การตรวจสอบอัลลีลของยีน ที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ (MSP1) ของ *Plasmodium falciparum* อย่างรวดเร็วโดยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชันและการวิเคราะห์โดยเอนโดนิวคลีเอสชนิดตัดจำเพาะ

นางสาวสุนีย์ สีธรรมใจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-753-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16588903

RAPID ALLELIC TYPING OF THE *Plasmodium falciparum* MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1 (MSP1) GENE BY POLYMERASE CHAIN REACTION AND RESTRICTION ENDONUCLEASE ANALYSIS

Miss Sunee Seethamchai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-631-753-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบอัลลีลของยีน ที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ (MSP1) ของ *Plasmodium falciparum* อย่างรวดเร็วโดยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชันและการวิเคราะห์โดยเอนโดนิวคลีเอสชนิดตัดจำเพาะ
โดย	นางสาวสุนีย์ สีธรรมใจ
ภาควิชา	ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. พงชัย หาญยุทธนากร)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ขอสงวนลิขสิทธิ์ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุนีย์ สีธรรมใจ : การตรวจสอบอัลลีลของยีน ที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ (MSP1) ของ *Plasmodium falciparum* อย่างรวดเร็วโดยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชันและการวิเคราะห์โดยเอนโดนิวคลีเอสชนิดตัดจำเพาะ (RAPID ALLELIC TYPING OF THE *Plasmodium falciparum* MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1 (MSP1) GENE BY POLYMERASE CHAIN REACTION AND RESTRICTION ENDONUCLEASE ANALYSIS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. สดศรี ไทยทอง, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์, 144 หน้า . ISBN 974-631-753-9

โปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ของ พลาสโมเดียม ฟาลซิปารั่ม (MSP1) เป็นโปรตีนที่มีศักยภาพในการผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียสำหรับระยะที่เชื้อเจริญในเม็ดเลือดแดงโดยไม่ใช้เพศ โปรตีนชนิดนี้มีความหลากหลายของแอนติเจนระหว่างไอโซเลตมาก ดังนั้น MSP1 จึงสามารถใช้เป็นตัวแยกความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของมาลาเรียที่น่าสนใจชนิดหนึ่ง อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจสอบจีโนไทป์ของ MSP1 ทั้งโมเลกุลถูกจำกัดโดยยีนที่มีขนาดใหญ่และปรากฏเป็น 2 รูปแบบ (dimorphic) โดยสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมภายในยีนจึงเกิดอัลลีลที่ต่างกัน การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบจีโนไทป์ของ MSP1 อย่างรวดเร็วโดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนของยีนตั้งแต่ block 1 ถึง 5 block 5 ถึง 13 และ block 12 ถึง 17 แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน ดังนั้นสามารถแยกอัลลีล K1 และ RO33 ในส่วนของ block 2 โดยตำแหน่งตัดจำเพาะของ *Alu*I และ *Pst*I ในบริเวณดังกล่าวตามลำดับ นอกจากนี้ในส่วนของ block 4 สามารถแยกอัลลีล K1 และ MAD20 ได้โดยย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Hae*III สำหรับผลิตผล PCR ตั้งแต่ block 5 ถึง 13 และ block 12 ถึง 17 สามารถแยกชนิดของอัลลีลโดยการย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Dra*I และ *Hind*III ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีดังกล่าวโดยใช้ไอโซเลตที่ทราบอัลลีลจำนวน 15 ไอโซเลต และ 1 สายพันธุ์ และไม่ทราบอัลลีล 10 ไอโซเลต และ 4 สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ probe ที่มีความจำเพาะต่ออัลลีลพบว่าให้ผลสอดคล้องกัน นอกจากนี้การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยวิธีนี้สามารถตรวจพบการปะปนของเชื้อที่มีอัลลีล MSP1 ต่างกันใน 8 ไอโซเลต โดยมีขีดจำกัดของการตรวจเมื่อเชื้อมีจำนวนไม่ต่ำกว่า 4 ตัว ดังนั้นวิธีดังกล่าวสามารถตรวจสอบจีโนไทป์ของ MSP1 ได้ทั้งอัลลีล และน่าจะใช้ศึกษาลักษณะที่ต่างกันในกลุ่มประชากรของ *P. falciparum*

