บทที่ 6

วิจารณ์ผลการทดลอง

โดยทั่วไปโปรตีนที่เป็นแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียมักจะมีคุณลักษณะของ antigenic diversity แตกต่างไปตามสายพันธุ์ของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนบนผิวของมาลาเรียในระยะต่าง ๆ รวมทั้ง MSP1 ซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MSP1 ของ *P.falciparum* แม้จะพบว่าประกอบด้วยอัลลีลแม่แบบเพียง 2 ชนิด แต่ในกลุ่มประชากรของมาลาเรียดังกล่าวมักจะพบว่ามีความหลากหลายของอัลลีล MSP1 ซึ่งอธิบายได้จากการแลกเปลี่ยนส่วนต่าง ๆ ของยีนในขณะที่เชื้อมาลาเรียมีการสืบพันธุ์โดยใช้เพศในยุงก้นปล่อง ทำให้เกิดอัลลีลที่แตกต่างกัน เนื่องจาก MSP1 เป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จึงพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนต่าง ๆ ของยีนได้หลายตำแหน่ง

สำหรับ Pv200 ซึ่งเป็น MSP1 ของ *P.vivax* ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายของยีนดังกล่าวมีอยู่ค่อนข้างจำกัดโดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนนี้มีเพียง 2 สายพันธุ์ คือ Sal-1 และ Belem ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ปรับตัวให้เจริญได้ในลิง squirrel เนื่องจาก *P.vivax* ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงให้เจริญในหลอดทดลองได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการศึกษา Pv200 จึงต้องใช้ *P.vivax* จากผู้ป่วยโดยตรง ทำให้มีข้อจำกัดในการศึกษายีนนี้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Sal-1 และ Belem พบว่าประกอบด้วยส่วน conserved block และ variable block เช่นเดียวกับ MSP1 ของ *P.falciparum* ดังนั้นจึงสามารถศึกษาความหลากหลายของ Pv200 จากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยโดยอาศัยเทคนิค PCR เป็นพื้นฐานเพื่อเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วน block 4, 5 และ 6 จากการศึกษาของ Porto และคณะ (1992) โดยใช้ตัวอย่างจากประเทศบราซิลจำนวน 22 ไอโซเลต และทำ Southern blot hybridization โดยใช้ oligonucleotide

probe ของอัลลีล Sal-1 และ อัลลีล Belem ในส่วนของ block 6 พบว่าประกอบด้วยอัลลีล Sal-1 12 ไอโซเลต อัลลีล Belem 22 ไอโซเลต และพบว่ามีไอโซเลตที่มีอัลลีล Sal-1 และ Belem ในตัวอย่างเดียวกันจำนวน 11 ไอโซเลต (ร้อยละ 48) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 1 ไอโซเลต พบว่าประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ Sal-1 โดยมีความแตกต่างกันของนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่ง การศึกษาความหลากหลายของ Pv200 ในบริเวณ block 5 จากผู้ป่วย ในประเทศศรีลังกา (Premawansa et al. 1993) จำนวน 22 ไอโซเลตเมื่อใช้ oligonucleotide probe จากปลาย block 4, 5 และส่วนต้นของ block 6 เพื่อทำ Southern blot hybridization กับไอโซเลตดังกล่าว พบว่าให้ ผลบวกทุกไอโซเลต และใน 14 ไอโซเลตมีแถบของการเกิด hybridization มากกว่า 1 แถบ แสดงว่าไอโซเลตดังกล่าวน่าจะมีอัลลีล Pv200 ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามไอโซเลตที่ให้ผลบวก และมี hybridization เพียงแถบเดียวอาจ จะมีจำนวนอัลลีลมากกว่า 1 อัลลีลที่แตกต่างกันได้ เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5 ไอโซเลต พบว่าประกอบด้วยอัลลีล Belem 1 ไอโซเลต อัลลีล Sal-1 2 ไอโซเลต และพบอัลลีลที่มีส่วน 5' ของ Block 5 คล้ายกับ Sal-1 แต่ในส่วน 3' คล้ายกับ Belem 3 ไอโซเลต (ตรงกับกลุ่มอัลลีลที่ 3 ในรูปที่ 8) ซึ่งพบอัลลีล Belem และอัลลีลในกลุ่มที่ 3 ในไอโซเลตเดียวกัน ต่อมา Mancilla และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษา *P.vivax* จากประเทศโคลัมเบีย จำนวน 18 ไอโซเลต พบอัลลีล Sal-1 จำนวน 11 ไอโซเลต และอัลลีล Belem 15 ไอโซเลต โดยพบไอโซเลตที่มีอัลลีลต่างกันร้อยละ 44.4 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากไอโซเลตที่มีอัลลีล Sal-1 และอัลลีล Belem อย่างละไอโซเลตพบความแตกต่างจากอัลลีลแม่แบบดังกล่าวน้อยมาก จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่าอัลลีลของ Pv200 ในส่วนของ Block 4, 5 และ 6 ประกอบ ด้วยอัลลีลพื้นฐานเพียง 2 แบบคือ Sal-1 และ Belem นอกจากนี้ในส่วน Block 5 ซึ่งเป็น variable block ยังประกอบด้วยอัลลีลที่มีส่วนของ Sal-1 และ

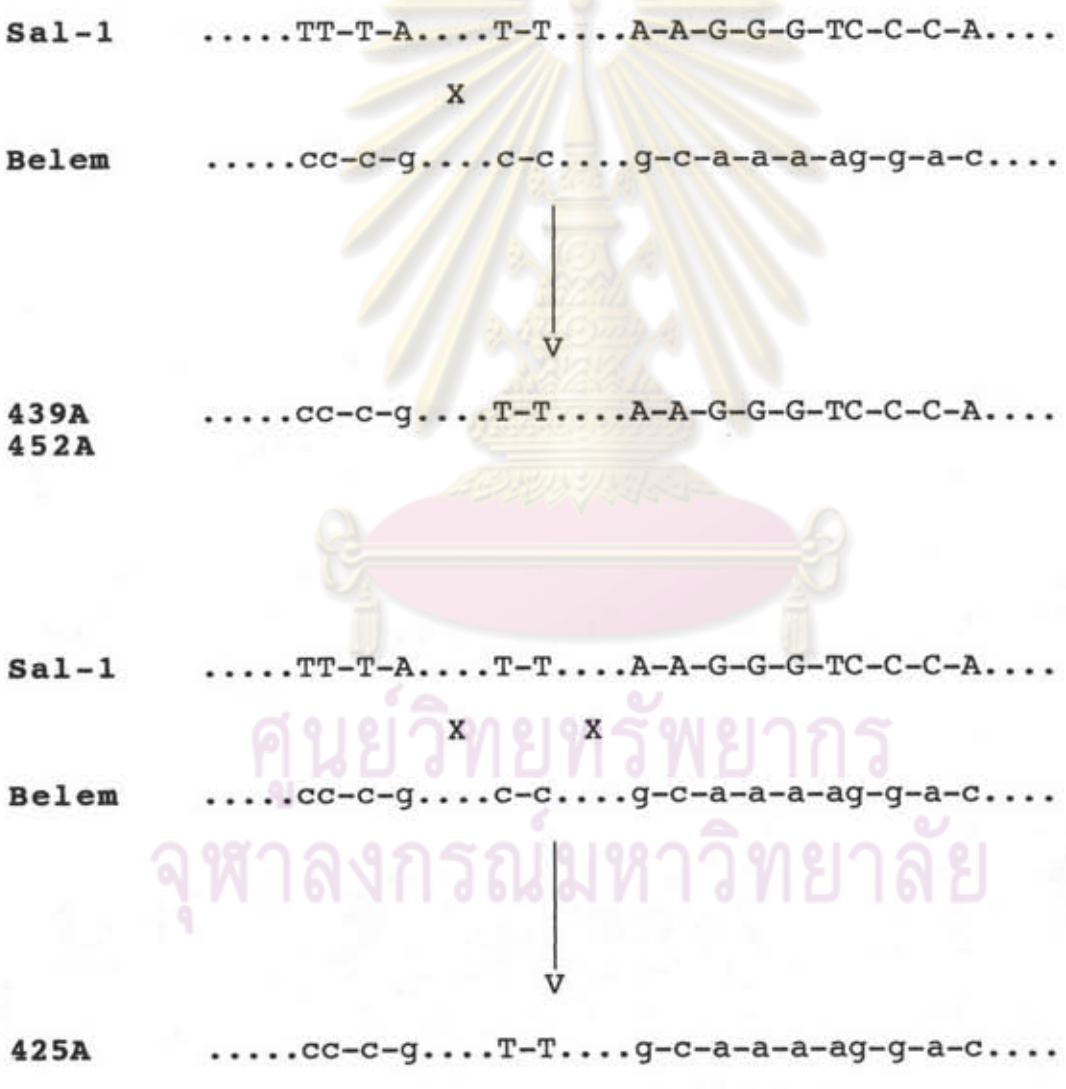
Belem เป็นองค์ประกอบอยู่ในบางอัลลีล สำหรับการพบอัลลีลที่แตกต่างกันในไอโซเลตเดียวกันนั้นมักพบได้บ่อยเช่นเดียวกับ *P.falciparum* MSP1

การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการคล้ายกับการศึกษาดังกล่าวข้างต้นเพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของ Pv200 ในส่วนของ Block 4, 5 และ 6 จากตัวอย่าง *P.vivax* ที่ได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยจำนวน 15 ไอโซเลต โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกไอโซเลต พบว่าประกอบด้วยอัลลีลทั้งหมด 20 อัลลีล โดยพบว่าไอโซเลตที่มีอัลลีลที่แตกต่างกันในไอโซเลตเดียวกันจำนวน 5 ไอโซเลต (ร้อยละ 33.3) และสามารถนำ 20 อัลลีลนี้มาจัดกลุ่มตามลักษณะพื้นฐานของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน Blcok 5 ได้เป็น 5 กลุ่ม (ดูรูปที่ 8) และอัลลีลในกลุ่มที่ 2 และ 4 เป็นอัลลีลใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนโดยมีพื้นฐานของลำดับนิวคลีโอไทด์จากอัลลีล Sal-1 และอัลลีล Belem เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 3 แต่มีองค์ประกอบแตกต่างกันซึ่งภายในแต่ละกลุ่มมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่ง แม้ว่าตัวอย่างที่ใช้ศึกษามีจำนวนไม่มากนัก แต่จากการวิเคราะห์อัลลีลดังกล่าวพบว่าเชื้อ *P.vivax* มีอัลลีลของ Pv200 ในแต่ละกลุ่มแตกต่างกันโดยพบอัลลีลในกลุ่มที่ 1 หรือกลุ่ม Sal-1 และอัลลีลในกลุ่มที่ 3 มากกว่าอัลลีลกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งคล้ายกับ อุบัติการในอัลลีล MSP1 ของ *P.falciparum* จากตัวอย่างในประเทศไทย กล่าวคือจะพบอัลลีล MAD20 มากกว่าอัลลีล K1 และ RO33 (Jongwutiwes et al, 1991) สำหรับไอโซเลตที่มีอัลลีลที่แตกต่างกันในไอโซเลตเดียวกันจากผลการศึกษานี้เปรียบเทียบกับตัวอย่างจากประเทศบราซิลและโคลัมเบียพบว่ามีความใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ใช้วิธีเลือก recombinant subclone เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการสุ่มจากแต่ละไอโซเลตจำนวน 5 subclones ทำให้การตรวจหาอัลลีลที่มีอยู่ในปริมาณน้อย ๆ เป็นไปได้ยากหรืออาจไม่พบเลย ดังนั้นในกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษานี้อาจจะมีไอโซเลตที่ประกอบด้วยอัลลีลที่ต่างกันมากกว่านี้ นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลตที่ได้จากอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด ประกอบด้วยอัลลีลต่างกันโดยพบทุกกลุ่มอัลลีลแสดงว่าในเขตปรากฏโรคมาลาเรียบริเวณใดบริเวณหนึ่งในประเทศไทยมีโอกาส

พบความหลากหลายของ อัลลีล Pv200 ได้มาก สำหรับอัลลีลในกลุ่มที่ 2 และ 4 ที่พบใหม่ในการศึกษานี้อาจมีการแพร่กระจายอยู่ในบริเวณอื่นของโลก ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาโดยการหาลำดับดีเอ็นเอของ Pv200 โดยใช้ตัวอย่างจากประเทศต่าง ๆ ให้มากขึ้น

