



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การโคลนยีนเอกโซนิวคลีเอสของ *Plasmodium falciparum* ด้วยวิธี overlapping PCR

ชื่อบิสิต นายปรมัตต์ เลาหกรรณวนิช รหัสประจำตัว 60 3 23300 23

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การโคลนยีนเอกโซนิวคลีเอสของ *Plasmodium falciparum* ด้วยวิธี overlapping PCR
(Molecular cloning of exonuclease from *Plasmodium falciparum* using overlapping PCR)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รศ.ดร. วันชัย อัครลาภสกุล

นิสิตในโครงการ

นายปรมัตต์ เลหากรรณวิช 60 3 23300 23

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ชื่อโครงการ:	การโคลนยีนเอกโซนิวคลีเอสของ <i>Plasmodium falciparum</i> ด้วยวิธี overlapping PCR	
นิสิตในโครงการ:	นายปรมัตต์ เลหากรรณวนิช	เลขประจำตัวนิสิต 60 3 23300 23
อาจารย์ที่ปรึกษา:	รศ.ดร. วันชัย อัครลาภสกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
ปีการศึกษา	2563	

บทคัดย่อ

ปัจจุบันโรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาหลักทางสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก แม้จะมีรายงานจำนวนของผู้ป่วยมาลาเรียลดลงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามในปี 2018 ยังคงมีการรายงาน ผู้ป่วยมาลาเรียสูงถึง 228 ล้านราย และประมาณการว่ามีผู้เสียชีวิตจากโรคดังกล่าว 405,000 ราย โรคมาลาเรียเกิดจากโปรโตซัวในสกุล *Plasmodium sp.* โดยปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียได้รุนแรงที่สุด คือ *Plasmodium falciparum* และเมื่อไม่นานมานี้พบว่ามียาต้านมาลาเรีย Dihydroartemisinin-piperaquine ที่เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียสูง จากงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในปี 2020 ได้ศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรม ที่มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยา piperaquine และ พบว่ายีนเอกโซนิวคลีเอสมีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา piperaquine ดังนั้นโครงการนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มปริมาณเอกโซนิวคลีเอสของ *P. falciparum* และสร้างรีคอมบีแนนท์พลาสมิด วิธีการทดลองเริ่มจากเพิ่มจำนวนยีนเอกโซนิวคลีเอส Exon 1 และ Exon 2 ของ *P. falciparum* ด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ genomic DNA เป็นต้นแบบ และเชื่อมต่อกับ Exon ทั้ง 2 ส่วนด้วยวิธี overlapping PCR เพื่อนำไปสร้างรีคอมบีแนนท์พลาสมิด หลังจากนั้น transformation เข้าสู่ DH5 Alpha competent *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวนรีคอมบีแนนท์พลาสมิด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Exon แต่ละส่วนความยาว 949 และ 1,193 คู่เบสตามลำดับ สามารถเชื่อมกันด้วยวิธี overlapping PCR ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 2,142 คู่เบส อย่างไรก็ตามยังไม่ประสบความสำเร็จในการ transformation ยีนเอกโซนิวคลีเอสเข้าสู่ DH5 Alpha competent *E. coli*

คำสำคัญ: มาลาเรีย, *Plasmodium falciparum*, piperaquine, เอกโซนิวคลีเอส, overlapping PCR

Project title: Molecular cloning of exonuclease from *Plasmodium falciparum* using overlapping PCR

Investigator: Mr. Poramut Laohakanwanich Student ID 60 3 23300 23

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Wanchai Assavalapsakul
Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Abstract

Malaria remains one of the major public health problems in more than 100 endemic countries worldwide. Even though the numbers of malaria cases are decreasing, there were still 228 million estimated cases and 405,000 deaths globally in 2018. *Plasmodium falciparum* is the most virulent human parasite responsible for the majority of mortality cases. Recently, the spread of dihydroartemisinin-piperaquine resistance is the first-line drug treatment for uncomplicated *P. falciparum*. Researches in 2020 have studied the genetic markers which was associated with piperaquine resistance. The exonuclease was found to be involved in drug resistance. The objective of this research was to clone the *P. falciparum* exonuclease gene to increase DNA content and generate recombinant plasmid. First, exonuclease gene of *P. falciparum* was multiplied by conventional PCR using the genomic DNA as a template and the exon segments were joined by overlapping PCR to construct the recombinant plasmid. Afterwards, the plasmids were transformed into DH5 Alpha competent *E. coli* to increase the number of recombinant plasmids. The results showed that the exon fragments length 949 bp and 1,193 bp, respectively, could be splicing by overlapping PCR to obtain 2,142 bp DNA. However, the transformation exon of the exonuclease to DH5 Alpha competent *E. coli* has not been successful.

Keywords: malaria, *Plasmodium falciparum*, piperaquine, exonuclease, overlapping PCR

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. วันชัย อัครลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ซึ่งได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน ทางผู้จัดทำโครงการฯ ขอกราบขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์สำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยในการดำเนินงาน รวมถึงให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.นลวัฒน์ บุญญาลัย จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ที่คอยให้ความช่วยเหลือในเรื่องของตัวอย่างจีโนมของ *Plasmodium falciparum* นอกจากนี้ยังให้คำแนะนำและความรู้เกี่ยวกับมาลาเรีย สำหรับการเขียนรายงานวิจัยต่าง ๆ

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อใช้ในโครงการฯ

ขอขอบคุณเพื่อนและพี่ ๆ ร่วมห้องปฏิบัติการ 2014 สำหรับคำแนะนำ วิธีใช้เครื่องมือ และขั้นตอนการทำงานทดลอง และเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัย

ปรมัตต์ เลาหกรรณวิช
ผู้จัดทำ

สารบัญ

บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
- โรคมาลาเรีย	1
- <i>Plasmodium falciparum</i>	7
- การดื้อยา Piperaquine ของเชื้อมาลาเรีย <i>Plasmodium falciparum</i>	10
- Overlapping PCR	12
บทที่ 2 วิธีดำเนินการทดลอง	14
บทที่ 3 ผลการทดลอง	23
บทที่ 4 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	35

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	15
ตารางที่ 3.2 ปริมาตรและความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน Exon 1 และ Exon 2	15
ตารางที่ 3.3 อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน Exon 1 และ Exon 2	16
ตารางที่ 3.4 ปริมาตรและความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ overlapping PCR เพื่อเชื่อมต่อบริเวณ Exon 1 และ Exon 2 โดยใช้ primer	17
ตารางที่ 3.5 อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา overlapping PCR เพื่อเชื่อมต่อบริเวณ Exon 1 และ Exon 2 โดยใช้ primer	18
ตารางที่ 3.6 ปริมาตรและความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ overlapping PCR เพื่อเชื่อมต่อบริเวณ Exon 1 และ Exon 2 โดยไม่ใช้ primer	19
ตารางที่ 3.7 อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา overlapping PCR เพื่อเชื่อมต่อบริเวณ Exon 1 และ Exon 2 โดยไม่ใช้ primer	19

สารบัญรูป

รูปที่ 1.1	ภาพวาด ต้น ใบ ดอกและผลของต้น Cinchona (<i>Chichona calisaya</i>)	3
รูปที่ 1.2	แสดงโครงสร้างของยา quinine	4
รูปที่ 1.3	แสดงเชื่อมมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์	7
รูปที่ 1.4	แสดงแผนที่ของประเทศกัมพูชาที่แสดงถึงเมืองและจังหวัดที่มีการทดสอบการใช้งานยา Dihydroartemisinin- piperazine	10
รูปที่ 1.5	แสดงโครงสร้างของยา piperazine	11
รูปที่ 1.6	แสดงแผนภาพขั้นตอนการทำ Overlapping PCR	13
รูปที่ 3.1	แสดงขั้นตอนการเชื่อม Exon ทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกันด้วยวิธี overlapping PCR	16
รูปที่ 3.2	แสดงโครงสร้างพลาสมิด pJET1.2/blunt	21
รูปที่ 4.1	0.8 % agarose gel แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการ PCR ส่วน Exon 1	23
รูปที่ 4.2	0.8 % agarose gel แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการ PCR ส่วน Exon 2	24
รูปที่ 4.3	0.8% agarose gel แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ overlapping PCR โดยใช้ไพรเมอร์	25
รูปที่ 4.4	0.8 % agarose gel แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการ Overlapping PCR เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR ก่อนหน้า	26
รูปที่ 4.5	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการ rapid size screening	27
รูปที่ 4.6	1 % agarose gel แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Xho I	28

บทที่ 1

บทนำ

1. โรคมาลาเรีย (malaria)

มาลาเรีย (malaria) เป็นคำที่มีรากศัพท์จากภาษาอิตาลี มาจากคำว่า malo (สำหรับเพศชาย) หรือ mala (สำหรับเพศหญิง) แปลว่าไม่ดี หรือ bad ในภาษาอังกฤษ และคำว่า aria แปลว่า อากาศ หรือ air ในภาษาอังกฤษ สืบเนื่องจากความเข้าใจผิดในอดีตที่เชื่อว่ามาลาเรียเกิดจากอากาศไม่ดี ก่อนที่จะมีการค้นพบในภายหลังว่า มาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัวชนิดหนึ่งที่มีพาหะเป็นยุงก้นปล่อง (*Anopheles sp.*) เป็นหลัก (Rossati A., et al., 2016) นอกจากนี้เคยมีรายงานการติดเชื้อจากคนสู่คน ผ่านทางการรับเลือด การปลูกถ่าย อวัยวะ และจากมารดาสู่ทารกในครรภ์ (Thanapongpichat S., et al., 2013) ทั้งนี้อาการที่มีลักษณะสอดคล้องกับโรคมาลาเรียมีบันทึกมาตั้งแต่อดีตกาลในหลายแหล่งอารยธรรม (แม้จะเป็นที่รู้จักในชื่อต่าง ๆ ตามความแตกต่างของภาษาและความเชื่อในแต่ละภูมิภาค นอกจากนี้ยังเชื่อว่าโรคมาลาเรียยังเป็นสาเหตุหรือปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อเหตุการณ์ทางประวัติศาสตร์หลายเหตุการณ์) ต่อมาภายหลังจากการค้นพบเชื้อมาลาเรียตลอดจน การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อมาลาเรียและโรคมาลาเรียในเชิงวิทยาศาสตร์และการแพทย์ ทำให้เกิดองค์ความรู้และ นับเป็นโรคติดเชื้อที่ได้รับการศึกษามากที่สุดชนิดหนึ่งอย่างรอบด้าน โดยมีเป้าหมายหลักคือ การรักษา ควบคุมและ ป้องกันโรค ทั้งนี้ภายหลังจากการค้นพบเชื้อมาลาเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในคนแล้ว ได้มีการค้นพบว่าสัตว์มีกระดูก สันหลังชนิดอื่น ๆ อีกหลายชนิดสามารถติดเชื้อมาลาเรียที่จำเพาะกับชนิดของสัตว์ต่าง ๆ ได้ (Garnham PCC., 1966)

1.1 การค้นพบเชื้อมาลาเรีย

ก่อนการค้นพบเชื้อมาลาเรียได้มีการกล่าวถึงเม็ดสี (pigment) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีในปัจจุบันว่าคือ องค์ประกอบหนึ่งของเชื้อมาลาเรีย เรียกว่า malaria pigment หรือ hemozoin โดยในปี ค.ศ. 1717 โจวันนี ลันซี ชิ (Giovanni Lancisi) แพทย์ชาวอิตาลีได้บรรยายลักษณะของผลึกเม็ดสีดำในม้ามและสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิต แต่ไม่ได้ระบุว่ามีความเกี่ยวข้องกับโรคมาลาเรีย ปี ค.ศ. 1847 โยฮัน เม็คเคิล (Johan Meckel) แพทย์ชาวเยอรมัน ได้ตรวจพบเม็ดสีดังกล่าวปรากฏอยู่ในก้อนโปรโทพลาส (protoplasmic) ภายในเซลล์ของม้ามและเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1858 รูดอล์ฟ วีร์โชว์ (Rudolf Virchow) ได้วาดภาพเกี่ยวกับพยาธิสภาพที่พบในตับซึ่งมี ลักษณะของเชื้อมาลาเรียอยู่ด้วยแต่ก็ไม่ได้บรรยายถึงรายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อมาลาเรีย (Garnham PCC., 1966)

