ดีเอนเอตรวจสอบเพื่อการจำแนกชนิดเชื้อ Plasmodium falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์

นางสาว เนาวรัตน์ สีสด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2532

ISBN 974-576-324-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015411

I10302712

DNA Probe for Differentiation of *Plasmodium falciparum* Clones

Miss Nauwarut Seesod

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

1989

ISBN 974-576-324-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ดีเอนเอตรวจสอบเพื่อการจำแนกชนิดเชื้อ Plasmodium falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์

โดย นางสาว เนาวรัตน์ สีสด

ภาควิชา ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง

รองศาสตราจารย์ ธาดา สืบหลินวงศ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. พเยาว์ บุญประกอบ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. นวลทิพย์ กมลวารินทร์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เนาวรัตน์ ลีลัด : ดีเอนเอตรวจสอบเพื่อการจำแนกชนิดเชื้อ Plasmodium falciparum ลายพิมพ์บริสุทธิ์ (DNA PROBE FOR DIFFERENTIATION OF Plasmodium falciparum CLONES) อ.ที่ปรึกษา : รศ.สุดศรี ไทยทอง, 110 หน้า.

ศึกษารูปแบบดีเอนเอของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม จำนวน 3 ไอโซเลต และ 19 ลายพิมพ์บริสุทธิ์ โดยย่อยดีเอนเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ Alu I, EcoR I และ Hind III จากนั้นนำไปแยกตามลำดับน้ำหนักโมเลกุลด้วยอากาโรสเจล อิเลคโตรฟอริซิส พบว่ารูปแบบของดีเอนเอที่ได้จากการแยกด้วยอากาโรสเจล อิเลคโตรฟอริซิสเพียงลำพังไม่สามารถบอกความแตกต่างของเชื้อมาลาเรียในระดับไอโซเลตและลายพิมพ์บริสุทธิ์ได้ เมื่อทำเซาเทิ่นไบริไดเซชันด้วยดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ ผลพบว่าสามารถบอกความแตกต่างของเชื้อกลุ่ม CH_{150}, CH_{150R}, TM_4, TM_9 และ TM_{142R} ได้ ทั้งยังสามารถแบ่งเชื้อมาลาเรียที่ศึกษาทั้งหมดออกเป็นแบบ (type) ซึ่งจะแตกต่างกันได้มากหรือน้อยแบบขึ้นอยู่กับชนิดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยพบว่าเมื่อใช้ Alu I จะแบ่งเชื้อมาลาเรียทั้ง 22 ตัวอย่างออกเป็น 4 แบบ ส่วน EcoR I และ Hind III ต่างแบ่งออกได้ 19 แบบเท่า ๆ กัน

การเปรียบเทียบรูปแบบดีเอนเอกับรูปแบบโปรตีนซึ่งศึกษาโดย 2D PAGE พบว่าไม่อาจกำหนดรูปแบบของโปรตีนแบบหนึ่งว่าจะต้องมีรูปแบบเฉพาะตัวต่อรูปแบบดีเอนเอ แต่รูปแบบดีเอนเอที่ได้เมื่อศึกษาด้วย $EcoR_1$ จะให้แถบที่มีความจำเพาะของแต่ละกลุ่มได้ยัดเจน เช่น TM_4 พบที่ขนาด 4.8 kb CH_{150} และ CH_{150R} พบแถบจำเพาะที่ขนาด 5.4, 4.3 และ 3.4 kb TM_{90} พบแถบ 18.9, 15.9, 7.8 และ 4.6 kb ส่วน TM_{142R} พบแถบ 17.4 kb จึงอาจสรุปว่า EcoR I เป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ให้ผลความแตกต่างในรูปแบบดีเอนเอของพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ได้ดีกว่า Alu I และ Hind III

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตววิทยา

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NAUWARUT SEESOD : DNA PROBE FOR DIFFERENTIATION OF Plasmodium falciparum CLONES. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF.SODSRI THAITHONG, 110 PP.

Purified DNA extracted from 3 isolates and 19 clones of P. falciparum were digested with three different restriction enzymes : Alu I, EcoR I and Hind III before the separation of these digested fragments on agarose gel electrophoresis. Analysis of the ethidium bromide banding patterns alone did not show any significant differences among various clones of CH_{150} , CH_{150R} , TM_4 , TM_{90} and TM_{142R}. Southern blot hybridization using pBR K_{1-14} probe exhibited the differences in autoradiographic banding pattern. The autoradiographic banding patterns obtained after Alu I digested of the 22 parasitic DNA could be grouped into 4 types while EcoR I and Hind III yielded 19 patterns.

The comparison of restricted DNA patterns to the 2D PAGE protein patterns indicated that there were no specific correlating patterns among DNA and 2D-PAGE bands. Nevertheless, the EcoR I restricted DNA patterns exhibited some isolate and clonal specific fragments i.e. the 4.8 kb band of TM_4, bands marked 5.4 , 4.3 and 3.4 kb in CH_{150} and CH_{150R}, 18.9 , 15.9 , 7.8 and 4.6 kb of TM_{90} and a band of 17.4 kb in TM_{142R}. It is concluded that the EcoR I restricted DNA fragments produced more variating plasmodial DNA patterns than Alu I and Hind III.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตววิทยา

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ทองสมุทรกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณายิ่งของ รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่อง วิทยานิพนธ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พเยาว์ บุญประกอบ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ดร. นวลทิพย์ กมลวารินทร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาร่วมแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรม กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และการพลังงานแห่งประเทศไทย และคณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์ ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อตีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$

ขอขอบพระคุณภาควิชาสูตินารีเวชวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ใช้เครื่อง scintillation couter

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ศูนย์วิจัยมาลาเรียร่วมองค์การอนามัยโลก เพื่อการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และคณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่แผนกโสตทัศนศึกษา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณดำรงศักดิ์ เดี่ยววาณิชย์ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการถ่ายรูป และสไลด์ ผลการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณอรัญญา ตันติปัญจพร ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการพิมพ์วิทยานิพนธ์

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา เป็นอย่างสูง ที่ได้กรุณาให้กำลังใจสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1
2. สอบสวนเอกสาร 7
3. วัสดุและอุปกรณ์ 30
4. วิธีดำเนินการทดลอง 36
5. ผลการทดลอง 68
6. วิจารณ์ผลการทดลอง 92
7. สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 101

เอกสารอ้างอิง 103

ประวัติผู้เขียน 110

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า G-C content กับผลการไฮบริไดเซชันด้วยเอ็นไซม์ 4 ชนิด 13
2. แสดงส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่เอ็นไซม์ต้องการ 16
3. แสดงช่วงความสัมพันธ์เส้นตรงที่ความเข้มข้นของอากาโรสเจลต่าง ๆ กัน 20
4. แสดงผลการสกัดดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum 68
5. แสดงผลการไฮบริไดเซชันของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum เมื่อย่อยด้วย Alu. I กับดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ 73
6. แสดงผลการไฮบริไดเซชันของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum เมื่อย่อยด้วย Eco. RI กับดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ 74
7. แสดงผลการไฮบริไดเซชันของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum เมื่อย่อยด้วย Hind III กับดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ 75
8. แสดงผลรวมของการไฮบริไดเซชัน 76
9. แสดงรูปแบบของโปรตีนของเชื้อ P. falciparum 77
10. แสดงขนาดของดีเอนเอในนิวเคลียสของ Eukaryote ชั้นต่ำบางชนิด และแสดงเปอร์เซนต์การซ้ำของดีเอนเอ 93

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. แสดงโครงสร้างของอีรีเดียมโบรไมด์ และการเข้าสอดขึ้นในดีเอนเอของอีรีเดียมโบรไมด์ 17
2. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดีเอนเอ ($\log_{10}$ M.W.) กับการเคลื่อนที่ของดีเอนเอในอากาโรสเจล 19
3. แสดงปฏิกิริยาการตรวจพบไบโอติน โดยสเตรปตราวิดิน เชื่อมกับเอ็นไซม์ที่เหมาะสม 22
4. แสดงขบวนการ Nick translation 23
5. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วการรวมตัวของดีเอนเอสกุลต่าง ๆ กัน ที่มี complexcity แตกต่างกัน 26
6. แสดงการปั่นแยกชั้นของ plasmid DNA โดยวิธี CsCl gradient 43
7. แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทำอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส 45
8. แสดงการทำ sounthern bloting 46
9. แสดงการทำ sephdex G-50 fine column 48
10. กราฟแสดงรูปแบบการดูดกลืนแสงระหว่างความยาวคลื่นช่วง 190 ถึง 400 นาโนเมตร เปรียบเทียบระหว่าง salmon sperm DNA และดีเอนเอของ P. falciparum 52
11. แสดงรูปแบบของดีเอนเอ ของเชื้อ P. falciparum ไอโซเลตและสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อถูกย่อยด้วย Hind III, Alu. I และ Eco. RI แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ปริมาณของดีเอนเอที่ใช้ในแต่ละตัวอย่างคือ 3 µg 55
12. แสดงรูปแบบของดีเอนเอ ของเชื้อ P. falciparum ไอโซเลตและสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อถูกย่อยด้วย Hind III, Alu. I และ Eco. RI แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ปริมาณของดีเอนเอที่ใช้ในแต่ละตัวอย่างคือ 3 µg 57
13. แสดงรูปแบบของดีเอนเอ ของเชื้อ P. falciparum ไอโซเลตและสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อถูกย่อยด้วย Hind III, Alu. I และ Eco. RI แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ปริมาณของดีเอนเอที่ใช้ในแต่ละตัวอย่างคือ 3 µg 59

รูปที่ หน้า

14. แสดงรูปแบบของดีเอนเอ ของเชื้อ P. falciparum ไอโซเลตและสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อถูกย่อยด้วย Alu. I, Eco. RI และ Hind III แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ปริมาณของดีเอนเอที่ใช้ในแต่ละตัวอย่าง คือ 3 µg 61

15. แสดงรูปแบบของดีเอนเอ ของเชื้อ P. falciparum ไอโซเลตและสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อถูกย่อยด้วย Eco. RI แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ปริมาณของดีเอนเอแต่ละตัวอย่าง 3 µg 63

16. แสดงรูปแบบของดีเอนเอ ของเชื้อ P. falciparum ไอโซเลตและสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อถูกย่อยด้วย Hind III แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ปริมาณของดีเอนเอแต่ละตัวอย่าง 3 µg 65

17. แสดงรูปแบบของดีเอนเอ ของเชื้อ P. falciparum ไอโซเลตและสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อถูกย่อยด้วย Alu. I แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ปริมาณของดีเอนเอแต่ละตัวอย่าง 3 µg 67

18. แสดงผล autoradiograph (A) และแผนภาพ (B) ของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum เมื่อย่อยด้วย Eco. RI และไฮบริไดซ์ด้วยดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ ที่ติดฉลากด้วย ^{32}P ค่า specific activity 9.3×10^7 cpm/µg expose ฟิล์ม x-ray ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 79

19. แสดงผล autoradiograph (A) และแผนภาพ (B) ของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum เมื่อย่อยด้วย Hind. III และไฮบริไดซ์ด้วยดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ ที่ติดฉลากด้วย ^{32}P ค่า specific activity 5.5×10^7 cpm/µg expose ฟิล์ม x-ray ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน 81

20. แสดงผล autoradiograph (A) และแผนภาพ (B) ของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum เมื่อย่อยด้วยHind. III (แถบที่ 1 ถึง 7) และย่อยด้วย Eco. RI (แถบที่ 8 ถึง 14) แล้วไฮบริไดซ์ด้วยดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ ที่ติดฉลากด้วย ^{32}P ค่า specific activity 6.7×10^7 cpm/µg expose ฟิล์ม x-ray ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน 83

รูปที่ หน้า

21. แสดงผล autoradiograph (A) และแผนภาพ (B) ของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum เมื่อย่อยด้วย Alu. I แล้วไฮบริไดซ์ด้วยดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ ที่ติดฉลากด้วย ^{32}P ค่า specific activity 4.6×10^7 cpm/µg expose ฟิล์ม x-ray ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน 85

22. แสดงผล autoradiograph (A) และแผนภาพ (B) ของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum เมื่อย่อยด้วย Alu. I แล้วไฮบริไดซ์ด้วยดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ ที่ติดฉลากด้วย ^{32}P ค่า specific activity 8.8×10^7 cpm/µg expose ฟิล์ม x-ray ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน 87

23. แสดงผล autoradiograph (A) และแผนภาพ (B) ของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum เมื่อย่อยด้วย Alu. I แล้วไฮบริไดซ์ด้วยดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ ที่ติดฉลากด้วย ^{32}P ค่า specific activity 5.4×10^8 cpm/µg expose ฟิล์ม x-ray ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน 89

24. แสดงผล autoradiograph (A) และแผนภาพ (B) ของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum เมื่อย่อยด้วย Hind. III (แถบที่ 1 ถึง 2) และย่อยด้วย Alu. I (แถบที่ 3 ถึง 4) แล้วไฮบริไดซ์ด้วยดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ ที่ติดฉลากด้วย ^{32}P ค่า specific activity 3.5×10^7 cpm/µg expose ฟิล์ม x-ray ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 91

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย