของไข่พยาธิที่สำคัญและเป็นแอนติเจนเป้าหมายสำหรับการศึกษากการพัฒนาวัคซีนป้องกันพยาธิวิทยา

การศึกษาเกี่ยวกับ พยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* มากมายได้พบว่า แอนไซม์ LAP เป็นแอนติเจนที่สำคัญในระยะไข่ของพยาธิใบไม้เลือด ดังนั้นจึงมีการศึกษาต่อในปี 2009 (Rinaldi et al., 2009) ศึกษาการรบกวน RNA ที่ทำการสร้างโปรตีน LAP เพื่อให้มีผลต่อการลดการฟักไข่ของพยาธิใบไม้เลือด ผลการทดลอง LAP มีอยู่ในระยะไข่ของพยาธิใบไม้เลือด และเกี่ยวข้องกับการฟักไข่ของ miracidia ทั้งนี้ตรวจพบกระบวนการในการฟักไข่และการเกิดขึ้นของ miracidia ซึ่งถูกยับยั้งโดย Bestatin L-leucine เป็นยาปฏิชีวนะของแหล่งกำเนิดของจุลินทรีย์ที่มีการต่อต้านกับ LAP, aminopeptidases B และ N และ metalloprotease อื่น ๆ ผลลัพธ์ที่ได้ สนับสนุนการค้นพบว่า RNAi กับ bestatin ต่อต้านและยับยั้งการสร้างโปรตีน LAP ป้องกันกระบวนการฟักไข่ ดังนั้นการแช่ไข่ schistosome ใน dsRNA โดยกำหนดเป้าหมายที่ SmLAP1 SmLAP2 และการทำงานของ Bestatin มีผลต่อการทำงานของ mRNA โดยมีผลทำให้การทำงานของ LAP ลดลงจากสารตั้งต้น leucine aminopeptidase มีความสำคัญต่อการฟักของไข่ พยาธิใบไม้เลือด แสดงให้เห็นอย่างชัดเจน โดยใช้การรบกวน RNA ที่กำหนดเป้าหมายจากทั้งยีน schistosome LAP นั้นดูเหมือนจะมีความจำเป็นสำหรับการฟักไข่ของ schistosome LAP เป็นผลให้ miracidia สามารถฟักออกจากไข่ในสิ่งแวดล้อมได้ทันที เกิดขึ้นเมื่อไข่ลงสู่แหล่งน้ำจืด สำหรับการเกิดขึ้นของ miracidia จากเปลือกไข่ สิ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเหตุการณ์ทางสรีรวิทยาและโมเลกุลนำไปสู่การฟักไข่ ได้แก่ แคลเซียม ไอออนฟลักซ์และกิจกรรมของ LAP การปล่อยของ LAP ทันทีหลังจากการฟักไข่ *S. mansoni* ความเป็นไปได้อย่างหนึ่งคือ LAPs schistosome มีส่วนร่วมในการย่อยส่วนประกอบของเยื่อหุ้มชั้นในของไข่ ในกระบวนการฟักไข่ ตัวตนของสารตั้งต้นธรรมชาติสำหรับ LAP จากไข่ไม่ได้

งานวิจัยในปี 2018 (Maggioli et al., 2018) ทำการศึกษา LAP ใน พยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ผลการทดลอง พบว่า SmLAP1 มีความยาว 523 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 56.7 kDa ค่า pI อยู่ที่ 7.58 ส่วนของ SmLAP2 มีความยาว 544 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 59.7 kDa ค่า pI อยู่ที่ 6.30 ซึ่ง SmLAP ทั้ง 2 โปรตีนเป็น active proteases และมีคุณลักษณะทางชีวเคมีที่คล้ายคลึงกัน แต่ SmLAP1 แสดงค่ากิจกรรมของ Enzyme ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกันกับงานวิจัยของ (McCarthy et al., 2004) SmLAP2 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ต่ำกว่าเช่นเดียวกับเอนไซม์ M17 family ซึ่ง SmLAP2 สามารถ hydrolyzed met-AMC และ Ang-AMC ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ Tyr-AMC, Thr-AMC และ Phe-AMC พบกิจกรรมเอนไซม์น้อยสุด นอกจากนี้ช่วงกิจกรรมของเอนไซม์ ตั้งแต่ pH 7.5-8.5 โดยมีกิจกรรมที่เหมาะสมที่สุดคือ pH 8 ไอออนบวกของ Divalent เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับกิจกรรมของ metallopeptidase และกิจกรรมของเอนไซม์ M 17metal (Acosta et al., 2008) ผลของโลหะไอออนของ Divalent คือ ทำให้ค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อใช้ Mg^{2+} or Mn^{2+} แต่เกิดการลดกิจกรรมโดย Zn^{2+} และ Ca^{2+} การศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ *S. mansoni* LAP และ *C. Sineasis* LAP2 (Acosta et al., 2008; McCarthy et al., 2004) ผลการทดลอง metal chelatore และ สารยับยั้งโปรตีเอสที่มีผลต่อกิจกรรมของ SmLAP ทำการวิเคราะห์กิจกรรมนี้ถูกยับยั้งอย่างมาก โดย bestatin ตัวยับยั้งเฉพาะของ aminopeptidase และยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย metal chelator EDTA metal chelator 1,10 phenantroline พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งน้อยไม่เท่ากับ EDTA กับ ยับยั้ง peptides อื่นๆ ได้แก่ PMSF, DTT และ E-64 ถูกยับยั้งเพียงเล็กน้อยหรือไม่

ตำแหน่งที่พบ LAP ทั้ง 2 ชนิดแสดงออกมากและพบมากใน strong experience malian stases ระยะ adult male female แต่ SmLAP2 แสดงออกมากกว่า SmLAP1 ใน miracidium และ sporocysts (McCarthy et al., 2004) LAP ทั้ง 2 ชนิดจะพบตลอดวงจร แต่ SmLAP2 จะพบมากในช่วงระยะ molluscan infective free-living developmental stage (miracidium) และ intrasnaill stages ส่วนของ SmLAP1 predominantly localized พบบริเวณ gastrodermal เพื่อใช้ย่อยอาหารในที่นี้ย่อยฮีโมโกลบินของ host สุดท้าย

เอนไซม์มีส่วนเกี่ยวข้องกับ การย่อยอาหาร (Acosta et al., 2008; Brindley et al., 1997; Vale et al., 2017) สารยับยั้งของทั้ง 2 เอนไซม์ช่วยลดการฟักไข่ของ *S. mansoni* เอนไซม์มีบทบาทในระยะไข่ ผลของการประเมิน specific antibodies ได้จากกระต่าย Anti-SmLAP1 แอนติบอดีที่จำเพาะมาจับกับ protein ที่ membrane Antibody anti-nitrogen ที่อยู่บน membrane ทำปฏิกิริยากันแอนติบอดีเหล่านี้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์อิมมูโนบลอตเพื่อค้นหาเอนไซม์ในสารสกัดไข่พยาธิและระยะเต็มวัยของ *S. mansoni* เอนไซม์ทั้ง 2 พบในระยะเต็มวัยแต่ใน

ระยะไข่พบเพียง SmLAP1เท่านั้น ผล Western anti- smLAP1 พบใน (1) precipitate eggs extract (3) anti-smLAP2 พบใน (3) precipitate adult extract บงบอกว่า LAP มีบทบาทในระยะไข่ (Rinaldi et al., 2009; Schistosoma japonicum Genome & Functional Analysis, 2009; Xu, Matsuda, & Dresden, 1988)

5. การประยุกต์ใช้โปรตีนลิวนินอะมิโนเปปไทด์ในการเป็นวัคซีนและการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาและการศึกษาตำแหน่งที่พบโปรตีนลิวนินอะมิโนเปปไทด์ในเนื้อเยื่อ

5.1 งานวิจัยที่ประยุกต์ใช้โปรตีนลิวนินอะมิโนเปปไทด์ในการเป็นวัคซีน

ในปี 1999 (Piacenza et al., 1999) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีน LAP ที่อยู่ในรูปโปรตีนที่มีโครงสร้างตามธรรมชาติ (native protein) ที่สกัดได้จากพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ในการป้องกันต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ในแกะโดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การป้องกัน (protection) อยู่ที่ 89% ถือว่ามีการป้องกันในระดับที่สูง

และงานวิจัยของ Acosta et al. (2008) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ LAP ในการเป็นวัคซีนต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* เช่นกัน โดยใช้โปรตีน LAP ในรูปโปรตีนรีคอมบิแนนท์ (recombinant protein) ในการป้องกันพยาธิ *F. hepatica* ในกระต่าย (สายพันธุ์แคลิฟอร์เนีย) ซึ่งในการทดลองนี้ได้แบ่งกลุ่มการทดลองมี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมติดเชื้อและไม่ได้รับวัคซีน และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มติดเชื้อพยาธิและได้รับโปรตีนวัคซีน LAP ผลการทดลอง พบว่า กลุ่มที่ได้รับวัคซีนรีคอมบิแนนท์ LAP ในการป้องกันพยาธิ *F. hepatica* ให้ผลเปอร์เซ็นต์การป้องกันอยู่ที่ 78% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า LAP ที่อยู่ในรูปรีคอมบิแนนท์วัคซีนสามารถป้องกันพยาธิใบไม้ *F. hepatica* ได้ ต่อมาได้มีการศึกษา ต่อในปี 2011

การศึกษาของ Maggioli et al. (2011) ที่ใช้โปรตีน LAP ในรูปโปรตีนรีคอมบิแนนท์เช่นกัน โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LAP ในการให้รวมกันกับสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) ที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการป้องกันพยาธิ *F. hepatica* ในแกะ ผลการทดลอง พบว่า ทุกกลุ่มที่ได้รับโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LAP ร่วมกันกับสารเสริมฤทธิ์ต่าง ๆ สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่ให้การป้องกันระดับสูง คือ กลุ่มที่ 1 LAP + FCA/FIA (G1) กลุ่มที่ 2 LAP + Adyuvac 50 (G2) และกลุ่มที่ 3 LAP + Alum (G3) มีค่าเปอร์เซ็นต์การป้องกันอยู่ที่ 83.8%, 74.4% และ 86.9% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ให้ผลการป้องกันอยู่ที่ระดับปานกลาง คือ กลุ่มที่ 4 LAP + DEAE-D (G4) และกลุ่มที่ 5 LAP + RIBI (G5) มีค่าเปอร์เซ็นต์การป้องกันอยู่ที่ 49.5% และ 49.8% ตามลำดับ ทั้งนี้การป้องกันที่ต่างกันอาจเป็นผลเนื่องมาจากการทำงานที่ต่างกันของสารเสริมฤทธิ์

แต่ละตัวที่นำมาใช้รวมกันกับวัคซีนภูมิด้วยสารเสริมฤทธิ์เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ 4 กลุ่มติดเชื้อ และได้รับการกระตุ้นภูมิด้วยโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LAP ร่วมกับสารเสริมฤทธิ์ Freund's

การศึกษา LAP ต่อการเป็นแอนติเจนที่มีคุณสมบัติในการป้องกันพยาธิใบไม้ยังคงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ในปี 2013 Changklungmoa et al. (2013) ได้ศึกษาการป้องกันพยาธิใบไม้ ตับ *F. gigantica* ในหนู (สายพันธุ์ ICR) โดยใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ LAP ร่วมกับสารเสริมฤทธิ์ Freund's ซึ่งมีการแบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 กลุ่มไม่ติดเชื้อและไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิ กลุ่มที่ 2 กลุ่มติดเชื้อและไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิ กลุ่มที่ 3 กลุ่มติดเชื้อและได้รับการกระตุ้นภูมิด้วย สารเสริมฤทธิ์เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ 4 กลุ่มติดเชื้อและได้รับการกระตุ้นภูมิด้วยโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LAP ร่วมกับสารเสริมฤทธิ์ Freund's ผลการทดลอง พบว่า กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่ได้รับโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LAP ร่วมกับสารเสริมฤทธิ์ Freund's ให้ผลเปอร์เซ็นต์การป้องกันอยู่ที่ 60.8% มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 กลุ่มติดเชื้อและไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3 กลุ่มติดเชื้อและได้รับการกระตุ้นภูมิให้แค่สารเสริมฤทธิ์ Freund's ให้ผลเปอร์เซ็นต์การป้องกันอยู่ที่ 64.3% มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ได้รับ การกระตุ้นภูมิด้วยโปรตีนรีคอมบิแนนท์ LAP ร่วมกับสารเสริมฤทธิ์ Freund's สามารถลดการติด เชื้อของพยาธิใบไม้ *F. gigantica* ได้ โดยได้สรุปเปอร์เซ็นต์การป้องกันของโปรตีน LAP ในการเป็น วัคซีนโรคพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* spp.