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C425261 : MAJOR ZOOLOGY
# #
KEY WORD: *Plasmodium falciparum* / MSP1 GENE / PCR

SUNEE SEETHAMCHAI : RAPID TYPING OF *Plasmodium falciparum* MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1 (MSP1) GENE BY POLYMERASE CHAIN REACTION AND RESTRICTION ENDONUCLEASE ANALYSIS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SODSRI THAITHONG, M. Sc., THESIS CO-ADVISOR : ASS. PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D., Ph.D.

144 pp. ISBN 974-631-753-9

The merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* is a potential vaccine candidate for asexual blood-stage malaria vaccine. MSP1 exhibits extensive antigenic diversity among parasite isolates. Therefore, MSP1 is also an attractive marker for differentiating parasite isolates. However, methods for genotyping the entire MSP1 have been limited because of its large dimorphic gene capable of intragenic recombination, generating different alleles. In the present study, rapid MSP1 genotyping is developed, exploiting polymerase chain reaction to amplify the MSP1 gene encompassing blocks 1 and 5, blocks 5 and 13 , and blocks 12 and 17, followed by restriction endonuclease digestions. Thus, K1 type and RO33 type could be identified by *Alu*I site and *Pst*I site in block 2, respectively . In addition, block 4 of K1 type and MAD20 type were determined by *Hae*III digestion. On the other hand, PCR products from blocks 5 to 12 and from blocks 12 to 17 could be typed by *Dra*I and *Hind*III digestions, respectively. This technique has been verified using 15 *P. falciparum* field isolates and 1 clone of known MSP1 alleles, 10 uncharacterized field isolates and 4 clones. Concordant results were obtained from Southern blot hybridization with allele-specific probes and the technique developed in this study. Furthermore, genotyping by this technique could detect mixed infections of different MSP1 alleles in 8 isolates. The limit in the quantity required is as low as 4 parasites. Therefore, genotype of the entire MSP1 allele can be examined by this technique and should be suitable for characterization of *P. falciparum* population.

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ มาด้วยดียิ่งตลอด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้ด้วย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ความเข้าใจ ข้อแนะนำในการแก้ปัญหาต่างๆ ในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ มาด้วยดียิ่งตลอด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ อาจารย์ ดร. พงชัย หาญยุทธนากร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้อง และสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อช่วยเหลือในด้านสถานที่ และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ ศูนย์วิจัยมาลาเรียร่วมองค์การอนามัยโลก เพื่อการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย ที่ใช้ในการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่แผนกโสตทัศนศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการถ่ายภาพ และสไลด์ ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนใหญ่ จากเงินทุนวิจัยที่ทางองค์การอนามัยโลกมอบให้แก่ รองศาสตราจารย์สดศรี ไทยทอง ในโครงการ ID800 279 Epidemeology and Immune Response to Potential Candidate vaccine Antigen for a P. falciparum Blood Stage Vaccine และทุนวิจัยจากโครงการชีวโมเลกุล ปีพ.ศ 2537-2538 ที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มอบให้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ และบางส่วนจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย นอกจากนี้วัสดุอุปกรณ์บางส่วนได้

รับการสนับสนุนจากภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณ องค์การอนามัยโลก คณะแพทยศาสตร์ และ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ โครงการผลิต และพัฒนาอาจารย์มหาวิทยาลัย ทบวงมหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนการศึกษา ในระหว่างปีการศึกษา 2534-2535

ขอขอบพระคุณ ทุกๆ ท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ และพี่น้องทุกคน ที่ให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....จ