ในระดับนิวคลีโอไทด์พบว่า block 4 และ 6 ในส่วนที่ศึกษาเป็น conserved block โดยพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 40 ตำแหน่งหรือร้อยละ 6.00 เป็นที่น่าสังเกตุว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไดท์ในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งนั้นมีนิวคลีโอไทด์เพียง 2 ชนิดเท่านั้น (ยกเว้นตำแหน่งที่ 1900 และ 2637) และลักษณะดังกล่าวจะคล้ายกับบริเวณ conserved block ของ MSP1 ของ *P.falciparum* เนื่องจากไม่พบการขาดหายไปหรือการเพิ่มเติมของนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวเลย และยังพบว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวในบางบริเวณจะ มีความสัมพันธ์กัน (linkage) เช่น C ในตำแหน่งที่ 2471, 2472 และ 2475 จะสัมพันธ์กัน G ในตำแหน่งที่ 2485 เสมอ สำหรับ C ในตำแหน่งที่ 2559 สัมพันธ์กับ C ในตำแหน่งที่ 2562 ส่วน G, C, A, A, A, A, G, G และ A ในตำแหน่งที่ 2581, 2583, 2587, 2589, 2596, 2598, 2599, 2605 และ 2623 จะสัมพันธ์กันและนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 2715 และ 2727 จะมีความสัมพันธ์กัน (C และ G) ทำให้การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันด้วย ลักษณะดังกล่าวพบในบริเวณ conserved block ของ *P.falciparum* MSP1 เช่นกัน (Jongwutiwes et al., 1992; Jongwutiwes et al., 1993) บริเวณระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่มีความสัมพันธ์กันอาจจะเป็นตำแหน่งของการเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (potential recombination site)ในขณะที่มาลาเรียมีการสืบพันธุ์โดยใช้เพศในยุงก้นปล่อง เช่น อัลลีล 439A และ 452A อาจเกิดจากการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งระหว่าง 2485 ถึง 2559 ระหว่างอัลลีล Sal-1 และอัลลีล Belem สำหรับอัลลีล 425A อาจมีการ แลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ระหว่างอัลลีล Sal-1 และ Belem ในตำแหน่งระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่ 2485 ถึง 2559 และ 2562 ถึง 2581 เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 16 ลักษณะการแลกเปลี่ยนสาร

Figure 16 Postulated recombination between genes for Pv200. Nucleotide substitutions at positions 2471, 2472, 2475, 2485, 2559, 2562, 2581, 2583, 2587, 2589, 2596, 2598, 2599, 2605 and 2623 are shown (see Fig. 8). Upper case letters are nucleotides for Sal-1 and lower case letters for Belem. Dashes and dots indicate intervening sequences and potential recombination sites, respectively. Recombination site between alleles is marked by a cross.



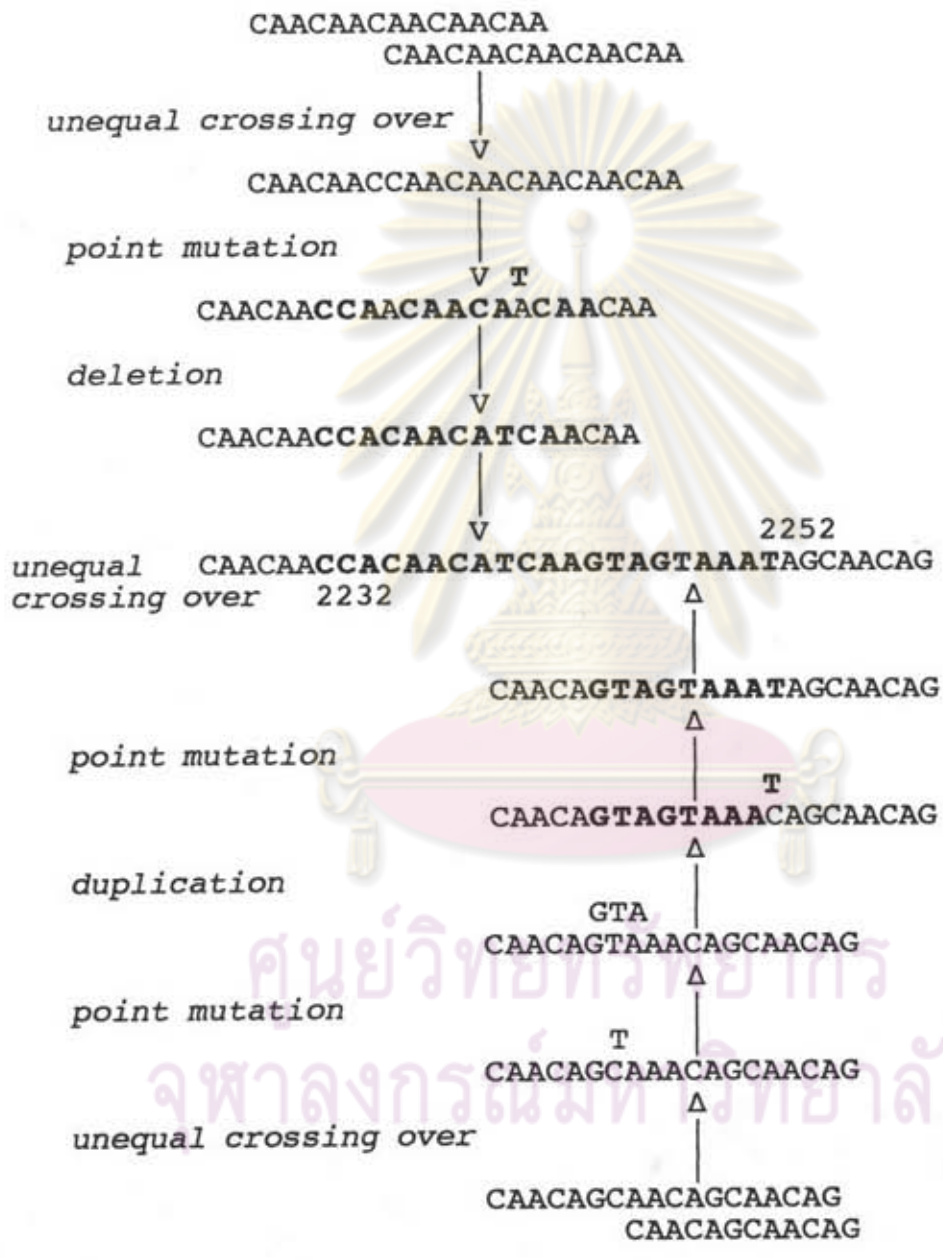
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พันธุกรรมภายในยีนเดียวกัน (intragenic recombination) ในบริเวณ conserved block นี้ Cheng และคณะ (1994) ได้ศึกษาโดยใช้ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P.vivax* จำนวน 18 ไอโซเลตจากประเทศฟิลิปปินส์ สาธารณรัฐประชาชนจีน หมู่เกาะโซโลมอน และหมู่เกาะปาปัวนิวกินี โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ conserved block 4 ตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ที่ 1126 ถึง 2230 พบว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งมีเพียง 2 ชนิดเป็นส่วนใหญ่ และพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กันเสมอซึ่งคล้ายกับ MSP1 ของ *P.falciparum* (Jongwutiwes et al., 1992; Jongwutiwes et al., 1993) อนึ่งการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งในบริเวณ block 6 เช่น C, C, C และ G ในตำแหน่งที่ 2471, 2472, 2475 และ 2485 พบเฉพาะในอัลลีลกลุ่มที่ 3, 4 และ 5 เป็นต้น แสดงว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งอาจเป็นลักษณะเฉพาะของกลุ่มอัลลีล นอกจากนี้ยังพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่งที่เกิดขึ้นในบางอัลลีลโดยไม่มีความสัมพันธ์กับนิวคลีโอไทด์ที่มีการแทนที่ในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งใกล้เคียงกัน ซึ่งการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวนี้อาจเกิดจากการผ่าเหล่า (mutation) และเป็นสาเหตุทำให้เกิดความหลากหลายของอัลลีลมากขึ้น หรืออาจเป็นเพราะการเกิด intragenic recombination หลาย ๆ ครั้งและเกิดหลาย ๆ ตำแหน่งพร้อมกันในอดีตของวิวัฒนาการอันยาวนาน หรือเกิดจากทั้ง mutation และ intragenic recombination ร่วมกันโดยอาจมีกระบวนการคัดเลือกในธรรมชาติ (natural selection) เพื่อให้อัลลีลที่เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมเท่านั้นที่คงอยู่ ซึ่งจำเป็น ต้องมีการศึกษาต่อไปจากวิธีการทดลองหรือใช้ตัวอย่างมากขึ้นในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน block 5 พบว่ามีความหลากหลายมากแต่สามารถจัดได้เป็น 5 กลุ่มอัลลีล โดยกลุ่มอัลลีลที่ 2, 3 และ 4 สามารถอธิบายได้จากการเกิด intragenic recombination ระหว่างอัลลีลในกลุ่มที่ 1 (Sal-1) และกลุ่มที่ 5 (Belem) ซึ่งอาจถือว่าเป็นอัลลีลแม่แบบ โดยการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์อาจเกิดขึ้นได้หลายตำแหน่ง สมมติฐานการเกิด

