MOLECULAR CLONING OF EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS ENCODING GENES FROM THE LIVER FLUKE, OPISTHORCHIS VIVERRINI

JIRAPORN RUANGSITTICHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (BIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7820-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การโคลนยีนของแอนติเจนที่ได้จากการคัดหลั่งและขับออกจากพยาธิใบไม้ตับชนิด OPISTHORCHIS VIVERRINI (MOLECULAR CLONING OF EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS ENCODING GENES FROM THE LIVER FLUKE, OPISTHORCHIS VIVERRINI)

จิราภรณ์ เรืองสิทธิชัย 4237507 SCBI/D

ปร.ด. (ชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิฑูรย์ ไวยนันท์, Ph.D., สุขศิริ วิชาศรี กรามส์ , Dr. rer. nat., สมาน เทศนา, Ph.D., ประเสริฐ โศภน, Ph.D., Annemarie Hofmann, Dr. rer. nat

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาโปรตีนแอนติเจนที่มีเอกลักษณ์เฉพาะจากสารคัดหลั่งและสารที่ขับออกภายนอกพยาธิ *Opisthorchis viverrini* เพื่อนำมาพัฒนาการวินิจฉัยโรคติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ โดยใช้เทคนิคทางด้านโมเลกุลและวิทยาภูมิคุ้มกัน โดยการค้นหายีนด้วยวิธี immunoscreening ของห้องสมุด cDNA จากระยะตัวเต็มวัยของ *O. viverrini,* ศึกษาลักษณะ RNA ของยีนด้วยวิธี Northern blot analysis, การกระจายของ RNA ในพยาธิด้วยเทคนิค *In situ* hybridization และการแสดงออกของยีนในระยะการเจริญช่วงต่าง ๆ ของพยาธิด้วยวิธี RT-PCR จากนั้นผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยใช้ระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย รวมทั้งประเมินความสามารถในการเป็นแอนติเจนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับจากการติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini*

ยีนที่แยกออกมาได้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ยีนของโปรตีนสร้างเปลือกไข่ (OvESP) ซึ่งประกอบด้วย 689 คู่เบส และแปลรหัสได้ 187 กรดอะมิโน ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 18.6 กิโลดาลตัน ลำดับ mRNA มีความยาวประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ และกระจายอยู่เฉพาะส่วนของ vitelline cells จากการศึกษาด้วยวิธีRT-PCR พบว่า OvESP มีการแสดงออกในตัวอ่อนตั้งแต่ระยะ 2 สัปดาห์ จนถึงระยะตัวเต็มวัย และผลการทดลองด้วยวิธี Immunolocalization พบว่า OvESP กระจายอยู่ทั้งภายในและภายนอกของเปลือกไข่ขณะที่อยู่ในท่อนำไข่ (uterus) ของพยาธิ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blots พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนของ OvESP (rOvESP) สามารถทำปฏิกิริยาทางวิทยาภูมิคุ้มกันกับแอนติบอดีจำเพาะในซีรั่มของคน และสัตว์ทดลอง (แฮมสเตอร์)ที่ติดเชื้อพยาธิได้ดี โดยมีปฏิกิริยาข้ามชนิดเล็กน้อยกับซีรั่มของหนูทดลองที่ติดเชื้อพยาธิชนิด *Schistosoma mansoni*, *S. mekongi* หรือ *Fasciola gigantica* และจากผลการประเมินความสามารถในการเป็นแอนติเจนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในการวินิจฉัยโรค โดย ELISA พบว่า ค่าความไวของ rOvESP ต่อซีรั่มของผู้ที่ติดเชื้อพยาธิ *O.viverrini* (82%) สูงกว่า ค่าความไวของ ES antigen (48%) ในขณะที่ค่าความจำเพาะของแอนติเจนทั้งสองชนิดแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (97% ใน rOvESP และ 91% ใน ES antigen) ซึ่งสามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า rOvESP มีศักยภาพที่จะนำใช้ในเป็นแอนติเจนเพื่อการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ (opisthorchiasis) ด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

138 หน้า ISBN 974-04-7820-4

MOLECULAR CLONING OF EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS ENCODING GENES FROM THE LIVER FLUKE, OPISTHORCHIS VIVERRINI

JIRAPORN RUANGSITTICHAI 4237507 SCBI/D

Ph.D. (BIOLOGY)

THESIS ADVISORS : VITHOON VIYANANT, Ph.D., SUKSIRI VICHASRI GRAMS, Dr. rer. nat., SMARN TESANA, Ph.D., PRASERT SOBHON, Ph.D, ANNEMARIE HOFMANN, Dr. rer. nat.

ABSTRACT

The major aim of this study was to find novel proteins among the excretory-secretory (ES) antigens of *Opisthorchis viverrini* and to develop an immunodiagnosis of opisthorchiasis based on molecular and immunological techniques. Therefore, ES antigen encoding cDNAs were isolated by immunoscreening from an adult stage *O. viverrini* cDNA library and further molecular characterization by Northern blot analysis, RNA *in situ* hybridization and RT-PCR. In addition, recombinant protein was produced and analyzed for its immunogenic potential by ELISA.

In this study, a cDNA encoding an eggshell protein (OvESP) was isolated by immunoscreening of an adult stage cDNA library using an antiserum against the parasite's ES antigens. The OvESP cDNA had a size of 689 base pairs, encoding a protein of 187 amino acid residues with a calculated molecular mass of 18.6 kDa. Northern blot hybridization of total RNA, adult stage, revealed a prominent transcript with a size of 800 nucleotides. The OvESP mRNA was found by RNA *in situ* hybridization to be only present in the vitelline cells. OvESP transcripts were already detected in 2-week-old juveniles and adult stage by RT-PCR. The result of immunolocalization showed that native OvESP was presented on the inner and outer shell of intrauterine eggs. Moreover, Western blot analysis revealed that recombinant OvESP (rOvESP) strongly reacted with the sera from *O. viverrini* infected humans and hamsters while weak cross-reactivity was found with the sera of mice infected with other trematodes (*Schistosoma mansoni*, *S. mekongi*, and *Fasciola gigantica*). A comparative evaluation of rOvESP and ES antigens as diagnostic tools for human opisthorchiasis by ELISA showed a sensitivity of 82% for rOvESP versus 48% for the ES antigen. The obtained specificities differed less with 97% for rOvESP and 91% for the ES antigens. The results clearly demonstrated that rOvESP has diagnostic potential for immunodiagnosis of opisthorchiasis.

KEY WORDS: OPISTHORCHIS VIVERRINI / EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS / IMMUNOSCREENING / CLONING / OvESP / NORTHERN BLOT / RT-PCR / HYBRIDIZATION / rOvESP / WESTERN BLOT / LOCALIZATION / ELISA

138 P. ISBN 974-04-7820-4