กิตติกรรมประกาศ .....ฉ

สารบัญตาราง .....ฌ

สารบัญรูป .....ญ

คำย่อ .....ฏ

บทที่

1 บทนำ 1

2 บทสืบสวนเอกสาร 4

3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 27

4 ผลการทดลอง 49

5 วิจารณ์ผลการทดลอง 110

6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 119

รายการอ้างอิง 121

ภาคผนวก 133

ภาคผนวก ก 134

ภาคผนวก ข 138

ประวัติผู้เขียน 144

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงผลการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ภายหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย MSP1 หรือส่วนอื่นๆ ของ MSP1 23-24

2 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* แหล่งที่มา และปีที่ทำการเก็บเชื้อ ที่ทราบ MSP1 allele จำนวน 1 สายพันธุ์ และ 15 ไอโซเลต 27-28

3 แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* แหล่งที่มา และปีที่ทำการเก็บเชื้อ ที่ไม่ทราบ MSP1 allele จำนวน 4 สายพันธุ์ และ 10 ไอโซเลต 28-29

4 แสดงผลการวิเคราะห์อัลลีลจากการตัดผลิตผล PCR ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายในของยีน MSP1 56

5 แสดงผลการวิเคราะห์อัลลีลใน block ต่างๆ ที่ได้จากผลการทำ Southern blot hybridization 60

6 รูปแบบอัลลีลของยีน MSP1 จากการทำ Southern blot hybridization และ DNA sequencing เปรียบเทียบกับผลการศึกษาโดยวิธี PCR และ Restriction endonuclease ในกลุ่มตัวอย่างที่ทราบอัลลีลจำนวน 16 ตัวอย่าง 92

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 แผนภาพวงชีวิตของมาลาเรีย 7

2 แสดงโครงสร้าง และความหลากหลายของยีน MSP1 ในสายพันธุ์ต่างๆ 15

3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน *Pst*I (-CTGCA/G-) และ *Alu*I (-AG/CT-) ของ K1 type, MAD20 type และ RO33 type 18

4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน *Hae*III (-GG/CC-) ของ K1 type 19

5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน *Dra*I (-TTT/AAA-) และ *Hind*III (-A/AGCTT-) ของ K1 type และ MAD20 type 20

6 ตำแหน่งของ PCR primers P1, P2, P3, P4, P5 และ P6 บนยีน MSP1 39

7 ส่วนประกอบของ vacuum blotter 42

8 ตำแหน่งของ Probes ที่ใช้ใน block 2, 4, 6 และ 16 ของอัลลีล K1, MAD20 และ RO33 ใน Southern blot hybridization 44

9 แสดงผลิตผลจาก PCR ในช่วง block 1 ถึง block 5 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ∅X174/*Hae*III 62-64

10-19 แสดงแถบดีเอ็นเอบน 1.7% อะกาโรสเจล ของผลิตผลจาก PCR และแถบดีเอ็นเอ จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Pst*I และ *Alu*I เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda/*Hind*III/*Eco*RI และ ∅X174/*Hae*III.....65-84

20-25 แสดงแถบดีเอ็นเอบน 1.7% อะกาโรสเจล ของผลิตผลจาก PCR และแถบดีเอ็นเอ จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hae*III เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ∅X174/*Hae*III.....85-96

26-28 แสดงแถบดีเอ็นเอบน 1% อะกาโรสเจล ของผลิตผลจาก PCR ในช่วง block 5 ถึง block 13 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda/*Hind*III/*Eco*RI 97-102

29-31 แสดงแถบดีเอ็นเอบน 1% อะกาโรสเจล ของผลิตผลจาก PCR ในช่วง block 12 ถึง block 17 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda/*Hind*III/*Eco*RI...103-108

32 แสดงแถบดีเอ็นเอจากผลิตผล PCR (ก) และ จาก Southern blot hybridization (ข) ที่ได้จากการทำ limiting dilution 109

33 ขั้นตอนการวิเคราะห์อัลลีลของยีน MSP1 115

คำย่อ

a.a.	amino acid
bp	base pair
C	degree celsius
cm	centimetre
EtBr	eihidium bromide
ddw	double distilled water
g	gram
Kb	kilobase
l	litre
µg	microgram
µl	microlitre
µM	micromolar
mg	milligram
ml	millilitre
mm	millimetre
mM	millimolar
ng	nanogram