intragenic recombination เพื่อให้เกิดกลุ่มอัลลีลที่ 2, 3 และ 4 แสดงในรูปที่ 17 การเกิดความหลากหลายของอัลลีลโดย intragenic recombination ในบริเวณ variable block ดังกล่าวสามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับการเกิดความหลากหลายของอัลลีลใน MSP2 ของ *P.falciparum* (Marshall et al., 1991) และ CSP ของ *P.falciparum* (Jongwutiwes et al., 1994) ความหลากหลายดังกล่าวมักจะทำให้คุณสมบัติของแอนติเจนเปลี่ยนแปลงไปด้วยเมื่อองค์ประกอบของกรดอะมิโนภายในเปลี่ยนแปลงไป (Fenton et al., 1991) นอกจากนี้กลไกทางพันธุกรรมอื่นที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดความหลากหลายภายใน กลุ่มอัลลีลได้แก่ การเพิ่มของโคดอนในบางตำแหน่งของอัลลีลกลุ่มที่ 1 หรือการขาดหายไปของบางโคดอนในกลุ่มที่ 5 ตลอดจนการทวีจำนวน (duplication) ของโคดอนที่สร้าง glutamine ในอัลลีลกลุ่มที่ 3, 4 และ 5 อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตุว่าอัลลีลกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งน่าจะเกิดจาก intragenic recombination ระหว่างอัลลีล Sal-1 และ Belem นั้นล้วนมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 5' เหมือนกับ Sal-1 ทั้งหมดโดยไม่พบอัลลีลที่มีส่วน 5' เหมือน Belem และส่วน 3' เหมือน Sal-1 เลยซึ่งอัลลีลดังกล่าวอาจตรวจไม่พบหากใช้ตัวอย่างศึกษาจำนวนไม่มากหรือในธรรมชาติอาจปรากฏอยู่ในปริมาณ น้อย ๆ หรือในทางตรงข้ามอัลลีลดังกล่าวอาจเกิดขึ้นแต่ไม่เหมาะในการเจริญเติบโตจึงตายไปในที่สุด เมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบและลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ block 6 พบว่ามี C และ A เป็นองค์ประกอบอยู่มากในแต่ละกลุ่มอัลลีลประมาณร้อยละ 61 ถึง 71 และยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่โคดอนของ glutamine มีกลุ่มของนิวคลีโอไทด์ CA, CAA, CAAA, CAG หรือ CAAG แทรกอยู่ทั่วไป ทำให้เกิดแนวความคิดว่า สายบรรพบุรุษร่วมกัน (common ancestry) ของอัลลีล Sal-1 และอัลลีล Belem อาจจะมีองค์ประกอบของ CAA หรือ CAG ที่ซ้ำ ๆ กันเป็นพื้นฐาน จากรูปที่ 17 แสดงสมมติฐานของการเกิดลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของอัลลีล Sal-1 และอัลลีล Belem ที่ไม่ใช่บริเวณของ นิวคลีโอไทด์ที่สร้าง glutamine ซ้ำ ๆ กัน โดยอาศัยกลไกทางพันธุกรรมต่าง ๆ เช่น การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมแบบไม่สมดุลย์