ในปี ค.ศ. 1880 ชาลส์ หลุยส์ อาลฟงส์ ลาฟว์ร็อง (Charles Louis Alphonse Laveran) แพทย์ชาวฝรั่งเศส ขณะปฏิบัติหน้าที่ ณ โรงพยาบาลคอสแตนติน ในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนแอลจีเรีย ได้ตรวจเลือดผู้ป่วยโรคมalaria โดยไม่ได้ย้อมสีและพบว่าเม็ดเลือดแดงเกิดการกระเพื่อมไปมาจากการโบกพัดของสายใยขนาดเล็ก (fine filament) โดยสายใยเหล่านี้มีปลายด้านหนึ่งเชื่อมต่อกับก้อนกลมที่มีเม็ดสีอยู่ภายในหรือเป็นที่ทราบกันดีในปัจจุบันว่าเป็นกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของเชื้อมาลาเรีย เชื่อว่าสิ่งที่เขาค้นพบคือเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคและตั้งชื่อว่า *Oscillaria* แต่เมื่อนำการค้นพบดังกล่าวเสนอต่อสมาคมแพทย์แห่งกรุงปารีส (Academy of Medicine of Paris) ในปีเดียวกันแต่กลับไม่มีผู้ใดเชื่อถือในการค้นพบดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องจากในปีก่อนหน้ามีการยอมรับว่าการค้นพบของเครบส์ (Krebs) และโตมาซี กรูเดลี (Tomasi-Crudeli) ว่าโรคมalaria เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย Krebs Tomasi-Crudeli bacillus ซึ่งพบได้จากหนองน้ำที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมalaria และเมื่อฉีดใส่กระต่ายพบว่าก่อให้เกิดโรคซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายมาลาเรีย

ในปี ค.ศ. 1884 Marchiafava และ Celli ได้ศึกษาเลือดจากผู้ป่วยโดยตรงตามวิธีการที่นายแพทย์ ลาฟว์ร็อง ได้ศึกษามาก่อนและพบระยะต่างๆของเชื้อดังกล่าวภายในเม็ดเลือดแดง ทั้งคู่จึงตั้งชื่อเชื้อดังกล่าวว่า *Plasmodium malariae* ในขณะเดียวกันคามิลโล กอลจิ (Camillo Golgi) พยาธิแพทย์ชาวอิตาลีได้ศึกษาลักษณะการจับไขในผู้ป่วยโรคมalaria ที่มีลักษณะวันเว้นวันและวันเว้นสองวัน พร้อมทั้งตั้งข้อสังเกตว่าเกิดจากเชื้อมาลาเรียคนละชนิดกัน ในปี ค.ศ. 1884 นายแพทย์กอลจิ (Golgi) ได้ศึกษาลักษณะของเชื้อมาลาเรียที่ได้จากผู้ป่วยที่มีลักษณะการจับไขต่างกัน พบว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการจับไขวันเว้นวันคือ *Plasmodium vivax* โดยมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันชัดเจนกับเชื้อที่ก่อให้เกิดไขวันเว้นสองวันคือ *Plasmodium malariae* (Cox FEG., 1996) ในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน วาซิลี ดานิลอฟ (Vasily Danilewsky) นักวิทยาศาสตร์ชาวรัสเซียได้บรรยายถึงโปรโตซัวหลายชนิดรวมถึงเชื้อมาลาเรียที่พบในนก การค้นพบดังกล่าวส่งผลให้มีการศึกษาชนิดของเชื้อมาลาเรียในสัตว์มีกระดูกสันหลังมากขึ้น

ปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมให้การศึกษาเชื้อมาลาเรียดำเนินไปอย่างดีและรวดเร็วขึ้นคือ การค้นพบสีย้อมใหม่ โดยนายแพทย์ ดิมิทรี โรมานอฟสกี (Dimitri Romanovsky) ในปี ค.ศ. 1891 โดยสีดังกล่าวมีองค์ประกอบของสี Eosin Y และสี Tetramethylthionin ที่อยู่ในสภาพที่ถูกเก็บไว้นาน เมื่อโรมานอฟสกีทดลองย้อมเลือดจากผู้ป่วยโรคมalaria พบว่านิเวศของเชื้อมาลาเรียติดสีแดงของ Eosin Y ส่วนไซโทพลาสซึมติดสีน้ำเงิน จากการใช้สีย้อมชนิดใหม่นี้ ทำให้ในปี ค.ศ. 1904 นายแพทย์ Marchiafava และนายแพทย์ Amico Bignami ทำการศึกษาลักษณะของเชื้อมาลาเรียชนิดใหม่ *Plasmodium falciparum* ได้อย่างชัดเจน (Hemming F., 1954) อย่างไรก็ตามการค้นพบเชื้อมาลาเรียครั้งแรกของนายแพทย์ลาฟว์ร็องนับเป็นจุดเริ่มต้นสำคัญที่ก่อให้เกิดการศึกษาโรคมalaria ในภายหลัง ดังนั้นนายแพทย์ลาฟว์ร็องจึงได้รับรางวัลโนเบลสาขาสรีรวิทยาหรือการแพทย์ในปี ค.ศ. 1907

1.2 ที่มาและความเป็นไปของยาต้านมาลาเรีย

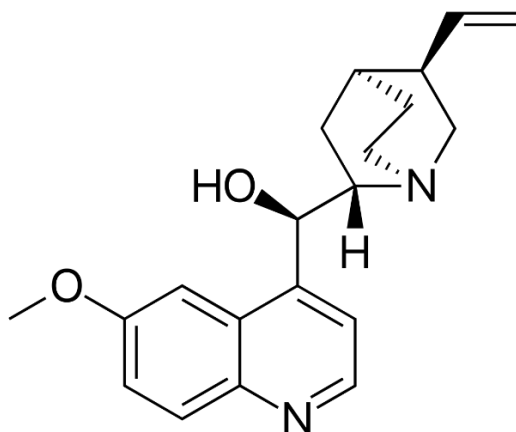
ชนพื้นเมืองอินเดียนแดงที่อาศัยอยู่ในแถบอเมริกาใต้บริเวณสาธารณรัฐเปรูในปัจจุบัน รู้จักการนำเปลือกไม้ชนิดหนึ่งมารักษาไข้มาลาเรียนับแต่โบราณกาล โดยมีเรื่องเล่าว่าได้เกิดแผ่นดินไหวครั้งใหญ่บริเวณเมืองลือกซา (Loxa) ซึ่งมีต้นซิงโคนา (cinchona) อยู่เป็นจำนวนมากอยู่รายล้อมและได้โคนลงในแหล่งน้ำ ทำให้น้ำมีรสชาติดขมเมื่อชาวอินเดียนแดงพื้นเมืองผู้ซึ่งป่วยด้วยโรคมมาลาเรียและมีอาการกระหายน้ำได้ดื่มน้ำดังกล่าวเข้าไป ภายหลังจาก 2 ถึง 3 วัน อาการไข้ได้หายไปจึงเป็นที่เล่าขานกันและรู้จักกันดีในกลุ่มชนพื้นเมืองถึงสรรพคุณของเปลือกไม้ชนิดนี้ในการบำบัดไข้มาลาเรีย (Guerra F., 1964)

ในปี ค.ศ. 1663 เซบาสเตียนโน บาโด (Sebastiano Bado) แพทย์ชาวอิตาลีได้ศึกษาและบันทึกเกี่ยวกับสรรพคุณของเปลือกไม้จากเปรูและพบว่าให้ผลการรักษาที่ดีในการรักษาโรคมมาลาเรียพร้อมทั้งแนะนำปริมาณที่เหมาะสมสำหรับเด็กและผู้ใหญ่ ซึ่งในปี ค.ศ. 1671 ฟรานเชสโก เรดี (Francesco Redi) ซึ่งเป็นแพทย์ชาวอิตาลีเช่นกัน ได้ยืนยันผลการรักษาโรคมมาลาเรียโดยเปลือกไม้ชนิดเดียวกัน (Jaramillo-Arango J., 1950) ต่อมาในปี ค.ศ. 1742 Carl Linnaeus แพทย์ชาวสวีเดน นักพฤกษศาสตร์ และนักสัตววิทยาได้รับการยกย่องว่าเป็นบิดาแห่งอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์สำหรับพืชที่มีเปลือกไม้ใช้บำบัดโรคมมาลาเรียจากประเทศเปรูให้อยู่ใน genus *Cinchona* (รูปที่ 1.1) สำหรับสารสกัดจากเปลือกไม้ดังกล่าวหรือที่รู้จักกันในชื่อควินิน (quinine) นั้นน่าจะได้รับอิทธิพลจากชื่อของต้น *Peruvian balsam* ซึ่งไม่มีสรรพคุณรักษาโรคมมาลาเรียแต่รู้จักกันในชื่อสามัญในหมู่ชาวอินเดียนว่า quina หรือ quinaquina แม้ว่าจะมีการยืนยันคุณสมบัติของเปลือกต้น *cinchona* ในการรักษาโรคมมาลาเรียและมีการใช้ยาที่สกัดจากเปลือกไม้ดังกล่าวแต่ผลการรักษายังแปรเปลี่ยนไปตามคุณภาพของยาที่เตรียม



รูปที่ 1.1 ภาพวาด ต้น ใบ ดอกและผลของต้น *Cinchona* (*Chichona calisaya*)

ในปี ค.ศ. 1820 เปลติเยร์ (Pelletier) และกาวิองตู (Caventou) นักเคมีชาวฝรั่งเศส ได้ทำการสกัดเปลือกต้นชิงโคนาด้วยแอลกอฮอล์ พบว่าสารสำคัญจัดอยู่ในกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloid) ทั้งคู่ประสบความสำเร็จในการสกัด quinine (รูปที่ 1.2) และ cinchonin ในรูปของผลึกโดย quinine เป็นองค์ประกอบหลักที่แยกได้และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียชัดเจน (Jaramillo-Arango J., 1950) นอกจากนี้พบว่าการใช้ quinine ทำให้เกิดอาการข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียนลดลง แต่กลับมีประสิทธิภาพในการรักษาสูงขึ้น ดังนั้นความต้องการยา quinine ในตลาดโลก จึงมีมากขึ้น แต่เนื่องจากกระบวนการผลิตต้องอาศัยวัตถุดิบในธรรมชาติ คือ เปลือกต้นชิงโคนา ในระยะแรกมีการตัดต้นไม้เหล่านี้จากถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสาธารณรัฐเปรูและมีการปลูกใหม่ทดแทน และในปี ค.ศ. 1872 ได้มีการนำเมล็ดพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงจากทวีปอเมริกาใต้ไปปลูกที่เกาะชวา และมีการลักลอบในเมล็ดพันธุ์ไปปลูกในเกาะมินดาเนาของฟิลิปปินส์ ในเวลาต่อมาการมีแหล่งผลิตจำนวนมากทำให้ quinine เป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาอย่างแพร่หลายเป็นเวลามากกว่า 60 ปี จนสงครามโลกครั้งที่ 1 และ 2 มีการให้ความสำคัญกับการหาสารตัวใหม่แทน quinine



รูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของยา quinine

ในปี ค.ศ. 1932 จากการทุ่มเทวิจัยของสหรัฐอเมริกาและสหราชอาณาจักร ทำให้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์เอทาทาบริน (atabrine) ซึ่งให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย (Bruce-Chwatt L.J., 1986) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. falciparum* แต่เนื่องจากยาดังกล่าวมีผลข้างเคียงดังนั้นจึงมีการแสวงหาสารชนิดอื่น รวมถึงทดสอบอนุพันธ์ 4-aminoquinoline ที่นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันได้ทดลองมาก่อนหน้านี้ ซึ่งก็คือ เรโซชิน (resochin) และซอนโตชิน (sontichin) จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารดังกล่าวพบว่า resochin ให้ผลดีมากในการรักษาโรคมมาลาเรียและมีอาการข้างเคียงค่อนข้างต่ำ ภายหลัง resochin จึงถูกเปลี่ยนชื่อเป็น คลอโรควิน (chloroquine) โดยปราศจากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีใด ๆ เลย สารสังเคราะห์ดังกล่าวจึงนับเป็นผลงานของนักวิจัยชาวเยอรมันโดยตรง (Coatney GR., 1963)