Vaccine	Adj	Host	Parasite	% Protection	References
CL1-CL2LAP	Freund's	Sheep	<i>F. hepatica</i>	79*	Piacenza et al., (1999)
FhLAP	Freund's	Sheep	<i>F. hepatica</i>	89.6*	(Piacenza et al., 1999)
rFhLAP	Freund's	Rabbits	<i>F. hepatica</i>	78*	(Acosta et al., 2008)
rFhLAP	FCA/FIA	Sheep	<i>F. hepatica</i>	83.8*	(Maggioli et al., 2011)
rFhLAP	Adyuvac 50	Sheep	<i>F. hepatica</i>	74.4*	(Maggioli et al., 2011)
rFhLAP	Alum	Sheep	<i>F. hepatica</i>	86.9*	(Maggioli et al., 2011)
rFhLAP	DEAE-D	Sheep	<i>F. hepatica</i>	49.5*	(Maggioli et al., 2011)
rFhLAP	RIBI	Sheep	<i>F. hepatica</i>	49.8*	(Maggioli et al., 2011)
rFgLAP	Freund's	Mice	<i>F. gigantica</i>	64.43*	(Changklungmoa et al., 2013)

4.2 งานวิจัยที่ประยุกต์ใช้โปรตีนลิวนินอะมิโนเปปติเดสในการตรวจวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยา

ในปี 2010 (Zhong et al., 2010) ได้ศึกษาการใช้แอนติเจนสำหรับการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด Schistosomiasis ศึกษาความไวในการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด โดยใช้ rSjLAP และ rSjFBPA โดยตัวอย่างเลือดที่ใช้มี 7 แบบ คือ 1. เลือดที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ schistosomiasis แบบเฉียบพลัน จำนวน 52 ตัวอย่าง 2. เลือดที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ schistosomiasis แบบเรื้อรัง จำนวน 98 ตัวอย่าง 3. เลือดที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ schistosomiasis แบบเฉียบพลัน ที่ได้รับการรักษา น้อยกว่า 6 เดือน จำนวน 33 ตัวอย่าง 4. เลือดที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ schistosomiasis แบบเฉียบพลัน ที่ได้รับการรักษา 6 – 12 เดือน จำนวน 33 ตัวอย่าง 5. เลือดที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ schistosomiasis แบบเรื้อรัง ที่ได้รับการรักษา น้อยกว่า 6 เดือน จำนวน 54 ตัวอย่าง 6. เลือดที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ schistosomiasis แบบเรื้อรัง ได้รับการรักษา 6 – 12 เดือน จำนวน 54 ตัวอย่าง 7. เลือดที่ได้จากผู้บริจาคที่มีสุขภาพดี จำนวน 90 ตัวอย่าง โดยวิธี ELISA โปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ SjLAP และ SjFBPA ถูกแสดงออกให้เป็นโปรตีนรีคอมบิแนนท์ได้สำเร็จ ผลลัพธ์ถูกนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรค Schistosomiasis ของมนุษย์โดยใช้ เทคนิค ELISA ผลการวิจัยพบว่ามีค่าความไว 98.1% และ 87.8% สำหรับ schistosomiasis เฉียบพลันและเรื้อรังที่ใช้ rSjLAP และ 100% และ 84.7% ที่ใช้ rSjFBPA ในขณะที่การทดสอบพบว่ามีค่าจำเพาะ 96.7% กับทั้ง 2 โปรตีนรีคอมบิแนนท์ โปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่เป็นแอนติบอดีเหล่านี้ มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัย *S. japonica*

4.3 งานวิจัยที่ทำการศึกษาลำดับของกรดอะมิโนที่บ่งบอกการเป็น M17 family และศึกษาตำแหน่งที่พบโปรตีนลิวนินอะมิโนเปปติเดสในเนื้อเยื่อ

ในปี 2004 (McCarthy et al., 2004) ได้ทำการศึกษาลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนลิวนินอะมิโนเปปติเดสในพยาธิ *Schistosoma mansoni* และ *Schistosoma japonicum* ได้นำข้อมูลลำดับของกรดอะมิโนมาทำการเปรียบเทียบกัน ได้ผลการเปรียบเทียบ ลำดับของกรดอะมิโนที่บ่งบอกการเป็น M17 family คือ อีพิโทป “NTDAEGRL” คือตำแหน่ง catalytic site ของทั้ง SmLAP และ SjLAP และศึกษาตำแหน่งที่พบโปรตีนลิวนินอะมิโนเปปติเดสในเนื้อเยื่อ (localization)

การศึกษา LAP ในปี 2004 (McCarthy et al., 2004) โดยได้ทำการศึกษา LAP ใน *S. mansoni* และ LAP ใน *S. japonicum* ทำการเก็บรวบรวมยีน โดยการค้นหาฐานข้อมูลด้วยเปปไทด์ ลำดับ NTDAEGRL บริเวณไซต์ของ aminopeptidases และทำการเปรียบเทียบความเหมือนของยีนที่ต้องการโดยใช้วิธี phylogenetic analyses ยีน ของ LAP ใน *S. mansoni* และ *S. japonicum* มีความคล้ายคลึงกันถึง 85% และความสัมพันธ์ระหว่าง *S. mansoni* และ *S.*

japonicum LAPs และสมาชิกอื่น ๆ ในตระกูล M17 ได้รับการตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับในโดเมน C-terminal โดยทั้ง 2 ยีนเป็น เอนไซม์ในตระกูล M 17 SmLAP มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 57.5 kDa โดยการค้นหาฐานข้อมูลพบการแสดงยีน LAP ของ *S. mansoni* และ *S. japonicum* ที่ ในตระกูล M17 (LAPs) โปรตีน recombinant SmLAP ที่ผลิตในเซลล์มีคุณสมบัติทางชีวเคมีร่วมกันรวมถึง pH ที่เหมาะสมสำหรับ กิจกรรมความจำเพาะของสารตั้งต้นและการพึ่งพาไอออนบวกโลหะสำหรับกิจกรรม การศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันพบว่า *S. mansoni* LAP ถูกสังเคราะห์ในเซลล์ทางเดินอาหารที่อยู่รอบ ๆ ลำไส้เล็ก ดังนั้น เปปไทด์ในลูเมนของลำไส้ schistosome จะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ทางเดินอาหารและถูกแยกออกโดย LAP เพื่อให้ได้เป็น กรดอะมิโนอิสระก่อนที่จะกระจายไปยังเนื้อเยื่อภายในของปรสิต

จากการศึกษาในปี 2004 ได้มีการศึกษาต่อของ (Deng et al., 2012) ในปี 2012 ได้ทำการศึกษาลำดับของกรดอะมิโนของพยาธิเช่นกัน แต่เป็นพยาธิ *Clonorchis sinensis* (CsLAP) ได้ผลการเปรียบเทียบเช่นเดียวกันกับในปี 2004 แต่ผลการเปรียบเทียบเพิ่มเติมเป็นตำแหน่งที่พบก่อน catalytic site คือตำแหน่ง B-cell epitopes (“---GKGI—DTGG---K”) และศึกษตำแหน่งที่พบโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปทิเดสในเนื้อเยื่อ (localization) พบ CsLAP ที่ tegument และ intestine ในระยะตัวเต็มวัย ส่วนในระยะเมตาเซอคารีเรีย พบ CsLAP ที่ tegument และ excretory vesicle

ได้มีการศึกษาต่อในปี 2018 (Maggioli et al., 2018b) ทำการศึกษาลำดับของกรดอะมิโนของพยาธิ *Taenia pisiformis* ได้นำข้อมูลลำดับของกรดอะมิโนมาทำการเปรียบเทียบกัน ได้ผลการเปรียบเทียบ ลำดับของกรดอะมิโน คือ อีพิโทป “NTDAEGRL” คือตำแหน่ง catalytic site และตำแหน่ง B-cell epitopes (“---GKGI—DTGG---K”) หรือ metal-binding site (GKGI หรือ IGKG) จากการศึกษาในปี 2018 นี้ ได้ตำแหน่งที่สามารถบ่งบอกการเป็น M17 family ของโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส หากต้องการทราบว่าลำดับของกรดอะมิโนที่คาดว่าจะจะเป็นลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส ให้นำวิเคราะห์ หากมีตำแหน่งข้างต้น แสดงว่า เป็นอะมิโนในกลุ่ม M17

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 เชื้อแบคทีเรีย

1.1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการโคลนดีเอ็นเอสายผสมในการโคลนยีน (gene cloning)

1.1.2 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการโคลนดีเอ็นเอสายผสมในการแสดงออกของยีน (gene expression)

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 Luria-Bertani (LB) Broth medium

1.2.2 Luria-Bertani (LB) Broth agar

1.3 เอนไซม์

1.3.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI

1.3.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI

1.3.3 เอนไซม์ Taq DNA Polymerase

1.3.4 เอนไซม์ T4 DNA ligase

1.4 เครื่องมือ

1.4.1 เครื่องแยกโปรตีน (Polyacrylamide gel electrophoresis)

1.4.2 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (The balance of quality)

1.4.3 เครื่องแยกดีเอ็นเอ (Agarose gel electrophoresis)

1.4.4 เครื่องเคลื่อนย้ายโมเลกุลของโปรตีน ชนิดกึ่งแห้ง (Semi-Dry Transfer)

1.4.5 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)

1.4.6 ตู้เขี่ยเชื้อ (Biosafety cabinet)

1.4.7 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

1.4.8 ไมโครปิเปต (Micropipette)

1.4.9 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)

1.4.10 เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)

1.4.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Hermale)

1.4.12 เครื่องให้ความร้อนแบบแห้ง (Hot air oven)

1.4.13 เครื่องเนื้อเยื่อ (Microtome)

- 1.4.14 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (Microplate Reader)
- 1.4.15 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubate, N-Biotek)
- 1.4.16 เครื่องเขย่า (Shaker, Welllab)
- 1.4.17 เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 1.4.18 เครื่องวัด spectrophotometrically
- 1.4.19 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)

2. วิธีการทดลอง

2.1 cDNA ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

cDNA ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัย “การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมต่อพยาธิใบไม้ในเลือด *Schistosoma mekongi* ด้วยวิธี Sandwich ELISA” ซึ่งโครงการดังกล่าวผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะวิทยาศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เอกสารใบรับรองเลขที่ FTM-ACUC023/2017

2.2 การเพิ่มปริมาณยีน LAP ด้วยวิธี PCR

นำ cDNA ที่ได้จากข้อ 1 มาเพิ่มปริมาณยีน LAP ด้วยวิธี PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน LAP ซึ่งใช้ฐานข้อมูลสารสนเทศจาก NCBI โดยเลือก *Schistosoma japonicum* leucine aminopeptidase mRNA, complete cds (GenBank: JQ945190.1) เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ ดังนี้ Forward primer: 5'-ATGAGTCTCGTAACTCCTGCCTT-3' และ Reverse primer: 5'-GCTCGAATAACATGCCAGTCA-3' ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 10X PCR buffer, 50 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP, เอมไซม์ Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร), 10 มิลลิโมลาร์ Forward primer และ 10 มิลลิโมลาร์ Reverse primer และใส่ cDNA หลังจากนั้นใส่หลอด PCR ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยเริ่มจาก Denature ขั้นตอนของการทำให้สายดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงเข้าสู่รอบของการเพิ่มสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งหมด 35 รอบ โดยเริ่มที่การ Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ตามด้วยขั้นตอน Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อทำการสังเคราะห์ครบ 35 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อไปที่ 72 องศาเซลเซียสอีก เป็นเวลา 10 นาที นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย Ethidium bromide เปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้กับ 100 bp DNA ladder ตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA โดย UV transilluminator

2.3 การโคลนยีน LAP

2.3.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน LAP กับพลาสมิด pGEM®-T easy

คัดเลือกแถบ DNA และตัดแถบ DNA ของยีน LAP ที่ได้จากการทำ PCR ออกจาก agarose gel แยกชิ้น DNA จากเจล โดยใช้ PCR clean-up Gel extraction (NucleoSpin, Germany) โดยทำตามวิธีการของผู้ผลิต จากนั้นทำการล้างน้ำหนักรีดและน้ำหนักรีดที่ใส่เจลและทำการคำนวณหาค่าน้ำหนักของเจล ทำการจดบันทึกผลน้ำหนักเจล ทำการเติมบัฟเฟอร์ NT1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที เพื่อให้เจลละลาย ดูดสารละลายใส่คอลัมน์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทำการปั่นสารละลายซ้ำอีกครั้งแล้วจึงเทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายทิ้ง โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำคอลัมน์ไปปั่นอีกครั้งเพื่อให้คอลัมน์แห้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เมื่อเสร็จจึงทำการย้ายคอลัมน์ส่วนบนลงในหลอดใหม่แล้วเติมน้ำกลั่น ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัด DNA ออกจากเจลมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM® -T easy vector ซึ่งเป็น Cloning vector (Promega, USA) โดยทำตามขั้นตอนของผู้ผลิต ใช้ insert DNA (ยีนของโปรตีน LAP) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, pGEM® -T easy vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 2X ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยห้ามทำการเขย่าเด็ดขาดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

2.3.2 การนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยกระบวนการ Transformation

นำพลาสมิด DNA สายผสมเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* (*E. coli*) โดยวิธี heat shock transformation โดยนำ DNA สายผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microtube ที่มี competent cells ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจากนั้นทำ Heat shock นำไปแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงนำกลับมาแช่ น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เติมหาอาหารเหลว LB และนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นแบ่งเชื้อแบคทีเรียในหลอดปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติม 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร กับ Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 100

มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเพื่อเป็นทำ Blue/white Screening จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.3.3 การคัดเลือกและตรวจสอบโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

คัดเลือกโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Amplicilin, X-gal และ IPTG ซึ่งใช้เป็น selective medium ใช้ไม้จิ้มฟันที่อบฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Amplicilin ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.3.4 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุด GeneJET Plasmid Miniprep Kit

สกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ด้วยชุด GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป โดยนำเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยง ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการเทสารละลายส่วนบนทิ้ง และละลายตะกอนแบคทีเรียด้วย Resuspension solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจนตะกอนละลายหมด จากนั้นดูดใส่หลอด microtube แล้วเติม Lysis buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอกไปมาเบาๆ ประมาณ 4-6 ครั้ง เติม Neutralization solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอกไปมาเบาๆ ประมาณ 4-6 ครั้ง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์ GeneJET spin นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำ การล้างโปรตีนที่เหลืออยู่ด้วย Wash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีเทสารละลายทิ้ง โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำคอลัมน์ไปปั่นอีกครั้งเพื่อเอา Wash solution ออกให้หมด ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เมื่อเสร็จจึงย้ายคอลัมน์ส่วนบนลงในหลอดใหม่แล้วเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.3.5 การตรวจสอบพลาสมิดพาหะสายผสมด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำพลาสมิดพาหะสายผสม pGEM® -T easy cloning vector จากข้อ 3.4 มาทำการตรวจสอบขนาดของยีน LAP ด้วยเทคนิค PCR โดยในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 10X iTaq plus buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ Forward primer และ 10 มิลลิโมลาร์ Reverse primer ที่ทำการออกแบบไว้ ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, พลาสมิดพาหะสายผสม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ i-Taq polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำกลั่นที่ทำการฆ่า เชื้อแล้ว จากนั้นใส่หลอด PCR ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ เริ่มจากขั้นตอน Denature แยกสาย DNA เกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มสาย DNA เป้าหมาย 35 รอบ โดยเริ่มที่ขั้นตอน Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที และเมื่อทำการสังเคราะห์จนครบ 35 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำพลาสมิดพาหะสายผสม ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.2% (w/v) agarose gel และย้อมด้วย Ethidium bromide ทำการเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดพาหะสายผสมที่ได้โดยใช้ 100 bp DNA ladder และตรวจสอบ การเรืองแสงของโดยใช้ UV transilluminator นำพลาสมิดที่สกัดได้และตรวจสอบแล้วส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

2.4 ศึกษาลักษณะสมบัติของยีน LAP โดยการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์

การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน LAP จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยนำข้อมูลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารยีน (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Clustal omega วิเคราะห์โครงสร้าง ขนาด และลักษณะทางกายภาพของยีน LAP ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ExPASy Tool (<http://www.expasy.ch/tools>) และโปรแกรม I-TASSER

2.5 วิธีการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ LAP บนเนื้อเยื่อของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค In Situ Hybridization

สำหรับการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอ (mRNA) ของ LAP ใช้ตัวติดตาม (Probe) ที่สังเคราะห์จาก

Forward primer: 5'-ATGAGTCTCGTAACTCCTGCCTT-3'

Reverse primer: 5'-GCTCGAATAACATGCCAGTCA-3'