Figure 17 Postulated generation of part of Sal-1 block 5 sequence (nucleotides 2232 to 2252), as shown in bold, from common ancestral repeat sequences by unequal crossing overs, point mutations, deletions and duplications.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(unequal crossingover), point mutation, duplication, หรือ deletion เป็นต้น ซึ่งมีส่วนคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของคนชนิด mini-satellite (Jeffreys, et al., 1985) โดยกลไก unequal crossingover นี้อาจเกิดขึ้นคล้ายกับดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ กัน (Smith, 1976; Charlesworth et al., 1994)

การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ block 4 และ block 6 มีการแทนที่ทั้งชนิด transition และ transversion โดยพบชนิด transition มากกว่า transversion (ร้อยละ 75 และร้อยละ 25 ตามลำดับ) ซึ่งคล้ายกับการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน block 3 ของ *P.falciparum* MSP1 โดยพบ transition ร้อยละ 74.4 และ transversion ร้อยละ 25.6 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยีน Pv200 และ *P.falciparum* MSP1 มีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกัน กล่าวคือมี A+T สูง (ร้อยละ 70 สำหรับ *P.vivax* และร้อยละ 80 สำหรับ *P.falciparum*) (Weber, 1988) ในขณะที่ G+C จะต่ำ ทำให้การเลือกใช้โคดอนสำหรับกรดอะมิโนแต่ละชนิด (codon usage) มีความแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีองค์ประกอบของ A+T และ G+C ที่มีค่าใกล้เคียงกัน (Saul & Battistutta, 1988) ดังนั้นการสร้าง recombinant protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากในแบคทีเรียมักจะประสบปัญหาเช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาถึงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ในโคดอนพบว่า transition ที่เกิดขึ้นในตำแหน่งที่ 1 และ 3 มีมากกว่าตำแหน่งที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับ transversion อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก nonsynonymous substitution มีมากกว่า synonymous substitution โดยพบร้อยละ 57.57 และ 42.43 ตามลำดับซึ่งใกล้เคียงกับการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน block 3 ของ *P.falciparum* MSP1 (nonsynonymous substitution พบร้อยละ 60 และ synonymous substitution พบร้อยละ 40) ทำให้การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งของโคดอนค่อนข้างเบี่ยงเบน (bias) ไปจากการกระจายปกติ (normal distribution) เนื่องจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์

โดยทั่วไปในตำแหน่งที่ 1 ของโคดอน จะมีโอกาสเกิด synonymous substitution ร้อยละ 5 และการแทนที่ในตำแหน่งที่ 3 จะมีโอกาสเกิด synonymous substitution มากถึงร้อยละ 72 ในทางตรงข้ามการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 2 จะไม่มีโอกาสเกิด synonymous substitution เลย อย่างไรก็ตามการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนอื่น ๆ อาจจะมีลักษณะแตกต่างไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องหรือปัจจัยภายในถ้าบริเวณดังกล่าวเป็นตำแหน่งที่มีหน้าที่สำคัญของโมเลกุล เช่น บริเวณ C-terminus ใน CSP ของ *P.falciparum* ประกอบด้วย T cell epitopes ซึ่งจะพบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วน 3' ของยีนจำเพาะต่อบริเวณที่สร้าง T cell epitope หลายตำแหน่งและเป็น nonsynonymous substitution ทั้งหมด (Lockyer et al., 1989; Jongwutiwes et al., 1994) ในบริเวณดังกล่าวของ *P.vivax* พบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ และมีความหลากหลายอยู่มากเช่นเดียวกัน (Qari et al., 1992) ในทางตรงข้ามบริเวณ RI และ RII ของยีน CSP ทุกชนิดจะพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคงที่เสมอ เป็นต้น

เมื่อพิจารณาถึงการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในโคดอนโดยทั่วไปรวมทั้งในบริเวณ block 4 และ 6 ของ PV200 จะพบว่าส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งที่ 3 ซึ่งมีโอกาสเกิด synonymous substitution ได้มากที่สุด ในเชิงวิวัฒนาการของโมเลกุล (molecular evolution) นั้นมีแนวคิดที่สำคัญต่างกัน 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เชื่อว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นอย่างไม่เฉพาะเจาะจง และเมื่อเกิดขึ้นแล้วจะมีการคงที่ในบางตำแหน่งอย่างไม่เฉพาะเจาะจงเช่นกัน (random fixation) โดยปัจจัยภายนอกไม่มีส่วนเกี่ยวข้องหรือเกี่ยวข้องน้อยมาก (neutral mutation-random drift theory) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในหรือหน้าที่ (functional constraint) ของโมเลกุลกล่าวคือถ้าโปรตีนใดมี functional constraint มากหรือการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนทำให้สูญเสียหน้าที่ได้ง่าย อัตราการเกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จะเกิดขึ้นช้ากว่าโมเลกุลที่มี functional constraint ต่ำ ดังนั้นโดยทั่วไปการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จึงมัก

เกิดในตำแหน่งที่ 3 ของโคดอนซึ่งมีโอกาสเกิด synonymous substitution ได้มากที่สุด ทำให้เกิดความหลากหลายของอัลลีล (Kimura, 1977; Miyata et al., 1979) ในทางตรงข้ามกลุ่มที่มีแนวความคิดเกี่ยวกับผลจากปัจจัยภายนอกทำให้การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มีความหลากหลายและทำให้อัลลีลที่เหมาะสมเจริญหรือเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นกว่าอัลลีลอื่น (neo-Darwinian theory) (Lenski & Mittler, 1993) ดังเช่นการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่เป็น antigenic sites ของ influenza A virus ซึ่งทำให้ไวรัสสามารถหลบหนีจากการถูกทำลายโดยภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Fitch et al., 1991) เป็นต้น แต่จากการวิเคราะห์การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ block 4 และ 6 พบทั้ง synonymous และ nonsynonymous substitution ใกล้เคียงกันและพบได้มากถึง 48 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งเดียวกันในอัลลีลที่ต่างกันน่าจะเป็นผลจากการเกิด intragenic recombination ระหว่างอัลลีลแม่แบบที่ต่างกันมากกว่าการเกิด mutation ในแต่ละอัลลีลที่บังเอิญมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน (homoplasy) เนื่องจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในหลายตำแหน่งมีความสัมพันธ์กัน แม้ว่าในสายวิวัฒนาการของยีน Pv200 อาจเกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์อย่างไม่เฉพาะเจาะจงในอดีตอันยาวนาน แต่อาจจะมี functional constraint ทำให้การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นจำกัดเฉพาะบางตำแหน่ง (fixation) หรืออาจเป็นข้อจำกัดขององค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของมาลาเรียที่มี A+T สูงมากกว่า G+C อันอาจเป็นผลจากลักษณะเฉพาะของ DNA polymerase ของมาลาเรียและสัดส่วนของนิวคลีโอไทด์อิสระ (free nucleotides) ภายในเซลล์ดังเช่นการเกิด mutation ในจีโนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในยีน (Wolfe et al., 1989) อย่างไรก็ตามในวงชีวิตของมาลาเรียจำเป็นต้องอาศัยอยู่ในโฮสต์ตลอดเวลา โดยขณะที่มีการเพิ่มจำนวนโดยไม่ใช้เพศที่เกิดขึ้นในคนนั้นเชื้อมาลาเรียจะได้รับแรงกดดันจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (immune pressure) ดังนั้นในบริเวณที่เป็น antigenic sites ที่เกี่ยวข้องอาจถูกผลักดันให้เกิดการ

แทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่มีความหลากหลายและทำให้กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบเปลี่ยนแปลงไปดังในกรณีของ lymphocytic choriomeningitis virus ที่หลบเลี่ยงจากการทำลายโดย cytotoxic T cell ของโฮสต์โดยการเกิด point mutation ในส่วนของ T cell epitopes (Pircher et al., 1990) หรือในกรณีของ human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) พบว่ามีอัตราการเกิด point mutation ในอัตราที่รวดเร็วมากในขณะที่โฮสต์มีกลไกการทำลายไวรัสอย่างต่อเนื่อง (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995) แม้ในมาลาเรียยังไม่มีข้อมูลดังกล่าวชัดเจนแต่พบว่าปัจจัยภายนอกสามารถทำให้เกิด point mutation ได้ เช่น *P.falciprum* ที่ถูกเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีระดับยา mefloquine สูงเป็นระยะเวลานาน (Peel et al., 1994)

แม้ว่าจะไม่มีข้อสรุปชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการเกิดความหลากหลายของอัลลีล Pv200 โดยการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์แต่เมื่อพิจารณาในระดับกรดอะมิโนจะพบว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่มักจะไม่ทำให้กรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปมีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก ดังนั้นลักษณะการแทนที่ของกรดอะมิโนบริเวณ block 4 และ 6 อาจจะขึ้นอยู่กับ functional constraint มากกว่าผลของ natural selection ซึ่งเมื่อพิจารณา hydropathy profile ในบริเวณดังกล่าวของแต่ละกลุ่มอัลลีล แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในบางตำแหน่ง แต่จะพบลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกัน

สำหรับบริเวณ block 5 ซึ่งเป็น variable block พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละกลุ่มอัลลีลนอกจากจะมีความหลากหลายแล้วยังมีจำนวนนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน บริเวณดังกล่าวส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด hydrophilic ดังนั้นบริเวณ block 5 จึงน่าจะเป็นส่วนของโมเลกุลที่อยู่นอกเซลล์เมมเบรน และจากการศึกษาโดยใช้แอนติบอดีชนิด monoclonal ต่อ block 5 พบว่าทำให้เกิดปฏิกิริยา immunofluorescence ปรากฏที่ผิวของระยะไซซอนต์ของ *P.vivax* ได้ แสดงว่าบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนที่อยู่พ้นผิวเซลล์ (Mancilla et al., 1994) เป็นที่น่าสังเกตว่าลักษณะของ hydropathy

profile ของ block 5 มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอัลลีล และน่าจะมีโครงสร้างสามมิติหรือรูปร่าง (conformation) แตกต่างกันไปด้วย ดังนั้นบริเวณดังกล่าวน่าจะมี functional constraint น้อยกว่าบริเวณ block 4 และ block 6 ทั้งนี้ในระดับนิวคลีโอไทด์จะพบว่าบริเวณ block 5 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ กัน หรือคล้ายคลึงกันแทรกอยู่ทั่ว ๆ ไป ลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันนี้มักจะมีแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายโดยกระบวนการทางพันธุกรรม เช่น unequal crossingover หรือ gene conversion เป็นต้น ซึ่งในแอนติเจนของมาลาเรียชนิด *P.falciparum* พบความหลากหลายในองค์ประกอบของความยาวในบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเช่นเดียวกัน อาทิ บริเวณ block 2 ของ *P.falciparum* MSP1 และบริเวณ tetrapeptide repeatsใน CSP ของ *P.falciparum* เป็นต้น แต่ในระดับกรดอะมิโนจะพบว่า ลำดับกรดอะมิโนมักเปลี่ยนแปลงไม่มากเท่าการเปลี่ยนแปลงในระดับนิวคลีโอไทด์

ภาวะการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P.vivax* ต่อ Pv200 มีข้อมูลอยู่ค่อนข้างจำกัดเฉพาะบริเวณส่วน N-terminus ของโปรตีน จากการศึกษาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ recombinant Pv200 protein ในส่วนของ block 1 ถึง block 4 โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยในประเทศบราซิล พบว่าร้อยละ 90 มีแอนติบอดีต่อโปรตีนในบริเวณดังกล่าว โดยพบ IgG ร้อยละ 83 และ IgM มากกว่าครึ่งของประชากรที่ศึกษา (Mertens et al., 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีที่เกิดขึ้นมักจะตอบสนองต่อโปรตีนในส่วนที่เป็น variable หรือ semiconserved block (Levitus et al., 1994) แสดงว่าบริเวณดังกล่าวประกอบด้วย B cell epitope ที่สามารถกระตุ้นได้จากการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P.vivax* ในธรรมชาติ สำหรับบริเวณ block 5 ซึ่งเป็น variable block นั้นพบว่า IgG ของผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P.vivax* มีการตอบสนองต่อโปรตีนในบริเวณดังกล่าว แต่ไม่พบการตอบสนองในผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P.falciparum* หรือผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อมาลาเรียมาก่อน แสดงว่าแอนติบอดีต่อบริเวณ block 5 มีความจำเพาะต่อชนิดของมาลาเรีย นอกจาก

นี้ยังพบว่า IgG ที่เกิดขึ้นยังมีความจำเพาะต่ออัลลีลอีกด้วย (Mancilla et al., 1994)