ในปี ค.ศ. 1945 เคอร์ต (Curd) เดวี (Davey) และโรส (Rose) ค้นพบสรรพคุณของพาลูดริน (paludrine) ในการกำจัดเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีก รวมถึงยับยั้งการเจริญของ *P. vivax* และป้องกันการติดเชื้อ *P. falciparum* โดยมีผลข้างเคียงต่ำ การค้นพบดังกล่าวทำให้มีการศึกษาอนุพันธ์ของไพริมิดีน (pyrimidine) เพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งปี ค.ศ. 1951 มีการสังเคราะห์ไพริเมตามีน (pyrimethamine) โดยฮิทซิงส์ (Hitchings) และคณะเนื่องจากตัวยานี้ได้มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียได้ดีโดยเกิดอาการข้างเคียงต่ำ ทำให้ความนิยมการใช้ quinine รักษา มาลาเรียลดลง ต่อมาในปี ค.ศ. 1960 Shanghai Pharmaceutical Industry Research Institute ประเทศจีน และ Rhone Poulenc ประเทศฝรั่งเศส ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ piperazine เนื่องจากประสิทธิภาพและความทนทานที่สัมพันธ์กันทำให้ piperazine แทน chloroquine เป็นยาต้านมาลาเรียที่แนะนำโดย Chinese National Malaria Control Programme ในปี ค.ศ. 1978 แต่อย่างไรก็ตามจากการที่ *P. falciparum* ดื้อยาจึงทำให้การใช้ลดลงในปี ค.ศ. 1980 จนมีการค้นพบว่าสามารถใช้กับอนุพันธ์ artemisinin แล้วมีประสิทธิภาพในการรักษาได้สูง ราคาถูก ในช่วงปี ค.ศ. 1990

ในปี ค.ศ. 1971 ตูโหยวโหยว (Tu Youyou) และคณะวิจัยได้ดำเนินการศึกษาสรรพคุณของตำรับยาจีนโบราณเพื่อหายาที่ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ภายใต้โครงการศึกษาสรรพคุณของสมุนไพรโบราณของรัฐบาลสาธารณประชาชนจีนได้มีการทดสอบยาที่มีความสำคัญและเป็นที่ยอมรับกันตั้งแต่อารยธรรมจีนโบราณ คือสมุนไพรชิงเฮา (qing-hao) หรือมีชื่อสามัญ sweet wormwood จัดอยู่ใน genus *Artemisia* โดยมีบันทึกในตำราแพทย์ตั้งแต่สมัยราชวงศ์ซัน จากการศึกษาสรรพคุณของยาอาร์เทมิซินิน (artemisinin) ที่สกัดได้ในห้องปฏิบัติการพบว่ามียาฤทธิ์ทำลายเชื้อมาลาเรียได้ดีมาก ทำให้มีการศึกษาอนุพันธ์ดังกล่าวอีกหลายชนิด (Klaymen D., 1985) เช่น dihydroartemisinin เป็นต้น ทั้งนี้การศึกษาดังกล่าวเริ่มต้นโดย จนในที่สุดจึงค้นพบสารสกัดที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อมาลาเรีย *P. berghei* ในหนูและ *P. cynomolgi* ในลิงทดลองได้โดยไม่มีอาการข้างเคียงชัดเจน (Tu Y., 2011) ผลงานดังกล่าวเป็นที่ประจักษ์ว่าช่วยชีวิตประชากรโลกจากการเสียชีวิตของโรคมาลาเรียจำนวนมหาศาล ส่งผลให้ Tu Youyou ได้รับรางวัลโนเบลสาขาสรีรวิทยาหรือการแพทย์ในปี ค.ศ. 2015

1.3 พื้นที่ ๆ พบและอาการโดยทั่วไปของโรคมาลาเรีย

โรคมาลาเรียพบมากในภูมิภาคเขตร้อนชื้นและมักพบการระบาดมากในช่วงฤดูฝน โดยผู้ที่เป็นพาหะของโรคไข้มาลาเรียกัดซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อมาลาเรีย โดยเมื่อผู้ป่วยมีอาการป่วยในระยะแรกจะเริ่มมีอาการจับไข้จะยังไม่เป็นเวลา ร่วมกับมีอาการไม่เฉพาะอื่น ๆ เช่น ปวดศีรษะ ปวดเมื่อย เพลีย เบื่ออาหาร ใน 2-3 วันแรก หลังจากนั้นในปลายสัปดาห์หากยังไม่ได้รับการรักษา จะมีอาการจับไข้เป็นเวลาโดยมีไข้ขึ้น ๆ ลง ๆ เป็นพัก ๆ สลับกับการหนาวสั่นตามช่วงเวลาของเชื้อมาลาเรียในระยะในเม็ดเลือดแดงซึ่งเจริญเต็มที่และทำให้เม็ดเลือดแดงแตกออกโดยอาจเรียกว่าไข้วันเว้นสองวันหรือไข้วันเว้นวันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับ เชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนมีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์พาลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*)

สายพันธุ์ไวแวกซ์ (*P. vivax*) สายพันธุ์มาลาเรียอี (*P. malariae*) และสายพันธุ์โอวาล์ (*P. ovalae*) โดยสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดความรุนแรงมากที่สุด คือ *P. falciparum* เนื่องจากทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ขึ้นมากมาย อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ *P. vivax* และ *P. ovalae* สามารถทำให้เกิดไข้กลับซ้ำ (relapsing fever) ในผู้ป่วยได้

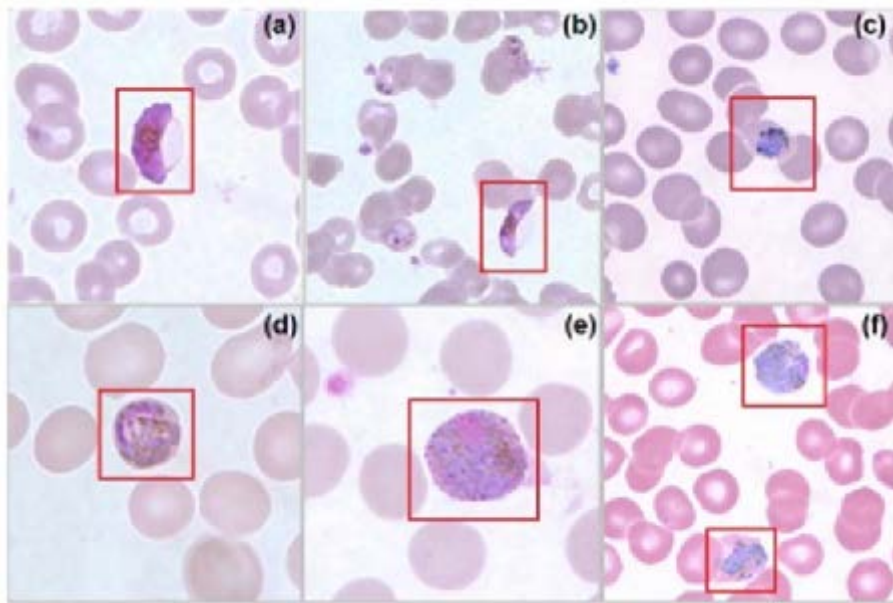
ผู้ป่วยโรคมาลาเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ ผู้ป่วยโรคไข้มาลาเรียที่ไม่มีภาวะแทรกซ้อน หมายถึง ผู้ป่วยโรคไข้มาลาเรียที่ไม่มีภาวะการรบกวนการทำงานของอวัยวะหลักหรือสูญเสียหน้าที่ เช่น มีระดับความรู้สึกตัวดี ไม่มีอาการตัวเหลืองตาเหลือง ปัสสาวะออกปกติ ไม่มีภาวะไตวาย ไม่หอบเหนื่อย เป็นลม หรืออ่อนเพลียมาก ยังรับประทานอาหารและดื่มน้ำได้เอง และผู้ป่วยโรคไข้มาลาเรียที่มีภาวะแทรกซ้อน หมายถึง ผู้ป่วยโรคไข้มาลาเรียที่มีอาการรุนแรง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* โดยหากได้รับการรักษาซ้ำผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้ ผู้ป่วยเหล่านี้จะมีอาการและอาการแสดงที่บ่งถึงความรุนแรงของโรคที่เกิดจาก การทำงานของอวัยวะหลักเสื่อมหรือสูญเสียหน้าที่ เช่น อ่อนเพลียมากจนไม่สามารถนั่ง เดิน หรือยืนเองได้ มีอาการชัก มีภาวะช็อก เป็นต้น

1.4 ความก้าวหน้าของการค้นคว้าโรคมาลาเรียในปัจจุบัน

ปัจจุบันโรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของโลก จากรายงานขององค์การอนามัยโลกในปี 2019 พบว่ามีผู้ติดเชื้อมาลาเรีย มากกว่า 229 ล้านคนทั่วโลก และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต ในผู้ป่วยประมาณ 4-5 แสนคน (Zekar L. และ Sharman T., 2020) ในช่วง 3 ทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคมาลาเรีย ยุงพาหะ และผู้ติดเชื้อมาลาเรียโดยการใช้ศาสตร์แขนงต่าง ๆ ส่งผลให้มีการสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับโรคและเชื้อมาลาเรียอย่างมาก ความสำเร็จของการเลี้ยง *P. falciparum* ในห้องปฏิบัติการได้อย่างต่อเนื่อง โดยใช้เม็ดเลือดแดงของคน (Trager W., 1994) นับเป็นรากฐานที่สำคัญของการประยุกต์เพื่อศึกษามาลาเรียในด้านต่าง ๆ ตั้งแต่การทดสอบระดับการตอบสนองของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านมาลาเรีย จนถึงการถอดรหัสพันธุกรรมทั้งหมดในจีโนม (genome) ของเชื้อมาลาเรีย (Gardner MJ., 2002) การใช้ข้อมูลดังกล่าวได้เริ่มมีการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางมากขึ้นในปัจจุบัน โดยเฉพาะในเรื่องของการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับพยาธิสภาพของโรคมาลาเรียที่มีความรุนแรงแตกต่างกัน โดยมีการค้นพบโปรตีนและโมเลกุลหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกับกระบวนการดังกล่าว นอกจากนี้การประยุกต์ศาสตร์เกี่ยวกับพันธุศาสตร์ประชากร (populations genetics) และวิวัฒนาการระดับโมเลกุล (molecular evolution) ได้มีส่วนช่วยให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับการกระจายของเชื้อมาลาเรียตามภูมิภาคต่าง ๆ การทราบต้นกำเนิดและการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียในสภาวะที่ได้รับแรงกดดัน เช่น จากยาต้านมาลาเรีย เป็นต้น นอกจากนี้ในบางภูมิภาคของโลก เช่น แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย ได้มีการค้นพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียที่มีลิงแสมหรือลิงหางยาว (*Macaca Fascicularis*) และลิงกัง (*Macaca nemestrina*) เป็นโฮสต์หลักที่สำคัญในสภาวะการติดเชื้อตามธรรมชาติโดยยุงก้นปล่อง (*Anopheles sp.*) (Putaporntip C., et al., 2009)

นอกจากนี้การวิเคราะห์พันธุกรรมของมาลาเรียทำให้ทราบความหลากหลายของชนิดมาลาเรียในไพรเมตชนิดต่าง ๆ ในหลายภูมิภาคของโลก (Liu W.,2016) ตลอดจนทำให้เกิดการค้นพบว่าเชื้อ *P. ovale* ประกอบด้วยเชื้อมาลาเรีย 2 ชนิดที่มีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เหมือนกันและได้รับการเสนอให้เป็น สปีชีส์ที่ต่างกัน (Sutherland C.J., et al., 2010) แต่เนื่องจากเป็นที่รู้จักมานาน เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนจึงมีผู้เสนอให้เรียก *Plasmodium ovale curtisi* และ *Plasmodium ovale wallikeri* เนื่องจากเชื้อมาลาเรียทั้งสองมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน (Putaporntip C., et al., 2013) อย่างไรก็ตามการตั้งชื่อดังกล่าวอาจจะไม่ถูกต้องตามหลักการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์

2. *Plasmodium falciparum*



รูปที่ 1.3 แสดงเชื้อมาลาเรียย้อมสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (a) และ (b) *P. falciparum* (c) *P. knowlesi* (d) *P. malariae* (e) *P. ovale* (f) *P. vivax* (Ningsih A.K., 2016)

เชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* เป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคมาลาเรียในคนก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วยและภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงมากกว่าเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ๆ จึงได้มีการศึกษามากที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับการระบาดวิทยา การตอบสนองต่อตัวยา รวมถึงการศึกษาในด้านต่าง ๆ เพื่อนำมาสู่การพัฒนาวัคซีนยาและป้องกันโรคมาลาเรีย

