รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

# การตรวจหาลำดับเบสของจีนไดไฮโดรโฟเลท รีดักเตส-ไทมิไดเลท ซินเทสของเชื้อมาลาเรีย สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีระดับความไวต่อยาไพริเมทามีนต่างกันด้วยวิธีการหาลำดับเบสโดยตรง

โดย

พงชัย หาญยุทธนากร
กาญจนา รังษีหิรัญรัตน์

วท
วท 15
009818

กุมภาพันธ์ 2541

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

## การตรวจหาลำดับเบสของจีนไดไฮโดรโฟเลท รีดักเตส-ไทมิไดเลท ซินเทสของเชื้อมาลาเรีย สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีระดับความไวต่อยาไพริเมทามีนต่างกันด้วยวิธีการหาลำดับเบสโดยตรง

โดย

นายพงชัย หาญยุทธนากร และ นางสาวกาญจนา รังษีหิรัญรัตน์

คุมภาพันธ์ 2541

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 9 ก.พ. 2543

I18533218

# กิตติกรรมประกาศ

ในขณะที่งานวิจัยชิ้นนี้ได้ดำเนินไปอย่างต่อเนื่องนั้น คณะผู้วิจัยก็ต้องประสบกับอุปสรรคต่างๆ หลายอย่างทั้งในด้านเวลา และเทคนิคในการทำวิจัย แต่งานชิ้นนี้ก็สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจาก ศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทองที่ช่วยเหลือในการให้คำปรึกษาต่างๆ รวมทั้งเปิดโอกาสให้ใช้เครื่องมือ รวมทั้งสารเคมีต่างๆ ของหน่วยวิจัยมาลาเรีย คณะวิทยาศาสตร์ คณะผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงในความกรุณาของศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง และหน่วยวิจัยมาลาเรีย คณะวิทยาศาสตร์ ไว้ ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัยต้องขอขอบคุณบุคลากรของ ฝ่ายศูนย์วิจัยมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คือ ดร. จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์ และดร. เนาวรัตน์ สีสด ที่ได้ช่วยสนับสนุน และให้กำลังใจในการทำวิจัยรวมทั้งการให้คำปรึกษาทางด้านเทคนิคต่างๆ รวมถึง คุณอารีย์ เสือก้อน คุณนภาพร ศิริพูล ที่ช่วยเหลือในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย ตลอดจนบุคลากรของฝ่ายศูนย์วิจัยมาลาเรียที่ได้ช่วยทำงานพื้นฐานของงานวิจัย

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอาใจใส่ คอยซักถามถึงความก้าวหน้าของงานวิจัยเสมอ

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะกรรมการติดตามและจัดสรรทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ที่เห็นความสำคัญของงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และเปิดโอกาสให้คณะผู้วิจัยได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช เพื่อทำงานวิจัยชิ้นนี้จนสำเร็จตามความมุ่งหวังทุกประการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยเรื่อง การตรวจหาลำดับเบสของจีนไดไฮโดรโฟเลท รีดักเตส-ไทมิไดเลท ซินเทสของเชื้อมาลาเรีย สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีระดับความไวต่อยาไพริเมทามีนต่างกันด้วยวิธีการหาลำดับเบสโดยตรง

ชื่อผู้วิจัย นายพงชัย หาญยุทธนากร และ นางสาว กาญจนา รังษีหิรัญรัตน์

เดือนและปีที่ทำการวิจัยเสร็จ กุมภาพันธ์ 2541

## บทคัดย่อภาษาไทย

ในอดีตยาไพริเมทามีน เป็นยาที่ให้ผลดีในการรักษาไข้มาลาเรียที่เกิดจาก *Plasmodium falciparum* โดยใช้ร่วมกับยาซัลฟาดอกซิน แต่ในปัจจุบันยาดังกล่าวได้ลดความสำคัญในการใช้ลงเนื่องจากการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยาในส่วนต่างๆของโลกอย่างกว้างขวาง ไพริเมทามีนเป็นยาในกลุ่ม antifolate ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) ของเชื้อมาลาเรียซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารจำพวกนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของดีเอ็นเอ จากการศึกษาลำดับเบสของจีนที่มีรหัสในการสร้างเอนไซม์ DHFR-TS ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* สายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/RC17 และสายพันธุ์ผ่าเหล่าที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์อีก 2 สายพันธุ์ (T9/94/M1-1-(b3) และ T9/94/300.300) ที่ได้จากการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์ T9/94 โดยใช้สารเคมี ทำให้มีคุณสมบัติในการดื้อต่อยามากกว่าสายพันธุ์ T9/94 และ สายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/RC17 ถึง 100 เท่าและ 10 เท่า ตามลำดับ พบว่า ในส่วนของจีน TS ไม่มีความแตกต่างของลำดับเบสในสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้งสาม แต่สายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/300.300 มีเบสที่ตำแหน่ง 613 แตกต่างไปจากเดิมซึ่งทำให้เอนไซม์ในส่วน DHFR มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 164 เปลี่ยนไปจาก ไอโซลูวซีน(isoleucine) เป็น เมไทโอนีน(methionine) ส่วนในสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M1-1-(b3) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในจีนดังกล่าวแสดงว่า การดื้อยาของสายพันธุ์บริสุทธิ์นี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของการถอดและ/หรือ การแปลรหัสของจีนดังกล่าว ทำให้มีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้มากกว่าสายพันธุ์ T9/94/RC17 ดังนั้นการที่สายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้งสองมีระดับของการดื้อยาต่างกันอาจเนื่องมาจากกลไกในการดื้อยาต่างกันนั่นเอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project title Sequence analysis of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene in both pyrimethamine-sensitive and -resistance clones from induced mutation by direct sequencing