Probe ที่ได้ถูกติดฉลากด้วย Digoxigenin (DIG) สำหรับขั้นตอนการเตรียม Probe มี ดังต่อไปนี้ทำ PCR ที่ประกอบด้วย 10X i Taq™ plus buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, PCR DIG Labeling Mix (Roche, Germany) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ Forward primer และ 10 มิลลิโมลาร์ Reverse primer ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ i-Taq polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร แล้วปรับ ปริมาตรสุทธิ ให้เท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่น ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่หลอด PCR ลงใน เครื่องควบคุม อุณหภูมิ และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ เริ่มจากขั้นตอน Denature แยกสาย DNA กลีดยวคู่ ให้เป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่ม สาย DNA เป้าหมาย 35 รอบ โดยเริ่มที่ขั้นตอน Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Annealing ที่ 55 องศา เซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที และเมื่อทำการสังเคราะห์ จนครบ 35 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย Ethidium bromide ทำการเปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้โดยใช้ 100 bp DNA ladder และตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA โดยใช้ UV transilluminator จากนั้นทำการสกัด PCR product เพื่อให้บริสุทธิ์ โดยใช้ PCR clean-up Gel extraction (NucleoSpin, Germany) แล้วทำ ตามขั้นตอนของผู้ผลิต นำ DNA Probe LAP ที่ทำการสกัดให้ บริสุทธิ์แล้ว ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัด Nanodrop บันทึกค่าดูดกลืนแสงไว้ สไลด์พยาธิ *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์, 5 สัปดาห์และระยะตัวเต็มวัย นำมาผ่าน สารต่างๆ ดังนี้ Toluene 5 นาทีจำนวน 2 ครั้ง, 100% Ethanol 3 นาทีจำนวน 2 ครั้ง, 95% Ethanol 3 นาทีจำนวน 2 ครั้ง, Distilled water 2 นาทีและ 1X (Tris-NaCl-EDTA; TNE) 5 นาที ชับสารแล้วใช้ปากกาวงรอบ บริเวณเนื้อเยื่อ เตรียม Proteinase K 12 ไมโครลิตร ใน 1X TNE 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว หยดให้ทั่วเนื้อเยื่อ เข้า incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีจากนั้นชับสารออก แล้วหยด 2X (Sodium Chloride/ Sodium Citrate; SSC) ให้ทั่ว บริเวณเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ชับสารออกหยด 0.5 M EDTA ให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จึงหยด 2X SSC ทิ้งไว้ 5 นาที ต่อมาเตรียม Formaldehyde 37% 20 ไมโครลิตร ในน้ำ กลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1.98 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยดให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 5 นาที แช่ในน้ำกลั่น นาน 5 นาที แสงกรดอะซิติก 20% เย็น 20 วินาที แช่ในน้ำกลั่น นาน 5 นาที จากนั้น เตรียม Formamide 1

มิลลิลิตร ใน 20X SSC 400 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 24 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยดให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ เอาเข้า incubate 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเตรียม Hybridization buffer โดยใช้สารต่างๆ ดังนี้ 50% Deionized Formamide 500 ไมโครลิตร, 50% Dextran Sulfate (w/v) 100 ไมโครลิตร, 50X Denhardt's Solution (Sigma) 20 ไมโครลิตร, 20X SSC 200 ไมโครลิตร, 10 mg/ml Salmon Sperm DNA (Invitrogen) 25 ไมโครลิตร และใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 มิลลิลิตร ใส่ DNA Probe LAP โดยคำนวณให้มีความเข้มข้นของ DNA Probe เท่ากับ 1,000 นาโนกรัมต่อ 1 สไลด์เนื้อเยื่อ ผสมให้เข้ากันแล้วนำ Hybridization buffer ที่เตรียมเสร็จไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แช่น้ำแข็งทันที 1 นาที จึงหยอดให้ทั่วบริเวณ เนื้อเยื่อ นำเข้า incubate 42 องศาเซลเซียส โดยแยกกล่องเพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างสไลด์ที่ไม่มี DNA Probe กับมี DNA Probe และแยกสไลด์ระหว่างที่มี DNA Probe แต่ต่างชนิดกัน ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นหยด 2X SSC ให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วแช่ใน 2X SSC ที่ 37 องศา เซลเซียส นาน 30 นาที, 1X SSC ที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที, 0.5X SSC ที่ 42 องศา เซลเซียส นาน 30 นาที และ 1X Buffer I นาน 5 นาที หยด Buffer II (Blocking solution) ทิ้งไว้ 30 นาที

เตรียม Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments Sigma 1 ไมโครลิตร ใน Buffer II 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยดให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ นำเข้า incubate 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แช่ใน Buffer I นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และหยด Buffer III ให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเตรียม NBT/BCIP Stock solution 20 ไมโครลิตร ใน Buffer III 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้า กันแล้วหยดให้ทั่วบริเวณ โดยจะเตรียมและหยดในห้องมืด เอาเข้า incubate 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง เช็คสีของเนื้อเยื่อว่ามีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ หากยังไม่เปลี่ยนแปลงให้เจือจาง NBT/BCIP Stock solution 10 เท่า หรือ 2 ไมโครลิตร ใน Buffer III 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว หยดให้ทั่วบริเวณ เอาเข้า incubate 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อเอาออกจาก incubate ให้ สังเกตสีของเนื้อเยื่อแล้วจึงหยด 1X TE Buffer ให้ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อเพื่อหยุดปฏิกิริยา โดยทิ้งไว้ 15 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที, 0.5% Bismarck brown Y 5 นาที และแช่น้ำกลั่น 5 นาทีเพื่อล้าง ส่วนเกินของสี 0.5% Bismarck brown Y จากนั้นตากสไลด์ให้แห้งจึงหยด Permount แล้วใช้ cover slip ปิด รอให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.6 การทำนายตำแหน่งที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันบนโมเลกุล LAP

ในการวิจัยนี้การทำนายตำแหน่งที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโปรตีน LAP จะใช้วิธีของ Hopp and Woods, Welling & al, Parker, B-EpiPred Server และ Kolaskar and Tongaonkar โปรแกรมนี้จะคาดการณ์ส่วนเหล่านั้นจากลำดับโปรตีนที่มีแนวโน้มที่จะเป็นแอนติเจนโดยดึงเอาการตอบสนองของแอนติบอดี

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekLAP

นิวคลีโอไทด์ SmekLAP ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีขนาด 1166 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสเป็นลำดับอะมิโนของโปรตีน SmekLAP มีขนาดลำดับกรดอะมิโน 388 กรดอะมิโน ทำนายน้ำหนักโมเลกุล 41.68 กิโลดาลตัน โดยตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ที่บิดำ แสดงถึงรหัสเริ่มต้นการแปลรหัส (Translation) ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน (ATG) (ภาพที่1)

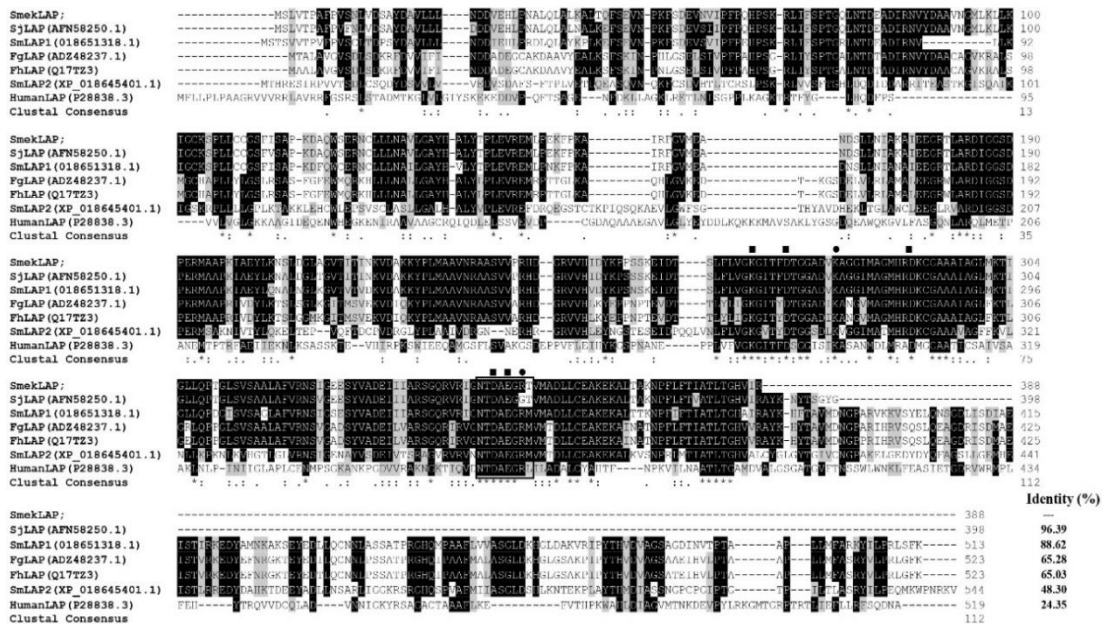
75	<u>ATG</u> AGTCTCGTAACTCCTGCCCTCCAGTCTCTAATCTGGTGGATTGAGCATATGATGCGGGTTTGGCTACTGAAC	25
150	M S L V T P A F P V S N L V D S A Y D A V L L L N GACGATGTAGAACATTTACCTAATGCTTTACAGTTGGCTTTGAAAGCTTTAACGCAATTTTCTGAGGTCAATCCT	50
225	D D V E H L P N A L Q L A L K A L T Q F S E V N P AAATTTTCAGATGAAGTCAATGTTATTCCTTTCCCTCAGCATCCATCAAAAAGATTAATATTTAGCCCAACTGGT	75
300	K F S D E V N V I P F P Q H P S K R L I F S P T G CAGCTAAAATACAGATGAAGTGCATTCGTAATGTGTATGATGCTGTGAAATGGCATGTTAAAATGTTGAAA	100
375	Q L N T D E A D I R N V Y D A A V N G M L K L L K ATAGTTGTAAATCACCGCTATTATGTTGGATCATTATATCAGCTCCGAAAGATGCTCAATGGTCCGAGCGT	125
450	I G C K S P L L C C G S F I S A P K D A Q W S E R AATTGTTTATTGAAATGCTGTATTAGGAGCATAACCATGCATTATATACACCTCTTGAAGTCCGTGAAATGCTT	150
525	N C L L L N A V L G A Y H A L Y T P L E V R E M L CCAGAAAAGTTTCTAAAAGCTATCCGATTTGGAGTATGGAAGCGAAGCAGCTCCTTACTAAAATTTGCCAAAGCT	175
600	P E K F P K A I R F G V M E A N D S L L N I A K A ATTGAAGAAGGGAGAACGTTAGCACGTGATATTGGTGGGTGAGATCCTGAACGTATGGCAGCCCCAAAAATTGCA	200
675	I E E G R T L A R D I G G S D P E R M A A P K I A GAATATTTAAAAAATTCCTTGGATGGTCTTGCAGGTGTTACAATCACTATTAATAAAGTTGATGCTAAAAAGTAT	225
750	E Y L K N S L D G L A G V T I T I N K V D A K K Y CCGTTAATGGCAGCTGTAATAGAGCTGCATCAGTTGTACCGCGTCATGACGGGAGAGTTGTCCATATTGACTAT	250
825	P L M A A V N R A A S V V P R H D G R V V H I D Y AAACCACCAAGCTCCAAAGAAATTGATACATCATTATTTCTGGTCGGTAAAGGTATTACTTTTGATACTGGTGGT	275
900	K P P S S K E I D T S L F L V G K G I T F D T G G GCTGATGTTAAAGCTGGTGGAAATTATGGCTGGAATGCATAGAGATAAATGTGGTGTGCTGCAGCGATAGTGGTTTA	300
975	A D V K A G G I M A G M H R D K C G A A A I A G L ATGAAAACGATTGGATTATTACAACCACTGGACTAAGTGTATCGGCAGCTTTAGCGTTTGTGCGAAATAGCATT	325
1050	M K T I G L L Q P T G L S V S A A L A F V R N S I GGTGAGGAATCATATGTGGCTGATGAAATTATAATTGCGCGTTCGGACAACGGGTACGCATAGGCAATACAGAC	350
1125	G E E S Y V A D E I I I A R S G Q R V R I G N T D GCTGAAGGTAGAACGGTTATGGCAGATTTATTATGTGAAGCAAAAGAAAAGGCACTTACAGCTAAAAATCCATTT	375
1166	A E G R T V M A D L L C E A K E K A L T A K N P F CTGTTCACTATAGCTACATTGACTGGGCATGTTATTCGAGC L F T I A T L T G H V I R	388

ภาพที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmekLAP ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

2. ผลการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ Identity

ทำการเก็บข้อมูลจากฐานข้อมูลมารวบรวมใน Data base แล้ว นำมาเข้าโปรแกรม Clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) เพื่อทำการวิเคราะห์หาค่า Identity และดูความสัมพันธ์ระหว่างกรดอะมิโนของยีน SmekLAP กับกรดอะมิโนของยีนอื่นๆ ที่ได้เก็บรวบรวมข้อมูลมาจากฐานข้อมูล

การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของ SmekLAP จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับ LAP ในกลุ่มพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆที่มีลักษณะของการเป็น M17 Family ได้แก่ Sm: *S. mansoni*; Sj: *S. japonicum*; Fh: *Fasciola hepatica*; Fg: *F. gigantica*; and Human: *Homo sapiens* โดยใช้โปรแกรม Clustal W และ BioEdit ในการวิเคราะห์ พบว่า SmekLAP จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีตำแหน่งที่สำคัญต่อการบ่งบอกคุณลักษณะของการเป็น M17 Family คือ ลำดับกรดอะมิโน “NTDAEGRN” ตามที่มีรายงาน และตำแหน่งที่สำคัญของยีน Leucine aminopeptidase มีตำแหน่งที่สำคัญต่อการบ่งบอกคุณลักษณะของการเป็น M17 Family 2 ตำแหน่งที่ชัดเจน คือ ลำดับกรดอะมิโน “NTDAEGRN” คือตำแหน่ง catalytic site และตำแหน่ง B-cell epitopes (“---GKGI—DTGG---K”) หรือ metal-binding site (GKGI หรือ IGKG) ตามที่มีรายงาน(Deng et al., 2012; McCarthy et al., 2004; Zhang et al., 2018) ซึ่งผลการเปรียบเทียบพบว่า ยีน SmekLAP ที่เราทำการศึกษาพบ 2 ตำแหน่งที่ชัดเจน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน SmekLAP จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับ LAP ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆและโฮสต์

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Clustal omega พบว่า SmekLAP มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ *S. japonicum* (GenBank:AFN58250.1) มากที่สุดอยู่ที่ 96.39% ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มของ *S. mansoni* คือ SmLAP1 (GenBank:XP_018651318.1) และ SmLAP2 (GenBank: XP018645401.1) มีความคล้ายอยู่ที่ 89.62% และ 48.30% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับปรสิตชนิด *F. gigantica* (GenBank: ADZ48237.1) และ *F. hepatica* (GenBank: O17TZ3) มีความคล้ายอยู่ที่ 65.28%, และ 65.03%ตามลำดับ สุดท้ายเป็นการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับ Human (GenBank: P28838.3) มีความคล้ายน้อยที่สุดอยู่ที่ 24.35%(ตารางที่1)

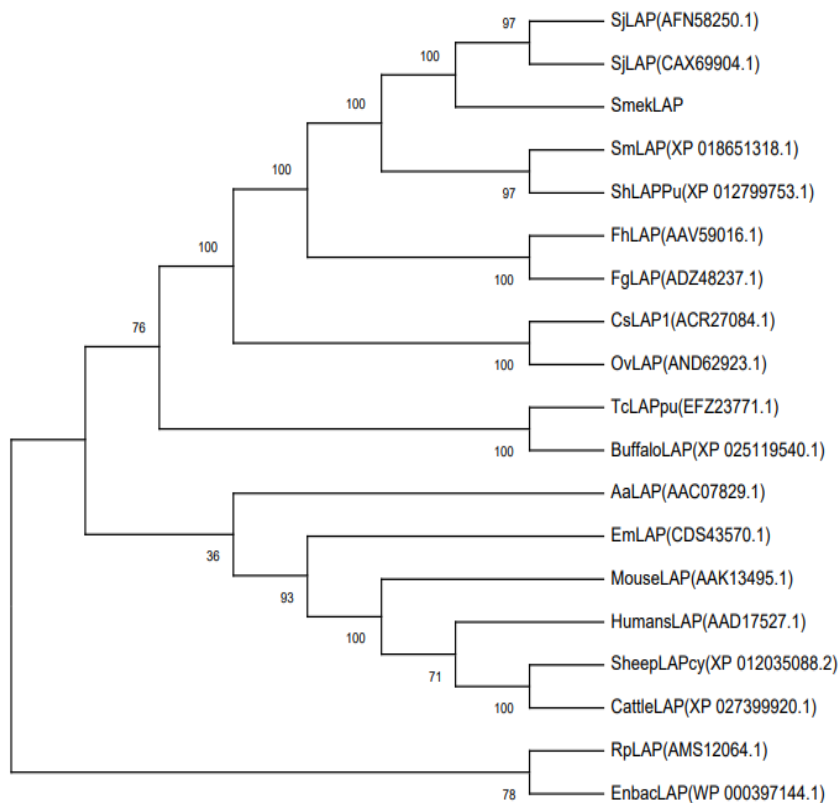
ตารางที่ 1 ผลเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *Schistosoma mekongi* กับปรสิตชนิดอื่นๆ

other parasitic species	<i>Schistosoma mekongi</i> % (percent)
<i>S. japonicum</i> (GenBank: AFN58250.1)	96.39
<i>SmLAP1</i> (GenBank: XP_018651318.1)	89.62
<i>SmLAP2</i> (GenBank: XP018645401.1)	48.30
<i>F. gigantica</i> (GenBank: ADZ48237.1)	65.28
<i>F. hepatica</i> (GenBank: O17TZ3)	65.03
<i>Human</i> (GenBank: P28838.3)	24.35



3. ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน SmekLAP จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับ LAP ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์ ใช้การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Clustal omega พบว่า SmekLAP มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ *S. japonicum* (GenBank:AFN58250.1) ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มของ *S. mansoni* คือ SmLAP1 (GenBank:XP_018651318.1) และ SmLAP2 (GenBank: XP018645401.1) มีความคล้าย SmLAP1 มากกว่า SmLAP2 เปรียบเทียบกับปรสิตชนิด *F. gigantica* (GenBank: ADZ48237.1) และ *F. hepatica* (GenBank: O17TZ3) มีความคล้ายกันไม่มากเท่ากับกลุ่ม *Schistosoma spp.* (ภาพที่3)

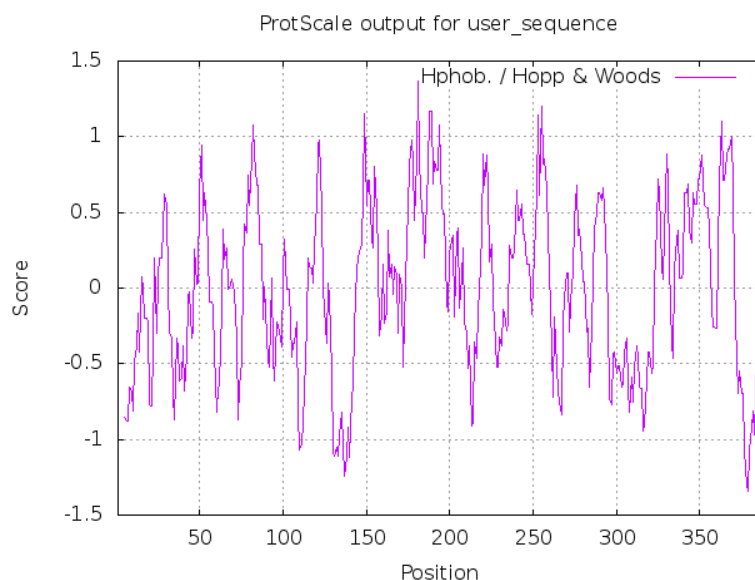


ภาพที่ 3 Phylogenetic ผลการทำเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มของโปรตีน LAP ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ และโฮสต์ โดยโปรแกรม MEGA-X

4. การทำนายสายโพลีเปปไทด์ Peptides

4.1 การทำนาย Antigenic determinants จากการนำโปรตีน SmekLAP เข้าวิเคราะห์ คำนวณด้วยโปรแกรมโปรแกรม ExPASy (<https://web.expasy.org/protscale/>) ได้ผลการทดลอง ช่วงที่สามารถนำไปพัฒนาต่อเป็น antigen ได้ โดยช่วงที่มีค่าเป็นบวกหรือมากกว่า 0 ค่าต่างๆนี้จะระบุ ถึงบริเวณที่มีความสามารถที่จะเป็น antigen ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด แบ่งการวิเคราะห์คำนวณเป็น 3 แบบดังนี้

แบบที่ 1 Hopp and Woods ทำนายประสิทธิภาพการเป็น antigen ของสายโปรตีน โดยดูจากค่า Hydrophilic เป็นหลักซึ่งช่วงของด้านที่เป็น polar คือช่วงที่มีค่าเป็นบวกหรือมากกว่า 0 (Hydrophilicity: score > 0) ช่วงที่มีค่ามากกว่า 0 มีดังนี้ 25-31, 47-55, 64-66, 68-70, 76-87, 100-101, 115-124, 127, 144-157, 160, 163-165, 167-168, 170-171, 174-197, 200-202, 204-205, 207-208, 219-225, 250-260, 270-271, 273-281, 286-294, 323-332, 335-356, 361-371 ซึ่งช่วง Peak ที่กว้างที่สุดคือตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 174-197 (Maximum Score 1.367) (ภาพที่ 4) (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 4 Hydrophobicity plot of Hopp & Woods for SmekLAP

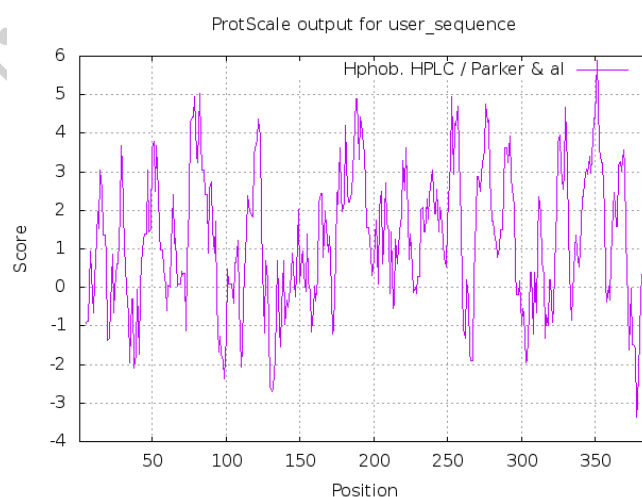
ตารางที่ 2 ตารางแสดงตำแหน่งและจำนวนช่วงที่ peak ของ Hydrophobicity plot of Hopp & Woods for SmekLAP

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8
Position	25-31	47-55	64-66	68-70	76-87	100-101	115-124	127

Peak	9	10	11	12	13	14	15	16
Position	144-157	160	163-165	167-168	170-171	174-197	200-202	204-205

Peak	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Position	207-208	219-225	250-260	270-271	273-281	286-294	323-332	335-356	361-371

แบบที่ 2 HPLC/Parker ทำนายประสิทธิภาพการเป็น antigen ของสายโปรตีน เช่นเดียวกับกับแบบที่ 1 Hopp and Woods คือช่วงที่มีค่าเป็นบวกหรือมากกว่า 0 (Hydrophilicity: score > 0) ช่วงที่มีค่ามากกว่า 0 มีดังนี้ 8-9, 11-19, 23, 26-33, 42-59, 61-72, 74-93, 101-104, 106-108, 113-125, 127-128, 135, 139, 144-146, 148-153, 155-156, 160, 162-171, 174-210, 212, 215-226, 228, 230-259, 263, 268-296, 299, 306-357, 359, 361-371, 382, 384 ซึ่งช่วง Peak ที่กว้างที่สุดคือตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 174-210 (Maximum Score 5.878) (ภาพที่ 5) (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 5 Hydrophobicity plot of HPLC/Parker for SmekLAP

ตารางที่ 3 ตารางแสดงตำแหน่งและจำนวนช่วงที่ peak ของ Hydrophobicity plot of HPLC/Parker for SmekLAP

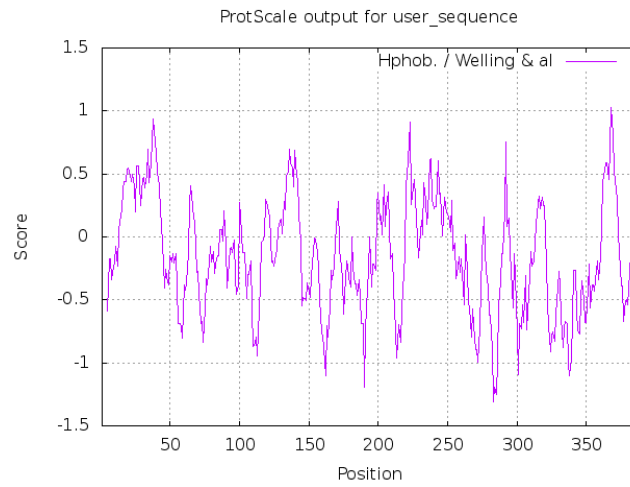
Peak	1	2	3	4	5	6	7	8
Position	8-9	11-19	23	26-33	42-59	61-72	74-93	101-104

Peak	9	10	11	12	13	14	15	16
Position	106-108	113-125	127-128	135	139	144-146	148-153	155-156

Peak	17	18	19	20	21	22	23	24
Position	160	162-171	174-210	212	215-226	228	230-259	263

Peak	25	26	27	28	29	30	31
Position	268-296	299	306-357	359	361-371	382	384

แบบที่ 3 Welling and al จะสามารถแสดงค่า antigenicity หรือค่าความสามารถในการทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อภูมิคุ้มกัน เช่นเดียวกับกับ Hopp and Woods จะแตกต่างกันโดยที่ไม่ใช่ทุกช่วงที่มีค่ามากกว่า 0 และไม่ใช่ทั้งหมดของ hydrophilic ไม่ใช่ช่วงที่ Peak ที่สุดหรือมีค่า Maximum Score ที่จะนำมาเป็น antigenic ได้ จึงมีการพัฒนาการคำนวณในการทำนาย ซึ่งจะคำนวณได้จากผลหารระหว่างเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่ทราบตำแหน่งของ antigen กับเปอร์เซ็นต์ของค่าเฉลี่ยโปรตีนตลอดทั้งสาย ผลการวิเคราะห์ Welling and al . ช่วงที่มีค่ามากกว่า 0 มีดังนี้ 13-44, 64-68, 86-87, 89, 100-101, 118-122, 128-143, 170-171, 181, 199-208, 220-227, 231-253, 263, 276, 291-294, 314-320, 361-373 ซึ่งช่วง Peak ที่กว้างที่สุดคือตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 13-44 (Maximum Score 1.024) (ภาพที่ 6) (ตารางที่ 4)



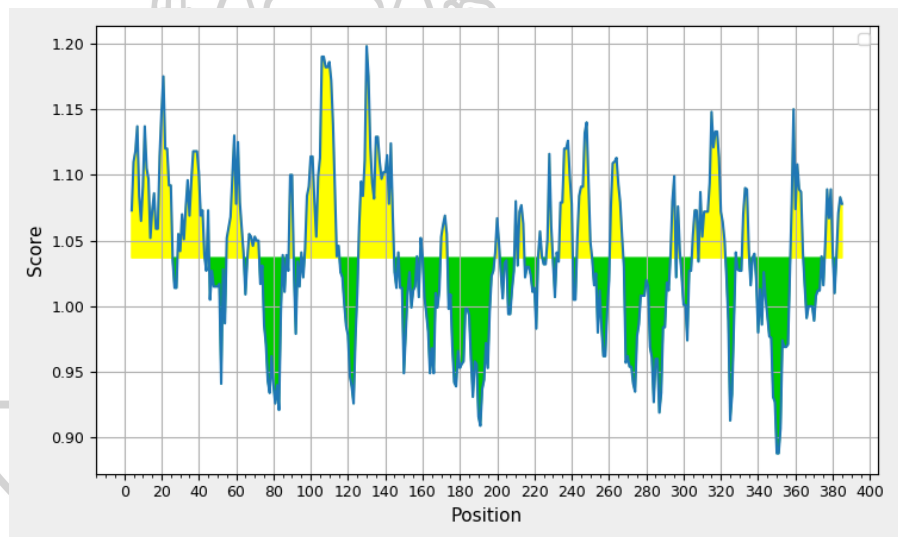
ภาพที่ 6 Hydrophobicity plot of Welling and al. for SmekLAP
 ตารางที่ 4 ตารางแสดงตำแหน่งและจำนวนช่วงที่ peak ของ Hydrophobicity plot of Welling and al. for SmekLAP

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8
Position	13-44	64-68	86-87	89	100-101	118-122	128-143	170-171

Peak	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Position	181	199-208	220-227	231-253	263	276	291-294	314-320	361-373

4.2 การวิเคราะห์ตำแหน่ง epitope

จากการคำนวณผ่านโปรแกรม IEDB Analysis Resource (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) การคำนวณแบบ Kolaskar and Tongaonkar antigenicity เป็นการวิเคราะห์ตำแหน่ง epitope ซึ่งถูกพัฒนามาจาก Hopp and Woods และมีความแม่นยำที่มากกว่าถึง 75% ใน SmekLAP จะมีช่วง Peak ที่กว้างที่สุดคือช่วงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 4-VTPAFPVSNLVDSAYDAVLLLN-25, 29-EHLPNALQLALKALT-43, 97-KLLKIGCKSPLLCCGSFIS-115, 126-NCLLLNAVLGAYHALYTPL-144, 243-GRVWHIDY-250 และ 309-PTGLSVSAALAFVR -322, (ภาพที่ 7) (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 7 Kolaskar and Tongaonkar antigenicity sites for SmekLAP