แม้ว่าการตอบสนองของ T cell ต่อบริเวณดังกล่าวยังไม่มีผู้ทำการศึกษา แต่จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่มีลักษณะของ T cell epitope motif โดยอาศัยข้อมูลจาก Rothbard และ Taylor (1988) พบลำดับกรดอะมิโนที่น่าจะเป็น T cell epitope motif อยู่ทั่วไปในบริเวณที่ศึกษา ยกเว้นบริเวณที่มี glutamine เรียงติดต่อกันซ้ำ ๆ กัน และส่วนของ block 5 ที่ต่อจากบริเวณดังกล่าวในกลุ่มอัลลีลที่ 3, 4 และ 5 (ดูรูปที่ 14) ซึ่งโดยทั่วไปลำดับกรดอะมิโนที่มีการเรียงตัวซ้ำ ๆ กัน มักจะไม่ใช่ T cell epitope motif เช่นบริเวณ block 2 ใน MSP1 ของ *P.falciparum* ที่มีอัลลีลในกลุ่มของ MAD20 หรือ K1 และบริเวณ tetrapeptide repeats ใน CSP ของ *P.falciparum* เป็นต้น เป็นที่ทราบกันว่าโปรตีนส่วนที่มีลำดับกรดอะมิโนซ้ำ ๆ กัน มักจะสามารถกระตุ้น B cell ได้โดยไม่ต้องอาศัย T cell (T cell-independent B cell response) โดยอาศัยการเชื่อมโยง (crosslink) ระหว่าง hapten-specific surface immunoglobulin ตัวอย่างของแอนติเจนดังกล่าว เช่น คาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรีย คอลลาเจน (collagen) และแฟลกเจลลิน (flagellin) เป็นต้น จากการทดสอบการตอบสนองของ B cell ต่อบริเวณ tetrapeptide repeats ของ *P.falciparum* พบว่าบริเวณดังกล่าวสามารถกระตุ้น B cell โดยไม่ต้องอาศัย T cell เลย ดังนั้นบริเวณ repeats จึงกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ B cell ที่ไม่มีประสิทธิภาพเท่าแอนติเจนที่กระตุ้น B cell โดยอาศัย T cell (T cell-dependent response) เนื่องจากแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะจับกับแอนติเจนได้ไม่ดี (low affinity) และมักไม่เกิดการจดจำแอนติเจนในภายหลัง (poor memory formation) ดังนั้นการทำลายเชื้อจึงเป็นไปอย่างไม่ได้ผลเต็มที่ นอกจากนี้บริเวณ repeats มักจะกระตุ้น B cell ได้ดี (immunodominant) จึงเกิดการปิดกั้น (suppress) การตอบสนองต่อ epitope ที่อยู่ใกล้เคียงกันภายในโมเลกุลเดียวกัน (cis-acting) คุณสมบัติ

ของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบใน repeats มักจะเป็นชนิด hydrophilic และมีโครงสร้างสามมิติที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามความแตกต่างขององค์ประกอบกรดอะมิโนใน repeats อาจเกิดขึ้นได้โดยไม่ทำให้ประสิทธิภาพการกระตุ้น B cell ลดลง ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบอัลลีลในส่วน repeats ที่มีความหลากหลายได้และมีความเหมาะสม (fit) ทัดเทียมกันใน กลุ่มประชากร ซึ่งไม่ได้เกิดจากผลของ natural selection โดยภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน แต่เป็นผลของ neutral mutation-random drift (Schofield, 1991) จากการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วยบางรายมีการติดเชื้อ *P.vivax* ปะปนกันระหว่างอัลลีลใน block 5 ของ Pv200 (ไอโซเลต TD207, TD425, TD430, TD439 และ TD458) แสดงว่าอัลลีลที่ต่างกันสามารถลุกลามและเจริญในเม็ดเลือดแดงภายใต้ระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์เดียวกัน แม้ว่าจะยังไม่มีการศึกษากลไกการตอบสนองของ B cell ต่อ block 5 ของ Pv200 แต่ความหลากหลายของอัลลีลในบริเวณดังกล่าว อาจมีส่วนช่วยให้มาลาเรียสามารถอยู่รอดจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ที่ไม่มีประสิทธิภาพ ถ้าบริเวณดังกล่าวกระตุ้นให้เกิด T cell-independent B cell response นอกจากนี้แอนติบอดีที่เกิดขึ้นต่ออัลลีลหนึ่ง ๆ ยังมีความจำเพาะด้วย (Mancilla et al., 1994) ดังนั้นการพบอัลลีลที่มีความหลากหลายในเขตปรากฏโรคบริเวณเดียวกันอาจมีผลให้ภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *P.vivax* ที่มีอัลลีลต่างกันเกิดขึ้นได้ช้า (Gupta et al., 1994)

แม้ว่าการศึกษานี้พบว่าทุกไอโซเลตที่ศึกษามีอัลลีล Pv200 ที่แตกต่างกันและบางไอโซเลตมีมากกว่า 1 อัลลีล ความหลากหลายที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นผลจากการผสมพันธุ์ระหว่างแกมีตเพศผู้และเพศเมียที่มีอัลลีลแตกต่างกันในระยะที่อยู่ในยุง ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นอย่างไม่เฉพาะเจาะจง ดังเช่นผลการศึกษาของ Walliker (1991) ใน *P.falciparum* และการพบอัลลีลที่ต่างกันในผู้ป่วยคนเดียวกันย่อมทำให้โอกาสที่อัลลีล Pv200 ต่างกันเกิด recombination ในยุงได้มากขึ้นเมื่อยุงดูดเลือดคนเพียงคนเดียว ดังนั้นประชากรของมาลาเรียจึงอาจมีลักษณะที่เกิดจากการผสมพันธุ์และเกิดการแลกเปลี่ยนส่วนของอัลลีลอย่างไม่เฉพาะเจาะ