2.1 ระบาดวิทยาและการกระจายทางภูมิศาสตร์

นับตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 19 มีรายงานการติดเชื้อมาลาเรียจากหลายภูมิภาคในโลกโดยครอบคลุมเส้นละติจูดที่ 64 องศาเหนือถึง 32 องศาใต้หรือเป็นบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งสาเหตุของโรคมมาลาเรียร้อยละ 95 มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *P. vivax* (Dutta HM. และ Dutt AK., 1978) และ *P. falciparum* ที่มีขอบเขตแพร่กระจายที่แคบกว่าและจำกัดอยู่ในภูมิภาคเขตร้อนของโลกเป็นหลัก ในปี ค.ศ. 2002 ประชากรโลกมีประมาณ 6,200 ล้านคน ร้อยละ 48 อาศัยในเขตที่เสี่ยงต่อการได้รับเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปแอฟริกาและบริเวณเอเชียใต้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสาธารณรัฐอินเดีย (Hay S., 2004) องค์การอนามัยโลกได้ประมาณว่าในระหว่างปี ค.ศ. 2000 ถึง 2010 ผู้ป่วยโรคมมาลาเรียส่วนใหญ่ราวร้อยละ 85 ถึงร้อยละ 90 เกิดจากการติดเชื้อ *P. falciparum* โดยในปี ค.ศ. 2000 และ ค.ศ. 2021 มีผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลกในราว 233 ล้านคนและ 238.8 ล้านคน ในขณะที่มีผู้เสียชีวิตในแต่ละปีประมาณ 985,000 คนและ 607,000 คนตามลำดับ ส่วนในปี ค.ศ. 2017 มีผู้ติดเชื้อทั่วโลก 219 ล้านคนและมีผู้เสียชีวิตประมาณ 435,000 คน

ในปี ค.ศ. 2017 องค์การอนามัยโลกได้ประมาณว่าผู้ป่วยโรคมมาลาเรียส่วนใหญ่อยู่ในทวีปแอฟริกา โดยคิดเป็นร้อยละ 92 ของผู้ป่วยทั่วโลก นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยทั่วโลกอาศัยอยู่ใน 5 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐไนจีเรีย สาธารณรัฐประชาธิปไตยคองโก สาธารณรัฐโมซัมบิก สาธารณรัฐอินเดีย และสาธารณรัฐยูกันดา คิดเป็นร้อยละ 25, 11, 5, 4 และ 4 ตามลำดับ โดย *P. falciparum* เป็นสาเหตุของโรคในทวีปแอฟริกาสูงถึงร้อยละ 99.7 และบริเวณเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นสาเหตุร้อยละ 62.8 ในขณะที่บริเวณทวีปอเมริกา *P. falciparum* เป็นสาเหตุร้อยละ 25.96

แม้มาตรการในการควบคุมโรคมมาลาเรียโดยคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกจะมีการผสมผสานกันระหว่าง มาตรการป้องกันการถูกยุงกัดโดยใช้มุ้งชุบสารเคมีกำจัดแมลง (insecticide-treated mosquito net, ITN) การใช้สารเคมีกำจัดแมลงฉีดพ่นตามบ้านเรือน (indoor residual spraying, IRS) การให้ยาป้องกันโรคมมาลาเรียในประชากรกลุ่มเสี่ยงพิเศษ เช่น หญิงมีครรภ์และเด็กเล็ก (chemoprevention) และในบางภูมิภาคมีการควบคุมลูกน้ำยุงโดยอาศัยหลักการทางชีวภาพ (biological mosquito control) แต่การให้ยารักษาโรคมมาลาเรียยังคงเป็นปัจจัยหลักในการควบคุมโรค อย่างไรก็ตามเชื้อ *P. falciparum* มีการปรับตัวและวิวัฒนาการในการดื้อยาต้านมาลาเรียหลายขนานซึ่งในปัจจุบันยาหลักในการรักษาโรคมมาลาเรียที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Plasmodium falciparum* คือการใช้ยาในกลุ่ม artemisinin ร่วมกับยาขนานอื่นที่ออกฤทธิ์นานกว่าหรือเรียกว่า artemisinin combination therapy (ACT) ซึ่งมียาหลากหลายต่างกันไปในแต่ละภูมิภาค โดยประสิทธิภาพของยาในการรักษาจะแตกต่างกันไปตามแต่ละภูมิภาค ปัจจุบันเชื้อ *P. falciparum* ที่ดื้อยา chloroquine กระจายไปตามภูมิภาคส่วนใหญ่ของโลก

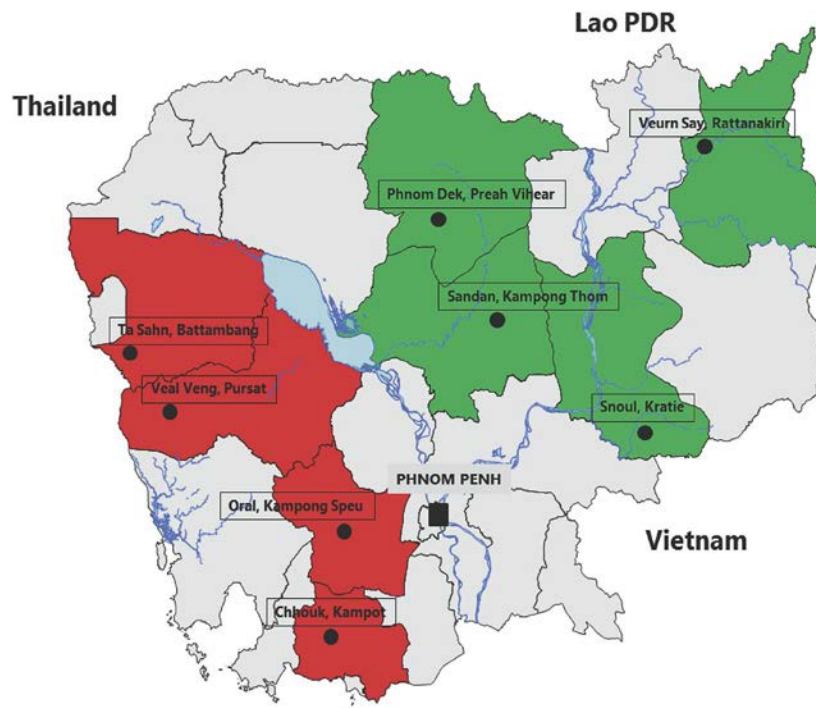
2.2 อาการแสดงของโรคมาลาเรียในคนจาก *Plasmodium falciparum*

ลักษณะการติดเชื้อ *P. falciparum* โดยทั่วไปสามารถจำแนกเป็น 3 กลุ่มตามอาการและความรุนแรงของโรค ได้แก่ [1] การติดเชื้อที่ไม่ปรากฏอาการ (asymptomatic parasitemia) อาจเป็นช่วงการติดเชื้อในระยะแรกหรือเกิดขึ้นในผู้มีภูมิคุ้มกันทางคลินิก (clinical immunity) จากการเคยติดเชื้อมาลาเรียมาก่อนหลายครั้ง ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อระยะเจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงโดยไม่มีอาการของโรค [2] การติดเชื้อที่มีอาการของโรคมาลาเรียไม่รุนแรง (uncomplicated malaria) และ [3] การติดเชื้อที่มีอาการของโรคมาลาเรียรุนแรง (complicated malaria) ซึ่งอาจเสียชีวิตได้ (World Health Organization, 2014) ในระยะแรกอาการของโรคมาลาเรียมักจะเริ่มด้วยอาการอ่อนเพลีย ตามด้วยอาการปวดเมื่อยบริเวณแขนและขา สำหรับอาการไข้และอาการหนาวสั่นแม้จะพบได้ใน *P. falciparum* แต่มักพบได้บ่อยกว่าในการติดเชื้อ *P. vivax*, *P. ovale curtisi* และ *P. ovale wallikeri*

ในการติดเชื้อ *P. falciparum* หลังจากมีอาการไข้ 3 ถึง 7 วัน ผู้ป่วยส่วนหนึ่งอาจเกิดอาการและมีการดำเนินโรคที่มีภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงในระบบต่าง ๆ ของร่างกายและอาจเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ แต่ในผู้ป่วยบางรายอาจเสียชีวิตได้ภายใน 24 ชั่วโมง (Dondrop AM., 2008) ภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงมักพบในเด็กอายุมากกว่า 6 เดือน โดยพบอัตราการตายสูงสุดในช่วง 1 ถึง 3 ปี สำหรับในเด็กโตหรือผู้ใหญ่ มักไม่พบอาการรุนแรงเนื่องจากการสร้างภาวะภูมิคุ้มกันซึ่งสามารถควบคุมการติดเชื้อมาลาเรียได้บางส่วน (partial immunity) สำหรับเด็กที่อายุน้อยกว่า 6 เดือนมักได้รับภูมิคุ้มกันบางส่วนจากมารดา สำหรับอัตราการเสียชีวิตในกลุ่มที่ได้รับยาต้านมาลาเรียที่เหมาะสมพบในอัตราร้อยละ 0.1 ในขณะที่ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาล่าช้าหรือเชื้อมาลาเรียดื้อยาที่ใช้รักษาโอกาสที่จะเสียชีวิตพบในอัตราร้อยละ 1 และเพื่อเป็นการกำหนดข้อบ่งชี้ที่ชัดเจนในการแยกกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อรุนแรงออกจากผู้ป่วยภาวะแทรกซ้อนไม่รุนแรง ในการประชุมของคณะผู้เชี่ยวชาญองค์การอนามัยโลกในปี ค.ศ. 1990 ได้กำหนดอาการและภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงของโรคมาลาเรียอันมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *P. falciparum* ดังนี้ [1] มาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ทำให้ผู้ป่วยมีอาการไม่รู้สึกรู้ตัวและไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น (coma) ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญในการติดเชื้อ *P. falciparum* ถึงร้อยละ 80 [2] ภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรง (severe normocytic anemia) [3] ภาวะไตวาย (acute renal failure) [4] ภาวะน้ำท่วมปอดหรือภาวะระบบทางเดินหายใจล้มเหลว (acute pulmonary edema, acute respiratory failure) [5] ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) [6] ภาวะระบบการไหลเวียนล้มเหลว (circulatory collapse, algid malaria) [7] ภาวะเลือดออกหรือแข็งตัวปกติ (spontaneous bleeding, disseminated intravascular) [8] การชักทั้งตัวที่เกิดขึ้นซ้ำ ๆ (repeated generalized convulsion) [9] ภาวะเลือดเป็นกรด (acidosis) [10] ภาวะที่มีฮีโมโกลบินในปัสสาวะสาเหตุจากเชื้อมาลาเรียหรือเรียกว่าไข้ปัสสาวะดำ (blackwater fever)

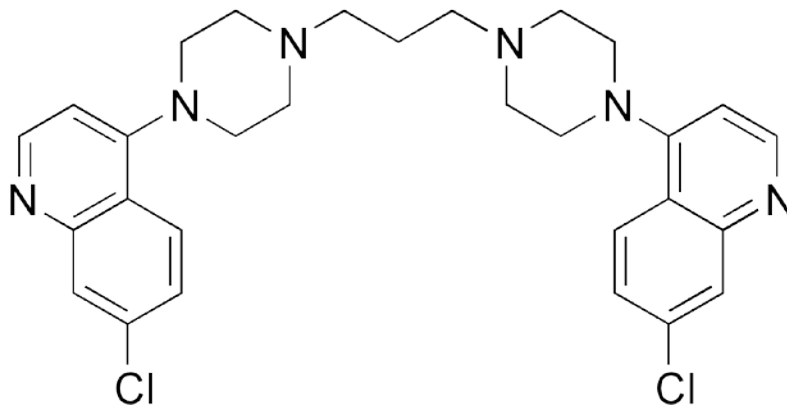
3.การดื้อยา Piperazine ของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum*

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2008 องค์การอนามัยโลกหรือ WHO ได้มีการประกาศให้ใช้ยา dihydroartemisinin (DHA) ซึ่งออกฤทธิ์ได้ไวเพื่อใช้ในการกำจัดเชื้อมาลาเรียในเลือดของผู้ป่วยควบคู่กับยา piperazine (PPQ) ซึ่งออกฤทธิ์ได้ช้าเพื่อใช้ในการกำจัดเชื้อที่ยังเหลืออยู่และป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียซ้ำ โดยการให้ยาทั้ง 2 ตัวควบคู่กันจัดเป็นวิธีการรักษาแบบ Artemisinin Combination Therapy (ACT) เพื่อใช้ในการรักษาโรคมมาลาเรียในกรณีของผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรงในเขตตะวันตกของประเทศกัมพูชาและได้มีการปรับใช้ไปยังเขตอื่น ๆ ของประเทศในปี 2010 โดยมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตัวยาทั้งสองในประเทศกัมพูชา (Janssens *et al.*, 2007) และในทวีปเอเชีย (Liu H., *et al.*, 2015) พบว่าสามารถรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานตั้งแต่ปี 2008 ถึง 2010 เป็นต้นมา พบว่าการรักษาด้วยตัวยา DHA-PPQ มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ลดลงจากอัตราการรักษาอยู่ที่ 89.4% เหลือเพียง 75.0% ในจังหวัดไพลิน ประเทศกัมพูชา (Leang R., *et al.*, 2015) และลดลงเรื่อยมาจนมีรายงานในปี 2015 พบว่าประสิทธิภาพในการรักษาลดลงจาก 64% เหลือเพียง 53% ในจังหวัด อุดรมีชัย (Saunders D., *et al.*, 2014)



รูปที่ 1.4 แผนที่ของประเทศกัมพูชาที่แสดงถึงเมืองและจังหวัดที่มีการทดสอบการใช้งานยา Dihydroartemisinin-piperazine เขตตะวันตกและเขตตะวันออกแทนด้วยสีแดงและสีเขียวตามลำดับ จุดสีดำแสดงให้เห็นถึงชื่อของเมืองที่ทำการทดสอบ (Leang R., *et al.*, 2015)

สืบเนื่องจากการที่ DHA-PPQ ซึ่งเป็น first-line drug ของประเทศกัมพูชามีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ติดเชื้อ *P. falciparum* ลดลงอย่างมากดังนั้นก็ได้มีการศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยมีเป้าหมายที่สนใจในการศึกษาได้แก่ Plasmepsin 2 (pfpm2), Exonuclease (pfexo) และ Chloroquine resistance transporter (pfcr1) gene ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยา piperazine นอกจากนี้เครื่องหมายทางพันธุกรรมเหล่านี้ยังถูกใช้ในการวิเคราะห์ถึงความชุกชุมของการดื้อยาในแต่ละภูมิภาค เพื่อนำมาใช้ในการปรับแนวทางการรักษาผู้ติดเชื้อ *P. falciparum* โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายทางพันธุกรรมและความสามารถในการต้านยา PPQ จากตัวอย่าง *P. falciparum* ในประเทศกัมพูชาแสดงให้เห็นว่าการเกิดการกลายพันธุ์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรม E415G-Exo และ pfcr1 ส่งผลให้เชื้อสามารถดื้อยา PPQ แต่กลับพบว่าการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น (overexpression) ของ pfpm2 เพียงอย่างเดียว ไม่ได้มีส่วนช่วยให้เชื้อสามารถดื้อยาได้มากขึ้น (Boonyalai N., et al., 2020)



รูปที่ 1.5 แสดงโครงสร้างของยา piperazine

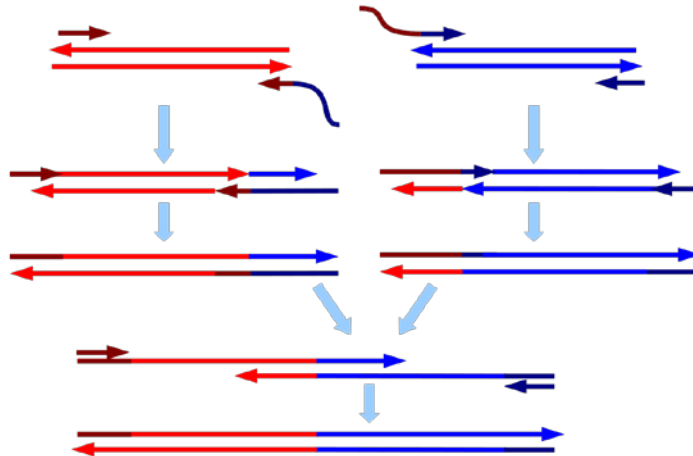
ดังนั้นเป้าหมายใหม่ที่น่าสนใจและยังไม่ได้มีการศึกษาอันหนึ่งในปัจจุบันคือ เอนไซม์เอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในขบวนการต่าง ๆ ของดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งเชื้อมาลาเรียด้วย เอกโซนิวคลีเอสสลายพันธะ 3'-5' ฟอสโฟไดเอสเทอร์เฉพาะที่ปลายสายพอลินิวคลีโอไทด์ ซึ่งแตกต่างจากเอนโดนิวคลีเอสซึ่งจะทำหน้าที่สลายพันธะ 3'-5' ฟอสโฟไดเอสเทอร์ตำแหน่งใดก็ได้ในสายพอลินิวคลีโอไทด์ กลไกในการสลายพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์จะใช้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เพื่อใช้ในขบวนการกำจัด RNA primer ออกจาก lagging strand และใช้ในการซ่อมแซมส่วนของการสังเคราะห์ที่ผิดพลาด (repair mutation) ของทั้ง DNA และ RNA เช่น DNA replication, recombination, repair ซึ่งเป็นกลไกที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียมีความซับซ้อนและมีขบวนการที่ต้องใช้เอกโซนิวคลีเอสในหลาย

ขั้นตอน เช่น หลังจากเข้าสู่เซลล์ดับ, ระหว่าง schizogony ในเซลล์เม็ดเลือดแดง, ระหว่าง gametogenesis, หลังจาก fertilization และ ในระยะ oocysts ดังนั้นเอกโซนิวคลีโอสิสจึงเป็นเป้าหมายหนึ่งสำหรับการศึกษากลไกการทำงาน

4. Overlapping PCR

การทำ Polymerase chain reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและมีศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ วิธีหนึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของ DNA ชนิดใดชนิดหนึ่งก็ได้ ในหลอดทดลองให้มีจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น โดยอาศัยหลักการแบบเดียวกันกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) ที่พบในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ (Ramesh R., *et al.*, 1992) โดยมีขั้นตอนน้อย และใช้เวลาไม่นาน ได้แก่ (1) Denaturing เป็นการทำให้ DNA เสื่อมสภาพ เพื่อที่จะแยกสาย DNA จากสภาพที่เป็นเกลียวคู่ (double helix) ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที ดังนั้นเราจึง ต้องเลือกใช้เอนไซม์ DNA polymerase ที่สามารถทนความร้อนได้สูง เพื่อไม่ให้เอนไซม์เสื่อมสภาพไปก่อน (2) Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับ DNA แม่แบบได้ (3) Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยจะสังเคราะห์จากด้าน 5' ของไพรเมอร์ ไปยังด้าน 3' ไปเรื่อย ๆ ตามลำดับนิวคลีโอไทด์บน DNA แม่แบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของ Taq polymerase ที่อุณหภูมิประมาณ 68-72 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ และระยะเวลาขึ้นอยู่กับความยาวของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่ง PCR เป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมาก โดยสามารถนำไปใช้ได้กับงานวิจัยทางชีวโมเลกุล และพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง DNA probe และการวิจัยประยุกต์ เช่น การสร้างยีนกลายพันธุ์ (PCR based mutagenesis) การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของโรค เป็นต้น

Overlapping PCR เป็นเทคนิคที่มีพื้นฐานมาจาก PCR เพื่อใช้ในการเชื่อมชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้องการเข้าด้วยกัน โดยไม่จำเป็นต้องคำนึงถึง restriction sites ซึ่งสามารถทำได้โดยการออกแบบลำดับเบสที่ปลาย 5' หรือ 3' ของ primers โดย primers แต่ละคู่ที่ออกแบบมีลำดับเบสที่ปลายเหมือนกัน เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะ PCR ชิ้นส่วน DNA แต่ละชิ้นก็จะเกิดการจับคู่ระหว่างดีเอ็นเอคู่สมกัน ทำให้ชิ้นส่วน DNA แต่ละชิ้นเชื่อมต่อกัน (Hilgarth R. และ Lanigan TM., *et al.*, 2019)



รูปที่ 1.6 แผนภาพแสดงให้เห็นถึงขั้นตอนการทำ Overlap Extension PCR โดยการออกแบบ primers แต่ละคู่ให้มีเบสคู่สมกันที่ปลาย 5' หรือ 3' เพื่อใช้ในการเชื่อมชิ้นส่วน DNA แต่ละส่วนเข้าด้วยกัน (รูปวาดงานวิจัยนี้)

ในงานวิจัยนี้สนใจที่นำส่วน Exon 1 และ Exon 2 ของยีนเอกโซนิวคลีเอสที่ต้องการศึกษาของ *P. falciparum* มาเชื่อมต่อกันโดยการใช้เทคนิค Overlapping PCR เพื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ เข้าพลาสมิดพาหะและเพื่อนำไปใช้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เชื่อมส่วนที่เป็น Exon 1 และ Exon 2 ของยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) ของ *P. falciparum* เข้าด้วยกันด้วยวิธี overlapping PCR

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน Exon ทั้ง 2 ส่วนของยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) แต่ละชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จากจีโนมของ *Plasmodium falciparum*

1.1 การทำ Polymerase chain reaction (PCR)

นำจีโนมของ *Plasmodium falciparum* ที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน exon ยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) ทั้ง 2 ส่วน โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนที่เป็น exon ของยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) ส่วนที่ 1 ความยาว 949 คู่เบส คือ PA-exon1 (forward) และ Exon1-Overlap-REV (reverse) และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนที่เป็น exon ของยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) ส่วนที่ 2 ความยาว 1193 คู่เบส คือ Exon1-Overlap-FOR (forward) และ PD-exon2 (reverse) โดยใช้ *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) ให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 50 – 100 นาโนกรัม, 2.5 U *Taq* DNA Polymerase, 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP, 2 ไมโครลิตร 25mM MgCl₂, 1 ไมโครลิตร forward primer และ 1 ไมโครลิตร reverse primer ปรับปริมาตรให้ครบ 25 ไมโครลิตรด้วยน้ำ (ตาราง 3.2)

จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมให้มีอุณหภูมิและระยะเวลา ดังนี้ Pre-Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบและจากนั้นตั้งให้เครื่องทำงานวนลูป 3 ขั้นตอน ประกอบไปด้วยขั้นตอน Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 53 (Exon 1)/ 52 (Exon 2) องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1.30 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที Holding ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.1 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ไป 3')	ความยาว (นิวคลีโอไทด์)
PA-exon1	ATGACATCACATATTAGTTACAATAAAATAAG	32
Exon1-Overlap-REV	CGTTAAAGCACATTCTCTGGTATCATCTGATGATAGGAGGT	42
Exon2-Overlap-FOR	CAGATGATACCACAGGAATGTGCTTTAACGAATGGAGT	38
PD-exon2	TCATTCCCATGTACTATCTTTG	22

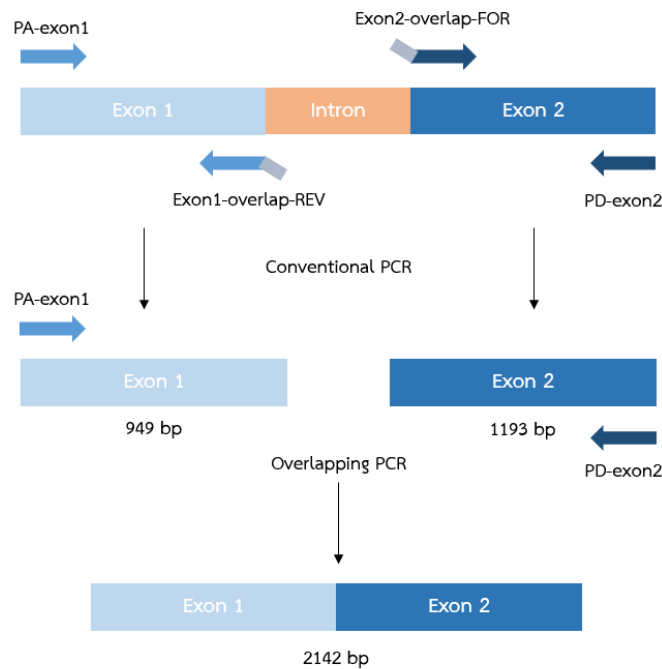
ตารางที่ 3.2 ปริมาณและความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน

Exon 1 และ Exon 2		
สารละลาย	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตรที่ใช้
10x PCR buffer	-	2.5 ไมโครลิตร
10mM dNTP	10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
25mM MgCl ₂	25 มิลลิโมลาร์	2 ไมโครลิตร
PA-Exon1 primer (Exon 1)/ PD- Exon2 primer (Exon 2)	10 ไมโครโมลาร์	1 ไมโครลิตร
Exon1-Overlap-REV primer (Exon 1)/ Exon2-Overlap-For-primer (Exon 2)	10 ไมโครโมลาร์	1 ไมโครลิตร
DNA template	5.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	5 Unit ต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
DW	-	7 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.3 อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน Exon 1 และ Exon 2

ขั้นตอนของปฏิกิริยา	สภาวะการทำ PCR	
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (วินาที)
Pre-denature	94	180
Denature	94	30
Annealing	53 (Exon 1)/ 52(Exon 2)	30
Extension	72	90
Final Extension	72	600
Holding	25	∞

2. เชื่อมชิ้นส่วน Exon ทั้ง 2 ส่วนของยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) เข้าด้วยกัน



รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการเชื่อม Exon ทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกันด้วยวิธี overlapping PCR

(รูปวาดงานวิจัยนี้)

2.1 การทำ Overlapping PCR โดยใช้ primer

นำชิ้นส่วน Exon ทั้ง 2 ส่วนที่มีส่วนปลาย overlap กันมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อต่อชิ้นส่วนยื่นเข้าด้วยกัน และเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนที่เป็นยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) คือ PA-exon1 (forward) และ PD-exon2 (reverse) โดยใช้ *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) ให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัม, 2.5 U *Taq* DNA Polymerase, 1 ไมโครลิตร dNTP, 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$, 1 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer ปรับปริมาตรให้ครบ 25 ไมโครลิตรด้วยน้ำ (ตารางที่ 3.4)

จากนั้นจึงนำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมให้มีอุณหภูมิและระยะเวลาดังนี้ Pre-Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบและจากนั้นตั้งให้เครื่องทำงานวนลูป 3 ขั้นตอน ประกอบไปด้วยขั้นตอน Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2.30 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที Holding ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3.5) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.4 ปริมาตรและความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ overlapping PCR เพื่อเชื่อมต่อส่วน Exon 1 และ Exon 2 โดยใช้ primers

สารละลาย	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตรที่ใช้
10x PCR buffer	-	2.5 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	25 มิลลิโมลาร์	2 ไมโครลิตร
Exon1 fragment	100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
Exon2 fragment	100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
PA-Exon1 primer	10 ไมโครโมลาร์	1 ไมโครลิตร
PD-Exon2 primer	10 ไมโครโมลาร์	1 ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 Unit ต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
DW	-	15 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.5 อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา overlapping PCR เพื่อเพื่อเชื่อมต่อบส่วน Exon 1 และ Exon 2 โดยใช้ primers

ขั้นตอนของปฏิกิริยา	สภาวะการทำ PCR	
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (วินาที)
Pre-denature	94	180
Denature	94	30
Annealing	52	30
Extension	72	150
Final Extension	72	600
Holding	25	∞

2.2 การทำ Overlapping Polymerase chain reaction โดยไม่ใช้ primer

นำชิ้นส่วน Exon ทั้ง 2 ส่วนที่มีส่วนปลาย overlap กันมาทำปฏิกิริยา Touchdown PCR เพื่อต่อชิ้นส่วนยีนเข้าด้วยกันแบบไม่ใช้ไพรเมอร์ PA-exon1 (forward) และ PD-exon2 (reverse) เข้ามาเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ โดยใช้ Taq DNA Polymerase kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอประมาณ 700 นาโนกรัม, 2.5 U Taq DNA Polymerase, 0.2 ปริมาตรให้ครบ 25 ไมโครลิตรด้วยน้ำ (ตารางที่ 3.6)

จากนั้นจึงนำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมให้มีอุณหภูมิและระยะเวลาดังนี้ Pre-Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบและจากนั้นตั้งให้เครื่องทำงานวนลูป 3 ขั้นตอน ประกอบไปด้วยขั้นตอน Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 69 องศาเซลเซียสโดย -0.5 องศาเซลเซียสต่อรอบ เป็นระยะเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1.30 นาที จำนวน 10 รอบ และตั้งให้เครื่องทำงานวนลูป 3 ขั้นตอนอีกครั้ง โดย Annealing ในครั้งนี้คงที่ที่ 64 องศาเซลเซียส อีกจำนวน 10 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที Holding ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3.7) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.6 ปริมาณและความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ overlapping PCR เพื่อเชื่อมต่อก่อนส่วน Exon 1 และ Exon 2 โดยไม่ใช้ primer

สารละลาย	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาณที่ใช้
10x PCR buffer	-	2.5 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
25mM MgCl ₂	25 มิลลิโมลาร์	2 ไมโครลิตร
Exon1 fragment	100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	7 ไมโครลิตร
Exon2 fragment	100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	7 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	5 Unit ต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
DW	-	5 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.7 อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา overlapping PCR เพื่อเชื่อมต่อก่อนส่วน Exon 1 และ Exon 2 โดยไม่ใช้ primer

ขั้นตอนของปฏิกิริยา	สภาวะการทำ PCR	
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (วินาที)
Pre-denature	94	180
Denature	94	30
Annealing	69 (-0.5/cycle)	30
Extension	72	90
Denature	94	30
Annealing	64	30
Extension	72	90
Final Extension	72	600
Holding	25	∞

3. การทำ gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ไปตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel และเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA) และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Document Imaging System Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

4. การตัดเจลและการสกัดเจล (Cutting a gel and gel extraction)

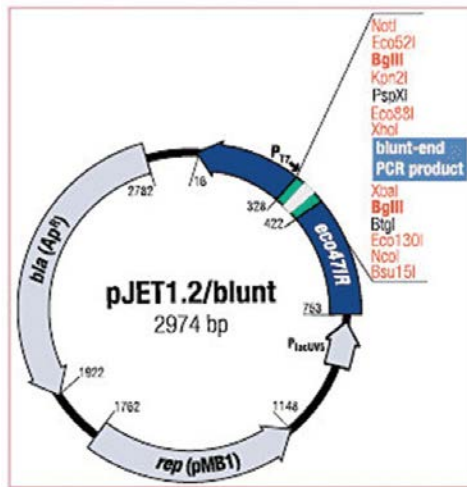
นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่พบว่ามี band ขนาดประมาณ 2100 คู่เบส ไปดูด้วยเครื่องส่องเจล (UV Transilluminator) และใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ตัดเจลที่ band 2100 คู่เบส ใส่ลง microtube 1.5 ml จากนั้นจึงทำการซังน้ำหนักเจลและเริ่มทำการสกัดเจลด้วย QIAquick Gel extraction kit ตามขั้นตอนที่ทางบริษัทแนะนำ เมื่อได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย NanoDrop spectrophotometer และเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การสร้าง recombinant plasmid และเพิ่มจำนวนของ recombinant plasmid ด้วย competent cells

5.1 การทำ ligation และ transformation

นำ Exon ที่ overlap ทั้ง 2 มาเชื่อม ligation เข้า pJET1.2/blunt cloning vector จาก CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ตามขั้นตอนที่ทางบริษัทแนะนำ โดยใช้ 2x Reaction Buffer 10 ไมโครลิตร, ผลิตภัณฑ์จาก overlapping PCR 7 ไมโครลิตร, DNA Blunting Enzyme 1 ไมโครลิตร, pJET 1.2/blunt Cloning Vector (50ng/ μ l) 1 ไมโครลิตร และ T₄ DNA ligase 1 ไมโครลิตร รวมปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร แล้วจึงทำการ transformation เข้าสู่ DH5-alpha competent cells โดยเริ่มจากการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ ligation 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร ใส่ใน competent cells และบ่มไว้บนน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำไปทำ heat shock ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วินาที นำไปบ่มไว้บน

น้ำแข็งทันที เป็นระยะเวลา 10 นาที ใส่ 850 ไมโครลิตรของ LB medium แล้วจึงนำไปบ่มพร้อมเขย่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง แบ่ง medium ปริมาณ 880 ไมโครลิตรออกเป็น 440 ไมโครลิตร 2 หลอด แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที ตู้อาหาร ให้ เหลือ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วจึงละลายตะกอนเซลล์และนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB agar ซึ่งมี ส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 16 – 18 ชั่วโมง



รูปที่ 3.2 แสดงถึงพลาสมิด pJET1.2/blunt

5.2 การทำ rapid size screening

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของ recombinant clone ด้วยไม้จิ้มฟันแล้วนำมาผสมเข้ากับ lysis buffer ปริมาณ 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มบน น้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 2 นาที นำ supernatant ปริมาณ 15 ไมโครลิตร โหลดพร้อม DNA Gel Loading Dye (6x) 2.5 ไมโครลิตรและ นำไปตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel เทียบ ขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA) ที่กำลังไฟฟ้า 120 โวลต์เป็นระยะเวลา 45 นาที และดูพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Document Imaging System Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

5.3 การสกัดพลาสมิด (plasmid extraction)

นำ recombinant clone ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงให้อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที เทอาหารทิ้งจากนั้นเติม STET buffer 300 ไมโครลิตรลงไปแล้วทำการ vortex จากนั้นใส่ lysozyme ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 25 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปต้ม 45 วินาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 30 นาที แยกเศษซากเซลล์ออกแล้วเติม 0.5% CTAB 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนอีก 10 นาที เท supernatant ทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วย NaCl ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ปริมาณ 300 ไมโครลิตร แล้วเติม RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วเติม chloroform ปริมาณ 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 15 นาที ดูดชั้นบนใส่ 1.5 ml microtube เติม isopropanol เท่ากับปริมาตรที่ดูดได้แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที ทิ้ง supernatant แล้วเติม 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อลงไป ปริมาณ 20-30 ไมโครลิตร

5.4 การตัดด้วย Restriction enzyme

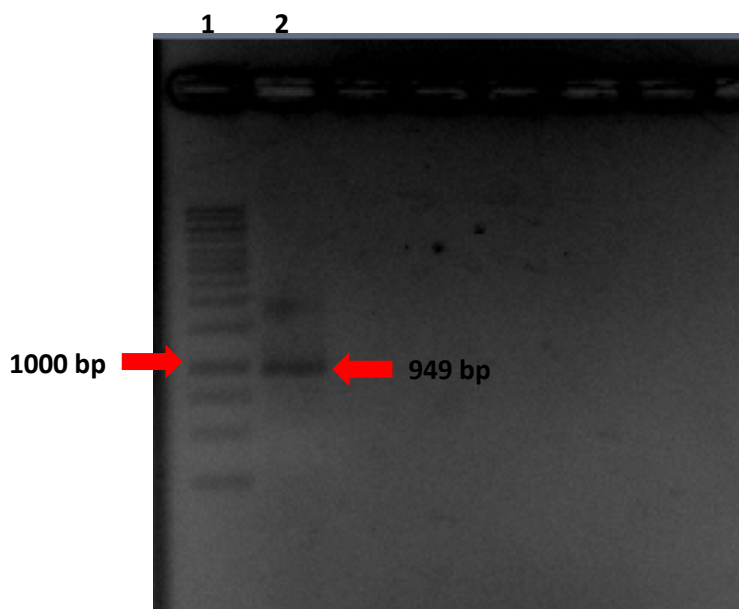
นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ในปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 10X buffer R, 0.5U *Xho* I enzyme (Thermo Fisher Scientific, USA) ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืนและตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1% เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน Exon ทั้ง 2 ส่วนของยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) แต่ละชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก genomic DNA ของ *Plasmodium falciparum*

จากการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน Exon ยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) ทั้ง 2 ส่วน โดย Exon 1 ใช้ไพรเมอร์คือ PA-exon1 (forward) และ Exon1-Overlap-REV (reverse) โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 53 องศาเซลเซียส ทั้งหมด 35 รอบ พบว่าเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ PCR ไปทำ gel electrophoresis และดูภาพภายใต้ Gel Document Imaging System Transluminator พบว่ามี band ขนาด 949 คู่เบส ปรากฏซึ่งเป็นขนาดของส่วน Exon 1 ที่ต้องการ (รูปที่ 4.1)

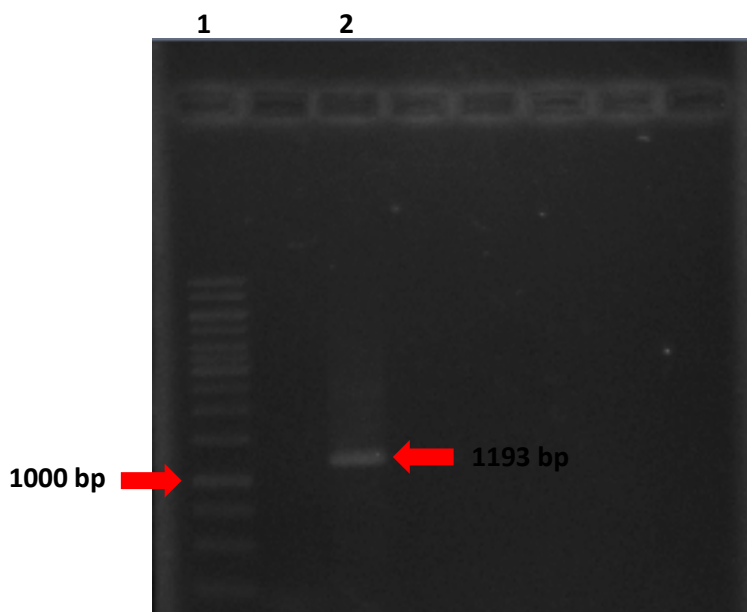


รูปที่ 4.1 0.8 % agarose gel แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ PCR ส่วน Exon 1.

Lane 1: 1 kb DNA ladder marker; Lane 2: Exon 1

เมื่อนำไปวัดหาความเข้มข้นด้วย NanoDrop spectrophotometer พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเข้มข้น 255.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

Exon 2 ใช้ไพรเมอร์คือ Exon2-Overlap-FOR (forward) และ PD-exon2 (reverse) โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส ทั้งหมด 35 รอบ พบว่าเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ PCR ไปทำ gel electrophoresis และดูภาพภายใต้ Gel Document Imaging System Transluminator พบว่ามี band ขนาด 1,193 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของส่วน Exon 2 ที่ต้องการ (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 0.8 % agarose gel แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ PCR ส่วน Exon 2.

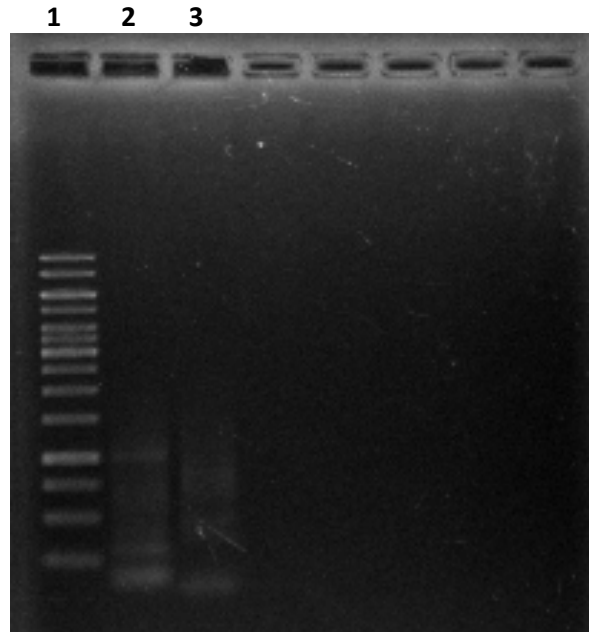
Lane 1: 1 kb DNA ladder marker; Lane 2: Exon 2

เมื่อนำไปวัดหาความเข้มข้นด้วย NanoDrop spectrophotometer พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเข้มข้น 344.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

2. เชื่อมชิ้นส่วน Exon ทั้ง 2 ส่วนของยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) เข้าด้วยกัน

การนำชิ้นส่วน Exon ทั้ง 2 ส่วนที่มีส่วนปลาย overlap กันจากปฏิกิริยาข้างต้น มาทำปฏิกิริยา Overlapping PCR เพื่อต่อชิ้นส่วนยีนเข้าด้วยกันและเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนที่เป็นยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) คือ PA-exon1 (forward) และ PD-exon2 (reverse) โดยใช้ DNA Template ได้แก่ Exon 1 ปริมาณ 50-100 นาโนกรัม กับ Exon 2 ความเข้มข้นเริ่มต้น 50-100 นาโนกรัม annealing ที่ อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส ทั้งหมด 35 รอบ พบว่าเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ overlapping PCR ข้างต้น ทั้ง 2

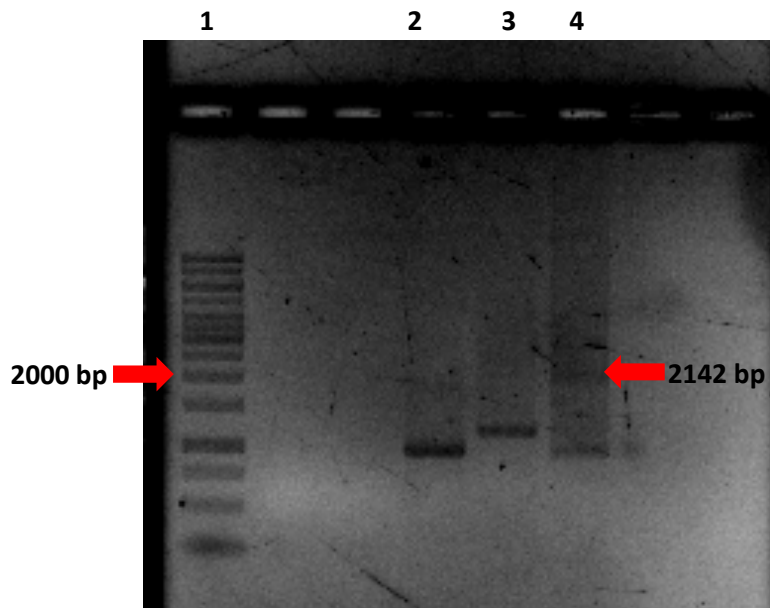
เข้าไปทำ gel electrophoresis และดูภาพภายใต้ Gel Document Imaging System Transluminator นั้นไม่ประสบความสำเร็จในการ overlap ส่วน Exon ทั้ง 2 เข้าด้วยกัน (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 0.8% agarose gel แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ overlapping PCR โดยใช้ไพรเมอร์

Lane 1: 1 kb DNA ladder marker; Lane 2: PCR product replicate 1; Lane 3: PCR product replicate 2

แต่เมื่อนำชิ้นส่วน Exon 1 และ Exon 2 มาทำปฏิกิริยา Overlapping PCR ประกอบกับการ touch down PCR เพื่อต่อชิ้นส่วนยีนเข้าด้วยกันโดยไม่ใช้ primer แต่ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของ DNA template ให้สูงขึ้น โดยมี Exon 1 ปริมาณ 700 นาโนกรัม กับ Exon 2 ความเข้มข้นเริ่มต้น 700 นาโนกรัม โดยปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้เริ่มต้นที่ 69 และลดลง 0.5 องศาเซลเซียส 10 รอบ และปรับให้คงที่อยู่ที่ 64 องศาเซลเซียส 10 รอบพบว่าเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ PCR ไปทำ gel electrophoresis และดูภาพภายใต้ Gel Document Imaging System Transluminator นั้นปรากฏ band 2,142 คู่เบส (รูปที่ 4.4) ซึ่งมาจากส่วน Exon 1 949 คู่เบส และส่วน Exon 2 1,193 คู่เบส ที่เชื่อมต่อกัน



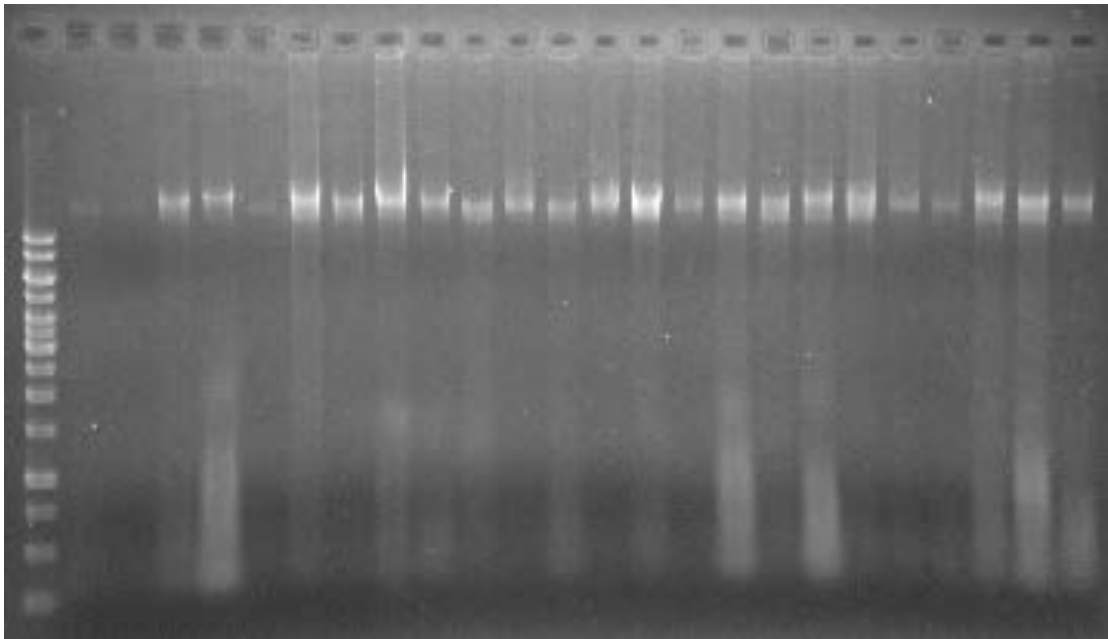
รูปที่ 4.4 0.8 % agarose gel แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ Overlapping PCR เทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR ก่อนหน้า.

Lane 1: 1 kb DNA ladder marker; Lane 2: Exon 1; Lane 3: Exon 2; Lane 4: full exon.

เมื่อนำไปวัดหาความเข้มข้นด้วย NanoDrop spectrophotometer พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเข้มข้น 29.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และภายหลังจากที่ตัดเจลและสกัดเจลแล้ว นำไปวัดความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้ อีกครั้งพบว่ามีความเข้มข้น 4.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จึงนำไปทำ ligation กับในอัตราส่วนของ insert DNA ต่อ vector เท่ากับ 1:1.5 หรือประมาณ 35 นาโนกรัมต่อ 50 นาโนกรัม

3. การสร้าง recombinant plasmid

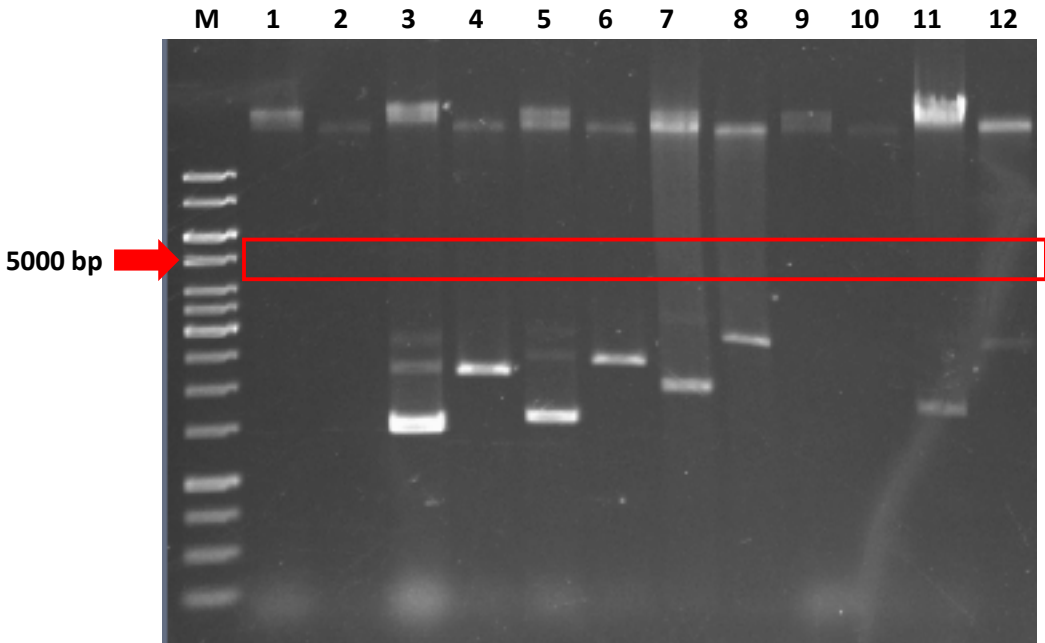
ผลที่ได้จากการ transformation ลงบน LB agar ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร บ่มเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 16-18 ชั่วโมงพบว่ามีการเจริญของรีคอมบิแนนท์โคลนเป็นโคโลนีเดียว



รูปที่ 4.5 1% agarose gel แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการ rapid size screening โดยในแถวแรกแสดงถึง 1 kb marker leader ในแต่ละแถวถัดมาแสดงถึงโคลนีเดี่ยวแต่ละโคลนีทั้ง 24 โคลนีที่ได้ทำการคัดเลือกมาทำ rapid size screening

เมื่อนำไปทำ rapid size screening และตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis ผลการทดลองไม่พบว่ามีโคลนีใดที่แสดงถึงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ (รูปที่ 4.5)

ผลที่ได้จากการคัดเลือกโคลนีเดี่ยวในครั้งถัดมา (ครั้งที่ 2) และนำไปสกัดพลาสมิด จากนั้นนำมาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ไม่พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีขนาด 5,116 คู่เบส (ขนาดพลาสมิด 2,974 คู่เบส + ขนาด inset 2,142 คู่เบส) ซึ่งเป็นขนาดที่ต้องการ (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 1 % agarose gel แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I.