ตารางที่ 5 ตารางแสดงตำแหน่งและจำนวนช่วงที่ peak ของ Kolaskar and Tongaonkar antigenicity sites SmekLAP

No.	Start	End	Peptide	Length
1	4	25	VTPAFPVSNLVD SAYDAVLLLN	22
2	29	43	EHLPNALQLALKALT	15
3	55	64	EVNVIPFPQH	10
4	67	72	KRLIFS	6
5	97	115	KLLKIGCKSPLLCCGSFIS	19
6	126	144	NCLLLNAV LGAYHALYTPL	19
7	234	240	AASVWPR	7
8	243	250	GRVWHIDY	8
9	261	267	SLFLVGK	7
10	309	322	PTGLSVSAALAFVR	14
11	358	364	ADLLCEA	7

การคำนวณแบบ Bepipred Linear Epitope Prediction เป็นการวิเคราะห์ตำแหน่ง epitope เช่นกัน โดยที่ดูจากความสัมพันธ์ระหว่าง ความไวและความจำเพาะ ของการจับกับ B-cell ใน SmekLAP จะมีช่วง Peak ที่กว้างที่สุดคือช่วงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 75-GQLNTDEADIR-85, 115-SAPKDAQWS-123, 185-DIGGSDPERMAAP-197, 250-YKPPSSKEI-258,270-TFDTGGADVKA-280, 344-VRIGNTDAEGRT-355 (ภาพที่11) (ตารางที่7)

5. ผลการศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของเมสเซนเจอร์ ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* โดยวิธี *In Situ Hybridization*

การศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ LAP บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยเทคนิค ISH ใช้ Probe ต่อยีน LAP ผลการศึกษานั้นพบว่า ยีน SmekLAP มีการกระจายตัวบนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่ตำแหน่งต่างๆ โดยแบ่งระยะที่ศึกษา ดังนี้

5.1 พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์

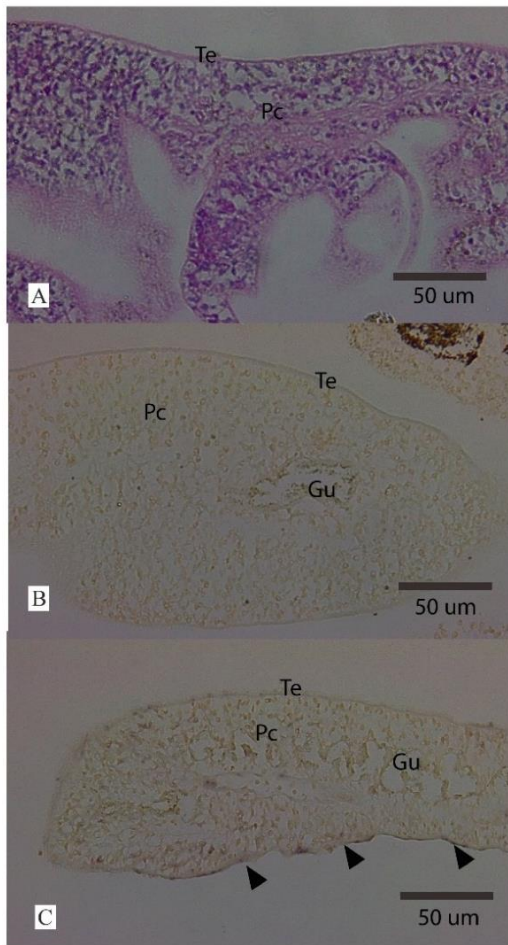
ผลการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของกรดนิวคลีอิก ของ SmekLAP บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่ระยะ 3 สัปดาห์ เนื้อเยื่อในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการใส่ Probe ของยีน LAP ไม่พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG (ภาพที่ 8B) ขณะที่เนื้อเยื่อที่ทำการใส่ Probe ของ SmekLAP พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG บนเนื้อเยื่อในส่วนติดสีม่วงอ่อนบริเวณที่ลูกศรชี้ ทั้งใน tegument และ gut lumen ไม่พบสัญญาณการติดสีของ DIG บนนิวเคลียสของเซลล์พาราเรคิม่า (ภาพที่ 8C)

5.2 พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์

ผลการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของกรดนิวคลีอิก SmekLAP บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่ระยะ 5 สัปดาห์ เนื้อเยื่อในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการใส่ Probe ของยีน GST ไม่พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG อ (ภาพที่ 9B) ในขณะที่เนื้อเยื่อกลุ่มที่ทำการใส่ Probe SmekLAP พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG บริเวณที่ลูกศรชี้ บนเนื้อเยื่อที่เป็นส่วนของ gut lumen ติดสีม่วง สันเกตได้ว่าบริเวณตำแหน่งนิวเคลียสของเซลล์พาราเรคิม่า ไม่พบสัญญาณการติดสีของ DIG (ภาพที่ 9C)

5.3 พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย

ผลการตรวจติดตามตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของกรดนิวคลีอิกของ SmekLAP บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่ระยะตัวเต็มวัย เนื้อเยื่อในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการใส่ Probe ของยีน LAP ไม่พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG (ภาพที่ 10B) ในขณะที่กลุ่มเนื้อเยื่อที่ทำการใส่ Probe SmekLAP พบสัญญาณการติดสีม่วงของ DIG บนเนื้อเยื่อ ทั้งใน tegument และ gut lumen บริเวณที่ลูกศรชี้ ไม่พบสัญญาณการติดสีของ DIG บนนิวเคลียสของเซลล์พาราเรคิม่า (ภาพที่ 10C)



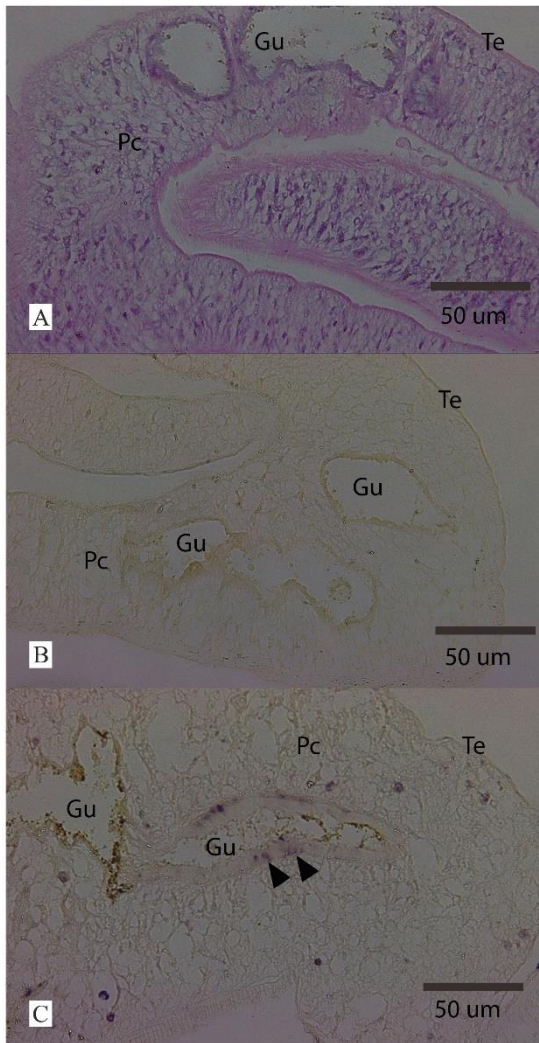
ภาพที่ 8 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. Mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekLAP ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายสูง (40X) โดยสัญลักษณ์ Te คือ Tegument, Pc คือ พาเรงคิมา, Gu คือ gut lumen (A) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์ ที่มีการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E

(B) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์ เป็นกลุ่มควบคุมเนื้อเยื่อติดสีน้ำตาลของ Bismarck brown Y ไม่พบการติดสีม่วงของ DIG

(C) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์แสดงภาพการติดสีม่วงบริเวณที่ลูกศรสีดำชี้ของ Probe ต่อ SmekLAP โดยพบการติดสีม่วงที่ gut lumen และ tegument ของพยาธิติดสีม่วงอ่อนขณะที่ไม่พบการติดสีม่วงที่พาเรงคิมา





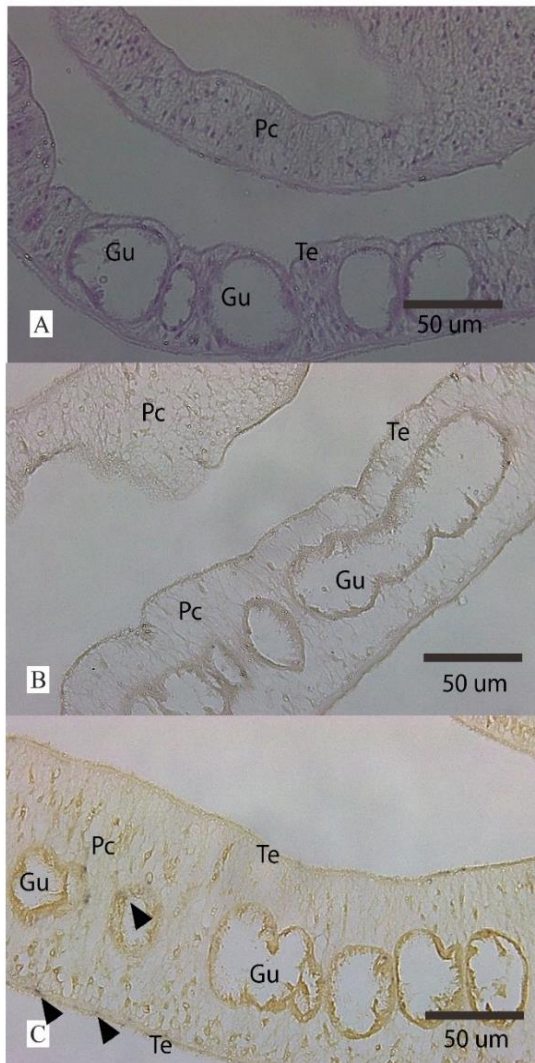
ภาพที่ 9 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin (H&E) กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekLAP ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายสูง (40X) โดยสัญลักษณ์ Te คือ Tegument, Pc คือ พาแรงคิมา, Gu คือ gut lumen

(A) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ ที่มีการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E

(B) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ เป็นกลุ่มควบคุมเนื้อเยื่อติดสีน้ำตาลของ Bismarck brown Y ไม่พบการติดสีม่วงของ DIG

(C) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ แสดงภาพการติดสีม่วงของ Probe ต่อ SmekLAP โดยพบการติดสีม่วงที่ gut lumen บริเวณที่ลูกศรสีดำชี้



ภาพที่ 10 แสดงภาพเปรียบเทียบการย้อมสีของเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 5 สัปดาห์ด้วยเทคนิค Hematoxylin and eosin (H&E) กับการระบุตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ SmekLAP ด้วยเทคนิค ISH บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะ 3 สัปดาห์

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายสูง (40X) โดยสัญลักษณ์ Te คือ Tegument, Pc คือ พาแรงคิมา, Gu คือ gut lumen

(A) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย ที่มีการย้อมสีด้วยเทคนิค H&E

(B) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย เป็นกลุ่มควบคุมเนื้อเยื่อติดสีน้ำตาลของ Bismarck brown Y ไม่พบการติดสีม่วงของ DIG

(C) ภาพเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย แสดงภาพการติดสีม่วงของ Probe ต่อ SmekLAP ที่ gut lumen และ tegument ของพยาธิติดสีม่วงอ่อนบริเวณที่ลูกครีส์ดำชี้ ไม่พบการติดสีม่วงที่พาแรงคิมา

6. วิจารณ์ผลการทดลอง

ยีน SmekLAP มีความใกล้เคียงกับ *S. japonicum* (GenBank:AFN58250.1) มากที่สุดอยู่ที่ 96.39% ทำการเปรียบเทียบเทียบกับกลุ่มของ *S. mansoni* คือ SmLAP1 (GenBank:XP_018651318.1) และ SmLAP2 (GenBank: XP018645401.1) มีความคล้ายอยู่ที่ 89.62% and 48.30% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับโปรตีนชนิด *F. gigantica* (GenBank: ADZ48237.1) และ *F. hepatica* (GenBank: O17TZ3) มีความคล้ายอยู่ที่ 65.28%, และ 65.03% ตามลำดับ สุดท้ายเป็นการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับ Human (GenBank: P28838.3) มีความคล้ายน้อยที่สุดอยู่ที่ 24.35% จากผลได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน SmekLAP อาจมีคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีต่อกัน ในกลุ่มของ *S. japonicum*, *S. mansoni* (SmLAP1) จากผลการเปรียบเทียบตำแหน่ง และรวมไปถึงการบ่งบอกการเป็น LAP1 หรือ LAP2 ของโปรตีน SmekLAP ได้อีกด้วย

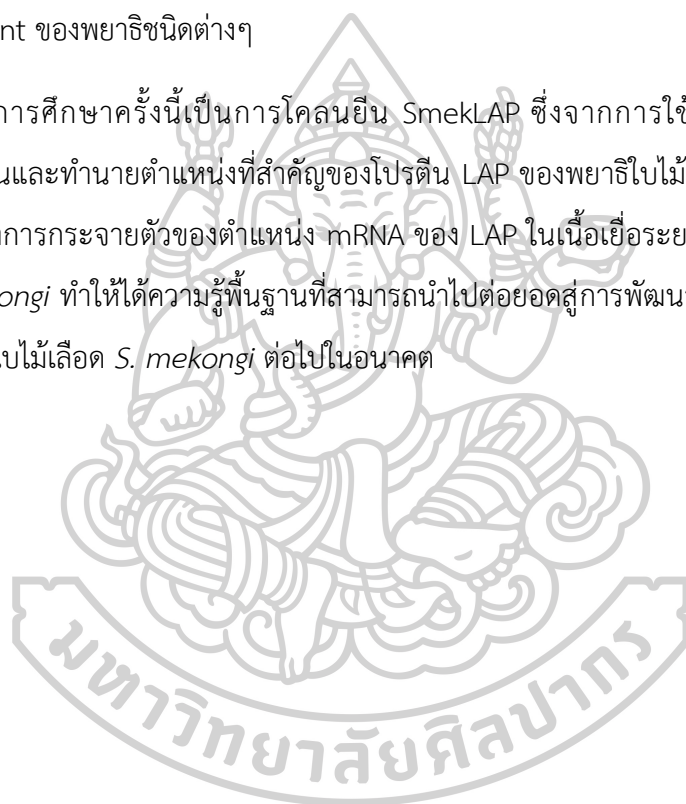
จากการเก็บข้อมูลจากฐานข้อมูลมารวบรวมใน Data base แล้ว นำมาเข้าโปรแกรม Clustal omega Clustal omega จากผลการเปรียบเทียบความคล้ายของยีน SmekLAP กับ LAP ในกลุ่มพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆที่มีลักษณะของการเป็น M17 Family พบว่า มีตำแหน่งที่สำคัญต่อการบ่งบอกคุณลักษณะของการเป็น M17 Family 2 ตำแหน่งที่ชัดเจน คือ ลำดับกรดอะมิโน “NTDAEGRN” คือ ตำแหน่ง catalytic site และตำแหน่ง B-cell epitopes (“---GKGI—DTGG---K”) หรือ metal-binding site (GKGI หรือ IGKG) ตามที่มีรายงาน(Deng et al., 2012; McCarthy et al., 2004; Zhang et al., 2018) ซึ่งผลการเปรียบเทียบพบว่า ยีน SmekLAP ที่เราทำการศึกษาพบทั้ง 2 ตำแหน่งเช่นเดียวกัน

จากการศึกษาการทำนายตำแหน่งของโมเลกุล SmekLAP พบว่าตำแหน่งที่ 243-GRVWHIDY-250 เป็นตำแหน่งที่ชอบน้ำและมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีศักยภาพในการเป็นตำแหน่งที่นำไปศึกษาต่อทั้งทางการใช้เพื่อเป็นชุดตรวจสอบการติดเชื้อหรือวัคซีน

จากผลการศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ LAP บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในระยะ 3 สัปดาห์, 5 สัปดาห์ และตัวเต็มวัย ด้วยเทคนิค ISH พบว่าเนื้อเยื่อพยาธิทั้ง 3 ระยะ มีการแสดงออกของ mRNA ของ SmekLAP ในตำแหน่งที่คล้ายกัน โดยพบว่าบริเวณ gut lumen มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด ส่วนของ tegument มีการแสดงออกของยีนด้วยเช่นกัน โดยพบการติดสีม่วง และไม่พบการแสดงออกของยีนในเซลล์ฟาเรงคิมา แสดงให้เห็นว่า LAP

มีการแสดงออกใน gut lumen ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ทั้ง 3 ระยะ ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานของ (McCarthy et al., 2004) ระบุว่าเซลล์ gut lumen และ tegument *S. japonicum* และ *S. mansoni* มีการปรากฏของโปรตีน LAP เช่นเดียวกับรายงานของ (Deng et al., 2012) ที่ พบว่า LAP จะถูกพบที่เซลล์ tegument ของพยาธิตัวแบน *Clonorchis sinensis* (พยาธิใบไม้ตับ ขนาดเล็ก) และจากรายงานของ (Maggioli et al., 2018b) พบว่า LAP ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ได้รายงานว่า LAP ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* มีการสร้างขึ้นจากบริเวณ gut lumen และ tegument จึงสอดคล้องกันกับงานวิจัยข้างต้นว่า พบ LAP อยู่ในบริเวณ gut lumen และ tegument ของพยาธิชนิดต่างๆ

จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการโคลนยีน SmekLAP ซึ่งจากการใช้โปรแกรมต่างๆศึกษา คุณลักษณะยีนและทำนายตำแหน่งที่สำคัญของโปรตีน LAP ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* และ จากการศึกษาระยะกระจายตัวของตำแหน่ง mRNA ของ LAP ในเนื้อเยื่อระยะต่าง ๆ ของพยาธิใบไม้ เลือด *S. mekongi* ทำให้ได้ความรู้พื้นฐานที่สามารถนำไปต่อยอดสู่การพัฒนาวัคซีนหรือชุดตรวจการ ติดเชื้อ พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ต่อไปในอนาคต



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. ลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekLAP

นิวคลีโอไทด์ SmekLAP ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีขนาด 1166 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SmekLAP มีขนาดลำดับกรดอะมิโน 388 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 41.68 กิโลดาลตัน และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekLAP เปรียบเทียบกับพยาธิใบไม้เลือดต่างชนิดกัน พบว่ามีความใกล้เคียงกับ LAP ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* และ *S. mansoni* มากที่สุด โดยมีความเหมือนในลำดับกรดอะมิโนที่ 90.49 เปอร์เซ็นต์ และ 89.62% เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน SmekLAP จัดอยู่ใน LAP ในกลุ่มของ M17 family โดยคล้ายกับ LAP ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum*, *S. mansoni* มากที่สุด SmekLAP อาจมีคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีต่อกัน ในกลุ่มของ *S. japonicum*, *S. mansoni* (SmLAP1) จากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน

2. การทำนายสายโพลีเปปไทด์ Peptides

จากการเก็บข้อมูลจากฐานข้อมูลมารวบรวมใน Data base แล้ว นำมาเข้าโปรแกรม Clustal omega Clustal omega จากผลการเปรียบเทียบความคล้ายของยีน SmekLAP กับ LAP ในกลุ่มพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆที่มีลักษณะของการเป็น M17 Family พบว่า มีตำแหน่งที่สำคัญต่อการบ่งบอกคุณลักษณะของการเป็น M17 Family 2 ตำแหน่งที่ชัดเจน คือ ลำดับกรดอะมิโน “NTDAEGRN” คือ ตำแหน่ง catalytic site และตำแหน่ง B-cell epitopes (“---GKGI—DTGG---K”) หรือ metal-binding site (GKGI หรือ IGKG)

จากการศึกษาการทำนายตำแหน่งของโมเลกุล SmekLAP พบว่าตำแหน่งที่ 243-GRVWHIDY-250 เป็นตำแหน่งที่มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีศักยภาพในการเป็นตำแหน่งที่นำไปศึกษาต่อทั้งทางการใช้เพื่อเป็นชุดตรวจสอบการติดเชื้อหรือวัคซีน

3. ผลการศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของเมสเซนเจอร์ ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* โดยวิธี *In Situ Hybridization*

จากผลการศึกษาตำแหน่งที่มีการกระจายตัวของ mRNA ของ LAP บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในระยะ 3 สัปดาห์, 5 สัปดาห์ และตัวเต็มวัย ด้วยเทคนิค ISH พบว่าเนื้อเยื่อพยาธิทั้ง 3 ระยะ โดยพบว่าบริเวณ ที่ทางเดินอาหาร (gut lumen) และ tegument มีการแสดงออกของ mRNA ของ SmekLAP โดยพบการติดสีม่วง และไม่พบการแสดงออกของยีนในเซลล์พาราคีมา



รายการอ้างอิง

- Acosta, D., Cancela, M., Piacenza, L., Roche, L., Carmona, C., & Tort, J. F. (2008). Fasciola hepatica leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 158(1), 52-64.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.011>
- Attwood, S. W. (2001). Schistosomiasis in the Mekong region: epidemiology and phylogeography. *Adv Parasitol*, 50, 87-152. doi:10.1016/s0065-308x(01)50030-5
- Attwood, S. W., Fatih, F. A., Campbell, I., & Upatham, E. S. (2008). The distribution of Mekong schistosomiasis, past and future: preliminary indications from an analysis of genetic variation in the intermediate host. *Parasitol Int*, 57(3), 256-270.
doi:10.1016/j.parint.2008.04.003
- Braun, L., Grimes, J. E. T., & Templeton, M. R. (2018). The effectiveness of water treatment processes against schistosome cercariae: A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(4), e0006364. doi:10.1371/journal.pntd.0006364
- Brindley, P. J., Kalinna, B. H., Dalton, J. P., Day, S. R., Wong, J. Y., Smythe, M. L., & McManus, D. P. (1997). Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Mol Biochem Parasitol*, 89(1), 1-9. doi:10.1016/s0166-6851(97)00098-4
- Changklungmoa, N., Kueakhai, P., Riengrojpitak, S., Chaithirayanon, K., Chaichanasak, P., Preyavichyapugdee, N., . . . Sobhon, P. (2013). Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against *Fasciola gigantica* in mice. *Parasitology research*, 112. doi:10.1007/s00436-013-3553-6
- Deng, C., Sun, J., Li, X., Wang, L., Hu, X., Wang, X., . . . Xu, J. (2012). Molecular identification and characterization of leucine aminopeptidase 2, an excretory-secretory product of *Clonorchis sinensis*. *Molecular Biology Reports*, 39(10), 9817-9826. doi:10.1007/s11033-012-1848-9
- Fukuhara, K., Phompida, S., Insisiengmay, S., Kirinoki, M., Chigusa, Y., Nakamura, S., . . . Ishikawa, H. (2011). Analysis of the effectiveness of control measures against *Schistosoma mekongi* using an intra- and inter-village model in Champasak Province, Lao PDR. *Parasitology International*, 60(4), 452-459. doi:<https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.07.017>
- Harinasuta, C. (1984). Epidemiology and control of schistosomiasis in Southeast Asia. *Southeast*

Asian J Trop Med Public Health, 15(4), 431-438.

Jiraungkoorskul, W., Sahaphong, S., Sobhon, P., Riengrojpitak, S., & Kangwanrangsan, N. (2005).

Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitology International*, 54(3), 177-183.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.04.001>

Kraft, M., Schleberger, C., Weckesser, J., & Schulz, G. E. (2006). Binding structure of the leucine aminopeptidase inhibitor microginin FR1. *FEBS Letters*, 580(30), 6943-6947.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.11.060>

Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., . . . Carmona, C. (2011).

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(48), 9057-9063. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.020>

Maggioli, G., Rinaldi, G., Giaudrone, I., Berasain, P., Tort, J., Brindley, P., & Carmona, C. (2018a).

Expression, purification and characterization of two leucine aminopeptidases of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 219.

doi:10.1016/j.molbiopara.2017.11.006

Maggioli, G., Rinaldi, G., Giaudrone, I., Berasain, P., Tort, J. F., Brindley, P. J., & Carmona, C.

(2018b). Expression, purification and characterization of two leucine aminopeptidases of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 219, 17-23.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.11.006>

McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S. M., Doyle, S., Mann, V. H., Brindley, P. J., . . . Dalton, J. P.

(2004). Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *International Journal for Parasitology*, 34(6), 703-714.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.008>

McManus, D. P., Gray, D. J., Li, Y., Feng, Z., Williams, G. M., Stewart, D., . . . Ross, A. G. (2010).

Schistosomiasis in the People's Republic of China: the era of the Three Gorges Dam.

Clinical microbiology reviews, 23(2), 442-466. doi:10.1128/CMR.00044-09

Moraes, J., Nascimento, C., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., & Nakano, E. (2012). *Schistosoma*

mansoni: In vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipilartine on schistosomula. *Experimental Parasitology*, 132(2), 222-227.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.07.004>

- Mouahid, G., Rognon, A., de Carvalho Augusto, R., Driguez, P., Geyer, K., Karinshak, S., . . . Moné, H. (2018). Transplantation of schistosome sporocysts between host snails: A video guide [version 1; peer review: 2 approved]. *Wellcome Open Research*, 3(3). doi:10.12688/wellcomeopenres.13488.1
- Nour, M., Lotfy, M., El-Kady, I., El-Shahat, M., & Doughty, B. (2005). Localization of leucine aminopeptidase in the *Schistosoma mansoni* eggs and in liver tissue from infected mice. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 35, 147-156.
- Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J. P., & Carmona, C. (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infection and immunity*, 67(4), 1954-1961. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10085042><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96552/>
- Rinaldi, G., Morales, M. E., Alrefaei, Y. N., Cancela, M., Castillo, E., Dalton, J. P., . . . Brindley, P. J. (2009). RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol Biochem Parasitol*, 167(2), 118-126. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.05.002
- Schistosoma japonicum Genome, S., & Functional Analysis, C. (2009). The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature*, 460(7253), 345-351. doi:10.1038/nature08140
- Sinou, M., Sayasone, S., Odermatt-Biays, S., Phompida, S., Duong, S., & Odermatt, P. (2010). *Schistosoma mekongi* in Cambodia and Lao People's Democratic Republic. *Advances in parasitology*, 72, 179-203. doi:10.1016/S0065-308X(10)72007-8
- Urbani, C., Sinoun, M., Socheat, D., Pholsena, K., Strandgaard, H., Odermatt, P., & Hatz, C. (2002). Epidemiology and control of mekongi schistosomiasis. *Acta Trop*, 82(2), 157-168. doi:10.1016/s0001-706x(02)00047-5
- Vale, Gouveia, M. J., Rinaldi, G., Brindley, P. J., Gärtner, F., & Correia da Costa, J. M. (2017). Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(5). doi:10.1128/aac.02582-16
- Viana, M., Faust, C. L., Haydon, D. T., Webster, J. P., & Lamberton, P. H. L. (2018). The effects of

- subcurative praziquantel treatment on life-history traits and trade-offs in drug-resistant *Schistosoma mansoni*. *Evol Appl*, 11(4), 488-500. doi:10.1111/eva.12558
- Wei, F., Liu, Q., Gao, S., Shang, L., Zhai, Y., Men, J., . . . Lin, J. (2008). Enhancement by IL-18 of the protective effect of a *Schistosoma japonicum* 26kDa GST plasmid DNA vaccine in mice. *Vaccine*, 26(33), 4145-4149. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.034>
- Wu, M., Yan, M., Xu, J., Liang, Y., Gu, X., Xie, Y., . . . Yang, G. (2018). Expression, Tissue Localization and Serodiagnostic Potential of *Echinococcus granulosus* Leucine Aminopeptidase. *Int J Mol Sci*, 19(4). doi:10.3390/ijms19041063
- Xu, Y. Z., Matsuda, H., & Dresden, M. H. (1988). Effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni* eggs: leucine aminopeptidase (LAP) activity and anti-LAP antibodies. *Am J Trop Med Hyg*, 39(1), 46-51. doi:10.4269/ajtmh.1988.39.46
- Zhang, S., Cai, X., Luo, X., Wang, S., Guo, A., Hou, J., & Wu, R. (2018). Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase gene from *Taenia pisiformis*. *Experimental Parasitology*, 186, 1-9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.01.012>
- Zhong, Z.-r., Zhou, H.-b., Li, X.-y., Luo, Q.-l., Song, X.-r., Wang, W., . . . Shen, J.-l. (2010). Serological proteome-oriented screening and application of antigens for the diagnosis of Schistosomiasis japonica. *Acta tropica*, 116, 1-8. doi:10.1016/j.actatropica.2010.04.014
- Zhou, X. N., Bergquist, R., Leonardo, L., Yang, G. J., Yang, K., Sudomo, M., & Olveda, R. (2010). Schistosomiasis japonica control and research needs. *Adv Parasitol*, 72, 145-178. doi:10.1016/s0065-308x(10)72006-6
- Zwang, J., & Olliaro, P. L. (2014). Clinical efficacy and tolerability of praziquantel for intestinal and urinary schistosomiasis-a meta-analysis of comparative and non-comparative clinical trials. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(11), e3286. doi:10.1371/journal.pntd.0003286



ภาคผนวก



อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. LB (Luria-Bertani) medium

ส่วนประกอบต่อลิตร

น้ำกลั่น	1	ลิตร
LB Broth (Hi-media)	25	กรัม

วิธีการเตรียม: ทำการเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตรลงใน LB Broth หลังจากนั้นทำการปั่นให้ละลายเข้ากัน และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา นาน 15 นาที

2. LB (Luria-Bertani) agar

ส่วนประกอบต่อลิตร

น้ำกลั่น	1	ลิตร
LB Broth (Hi-media)	25	กรัม
Agar	15	กรัม

วิธีการเตรียม: ทำการเติมน้ำกลั่น 1 ลิตรใน LB Broth และ Agar จากนั้นทำการปั่นให้ละลายและนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วจึงนำไปเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ

สำหรับ LB agar ที่มีการเติม ampicillin โดยผสมสารละลาย ampicillin ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน LB agar ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นหรือประมาณอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม ampicillin stock solution

ชั่ง ampicillin 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย 10X Phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4

ส่วนประกอบต่อลิตร

น้ำกลั่น	1	ลิตร
NaCl	80	กรัม
Na ₂ HPO ₄	14.4	กรัม
KCl	2	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.4	กรัม

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 7.4 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ในการเตรียมให้เป็น 1X PBS, pH 7.4 โดยผสม 10X PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. การเตรียมสารละลายสำหรับวิธี *In Situ* Hybridization

- การเตรียมสารละลาย 10X Tris-NaCl-EDTA (TNE)

ส่วนประกอบต่อลิตร

500 mM Tris-Cl	60.57	กรัม
100 mM NaCl	5.84	กรัม
10 mM EDTA	3.72	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 7.4 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ในการเตรียมให้เป็น 1X TNE, pH 7.4 โดยผสม 10X TNE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- การเตรียมสารละลาย Proteinase K 10 mg/ml

มีส่วนประกอบ ดังนี้

Proteinase K	100	มิลลิกรัม
--------------	-----	-----------

น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม Proteinase K 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นสะอาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร
เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

ในการเตรียม Proteinase K 20 µg/ml โดยผสม Proteinase K 10 ไมโครลิตร ใน 1X
TNE 5 มิลลิลิตร ซึ่งควรมีการเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

- การเตรียม 0.4% Formaldehyde solution

มีส่วนประกอบ ดังนี้

37% Formaldehyde solution 20 ไมโครลิตร

น้ำกลั่น 1.98 มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม 37% Formaldehyde solution ในน้ำกลั่นสะอาด เขย่าให้เข้ากันก่อน
นำไปใช้ ซึ่งควรมีการเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

- การเตรียม 50% Dextran Sulfate

มีส่วนประกอบ ดังนี้

Dextran Sulfate 50 กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม Dextran Sulfate ในน้ำกลั่นสะอาด ปั่นให้สารละลายด้วยเครื่อง hot
plate sterier จากนั้นแบ่งเก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

- การเตรียม Salmon Sperm DNA (10 mg/ml)

มีส่วนประกอบ ดังนี้

Salmon Sperm DNA 500 มิลลิกรัม

น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

การเตรียม: เติม Salmon Sperm DNA ลงในน้ำกลั่นสะอาดอย่างช้าๆ พร้อมปั่นให้ละลาย
ด้วยเครื่อง hot plate sterier จากนั้นแบ่งเก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศา
เซลเซียส

- การเตรียมสารละลาย 20X SSC (Sodium Chloride/ Sodium Citrate) buffer, pH 7.0

มีส่วนประกอบ ดังนี้

3 M NaCl 175.32 กรัม

0.3 M Na citrate 88.23 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 7.0 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ในการเตรียมให้เป็น 2X SSC, pH 7.0 โดยผสม 20X SSC ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ในการเตรียมให้เป็น 1X SSC, pH 7.0 โดยผสม 20X SSC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ในการเตรียมให้เป็น 0.5X SSC, pH 7.0 โดยผสม 20X SSC ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 975 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- การเตรียมสารละลาย 10X Buffer I

มีส่วนประกอบ ดังนี้

1 M Tris-HCl 121.14 กรัม

1.5 M NaCl 87.66 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น เขย่าจนสารละลายหมด แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ในการเตรียมให้เป็น 1X Buffer I โดยผสม 10X Buffer I ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- การเตรียมสารละลาย Buffer II (0.5% Blocking solution)

มีส่วนประกอบ ดังนี้

Blocking agent (Roche) 0.5 กรัม

1X Buffer I 100 มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม Blocking agent ใน 1X Buffer I จากนั้นปั่นให้สารละลายด้วยเครื่อง hot plate sterier จนสารละลายใส เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

- การเตรียมสารละลาย Buffer III, pH 9.5

100 mM Tris-HCl 12.114 กรัม

100 mM NaCl 5.844 กรัม

50 mM MgCl₂·6H₂O 10.16 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 9.5 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

- การเตรียมสารละลาย 10X TE buffer, pH 8.1

100 mM Tris-HCl	12.11	กรัม
10 mM EDTA	3.72	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้เป็น pH 8.1 ด้วย HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. การเตรียม buffer สำหรับวิธี *In Situ* Hybridization

- การเตรียม Pre-hybridization buffer

มีส่วนประกอบ ดังนี้

50% Deionized formamide	5	มิลลิลิตร
20X SSC	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3	มิลลิลิตร

การเตรียม: ผสม Formamide และ 20X SSC ในน้ำกลั่นสะอาด เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปใช้ ซึ่งควรมีการเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

- การเตรียมสารละลาย Hybridization buffer

มีส่วนประกอบ ดังนี้

50% Deionized formamide	250	ไมโครลิตร
50% Dextran Sulfate (w/v)	50	ไมโครลิตร
50X Denhardt's Solution (Sigma)	10	ไมโครลิตร
20X SSC	100	ไมโครลิตร
10 mg/ml Salmon Sperm DNA (Invitrogen)	12.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	77.5	ไมโครลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้รวมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใช้น้ำกลั่นสะอาด ปรับปริมาตรสารให้ครบ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปแช่น้ำแข็งทันที 1 นาที จึงจะนำมาใช้งาน



ภาคผนวก ค

การเปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SmekLAP

การเปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SmekLAP

1. การเปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SmekLAP กับยีน LAP ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ

และโฮสต์

```

CsLAP1 (ACR27084.1) -----MN---AQDQGICAKTVPI SVCSQLNS
OvLAP (AND62923.1) -----MSVSRSVTG-----DSGVN---AQEQGICAITVPINVCNQLNS
FhLAP (AAV59016.1) -----MAALAVGVSDLSLSD
FgLAP (ADZ48237.1) -----MTALAVGVSDLSLSD
SmekLAP -----MSLVTPAFPVSNLVD
SjLAP (AFN58250.1) -----MSLVTPAFPVFNLVD
SjLAP (CAX69904.1) -----MSLVTPAFPVFNLVD
SmLAP (XP_018651318.1) -----MS---TSVVTVPVFPVSCSLTD
ShLAPpu (XP_012799753.1) -----MS---TNVVTVPVFPVSCSLTD
TcLAPpu (EFZ23771.1) MSTAYKRQRTKSAYEEHNVSASFVESC IHFKTNLTFH---TAAEGKQ---LA-NEALQNH
BuffaloLAP (XP_025119540.1) -----MANVGLQ---FQ-ASAGDADP
AaLAP (AAC07829.1) -----MKEMEV-----AFKDDIKKY-----KGKS
EmLAP (CDS43570.1) --MLSIMRGGGLGLLAPASLGRIYASKRHFSESESSEYQERKLAGLV----G-----GYAV
MouseLAP (AAK13495.1) MYLLPLPAAARVALRRLGVRGLWDR-----GLS---TADMTKGLV---LG-----IYAK
SheepLAPcy (XP_012035088.2) MFLLPLPAAARVAVRHLSVRRLWAP-----GSA---AADMTKGLV---LG-----IYSK
CattleLAP (XP_027399920.1) MFLLPLPAAARVAVRHLSVKRLWAP-----GPA---AADMTKGLV---LG-----IYSK
HumansLAP (AAD17527.1) MFLLPLPAAAGRVVVRRLAVVRSGRS-----SLS---TADMTKGLV---LG-----IYSK
RpLAP (AMS12064.1) -----MLNINVFVNEESST-NQ---GLI---VF-----IDEQ
EnbacLAP (WP_000397144.1) -----MEFSVKSGSP-EKQRSACIV---VG-----VFEP

```

```

CsLAP1 (ACR27084.1) SDHDCVLVADV-----SILPTEFELISQCLS-----AQNSI--
OvLAP (AND62923.1) SDHDCVLVTDV-----SILPAEFELISQCLS-----AQNSI--
FhLAP (AAV59016.1) KRFDVVI FINDA-----DEGCAKDAAVYEALK-----SFSKI--
FgLAP (ADZ48237.1) KRFDVVI FINDA-----DEGCAKDAAVYEALK-----SFSKI--
SmekLAP SAYDAVLLNDDV-----EHLPNALQLALKALT-----QFSEV--
SjLAP (AFN58250.1) SAYDAVLLNDDV-----EHLPNALQLALNALK-----EFSEV--
SjLAP (CAX69904.1) SAYDAVLLNDDV-----EHLPNALQLALNALK-----EFSEV--
SmLAP (XP_018651318.1) PSYDAVLLNDDI-----EHLPRDLQLAYKPLK-----EFSEV--
ShLAPpu (XP_012799753.1) PSYDAVLLNDDI-----ENLPRTLQLAYKSLK-----EFCEV--
TcLAPpu (EFZ23771.1) QEPNIVLLGNQKQLEKKA---LSTFFPYYSKA---VESAINV--AASGKNYLAEITP
BuffaloLAP (XP_025119540.1) QSR-PLLLGQLLHHRVPSHVRGKQPRVTEELWQAALSTLNPNTDSCPLYLN----
AaLAP (AAC07829.1) -----VAVFV-----YEGDLKP
EmLAP (CDS43570.1) QRHNQGLLSPAIA-----YVDEV--
MouseLAP (AAK13495.1) DKDDD---LPQFT-----SAGESF-
SheepLAPcy (XP_012035088.2) EKEED---APQFT-----SAGENF-
CattleLAP (XP_027399920.1) EKEED---EPQFT-----SAGENF-
HumansLAP (AAD17527.1) EKEED---VPQFT-----SAGENF-
RpLAP (AMS12064.1) LKLNNNLI-----AL-----
EnbacLAP (WP_000397144.1) RRLSPIAE-----QL-----

```

```

CsLAP1 (ACR27084.1) -----VSEFHSGIHVIYCESLPSK-----RIVLSFTGSL---
OvLAP (AND62923.1) -----VPEFHSGVHLIYCESLPSK-----RIVLSFTGSL---
FhLAP (AAV59016.1) -----NPNLGSELSIVPPFAHPSG-----RLIYSPTGAL---
FgLAP (ADZ48237.1) -----NPHLGSELSIVPPFAHPSG-----RLIYSPTGAL---
SmekLAP -----NPKFSDEVNVI PPFQHP SK-----RLIFSPTGQL---
SjLAP (AFN58250.1) -----NPKFSDEVSI I PPFQHP SK-----RLIFSPTGQL---
SjLAP (CAX69904.1) -----NPKFSDEVSI I PPFQHP SK-----RLIFSPTGQL---
SmLAP (XP_018651318.1) -----NPKFSDEVSVI PPFQHP SK-----RLIFSPTGRL---
ShLAPpu (XP_012799753.1) -----NPKFSDEISVI PPFQHP SK-----RLIFSPTGRL---
TcLAPpu (EFZ23771.1) HARVLVGMV---SSKASRHNCPLR-----PDMISTL-VKDAV
BuffaloLAP (XP_025119540.1) ---YATVAAL---PSRVSRHNSPSA-----AHFITRL-VRTCL
AaLAP (AAC07829.1) LARLSKGTSNKAKRVAELENFKGKEGE--ILKVPTLGT SV-----DFVYIVGLGKKEKV
EmLAP (CDS43570.1) ---FLNGG---IKDRISKCL-SKIGAMDLCNATFLQ--SQYCIVCNPLI I R SAQNKECD
MouseLAP (AAK13495.1) -NKLVS GK---LREMLNISGPPKAGK---TRTFYGLHQDFP---SVVVVGLGKRSAG
SheepLAPcy (XP_012035088.2) -NKLVS GK---LREILNISGPPKAGK---TRTFYGLHEDFP---SVVVVGLGKKTAG
CattleLAP (XP_027399920.1) -NKLVS GK---LREILNISGPPKAGK---TRTFYGLHEDFP---SVVVVGLGKKTAG
HumansLAP (AAD17527.1) -DKLLAGK---LRETLNISGPPKAGK---TRTFYGLHQDFP---SVVLVGLGKKAAG
RpLAP (AMS12064.1) -DQQHYELI---SKTIQNKLFSGNYGQITVVP-----SVIKSCAVKYLIIIVGLGNVEKL
EnbacLAP (WP_000397144.1) -DKISDGYI---SA-LLRGELEGKPGQITLLH-----HV-PNVLSERILLIGCGKEREL

```

CsLAP1 (ACR27084.1) -----DRDYDDTRRVSEAARD-----GISHAFKIGSIRPLLALAPLKALEKIRIL
OvLAP (AND62923.1) -----DRDYDDIRRVSEAARD-----GISHALKIGSIRPLLALTPLKALEKIRVL
FhLAP (AAV59016.1) -----NTDTADIRNVYDAACA-----GVKRALSMGCHAPLLYLGLSLRSA---SFG
FgLAP (ADZ48237.1) -----NTDTADIRNVYDAACA-----GVKRALSMGCHAPLLYLGLSLRSA---SFG
SmekLAP -----NTDEADIRNVYDAAVN-----GMLKLLKIGCKSPLLCCGSFISA---PKD
SjLAP (AFN58250.1) -----NTDEADIRNVYDAAVN-----GMLKLLKIGCKSPLLCCGSFVSA---PKD
SjLAP (CAX69904.1) -----NTDEADIRNV-----LLKIGCKSPLLCCGSFISA---PKD
SmLAP (XP_018651318.1) -----NTDEADIRNVYDAAVN-----GMLKLLNIGCKSPLLCCGSFISA---PKD
ShLAPpu (XP_012799753.1) -----NTDEADIRNVYDAAVN-----GMLKLLNIGCKSPLLCCGSFISA---PKD
TcLAPpu (EFZ23771.1) HQARTGDSEKSVLR-----SVD-----IYCC-----SQ
BuffaloLAP (XP_025119540.1) PPGT-----HR-----CI-----LMVCE-----RS
AaLAP (AAC07829.1) -----GEDTYRRASA-----NLVKRMRDKVESTVVVIP-----RR
EmLAP (CDS43570.1) FKDDPGQGPSSWRRYHDKLQMC-----IGRGVQTLQRQGVV-EIFVDP-----
MouseLAP (AAK13495.1) -----VDDQENWHEG-KENIRAA-----VAAGCRQVQDLELP-SVEVDP-----
SheepLAPcy (XP_012035088.2) -----IDEQENWHEG-KENIRAA-----VAAGCRQIQDLEIP-SVEVDP-----
CattleLAP (XP_027399920.1) -----IDEQENWHEG-KENIRAA-----VAAGCRQIQDLEIP-SVEVDP-----
HumansLAP (AAD17527.1) -----IDEQENWHEG-KENIRAA-----VAAGCRQIQDLELS-SVEVDP-----
RpLAP (AMS12064.1) -----TEAKIEELGGKILQ-----HATCAKIATIGL---KIIN-----RI
EnbacLAP (WP_000397144.1) -----DERQYKQVIQKTIINTLNDTGSMEAVCFL---TEL---HVKG-----RN

CsLAP1 (ACR27084.1) PSWAKPEA---LCLSTLLGAL--HALYVPLEVREFTLRPVKSDLHKSVPKSVTSLGWFP
OvLAP (AND62923.1) PSWAKPEA---LCLSTLLGAL--HALYVPLEVREFTLRPVKSDLHKSVPKSVTSLGWFP
FhLAP (AAV59016.1) FEWMQRKH---LLLNALLGAY--HALYLPLEVREMRPTTGLKAQHLGVKE-----
FgLAP (ADZ48237.1) FEWMQRKH---LLLNALLGAY--HALYLPLEVREMRPTTGLKAQHLGVKE-----
SmekLAP AQWSEKRN---LLNNAVLGAY--HALYTPLEVREMLPEKFPKAIKRFVGM-----
SjLAP (AFN58250.1) AQWSEKRN---LLNNAVLGAY--HALYTPLEVREMLPEKFPKAIKRFVGM-----
SjLAP (CAX69904.1) AQWSEKRN---LLNNAVLGAY--HALYTPLEVREMLPEKFPKAIKRFVGM-----
SmLAP (XP_018651318.1) FQWSEKRN---LLNNAVLGAY--HALYTPLEVREMLPEKFPKAIKRFVGM-----
ShLAPpu (XP_012799753.1) SQWSEKRN---LLNNAVLGAY--HALYTPLEVREMLPEKFPKAIKRFVGM-----
TcLAPpu (EFZ23771.1) NVLVCVATA---IAR-A---ANRSFSA-KRGRAEEGYWERGLPVVVFAANT---TKPGAA
BuffaloLAP (XP_025119540.1) DAFASACA---LAR-A---FP-LFTH-RSGASR-RTEKKTVTVEFFLVGQD---NG---P
AaLAP (AAC07829.1) GD-VSKEITKAITEGAILGNRYRFDKYKSKKE---DEKFEIK-----EV
EmLAP (CDS43570.1) -----FTDAEMAAETAHLAAYSFDLKNPKS---RVNQPPI SCSFTAHPD---NDPDGF
MouseLAP (AAK13495.1) -----CGDAQAAAAGAVLGLYEYDDLKQK---VAVSAKL-----
SheepLAPcy (XP_012035088.2) -----CGDAQAAAAGAVLGLYEYDDLKQK---VVVSAKL-----
CattleLAP (XP_027399920.1) -----CGDAQAAAAGAVLGLYEYDDLKQK---VVVSAKL-----
HumansLAP (AAD17527.1) -----CGDAQAAAAGAVLGLYEYDDLKQK---MAVSAKL-----
RpLAP (AMS12064.1) NRFTSPTFTSLIAGFASLYRFHKYKTKL---EVEK-----FA-VE---SIEILT
EnbacLAP (WP_000397144.1) NYWKVRQA---VETAKETLYSFDQLKTNKS---EPRRPLRKMVFN-VP---TRRELT

CsLAP1 (ACR27084.1) GTYTVDHVHLVHIAWCLEEGRRVCRDIGGSDPERMCASRIVDYIKAELSD-----TG
OvLAP (AND62923.1) GTYTVDHVHLVHIAWCLEEGRRVCRDIGGSDPERMCASRIVDYIKAELSD-----TG
FhLAP (AAV59016.1) DT-KGSDELVLRLAMALEEGRWLARDIGGSDPERMAAPRIVDYKTLKSLGGM-----KG
FgLAP (ADZ48237.1) DT-KGSDELVLRLAMALEEGRWLARDIGGSDPERMAAPRIVDYKTLKSLGGL-----KG
SmekLAP A-----NDSLLNIAKAIIEEGRTLARDIGGSDPERMAAPKIAEYLNKALDGL-----AG
SjLAP (AFN58250.1) A-----NDSLLNIAKAIIEEGRTLARDIGGSDPERMAAPKIAEYLNKALDGL-----TG
SjLAP (CAX69904.1) A-----NDSLLNIAKAIIEEGRTLARDIGGSDPERMAAPKIAEYLNKALDGL-----TG
SmLAP (XP_018651318.1) A-----NDSLLNIAKAIIEEGRTLARDIGGSDPERMAAPKIAEYLNALNGL-----KG
ShLAPpu (XP_012799753.1) A-----NDSLLDIAKAIIEEGRTLARDIGGSDPERMAAPKIAEYLNALNGL-----KG
TcLAPpu (EFZ23771.1) VDDGDFACGSRRALEAVVTVQLCQRLVDAPTNLLDTITFTTEIAAGHVEKL---KGEGRD
BuffaloLAP (XP_025119540.1) W-----EVSTLQCLFSAIEGVRLAARIVDTPCNEMNTDFTLEEIK---K---VGKELG
AaLAP (AAC07829.1) LINRGDEE-GIRLGKIFAEAQNYARNLVNPNVGNINPITLAEAAKLAE-----EFG
EmLAP (CDS43570.1) QTRRKLAL-AWNRGRILQAQONQARRWEMMPANLFPPEVFAHEIEEALSEASKSAAGDAS
MouseLAP (AAK13495.1) -HGSQDLE-AWEKGVLFASGQNLARHLMESPANEMTPTRFAEIEKNLKSASS-----K
SheepLAPcy (XP_012035088.2) -HGSQDLE-AWQGVLFASGQNLARRLMETPANEMTPTKFAEIVEENLKSASS-----K
CattleLAP (XP_027399920.1) -HGSQDLE-AWQGVLFASGQNLARRLMETPANEMTPTKFAEIVEENLKSASIE-----K
HumansLAP (AAD17527.1) -YGSQDLE-AWQKGVLFASGQNLARQLMETPANEMTPTRFAEIEKNLKSASS-----K
RpLAP (AMS12064.1) DNNSEAMK-LFEVKKLIAEAVFFTRDISNEPNSNIKTPQVYAEERVEILE--PL-----G
EnbacLAP (WP_000397144.1) SG-----ER-AIQHGLAIAAGIKAAKDLGNMPPNICNAYLASQARQLADSYSK-----N

CsLAP1 (ACR27084.1) VVVET---GPVDAILYPLAAVDRGS-----NERHRGAIHVHLEYSGLPLAGDP
OvLAP (AND62923.1) VVVET---GPVEATLYPLAAVDRGS-----NERHRGAIHVHLEYSGLPLADDP
FhLAP (AAV59016.1) ITMSV---EKVDIQKYPLMAAVNRAA-----SVVARHDGRVHVKYEPNPTE
FgLAP (ADZ48237.1) ITMSV---EKVDIQKYPLMAAVNRAA-----SVVARHDGRVHVKYEPNPTE
SmekLAP VTITI---NKVDKAKYPLMAAVNRAA-----SVVPRHDGRVHIDYKPPSSKE
SjLAP (AFN58250.1) VTITI---NKVDKAKYPLMAAVNRAA-----SVVPRHDGRVHIDYKPPSSKE
SjLAP (CAX69904.1) VTITI---NKVDKAKYPLMAAVNRAA-----SVVPRHDGRVHIDYKPPSSKE
SmLAP (XP_018651318.1) VTITV---DKVDKAKYPLMAAVNRAA-----SVVPRHDGRVHIDYKPPSSKE
ShLAPpu (XP_012799753.1) VTITV---DKVDKAKYPLMAAVNRAASGEGINKHFFLSVVPVPRHDGRVHIDYKPPSSKE
TcLAPpu (EFZ23771.1) VSGIIGAEELREKGYGGMYGVGKAA-----EFPPLHVLTSYQPSNGIK
BuffaloLAP (XP_025119540.1) IVPTVIRDEELKARGFGGIVGVGKAA-----IHPALAVLSHTPDGA---
AaLAP (AAC07829.1) LECKVYDEKQIQEMGMALYSVGVGKS-----ATPPRFIHLIYKPSG-K-L
EmLAP (CDS43570.1) LTVEIHDKTWIEQQDMGGVLGVARGS-----TRPPCFVEINFGVDP-S-R
MouseLAP (AAK13495.1) TKVHIRPKSWIEEQEMGSFLSVAKGS-----EPPVFLIHYMGSFN-A-
SheepLAPcy (XP_012035088.2) TDVHIRPKSWIEEQEMGSFLSVAKGS-----EPPVFLIHYMGSFN-A-

SheepLAPcy (XP_012035088.2) -----LFEASIEtGDRVWRMPLFE-----HYTRQVIDCQLADVNNtG----KYRS
 CattleLAP (XP_027399920.1) -----LFEASIEtGDRVWRMPLFE-----HYTRQVIDCQLADVNNIG----KYRS
 HumansLAP (AAD17527.1) -----LFEASIEtGDRVWRMPLFE-----HYTRQVVDCQLADVNNIG----KYRS
 RpLAP (AMS12064.1) -----LkAGEAVNEKLWRMPLHD---DYD---AMINSDIADIANIGN---VPGA
 EnbacLAP (WP_000397144.1) -----LIAASEQSGDRAWRLPLGD---EYQ---EQLESNFADMANIGG---RPGG

CsLAP1 (ACR27084.1) RGHQSPAAMFIVASGLDShMTNAEKPLPYTHFDIAGSQGPCPG-----IPTAVPL
 OvLAP (AND62923.1) RGHQSPAAMFIVASGLDShMTNAEKPLPYTHFDIAGSQGPCPG-----IPTAVPL
 FhLAP (AAV59016.1) RGHQIPAAAFMALASGLDKHGLGSAKPIPYTHVDVAGSATEIHV-----LPTAAPL
 FgLAP (CDZ48237.1) RGHQIPAAAFMALASGLDKHGLGSAKPIPYTHVDVAGSAAEIHV-----LPTAAPL
 SmekLAP -----
 SjLAP (AFN58250.1) -----
 SjLAP (CAX69904.1) RGHQMPVAFVLVVASGLNKHGLDSKNQLPYTHVDVAGSAGDIYV-----TPTAAPL
 SmLAP (XP_018651318.1) RGHQMPAAFLVVASGLDKHGLDAKVRIPYTHVDVAGSAGDINV-----TPTAAPL
 ShLAPpu (XP_012799753.1) RGHQMPAAFLVVASGLNKHGLDAKVIPIYTNVDVAGSAGEINV-----TPTAAPL
 TcLAPpu (EFZ23771.1) ASSSCAAYFI-----GTHIDPKYQGSWAHIDMAAPVSR-DE-----ATGFGVTL-L
 BuffaloLAP (XP_025119540.1) SPSSCAGLFI-----ASHIGFDWPGVWVHLDIAAPVHAGER-----ATGFGVAL-L
 AaLAP (AAC07829.1) GGAI TAAMFL-----EEFVGEgi--KwVHLDIAGPAWSKEEYGYTYKGGTGFVVRT-C
 EmLAP (CDS43570.1) GSGAASAFI-----QSFVSPRI--PFVHLDIAGVMKTVGDDPGMRRGMTGRPTRP-L
 MouseLAP (AAK13495.1) AGACTAAAFI-----REFVT-HT--KWAHLDIAGVMTNKDEIPYLRKGMGRPTRT-L
 SheepLAPcy (XP_012035088.2) AGACTAAAFI-----KEFVT-HP--KWAHLDIAGVMTNKDEVPYLRKGMAGRPTRT-L
 CattleLAP (XP_027399920.1) AGACTAAAFI-----KEFVT-HP--KWAHLDIAGVMTNKDEVPYLRKGMAGRPTRT-L
 HumansLAP (AAD17527.1) AGACTAAAFI-----KEFVT-HP--KWAHLDIAGVMTNKDEVPYLRKGMTGRPTRT-L
 RpLAP (AMS12064.1) AGSCTAAHFI-----KRfIKDGV--DWAHLDIAGVANSNNASALCPKGAvgYGVRL-L
 EnbacLAP (WP_000397144.1) A--ITAGCFI-----SRfT-RKY--NWAHLDIAGTAWRSgK---AKGATGRVAL-L

CsLAP1 (ACR27084.1) LTLASRYLLQGFWEVSKL-----
 OvLAP (AND62923.1) LTLASRYLLQGFWEVSKL-----
 FhLAP (AAV59016.1) LMFASRYVLPRLGFK-----
 FgLAP (ADZ48237.1) LMFASRYVLPRLGFK-----
 SmekLAP -----
 SjLAP (AFN58250.1) -----
 SjLAP (CAX69904.1) MMFARRYVLPRLGFK-----
 SmLAP (XP_018651318.1) LMFARKYILPRLSFK-----
 ShLAPpu (XP_012799753.1) MMFARRYILPRLSFK-----
 TcLAPpu (EFZ23771.1) LQTFAMSIYNPA-----
 BuffaloLAP (XP_025119540.1) LALFGQASEDPLLNlVSPLGCEVDAQEGDAERDSKRRRLV
 AaLAP (AAC07829.1) LEYIMKVSSNV-----
 EmLAP (CDS43570.1) IHFFDRLARYGSIKASD-----EDED---V-----
 MouseLAP (AAK13495.1) IEFLFRFSKDS-----
 SheepLAPcy (XP_012035088.2) IEFLFRFSQDSA-----
 CattleLAP (XP_027399920.1) IEFLFRFSQDSA-----
 HumansLAP (AAD17527.1) IEFLFRFSQDNA-----
 RpLAP (AMS12064.1) EKfIKEYN-----
 EnbacLAP (WP_000397144.1) AQFLNRRAGFNgee-----



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวปิยนุช สูงสุวรรณ
วัน เดือน ปี เกิด	30 มกราคม 2539
สถานที่เกิด	นนทบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2560 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (สัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ.2561 เข้าศึกษาต่อ ระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตวศาสตร์) มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	1365/873 โครงการ Fullrich เฟส5 ต.ชะอำ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี 72160
ผลงานตีพิมพ์	การประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติ ครั้งที่ 11"วิจัยและนวัตกรรมเพื่อเตรียมพร้อมรับการเปลี่ยนแปลง จัดโดย บัณฑิตวิทยาลัย (24 - 25 มิถุนายน 2564) มหาวิทยาลัยศิลปากร(รูปแบบออนไลน์)