จง (panmixia) ดังเช่นการตรวจพบความหลากหลายของอัลลีลในกลุ่มประชากร ในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของ อัลลีล Pv200 ยังไม่สามารถใช้ปฏิเสธทฤษฎีเกี่ยวกับประชากรของโปรโตซัว (รวมทั้งมาลาเรีย) ว่ามีลักษณะเป็น clonal population กล่าวคือประชากรดังกล่าวแม้บางระยะที่มีการสืบพันธุ์โดยใช้เพศแต่อัตราการเกิด recombination ระหว่างอัลลีลที่ต่างกันมีน้อยมากกว่าการเกิดการปฏิสนธิภายในอัลลีลเดียวกัน (self-fertilization) ซึ่งอาจจะไม่มีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างแกมมีตเลย เป็นที่น่าสังเกตุว่าทฤษฎีดังกล่าวไม่ได้ปฏิเสธ recombination โดยสิ้นเชิง ความหลากหลายของอัลลีลอาจเกิดจากกลไกทางพันธุกรรมในสายวิวัฒนาการอันยาวนาน (Tibayrenc et al., 1990; Tibayrenc & Ayala, 1991) ดังนั้นแม้ว่า recombination ระหว่างอัลลีลที่ต่างกันจะมีโอกาสทำให้ลูกหลานมีอัลลีลต่างไป แต่การปฏิสนธิภายในอัลลีลที่เหมือนกันเป็นส่วนใหญ่ ย่อมมีโอกาสทำให้การเพิ่มจำนวนของประชากรมาลาเรียมีลักษณะของ clonality ได้ ซึ่งถ้าพิจารณาในการศึกษาความหลากหลายของแอนติเจนต่าง ๆ โดยทั่วไปจะพบว่าไอโซเลตที่ใช้ศึกษาได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียในระยะเฉียบพลัน ซึ่งไม่ใช่การสุ่มตัวอย่างที่ดีในการศึกษา กล่าวคือผู้ที่มีเชื้อมาลาเรียโดยไม่มีอาการมักจะไม่ถูกเลือกด้วย นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงชีววิทยาของมาลาเรียจะพบว่าช่วงเวลาที่จะเกิดการปฏิสนธิของแกมมีตเกิดขึ้นภายหลังจากยุงก้นปล่องดูดเลือดคนที่มีระยะแกมมีโตไซต์เพียง 30 นาที โดยปริมาณเลือดที่ยุงดูดไปนั้นมีเพียง 3 µl และจากการศึกษาของ Burkot และคณะ (1988) พบว่าสปอร์โรซอยต์ที่อยู่ในต่อมน้ำลายยุงมีอัลลีลต่างกันน้อยกว่าร้อยละ 20 ดังนั้นโอกาสที่จะเกิด self-fertilization จึงเป็นไปได้มากกว่า อนึ่งประชากรที่มีลักษณะ panmixia มักจะมีสัดส่วนของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียใกล้เคียงกัน ซึ่งจะทำให้อัลลีลที่ต่างกันเกิดการปฏิสนธิและแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมมีโอกาสเกิดขึ้นได้มาก ในขณะที่กลุ่มประชากรที่มีลักษณะ clonality จะมีสัดส่วนเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมากกว่าเนื่องจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จำนวนมากกว่าที่จำเป็นไม่ช่วยให้การปฏิสนธิดำเนินไปได้มากขึ้น จากการศึกษาสัดส่วนแกมมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมียของ

P.falciparum พบสัดส่วนของเพศผู้เพียง 0.18 (Day et al., 1992) ดังนั้นโครงสร้างประชากรของมาลาเรียจึงอาจไม่ใช่ลักษณะของ panmixia โดยแท้จริง อย่างไรก็ตามแม้จะไม่มีข้อสรุปชัดเจนเกี่ยวกับลักษณะประชากรของมาลาเรีย การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอัลลีล Pv200 ที่ปรากฏ ในประเทศไทยมีความหลากหลายเช่นเดียวกับ MSP1 ของ *P.falciparum* (Jongwutiwes et al., 1991) ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการเข้าใจลักษณะของ *P.vivax* เมื่อมีการศึกษาเปรียบเทียบกับข้อมูลดังกล่าวในอนาคต

การศึกษาอัลลีล Pv200 ในระดับนิวคลีโอไทด์ทำให้ทราบขอบเขตของความหลากหลายได้ลึกซึ้งกว่าวิธี Southern blot hybridization และ PCR เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละกลุ่ม พบว่ามีตำแหน่งที่สามารถถูกตัดได้โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายในหลายตำแหน่ง และมีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอัลลีล ดังแสดงในรูปที่ 15 ดังนั้นข้อมูลที่ได้จึงมีประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบอัลลีลของ Pv200 ในบริเวณ block 4, 5 และ 6 ได้อย่างรวดเร็วและมีความละเอียดกว่าวิธี Southern blot hybridization โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวโดยวิธี PCR และเลือกตัดผลิตผล PCR โดยเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะสำหรับแต่ละกลุ่มอัลลีล เช่น เมื่อใช้ *Pst* I จะตัดผลิตผล PCR เฉพาะกลุ่มอัลลีลที่ 1 และ 2 เท่านั้น ซึ่งสามารถแยกกลุ่มอัลลีลทั้งสองโดยใช้ *Tag* I อัลลีลในกลุ่มที่ 1 จะมีผลิตผล PCR ที่มีขนาด 94 และ 54 bp ในขณะที่กลุ่มอัลลีลที่ 2 จะมีขนาด 131 bp โดยส่วนอื่นจะมีขนาดเท่ากัน เมื่อใช้ *Spe* I จะแยกกลุ่มอัลลีลที่ 3 ออกจากกลุ่มอัลลีลที่ 4 และ 5 โดยกลุ่มอัลลีลที่ 3 จะมีขนาด 416 และ 520 bp ในขณะที่กลุ่มอัลลีลที่ 4 และ 5 จะมีขนาด 444 และ 538 bp ตามลำดับ สำหรับอัลลีลในกลุ่มที่ 4 และ 5 สามารถแยกจากกันโดย *Hae* III ซึ่งมีตำแหน่งตัดเฉพาะในกลุ่มอัลลีลที่ 5 โดยมีขนาด 307 bp วิธีการดังกล่าวมีผู้ใช้ตรวจสอบอัลลีล MSP2 ของ *P.falciparum* (Felger et al., 1993) ทำให้การศึกษาตัวอย่างมาลาเรียจำนวนมากในอนาคตเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว และมีประโยชน์ในการศึกษาพันธุประชากรของ

มาลาเรียการตรวจสอบการแพร่กระจายของมาลาเรียในธรรมชาติ และเป็นพื้นฐานในการผลิตวัคซีนตลอดจนการตรวจสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย