LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

CONSTRUCTION OF SPECIFIC DNA PROBES FOR *OPISTHORCHIS VIVERRINI* DETECTION AND AN ATTEMPT TO CLONE GENES CODING FOR DIAGNOSTIC EPITOPES

RASANA SERMSWAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1990

Copyright by Mahidol University

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสร้างตัวตรวจสอบที่จำเพาะสำหรับพยาธิ Opisthorchis viverrini และความพยายามในการผลิตโปรตีนที่จำเพาะจากพยาธิ โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค

ผู้วิจัย รศนา เสริมสวรรค์

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สถิตย์ สิริสิงห , D.M.D.,Ph.D.

สกล พันธุยิ้ม , Ph.D.

ศกรณ์ มงคลสุข , Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 4 กันยายน พ.ศ. 2533

บทคัดย่อ

วิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ Opisthorchis viverrini โดยการตรวจหาไข่ของพยาธิในอุจจาระ ต้องใช้เวลานานและอาศัยความชำนาญในการวินิจฉัย เมื่อสิ่งส่งตรวจมีไข่ของพยาธิที่มีความคล้ายคลึงผสมอยู่ด้วย วิธีการวินิจฉัยทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้แอนติเจนรวมจากพยาธิ พบว่ามีปฏิกริยาข้ามพวกกับพยาธิบางชนิด จากการศึกษาแอนติเจนต่างๆของพยาธิพบว่า โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 89 กิโลดาลตัน ไม่ทำปฏิกริยากับน้ำเหลืองของผู้ป่วยด้วยโรคพยาธิอื่นๆ นับเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย แต่เนื่องจากพยาธินี้ไม่สามารถเลี้ยงและเพิ่มจำนวนได้นอกสัตว์ทดลอง จึงเป็นการยากที่จะได้แอนติเจนมากเพียงพอเพื่อการแยกใช้เฉพาะโปรตีน 89 กิโลดาลตัน ดังนั้นวิธีการทางพันธุวิศวกรรมจึงได้นำมาใช้เพื่อผลิตบางส่วนของโปรตีนนี้ โดยอาศัยพลาสมิด pUC 8,9 และ 12 หรือ λgt11 เป็นพาหะ จากการคัดเลือกไม่สามารถค้นหา E. coli ที่ผลิตโปรตีนที่ต้องการ สาเหตุอาจมาจากการใช้เอ็นซัยม์ตัดเฉพาะที่ไม่เหมาะสม หรืออาจเป็นผลมาจากสภาพโดยธรรมชาติของสารพันธุกรรมของพยาธิชนิดนี้เอง หรือเนื่องมาจากการที่โปรตีน 89 กิโลดาลตัน นี้เป็นไกลโคโปรตีน ทำให้ยากที่จะผลิตบางส่วนขึ้นมาโดยใช้ E. coli

วิธีการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับอีกวิธีหนึ่งคือ การใช้ ดี เอน เอ ตรวจสอบที่จำเพาะซึ่งคัดเลือกแล้ว คือ pOV-P5 และ pOV-A6 ซึ่งมีสารพันธุกรรมของพยาธิขนาด 1.4 กิโลเบส และ 334 เบส เชื่อมอยู่ตามลำดับ โดยพบว่าชิ้นสารพันธุกรรมทั้งสองสามารถจับคู่เบสข้าม

Copyright by Mahidol University

กันได้ ตัวตรวจสอบทั้งสองเมื่อจับคู่กับสารพันธุกรรมของพยาธิที่ตัดด้วยเอ็นซัยม์ตัดเฉพาะ จะให้ผลเป็นเช่นเดียวกัน เมื่อตรวจดูลำดับเบสของสารพันธุกรรมพยาธิใน pOV-A6 พบว่าเป็นลำดับเบสที่มีความซ้ำซ้อนอยู่ในสารพันธุกรรม โดย pOV-A6 เป็นหน่วยที่เล็กที่สุด และเมื่อนำ pOV-P5 มาตัดด้วยเอ็นซัยม์ตัดเฉพาะพบว่าน่าจะมีหน่วยที่เล็กที่สุดของสารพันธุกรรมที่มีความซ้ำซ้อนสูงนี้อยู่ด้วย ตัวตรวจสอบทั้งคู่ สามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมของพยาธิได้ที่ปริมาณ 25 พิโคแกรม และตรวจสอบตัวเองได้ที่ปริมาณ 6.3 (pOV-P5) และ 3.1 (pOV-A6) พิโคแกรม

วิธีการที่ใช้ในการนำสารพันธุกรรมของพยาธิออกจากไข่เพื่อการตรวจสอบ ทำได้โดยใส่สารละลายด่าง (0.1 M NaOH) ผสมกับไข่แล้ว autoclave ประมาณ 5 นาที ตัวตรวจสอบสามารถตรวจพบไข่จำนวน 5 ใบได้ แต่จะมีความว่องไวในการตรวจสอบลดลงเมื่อมีการปนเปื้อนของอุจจาระ ในการตรวจสอบอุจจาระของผู้ที่มีพยาธิ พบว่าตัวตรวจสอบสามารถตรวจไข่ได้จนถึงระดับ 1,600-2,000 egg per gram นอกจากนี้ ยังสามารถตรวจพยาธิในช่วงต่าง ๆ ของวงจรชีวิต นั่นคือ metacercaria และ cercaria ได้อีกด้วย

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Construction of specific DNA probes for *Opisthorchis viverrini* detection and an attempt to clone genes coding for diagnostic epitopes.

Name Rasana Sermswan

Degree Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Supervisory Comittee

Stitaya Sirisinha, D.M.D., Ph.D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Skorn Mongkolsuk, Ph.D.

Date of Graduation 4 September B.E. 2533 (1990)

ABSTRACT

Conventional method of diagnosing *Opisthorchis viverrini* infection by microscopic examination is time-consuming. Distinguishing *O. viverrini* eggs from those of other small intestinal flukes also requires experienced personnels. Immunological methods still possess some difficulties due to frequent cross reactivity of *O. viverrini* antigens with those of other parasites. Although from an antigen analysis, the 89 kDa protein give promising results. Unfortunately, *O. viverrini* cannot be cultured *in vitro* which making it difficult to prepare a substantial quantities of the antigenic proteins. Thus, cloning a gene encoding for some of these specific proteins may overcome this problem. In this study therefore total genomic DNA from the parasite was used to construct libraries in pUC 8, 9 and 12 plasmids and a bacteriophage expression vector λgt11. Screening of these libraries with a number of different anti *O.*

Copyright by Mahidol University

viverrini antisera were however unsuccessful. This is probably due to the interference of introns in the antigenic gene or the restriction enzymes used are not suitable to cut into the coding region. Another possibility is that the 89 kDa is a glyoprotein, thus reducing the possibility when cloned this component in *E. coli*.

Another approach to diagnose this parasite is to develop specific DNA probes for detecting parasite eggs in stool samples. Two recombinant plasmids were selected and named pOV-P5 and pOV-A6. The pOV-P5 has a 1.4 kb insert which cross hybridized with a 334 base pair (bp) insert fragment of pOV-A6. When using as probes to hybridize with digested genomic DNA from *O. viverrini*, both plasmids gave similar tandemly repeated patterns. Sequence analysis of pOV-A6 suggests it to be the smallest unit of the repeated elements. This repeated unit was found to be conserved. The pOV-P5 was mapped and compared to pOV-A6 insert. The insert fragment of pOV-P5 may probably contains one unit of the same family of repeated elements. Both DNA probes were highly specific to *O. viverrini* and did not cross hybridize with genomes of other parasites, common intestinal bacterial flora and hosts. The sensitivity of pOV-P5 and pOV-A6 was also evaluated. The pOV-P5 and pOV-A6 insert could detect 25 pg of total genomic DNA and as little as 6.3 pg of pOV-P5 and 3.1 pg of pOV-A6 respectively. Various methods were used to release DNAs from *O. viverrini* eggs to facilitate the detection of parasite eggs in stool sample. Among the various attempts, a combination of alkaline treatment (0.1 N NaOH) and autoclaving for 15 min were found to be most efficient at releasing DNAs from the egg shell. Both probes could detect about 5 purified eggs. The pOV-A6 insert was used as a probe to evaluate its diagnostic

Copyright by Mahidol University

potential. It can detect about 1,600-2,000 eggs per gm of feces from human stool specimens. The level of detection of this probe is in the range of light infection. In addition, pOV-A6 can also detect *O. viverrini* at other stage of life cycle e.g. metacercaria and cercaria.

Copyright by Mahidol University