M: 1 kb DNA ladder marker; 1, 3, 5, 7, 9, 11: รีคอมบิแนนท์โคลนที่ 1 2 3 4 5 และ 6 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho* I ตามลำดับ; 2, 4, 6, 8, 10, 12: รีคอมบิแนนท์โคลนที่ 1 2 3 4 5 และ 6 ตามลำดับ

นอกจากนี้การ transformation และคัดเลือกโคโลนีในการทำในครั้งถัดมา (ครั้งที่ 3) ซึ่งมีการทำ positive control โดยเป็นการ ligation ชิ้นส่วน DNA ความยาว 976 คู่เบส และ negative control ที่มีแค่ pJET1.2/blunt นั้นพบว่า DH5 Alpha competent *E. coli* สามารถเจริญบน LB agar ที่มี ampicillin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ทั้ง positive control, sample และ negative control จึงได้ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของ positive control และ sample ไปเลี้ยงบน LB agar ที่เตรียมโดยใช้ ampicillin อีกครั้งพบว่ามีเพียง positive control เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ ขณะที่ sample นั้นไม่สามารถเจริญบนอาหารที่เตรียมใหม่ได้

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายการทดลอง

การระบาดของเชื้อดื้อยา *Plasmodium falciparum* ต่อยา piperazine ที่เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรค มาลาเรียจัดว่าเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่ร้ายแรง โดยพบว่าการกลายพันธุ์ของยีนเอกโซนิวคลีเอสมีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา piperazine (Boonyalai N.,2020) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิค overlapping PCR โดยมีจุดประสงค์เพื่อเชื่อมต่อส่วน Exon ของยีนเอกโซนิวคลีเอสทั้ง 2 ส่วน ได้แก่ Exon 1 และ Exon 2 เข้าด้วยกันเพื่อนำมาใช้ศึกษาคุณสมบัติต่อไปในอนาคต

ผลจากการทำ overlapping PCR โดยนำ Exon ทั้ง 2 ส่วนที่ overlap กันขนาด 30 คู่เบส คือ CGTTAAAGCACATTCCTGTGGTATCATCTG จาก 5' ไป 3' มาเชื่อมกัน พบว่าเมื่อใส่ไพรเมอร์ PA-exon1 และ PD-exon2 และโดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ต่ำกว่าอุณหภูมิ annealing ของส่วนที่ overlap กัน 30 คู่เบส ซึ่งอยู่ที่ 64 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเชื่อม Exon ทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกันได้ โดยอาจมีสาเหตุมาจากอุณหภูมิ annealing ที่แตกต่างกันเกินไประหว่างไพรเมอร์และส่วนที่ overlap ทำให้ Exon ทั้ง 2 ส่วนไม่สามารถจับกันได้ (Ishii K. และ Fukui M., 2001) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำ overlapping PCR โดยไม่ใช้ไพรเมอร์แต่เพิ่มความเข้มข้นของ Exon 1 และ Exon 2 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และทำ touch down PCR โดยอุณหภูมิ annealing เริ่มจาก 69 องศาเซลเซียสและลดลง 0.5 องศาเซลเซียสต่อรอบ จนถึง 64 องศาเซลเซียสและ PCR ต่อไปที่ 64 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่าสามารถเชื่อมต่อ Exon ทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกันได้ โดยได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความยาว 2142 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าการใช้อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมกับส่วน overlap ของ Exon ทั้ง 2 ส่วนนั้นช่วยให้ Exon ทั้ง 2 ส่วนสามารถจับกันได้มีประสิทธิภาพมากกว่าการเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ต่ำกว่าส่วน overlap กันและการทำ touch down PCR โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่สูงกว่าปกติ 4-5 องศาเซลเซียสและค่อย ๆ ลดลงมาจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับส่วน overlap นั้นทำให้ Exon ทั้ง 2 ส่วนสามารถจับกันได้อย่างจำเพาะและทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น (Hecker K. และ Roux KH., 1996 ; Korbie DJ. และ Mattick JS., 2008)

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค overlapping PCR สามารถนำมาใช้ในการเชื่อมต่อชิ้นส่วน Exon ของยีนเอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) ได้ แต่อย่างไรก็ตามการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความแตกต่างกันของอุณหภูมิ annealing กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบใน Exon แต่ละส่วน overlap กันนั้นทำให้การทำปฏิกิริยา

PCR ครั้งเดียวเพื่อเชื่อมต่อบริเวณ Exon เข้าด้วยกันและเพิ่มปริมาณของ Exon ไปพร้อมกันนั้นเป็นไปได้ยาก ซึ่งเพื่อที่จะแก้ปัญหาเรื่องการออกแบบไพรเมอร์ควรออกแบบให้มีอุณหภูมิ annealing ใกล้เคียงกับส่วนของ Exon ที่ overlap กัน เพื่อให้ง่ายต่อการเชื่อมและเพิ่มปริมาณ Full exon หรือชิ้นส่วน Exon 1 และ Exon 2 ที่เชื่อมต่อกันแล้วในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว

หลังการตัดเจลและนำเจลมาสกัดและทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่ามีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ที่ 4.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าที่ทางบริษัทแนะนำในการทำ ligation เมื่อ ligation เข้าสู่ pJET1.2/blunt cloning vector แล้วทำการ transformation ถึงจะมีโคโลนีเดี่ยวขึ้นบน LB agar แต่อย่างไรก็ตามไม่พบว่าโคโลนีเหล่านั้นมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุอันเนื่องมาจากไม่สามารถ ligate ชิ้นส่วน Exon ที่ overlap กันแล้วเข้าสู่ pJET1.2/blunt cloning vector ได้จากอัตราส่วนของ insert DNA ที่น้อยกว่า vector หรืออาจมาจากคุณภาพของ ampicillin ที่ใช้ในการทำ LB agar เกิดการเสื่อมสภาพ ทำให้แบคทีเรียปกติสามารถเจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแม้จะไม่มี recombinant plasmid ก็ตาม

ดังนั้นการทดสอบขั้นตอนต่อไปในอนาคตหากประสบความสำเร็จในการสร้างและเพิ่มปริมาณของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว คือ การนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนเอกโซนิวคลีเอสส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์เอกโซนิวคลีเอสและศึกษากิจกรรม *in vitro* ในการทำงานและความสามารถในการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ และศึกษาการทำงานที่สภาวะต่าง ๆ ยกตัวอย่าง เช่น ความสามารถในการทำงานในช่วงความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงาน องค์ประกอบอื่น ๆ ที่เอนไซม์จำเป็นต้องใช้ในการทำงาน เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- Boonyalai, N., Vesely, B. A., Thamnurak, C., Praditpol, C., Fagnark, W., Kirativanich, K., Saingam, P., Chaisatit, C., Lertsethtakarn, P., Gosi, P., Kuntawunginn, W., Vanachayangkul, P., Spring, M. D., Fukuda, M. M., Lon, C., Smith, P. L., Waters, N. C., Saunders, D. L., & Wojnarski, M. (2020). Piperaquine resistant Cambodian Plasmodium falciparum clinical isolates: *in vitro* genotypic and phenotypic characterization. *Malaria journal*, *19*(1), 269.
- Bruce-Chwatt L.J. (1986). Chemotherapy of malaria. World Health Organization. Geneva.
- COATNEY GR. (1963). Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *12*, 121–128.
- Cox FEG. (1996). Illustrated History of Tropical Diseases. 1st ed. London: The Wellcome Trust.
- Dondorp A. M. (2008). Clinical significance of sequestration in adults with severe malaria. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*, *15*(1-2), 56–57.
- Dutta, H. M., & Dutt, AK. (1978). Malarial ecology: a global perspective. *Social science & medicine*, *12*(2D), 69–84.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., Shallom, S. J., ... Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature*, *419*(6906), 498–511.

- Garnham PCC. (1966). Historical summary of the discovery of the malaria parasites. In: Garnham PCC, editor. *Malaria parasites and other Harmosporidia*. 1st ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 3-16.
- Guerra F. (1964). Maya medicine. *Medical History*, 8, 31-43.
- Hay, S. I., Guerra, C. A., Tatem, A. J., Noor, A. M., & Snow, R. W. (2004). The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *The Lancet. Infectious diseases*, 4(6), 327–336.
- Hecker, K. H., & Roux, K. H. (1996). High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *BioTechniques*, 20(3), 478–485.
- Hemming F. (1954). Opinions and declarations rendered by the International Commission for Zoological Nomenclature Vol.7 London: ICZM
- Hilgarth, R. S., & Lanigan, TM. (2019). Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction. *MethodsX*, 7, 100759.
- Ishii, K., & Fukui, M. (2001). Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Applied and environmental microbiology*, 67(8), 3753–3755.
- Janssens, B., van Herp, M., Goubert, L., Chan, S., Uong, S., Nong, S., Socheat, D., Brockman, A., Ashley, E. A., & Van Damme, W. (2007). A randomized open study to assess the efficacy and tolerability of dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 12(2), 251–259.
- Jaramillo-Arango J. (1950). *The conquest of malaria*. London: Heinemann Medical Books.
- Klayman D. L. (1985). Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* (New York, N.Y.), 228(4703), 1049–1055.

- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 3(9), 1452–1456.
- Leang, R., Taylor, W. R., Bouth, D. M., Song, L., Tarning, J., Char, M. C., Kim, S., Witkowski, B., Duru, V., Domergue, A., Khim, N., Ringwald, P., & Menard, D. (2015). Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-Piperazine Open-Label Multicenter Clinical Assessment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8), 4719–4726.
- Liu, H., Yang, H. L., Tang, L. H., Li, X. L., Huang, F., Wang, J. Z., Li, C. F., Wang, H. Y., Nie, R. H., Guo, X. R., Lin, Y. X., Li, M., Wang, J., & Xu, J. W. (2015). *In vivo* monitoring of dihydroartemisinin-piperazine sensitivity in *Plasmodium falciparum* along the China-Myanmar border of Yunnan Province, China from 2007 to 2013. *Malaria journal*, 14, 47.
- Liu, W., Sundararaman, S. A., Loy, D. E., Learn, G. H., Li, Y., Plenderleith, L. J., Ndjango, J. B., Speede, S., Atencia, R., Cox, D., Shaw, G. M., Ayoub, A., Peeters, M., Rayner, J. C., Hahn, B. H., & Sharp, P. M. (2016). Multigenomic Delineation of *Plasmodium* Species of the *Laverania* Subgenus Infecting Wild-Living Chimpanzees and Gorillas. *Genome biology and evolution*, 8(6), 1929–1939.
- Putaporntip, C., Hongsrimuang, T., Seethamchai, S., Kobasa, T., Limkittikul, K., Cui, L., & Jongwutiwes, S. (2009). Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. *The Journal of infectious diseases*, 199(8), 1143–1150.
- Putaporntip, C., Hughes, A. L., & Jongwutiwes, S. (2013). Low level of sequence diversity at merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* from Thai isolates. *PloS one*, 8(3), e58962.
- Ramesh, R., Munshi, A., & Panda, S. K. (1992). Polymerase chain reaction. *The National medical journal of India*, 5(3), 115–119.

- Rossati, A., Bargiacchi, O., Kroumova, V., Zaramella, M., Caputo, A., & Garavelli, P. L. (2016). Climate, environment and transmission of malaria. *Le infezioni in medicina*, 24(2), 93–104.
- Saunders, D. L., Vanachayangkul, P., Lon, C., U.S. Army Military Malaria Research Program, National Center for Parasitology, Entomology, and Malaria Control (CNM), & Royal Cambodian Armed Forces (2014). Dihydroartemisinin-piperaquine failure in Cambodia. *The New England journal of medicine*, 371(5), 484–485.
- Sutherland, C. J., Tanomsing, N., Nolder, D., Oguike, M., Jennison, C., Pukrittayakamee, S., Dolecek, C., Hien, T. T., do Rosário, V. E., Arez, A. P., Pinto, J., Michon, P., Escalante, A. A., Nosten, F., Burke, M., Lee, R., Blaze, M., Otto, T. D., Barnwell, J. W., Pain, A., ... Polley, S. D. (2010). Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *The Journal of infectious diseases*, 201(10), 1544–1550.
- Thanapongpichat, S., McGready, R., Luxemburger, C., Day, N. P., White, N. J., Nosten, F., Snounou, G., & Imwong, M. (2013). Microsatellite genotyping of *Plasmodium vivax* infections and their relapses in pregnant and non-pregnant patients on the Thai-Myanmar border. *Malaria journal*, 12, 275.
- Trager W. (1994). Cultivation of malaria parasites. *Methods in cell biology*, 45, 7–26.
- Tu Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature medicine*, 17(10), 1217–1220.
- World Health Organization. (2014). Severe malaria. *Trop Med Int Health* 19 (Suppl), 7-131
- Zekar, L., & Sharman, T. (2020). *Plasmodium falciparum* Malaria. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

ภาคผนวก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB) medium

Yeast extract	5.0 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10.0 กรัม
Tryptone	10.0 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารแข็ง ให้ใส่ผงวุ้นลงไป 15 กรัม) แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

*หมายเหตุ การเตรียม LB medium + Ampicillin (50 µg/µl) ทำโดยใส่ ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไป 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันหลังอบฆ่าเชื้อ