Name of the investigators : Pongchai Harnyuttanakorn and Kanchana Rungsihirunrat

Year 1998

## Abstract

Pyrimethamine was a drug of choice for *Plasmodium falciparum* treatment together with sulfadoxin, but, now it is not recommended as an effective treatment because of the widely distributed resistance strains in different parts of the world. Pyrimethamine is an antifolate drug. It binds to dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) enzyme which plays an important role in nucleotide synthesis and leads to function inhibition. In this study, T9/94/RC17 clone and other clones chemically induced mutants, T9/94/M1-1-(b3) and T9/94/300.300, which are more resistance to their parent and T9/94/RC17 about 100 and 10 times respectively, were analyzed and compared their DHFR-TS sequences. The comparison showed that there is no base change in the TS gene among these three clones. There is a base change at position 613 which results to amino acid change from isoleucine to methionine at position 164 in the DHFR protein of the T9/94/300.300 clone. However, there is no base change in the DHFR gene of the T9/94/M1-1-(b3) clone which suggested that changes in the transcription and/or translation of DHFR-TS gene may play an important role as the mechanism of pyrimethamine resistance in T9/94/M1-1-(b3). Different levels of resistance in these two clones may result from the different drug resistance mechanisms.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| หน้าหัวเรื่อง | i |
| กิตติกรรมประกาศ | ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | iv |
| รายการตารางประกอบ | vi |
| รายการภาพประกอบ | vii |
| การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 1 |
| วิธีการวิจัย | 4 |
| ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง | 9 |
| ข้อสรุป | 18 |
| ข้อเสนอแนะ | 19 |
| เอกสารอ้างอิง | 20 |
| ภาคผนวก | 22 |


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ ดห
วท 15
เลขทะเบียน 009818
วัน,เดือน,ปี 13 ธ.ค. 42

## รายการตารางประกอบ


| | | หน้า |
|---|---|---|
| ตารางที่ 1 | แสดงลำดับเบสและรายละเอียดของ primer ที่ใช้ในการทดลองสำหรับการเพิ่มจำนวนจีนส่วน DHFR และ TS | 9 |
| ตารางที่ 2 | แสดงองค์ประกอบของสารเคมีและความเข้มข้นที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนจีน DHFR-TS | 10 |
| ตารางที่ 3 | แสดงลำดับเบสและรายละเอียดของ primer ที่ใช้ในการทดลองสำหรับการหาลำดับเบส | 11 |
| ตารางที่ 4 | แสดงเบสภายในจีน DHFR-TS ในสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่นำมาทำการทดลอง (เฉพาะตำแหน่งที่เชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนที่บริเวณดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการดื้อยาไพริเมทามีน) | 17 |


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายการภาพประกอบ


| | หน้า |
|---|---|
| รูปที่ 1 แผนภาพแสดงวิธีการทดลอง | 8 |
| รูปที่ 2 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เมื่อนำแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis | 10 |
| รูปที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของจีน DHFR-TS จากสายพันธุ์ต่างๆ | 12-14 |
| รูปที่ 4 แสดงแผนภาพของตำแหน่ง primer ที่ใช้ในการทดลอง | 15 |
| รูปที่ 5 แสดงแถบของดีเอ็นเอบน sequencing gel ที่ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค autoradiograph เปรียบเทียบสัญญาณที่ได้กับการตกตะกอนก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์โดย sequencing gel | 24 |
| รูปที่ 6 แสดงสัญญาณที่ได้เมื่อใช้ F1 เป็น primer ที่ใช้ในการทำ sequencing ที่อุณหภูมิช่วง annealing ต่างกัน | 25 |
| รูปที่ 7 แสดงผลของการใช้ primer ที่ต่างกันต่อการเกิดสัญญาณขึ้นในคอลัมน์ทั้ง 4 เป็นบริเวณกว้าง | 26 |
| รูปที่ 8 แสดงผลของการใช้ primer ที่ต่างกันในการทำ PCRและ cycle sequencing | 27 |


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## การสำรวจแนวความคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไข้มาลาเรียเป็นโรคที่มีความสำคัญมากของประเทศในแถบร้อนชื้น ซึ่งรวมถึงประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศที่มีอากาศร้อนชื้นเหมาะต่อการเพาะพันธุ์ของยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะสำคัญของโรค ในปี 2539 จำนวนผู้ป่วยไข้มาลาเรียมีจำนวนถึง 83,767 คน(กรองทอง, 2540) ไข้มาลาเรียเกิดจากการติดเชื้อพวกโปรโตซัว(Protozoa) ในจีนัสของพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) เชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนมีอยู่ 4 ชนิด คือ *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* ในจำนวนนี้ *P. falciparum* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดอาการรุนแรงที่สุดและอาจทำให้ผู้ติดเชื้อถึงแก่ความตายได้ ปัจจุบันความหวังในการรักษาผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) โดยการใช้ยาที่ได้ผลดีในอดีต เช่น ควินิน(quinine) คลอโรควิน (chloroquine) ไพริเมทามีน (pyrimethamine) ลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเหล่านี้ได้แพร่กระจายไปทั่วโลก ปัญหาสำคัญในการค้นคว้าวิจัยเพื่อแก้ไขการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย คือ การเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยาแก้ไข้มาลาเรีย และกลไกการเกิดการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย ความเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยาแก้ไข้มาลาเรียเกือบทั้งหมดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้น มีเพียงยาในกลุ่มของไพริเมทามีนเท่านั้นที่นักวิทยาศาสตร์พบว่า กลไกการทำงานของยาชนิดนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตัวหนึ่งของเชื้อมาลาเรียที่มีชื่อเรียกว่า ไดไฮโดรโฟเลท รีดักเตส-ไทมิไดเลท ซินเทส (Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase, DHFR-TS) กลไกการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียต่อยาไพริเมทามีนจึงได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง

ไดไฮโดรโฟเลท รีดักเตส-ไทมิไดเลท ซินเทส (Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase, DHFR-TS) ของเชื้อมาลาเรีย (*P. falciparum*) เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นจากจีนหนึ่งจีนที่ปกติจะมีอยู่เพียงชุดเดียวบนโครโมโซมแท่งที่ 4 (Cowman *et al.*, 1988) จีนดังกล่าวประกอบด้วยรหัสหรือลำดับของเบสซึ่งสามารถถอดและแปลรหัสได้เป็นเปปไทด์ที่มีความยาว 608 กรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 71 KDa ปลายด้านอะมิโนของเปปไทด์เป็นส่วนของ DHFR ส่วนปลายด้านคาร์บอกซีเป็นส่วนของ TS โดยมีส่วนกลางที่มีความยาวประมาณ 90 กรดอะมิโนกั้นอยู่ระหว่าง DHFR และ TS ดังนั้นเปปไทด์ที่สร้างขึ้นจากจีนดังกล่าวจะสามารถทำหน้าที่เป็นทั้ง DHFR และ TS ในโมเลกุลเดียวกัน แต่การทำงานของเอนไซม์นี้จะต้องประกอบด้วยเปปไทด์ที่เหมือนกันสองสาย(homodimer) อยู่ร่วมกันจึงจะสามารถทำงานได้ (Bzik *et al.*, 1987, Sirawaraporn *et al.*, 1990) เอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญต่อเชื้อมาลาเรียในฐานะที่เร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารพวกไพริมิดีน (Pyrimidine) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของดีเอ็นเอ ดังนั้นเมื่อไพริเมทามีนไปจับกับเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานต่อไปได้ เชื้อมาลาเรียก็จะตายไปในที่สุด

จากการศึกษาจีนของ DHFR ของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาและเชื้อมาลาเรียที่ไวต่อยาที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลอง สามารถสรุปข้อสมมติฐานต่างๆได้ว่า การดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย(*P. falciparum*) อาจเกิดได้จาก

1. การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 16, 51, 59, 108 และ 164 ในจีนของ DHFR ทำให้โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ตติยภูมิ (tertiary structure) และโครงสร้างชั้นที่สูงกว่าเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย ทำให้เอนไซม์จับกับยาไพริเมทามีนได้ไม่ดี ยาจึงไม่สามารถยับยั้งการทำงาน

ของเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เอนไซม์ยังคงสามารถทำงานได้ (Peterson *et al.*, 1988; Cowman *et al.*, 1988; Foote *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1990; Plowe *et al.*, 1995; และ Walter, 1986)

2. การเพิ่มจำนวนจีนที่สร้างเอนไซม์ DHFR เชื้อมาลาเรียจึงสามารถสร้างเอนไซม์ได้มากขึ้น ทำให้ต้องใช้ปริมาณยาที่สูงขึ้นในการกำจัดเชื้อมาลาเรียเหล่านี้ (Inselburg *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1990)
3. การเปลี่ยนแปลงของการถอดและ/หรือการแปลรหัส ทำให้เชื้อมาลาเรียสามารถสร้างเอนไซม์ได้มากขึ้น (Thaithong *et al.*, 1992; Thaithong และ Beale, 1992)

อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่ากลไกในการดื้อต่อยาของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์หนึ่งๆในธรรมชาติเกิดจากกลไกหลายชนิดร่วมกัน

หน่วยวิจัยมาลาเรีย คณะวิทยาศาสตร์ ได้ทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM4/8.2 และสายพันธุ์ T9/94 ที่ไวต่อยาไพริเมทามีน โดยการใช้สารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) และ ethyl methane sulphonate(EMS) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นเฉพาะภายในโปรตีน DHFR ควบคู่ไปกับ การดื้อต่อยาไพริเมทามีนของเชื้อมาลาเรียที่กลายพันธุ์ไป ผลของการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ไปมีความดื้อต่อยาไพริเมทามีนแตกต่างกัน และกลไกที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาไพริเมทามีนก็อาจแตกต่างกันไปอีกด้วย เช่น สายพันธุ์บริสุทธิ์ TM4/8.2/4.1(กลายพันธุ์โดยใช้ MNNG) เมื่อกลายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 108 จาก Serine ไปเป็น Asparagine ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ TM4/8.2/4.1 ทนต่อยาไพริเมทามีนสูงกว่าสายพันธุ์ TM4/8.2 ถึง 500 เท่า ส่วนการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M1-1-(b3) (กลายพันธุ์โดยใช้ MNNG) และสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/300.300 (กลายพันธุ์โดยใช้ EMS) ทนต่อไพริเมทามีนสูงกว่าสายพันธุ์ T9/94 ถึง 100 เท่า และประมาณ 10 เท่า ตามลำดับ และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนพบว่า สายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M1-1-(b3) มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับสายพันธุ์ T9/94 ทุกประการ แต่สามารถสร้างเอนไซม์ได้เป็นปริมาณ 2 เท่าของสายพันธุ์ T9/94 โดยไม่มีการเพิ่มจำนวนชุดของจีน DHFR ในขณะที่สายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/300.300 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 164 เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น (จาก Isoleucine ไปเป็น Methionine) (Thaithong *et al.*, 1992; Thaithong และ Beale, 1992) **แต่เนื่องจากสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M1-1-(b3) และ T9/94/300.300 ได้จากการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี จึงมีโอกาสเป็นไปได้ว่า การชักนำการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจมีผลต่อการแปลและถอดรหัสของเอนไซม์ TS หรือการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างในระดับสูงของเอนไซม์ TS ทำให้เกิดผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ DHFR ที่อยู่บนโมเลกุลเดียวกัน เป็นผลให้เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้งสองมีความดื้อต่อยาไพริเมทามีนเพิ่มขึ้น** ดังนั้นการหาลำดับเบสของจีนในส่วนที่เป็น TS จึงมีความสำคัญในการวิเคราะห์ถึงสาเหตุของการดื้อยาในสายพันธ์บริสุทธิ์ทั้งสอง ซึ่งการทดลองก่อนหน้านี้ไม่มีการรายงานถึงลำดับเบสของจีนในส่วนนี้เลย นอกจากนี้ **การหาลำดับเบสโดยใช้ primer ที่อยู่ใน structural gene ในการทดลองข้างต้น ทำให้ความแตกต่างของลำดับเบสในช่วงปลายด้าน 5' และ 3' ของจีน DHFR ไม่อาจบ่งชี้ได้อย่างชัดเจนในสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีทั้งสองสายพันธุ์**

จุดประสงค์ของการทดลองนี้จึงเป็นการทดลองเพื่อหาลำดับของเบสภายในจีนทั้งในส่วนที่มีรหัสในการสร้าง DHFR และ TS ของสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/RC17 (ได้จากการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์มาจาก T9/94

โดยตรง) T9/94/M1-1-(b3) และ T9/94/300.300 ด้วยวิธีการหาลำดับเบสโดยตรง (direct sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบหาความแตกต่างภายในจีนของทั้งสามสายพันธุ์ โดยใช้ primer ที่อยู่นอก structural gene ทั้งด้านปลาย 5' และ 3' เพื่อให้สามารถอ่านลำดับของเบสภายในจีนของ DHFR-TS ได้ทั้งหมด

เชื้อมาลาเรียที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากคนไข้ที่ติดเชื้อมาลาเรียโดยตรงหรือนำมาเพาะเลี้ยงในห้องทดลองนั้นอาจมีเชื้อมาลาเรียหลายสายพันธุ์ปะปนในจำนวนที่แตกต่างกันไป การตรวจหาลำดับเบสของสายพันธุ์ทุกสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างเหล่านี้ด้วยวิธีการหาลำดับเบสแบบปกติจะต้องผ่านกระบวนการในการตัดจีนที่สนใจหรือเพิ่มจำนวนจีนที่สนใจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสแล้วนำไปต่อกับพาหะ (vectors) นำพาหะลูกผสม (recombinant vector) ไปใส่ในเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวนจีนนั้นให้มีปริมาณมากพอก่อนที่จะนำไปหาลำดับเบสด้วยวิธี dideoxynucleotide chain termination ผู้ตรวจหาจะต้องทำการหาลำดับเบสของโคลน(clone)ต่างๆของแบคทีเรียจำนวนมาก ซึ่งเป็นไปได้ยากที่จะแน่ใจว่าลำดับเบสที่ได้เป็นลำดับเบสของทุกสายพันธุ์ที่เจริญปะปนอยู่ด้วยกัน วิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยาก มีขั้นตอนซับซ้อน กินเวลานาน เสียค่าใช้จ่ายสูงอีกทั้งมีปัญหาในเรื่องของความถูกต้องของลำดับเบส และการตรวจสอบลำดับเบสที่ได้เนื่องจากความซับซ้อนของกระบวนการเอง (Oliveira *et al.*, 1996) นอกจากนี้ดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียเป็นดีเอ็นเอที่มีองค์ประกอบของ A และ T อยู่สูงและมีบริเวณที่มีลำดับเบสเฉพาะ A และ T ต่อกันเป็นช่วงยาวซึ่งเป็นลักษณะของดีเอ็นเอที่ไม่เสถียรเมื่อนำไปใส่ในเซลล์ของ *E. coli* (Wu *et al.*, 1995) จึงไม่สามารถแน่ใจได้ว่าความแตกต่างของลำดับเบสที่อ่านได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่เกิดภายในแบคทีเรียเองหรือไม่

การหาลำดับเบสโดยตรงเป็นเทคนิคในการหาลำดับเบสอย่างหนึ่ง โดยการรวมเอาเทคนิคการหาลำดับเบสแบบ dideoxynucleotide chain termination (Sanger *et al.*, 1977) และ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลส (Saiki *et al.*, 1988) เพื่อให้กระบวนการหาลำดับของเบสเป็นไปอย่างง่ายดายยิ่งขึ้น โดยการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสในการเพิ่มจำนวนจีนที่สนใจในหลอดทดลองแล้วจึงนำมาใช้ในการหาลำดับเบสด้วยวิธี dideoxynucleotide chain termination ร่วมกับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลสอีกครั้งหนึ่ง (Murray, 1989) เป็นการลดขั้นตอนการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงใช้เวลาน้อยลง เทคนิคนี้ได้มีผู้นำมาใช้อย่างแพร่หลายในการหาลำดับเบสจากสิ่งมีชีวิตต่างๆรวมทั้งเชื้อมาลาเรีย (Tolle *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังไม่สามารถใช้ในการหาลำดับเบสของเชื้อมาลาเรียที่แยกได้จากคนไข้โดยตรงหรือที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากวิธีนี้ไม่สามารถตรวจหาลำดับเบสของสายพันธุ์หลายสายพันธุ์ที่ปะปนอยู่ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีอยู่เป็นจำนวนน้อย แต่เนื่องจากเชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการทดลองนี้ที่ได้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้เพาะเลี้ยงอยู่ในห้องปฏิบัติการ วิธีการหาลำดับเบสด้วยวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมกว่าวิธีแบบปกติ

# บทที่ 2

# วิธีการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องทดลองและการปั่นเก็บเชื้อมาลาเรีย

   1.1. เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ T9/94/M1-1-(b3) T9/94/300.300 และ T9/94/RC17 จะถูกเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองตามวิธีของ Trager/Jensen (Trager และ Jensen, 1976) จนได้ parasitaemia ประมาณ 20%

   1.2. เชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงได้จะถูกนำมาปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

   1.3. ดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งให้มากที่สุด

   1.4. ล้างตะกอนเชื้อมาลาเรียด้วย phosphate buffer Saline (10 mM $NaH_2PO_4$ และ 150 mM NaCl) 3 ครั้ง

   1.5. นำเซลล์ที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียด้วยฟีนอล (ปรับปรุงจาก Snounou *et al.*, 1993)

   2.1. เติม 1 มิลลิลิตร ของ 0.05% saponin ใน phosphate buffer ลงในหลอด microcentrifuge ที่มีเชื้อบ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งสังเกตเห็นการสลายตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง นำหลอดแช่ในน้ำแข็งทันที

   2.2. ตกตะกอนเชื้อมาลาเรียด้วยการปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แช่หลอดในน้ำแข็ง ดูดส่วนที่เป็นของเหลวออก

   2.3. เติม lysis buffer 1 มิลลิลิตร (40 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0, 80 มิลลิโมลาร์ EDTA, pH 8.0, 2% SDS, proteinase K 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในตะกอนเชื้อมาลาเรีย vortex ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

   2.4. เติม Tris-equilibrated phenol, pH 8.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากันประมาณ 1 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนสารละลายซึ่งอยู่ส่วนบนออกไปใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่

   2.5. ทำซ้ำข้อ 2.4. อีกครั้งหนึ่งแต่ใช้ Tris-equilibrated phenol, pH 8.0 / chloroform / isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25: 24:1 แทน Tris-equilibrated phenol, pH 8.0

   2.6. เติม สารละลาย 3.0 M sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 45 ไมโครลิตร vortex ค่อยๆเพื่อให้เข้ากัน เติม absolute ethanol เย็น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เอียงหลอดไปมาเพื่อผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

   2.7. นำมาปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

   2.8 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 80% ethanol ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

   2.9. ทำซ้ำข้อ 2.8. อีกครั้งหนึ่ง ดูดส่วนที่เป็นสารละลายออกให้มากที่สุดโดยไม่ให้กระทบกระเทือนตะกอนดีเอ็นเอ ทิ้งให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย สารละลาย TE (10 mM Tris-Cl, pH 8.0 และ 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการหาลำดับเบสโดยตรงต่อไป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



3. การหาลำดับเบสของ primer ที่จะใช้ในการหาลำดับเบสโดยตรง และ Polymerase Chain Reaction (PCR)

ใช้ โปรแกรม OLIGO และ DNASIS ควบคู่กันในการคำนวณหาค่า *Tm* (melting temperature) โดยพิจารณาให้ค่า *Tm* ของ primer สำหรับการทำ PCR มีค่าสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และ primer ที่ใช้ในการหาลำดับเบสโดยตรงมีค่าสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส

4. การทำ PCR

ใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promega Corp.) และใช้เครื่อง DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus) สภาวะที่ใช้แสดงอยู่ในผลการทดลอง

5. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์

ดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR จะถูกตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเตรียม 1.5% agarose ในบัฟเฟอร์ TBE (Tris-borate 45 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์) ที่เติม ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำหน้าที่เป็นตัวกลาง ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตรเติมลงในแต่ละหลุม และใช้ DNA marker (DNA molecular-weight marker VI, Boehringer Mannheim) เป็นตัวเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ ใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transluminator (Fotodyne Inc.) บันทึกภาพด้วยฟิล์มโพลารอยด์

6. การทำให้ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์โดย GENECLEAN II kit (BIO101)

6.1. นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR มาแยกแถบดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

6.2. ตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ นำมาชั่งน้ำหนัก

6.3. เติมสารละลาย NaI ปริมาตรประมาณ 3 เท่าของเจลที่ตัดออกมา บ่มไว้ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที

6.4. เติม GLASSMILK® 10 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที(เขย่าทุก 1-2 นาที)

6.5. ปั่นให้ GLASSMILK®/DNA complex ตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

6.6. ดูดสารละลายออกทิ้ง

6.7. ล้างตะกอนด้วย สารละลาย NEW WASH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง

6.8. เติม TE buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร vortex แล้วจึงบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.9. นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับเบสโดยตรงต่อไป

7. การทำให้ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยสารเคมี

7.1. ดูด mineral oil ออกจากหลอดภายหลังการทำ PCR ให้มากที่สุด

7.2. ปรับปริมาตรของสารละลายให้ได้ 200 ไมโครลิตร

7.3. เติม phenol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากัน ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนใส่หลอด microfuge ใหม่

7.4. เติม phenol-chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากัน ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนใส่หลอด microfuge ใหม่

7.5. เติม 5 โมลาร์ ammonium acetate, pH 5.0 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.0 โมลาร์ vortex ให้เข้ากัน เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของสารละลาย นำไปแช่ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมง

7.6. ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายทิ้งไป

7.7. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 80% ethanol ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

7.8. ทิ้งให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วย สารละลาย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

8. การทำให้ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit Protocol

8.1. เติม PB buffer ลงในหลอดภายหลังการทำ PCR ในอัตราส่วน PB buffer: สารละลาย เท่ากับ 5:1 vortex ให้เข้ากัน

8.2. สวม QIAquick column ลงใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร

8.3. ดูดสารละลายในข้อ 8.1 ลงใน QIAquick column นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

8.4. ทิ้งสารละลายใน collection tube

8.5. ล้าง QIAquick column ด้วย PE buffer ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

8.6. ทิ้งสารละลายใน collection tube นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

8.7. สวม QIAquick column ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

8.8. แยกดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ออกจาก QIAquick column โดยการเติม 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางของ QIAquick column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

9. หาลำดับเบสโดยตรงด้วย CircumVent™ Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing kit

9.1. การหาลำดับเบสโดยตรงด้วยวิธีที่กำหนดไว้ในคู่มือ ดังนี้

9.1.1. เตรียมหลอด microcentrifuge 4 หลอด เขียนตัวอักษร A, G, C, T ไว้บนฝาหลอด

9.1.2. เติม CircumVent™ Deoxy/Dideoxy Sequencing Mixes ปริมาตร 3 ไมโครลิตรที่ก้นหลอดของแต่ละหลอด

9.1.3. เตรียมสารละลายปฏิกิริยาลงในหลอด microcentrifuge ใหม่ ดังนี้

| | |
|---|---|
| primer | 1.2 pmol |
| 10XCircumVent™ Sequencing Buffer | 1.5 ไมโครลิตร |
| 30X Triton X-100 | 1.0 ไมโครลิตร |
| ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ | 1.0 ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่นปลอดเชื้อ | ปรับปริมาตรให้เป็น 12 ไมโครลิตร |

9.1.4. เติม [$\alpha$-$^{35}$S] dATP(500 Ci/mmol) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ Vent $_R$®(exo$^-$) DNA polymerase 2 units

9.1.5. ดูดสารละลายปฏิกิริยาลงในหลอดทั้ง 4 ที่เตรียมไว้ หลอดละ 3.2 ไมโครลิตร

9.1.6. หยด sterile mineral oil ลงไปหลอดละ 1 หยด

9.1.7. ใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler

9.1.8. เติม stop/loading dye solution หรือน้ำกลั่นปลอดเชื้อ(ในกรณีที่ต้องการตกตะกอนด้วย ethanol ตามวิธีในข้อ 9.2) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงในหลอดแต่ละหลอด ต้มที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ก่อนที่จะนำไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis

9.2. การตกตะกอนผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา CircumVent™ Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing โดยวิธีตกตะกอนด้วย ethanol(sodium acetate)ของ ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

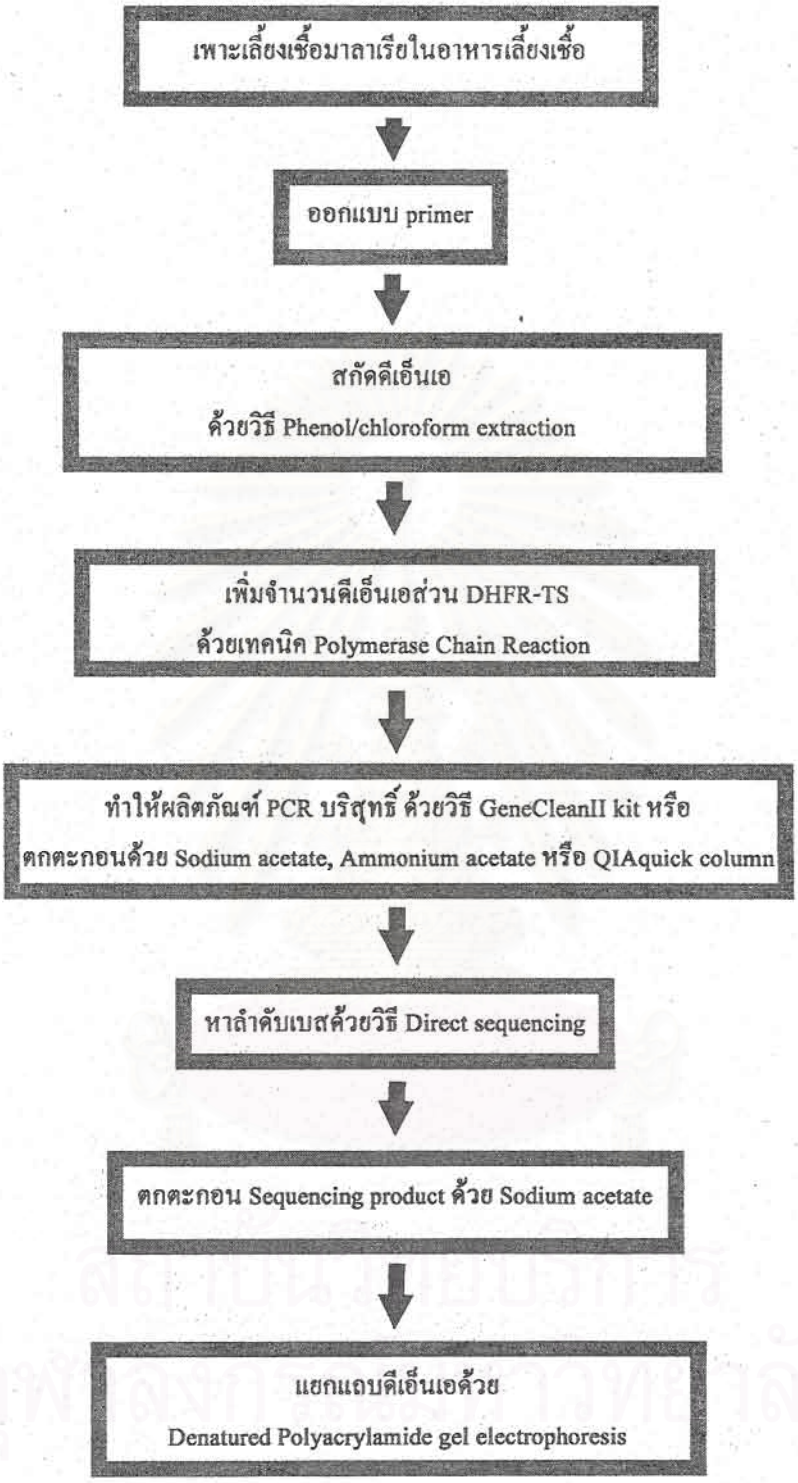
9.2.1. เติม 3 โมลาร์ sodium acetate, pH 4.6 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 95% ethanol ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที

9.2.2. ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

9.2.3. ดูดเอาสารละลายออกให้มากที่สุด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

9.2.4. ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ทิ้งให้แห้ง

9.1.8. ละลายตะกอนด้วยสารละลายผสมของ น้ำ: loading buffer เท่ากับ 3:2 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ต้มที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ก่อนที่จะนำไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis




<u>รูปที่ 1</u> แผนภาพแสดงวิธีการทดลอง

# บทที่ 3

## ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

### 1. การออกแบบ primer โดยใช้โปรแกรม Oligo และ DNASIS

ในขั้นตอนแรกของการออกแบบ primer ได้ออกแบบ primer โดยใช้โปรแกรม OLIGO และ DNASIS ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีน DHFR-TS ของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยาไพริเมทามีน สายพันธุ์ HB3, K1, 7G8 (Cowman *et al.*, 1988) และสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อต่อยาไพริเมทามีน FCR3 (Peterson *et al.*, 1990) ได้เป็น oligonucleotide 4 เส้น ดังนี้(รูปที่ 3 และ 4)

| ลำดับเบส | ความยาว | ชื่อที่ใช้ | ลำดับที่ในจีน | $T_m$(°C)* |
|---|---|---|---|---|
| forward primers | | | | |
| ATATTCCAACATTTTCAAGATTGATACA | 28-mer | F1 | 18 | 60.9 |
| ATGCCTTTAAAGAATGATGACAAAGA | 26-mer | F5 | 866 | 62.3 |
| reverse primers | | | | |
| TTCTTCATCATCATCATTTTCA | 25-mer | R6 | 979 | 58.8 |
| CTTAACCGTTCAGGTAATTTTGTCA | 25-mer | R1 | 2005 | 62.5 |

* คำนวนโดยใช้โปรแกรม DNASIS

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสและรายละเอียดของ primer ที่ใช้ในการทดลองสำหรับการเพิ่มจำนวนจีนส่วน DHFR และ TS

### 2. ผลการเพิ่มจำนวนจีนของ DHFR และ TS โดยวิธี PCR

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนจีนของ DHFR (โดยใช้ primer F1 และ R6), TS (โดยใช้ primer F5 และ R1) และ DHFR-TS (โดยใช้ primer F1 และ R1) พบว่า การเปลี่ยนปัจจัยต่างๆมีผลต่อการเพิ่มจำนวนจีนทั้งสามส่วน ปัจจัยเหล่านั้น ได้แก่ ปริมาณ genomic DNA ที่ใส่, อุณหภูมิในช่วง annealing, ความเข้มข้นของ $MgCl_2$, ความเข้มข้นของ primers ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยเหล่านี้มีผลทำให้ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ PCR เลย หรือได้ผลิตภัณฑ์จำนวนมาก หรือ มีผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดไม่ตรงตามที่คำนวณจากขนาดของดีเอ็นเอระหว่าง primer ที่ใช้

จากการศึกษาพบว่าสภาวะเหมาะสมอันหนึ่งในการเพิ่มจำนวนจีนของ DHFR และ TS โดยวิธี PCR ที่ให้ผลดีและให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง คือ ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

| สาร | ความเข้มข้นหรือปริมาณ |
|---|---|
| KCl | 50 มิลลิโมลาร์ |
| Tris-HCl, pH 8.8 | 10 มิลลิโมลาร์ |
| $MgCl_2$ | 2.5 มิลลิโมลาร์ |
| dNTPs | 75 ไมโครโมลาร์ |
| gelatin | 0.02 % |
| primers (each) | 0.1 ไมโครโมลาร์ |
| *Taq* DNA polymerase | 0.5 unit |
| DNA template(dilute 1:10) | 1.0 ไมโครลิตร |
| mineral oil | 20 ไมโครลิตร |

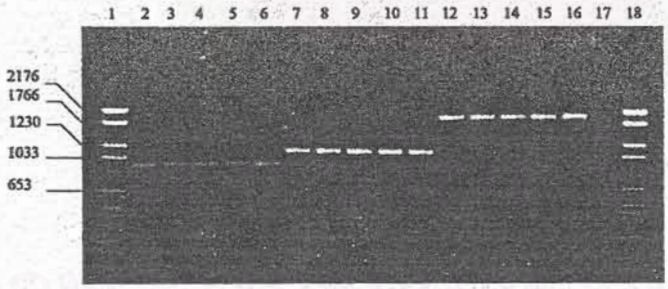
ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีและความเข้มข้นที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนจีน DHFR-TS

สภาวะที่ใช้มีดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| denaturation step | 95 องศาเซลเซียส | 25 วินาที | |
| annealing step | 50 องศาเซลเซียส | 35 วินาที | |
| extension step | 68 องศาเซลเซียส | 2 นาที 30 วินาที | ทำซ้ำ 30 รอบ |

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คำนวณจากขนาดของดีเอ็นเอระหว่าง primer ที่ใช้ กล่าวคือ

1. ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ระหว่าง F1 และ R6 ควรมีขนาดประมาณ 962 base pair(bp)
2. ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ระหว่าง F5 และ R1 ควรมีขนาดประมาณ 1150 bp
3. ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ระหว่าง F1 และ R1 ควรมีขนาดประมาณ 1198 bp(รูปที่ 2)




รูปที่ 2 แสดง ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เมื่อนำมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตัวอย่างที่ 1 และ 18 คือ DNA size marker พร้อมตัวเลขแสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอ (หน่วยเป็น bp)

ตัวอย่างที่ 2-6 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจาก primer F1 และ R6(คลอบคลุมส่วนที่เป็นจีนของ DHFR)

ตัวอย่างที่ 7-11 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจาก primer F5 และ R1(คลอบคลุมส่วนที่เป็นจีนของ TS)

ตัวอย่างที่ 12-16 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจาก primer F1 และ R1(คลอบคลุมส่วนที่เป็นจีนของ DHFR-TS)

ตัวอย่างที่ 17 คือ negative control

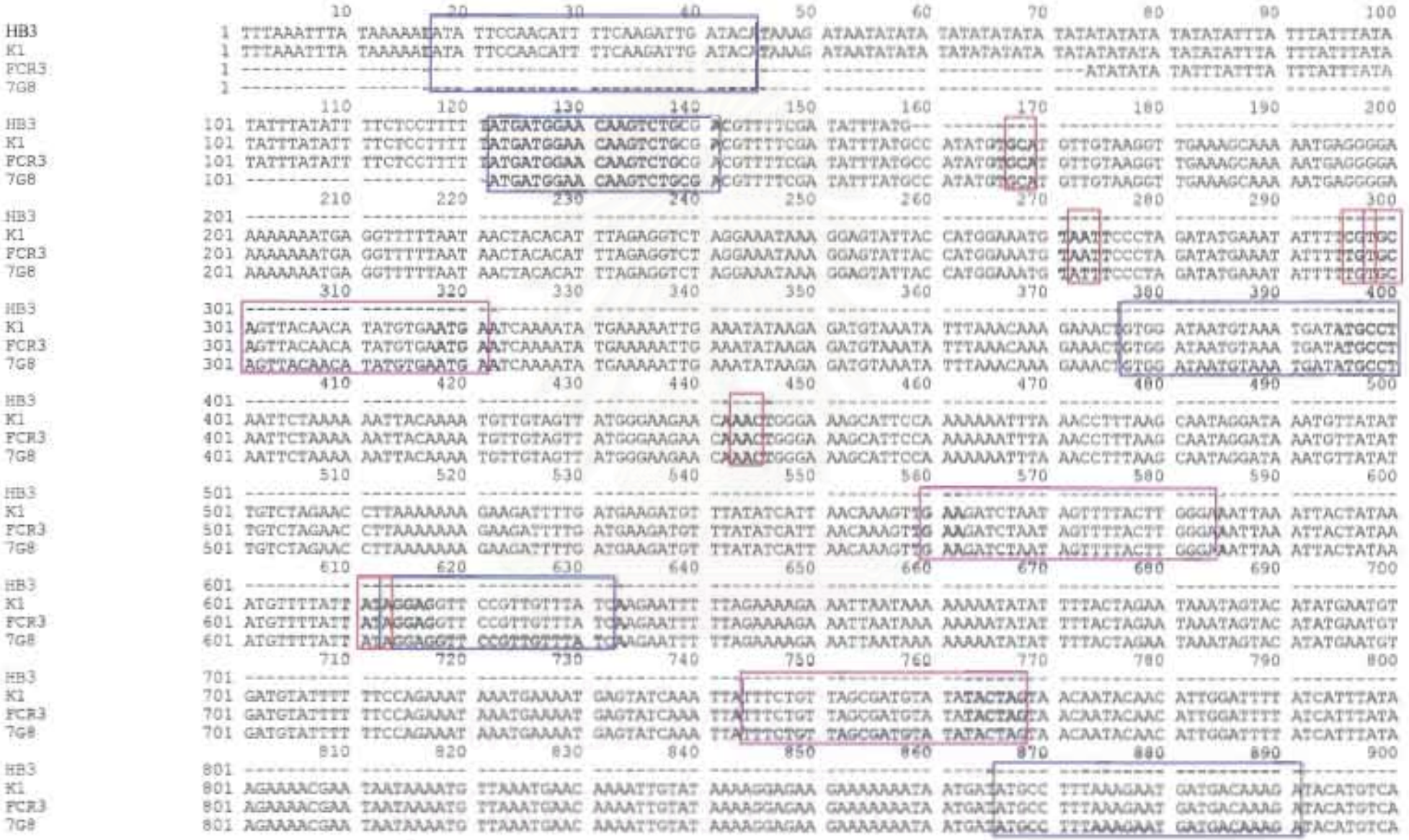
3. <u>การออกแบบ primer เพื่อใช้ในการหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR</u>

ในขั้นตอนแรกของการออกแบบ primer ได้ออกแบบ primer โดยใช้โปรแกรม OLIGO และ DNASIS ได้เป็น oligonucleotide 14 เส้นดังนี้ (ดูรูปที่ 3 และ 4)

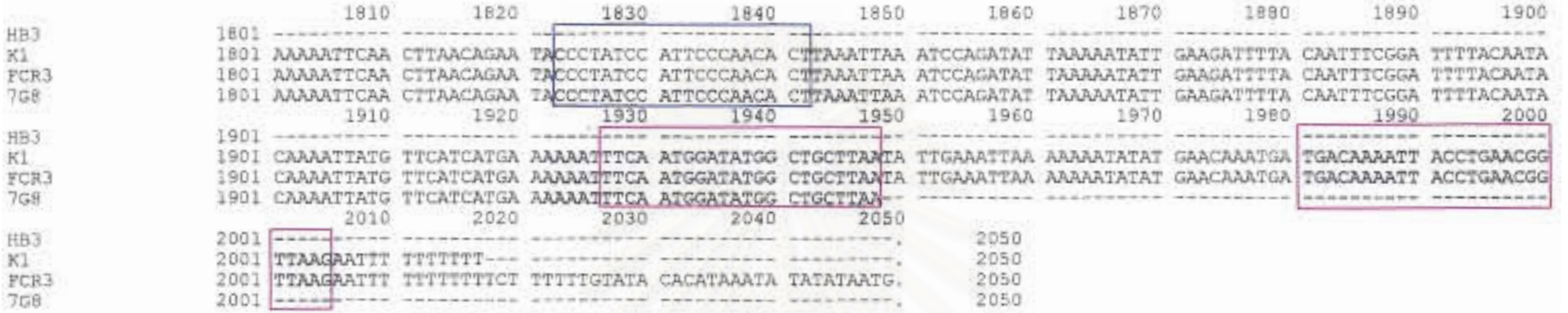
| ลำดับเบส | ความยาว | ชื่อที่ใช้ | ลำดับที่ในจีน | Tm(°C)* |
|---|---|---|---|---|
| <u>forward primers</u> | | | | |
| ATGATGGAACAAGTCTGCGA | 20 | F2 | 122 | 61.2 |
| GTGGATAATGTAAATGATATGCCT | 24 | F3 | 377 | 61.1 |
| AGGAGGTTCCGTTGTTTATC | 20 | F4 | 613 | 60.2 |
| AGCTTGAAATATAAATATCATCCTGA | 26 | F6 | 1070 | 60.3 |
| GAAGCTAATGGTACTAGGGA | 20 | F7 | 1334 | 61.5 |
| ACCAAATGGCATTACCTCCT | 20 | F8 | 1569 | 63.0 |
| CCCTATCCATTCCCAACACT | 20 | F9 | 1823 | 64.1 |
| <u>reverse primers</u> | | | | |
| TCATTCACATATGTTGTAACTGCA | 24 | R9 | 321 | 61.4 |
| TCCCAAGTAAAACTATTAGATCTTC | 25 | R8 | 584 | 60.9 |
| CTAGTATATACATCGCTAACAGAAA | 25 | R7 | 768 | 60.4 |
| ACTTAAAACACCTACTCCCGT | 21 | R5 | 1177 | 62.4 |
| TCAGCACCGAAATGTCTCCA | 20 | R4 | 1440 | 64.1 |
| ATTAAAAGGTACTCCTAGCCCT | 22 | R3 | 1684 | 64.3 |
| TTAAGCAGCCATATCCATTGAAA | 23 | R2 | 1948 | 61.5 |

* คำนวณโดยใช้โปรแกรม DNASIS

<u>ตารางที่ 3</u> แสดงลำดับเบสและรายละเอียดของ primer ที่ใช้ในการทดลองสำหรับการหาลำดับเบส


HB3
K1
FCR3
7G8

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
HB3 901 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1 901 TATGAAAAAA TTAACAGAAT TTTACAAAAA TGTAGACAAA TATAAAATTA ATTATGAAAA TGATGATGAT GATGAAGAAG AAGATGATTT TGTTTATTTT
FCR3 901 TATGAAAAAA TTAACAGAAT TTTACAAAAA TGTAGACAAA TATAAAATTA ATTATGAAAA TGATGATGAT GATGAAGAAG AAGATGATTT TGTTTATTTT
7G8 901 TATGAAAAAA TTAACAGAAT TTTACAAAAA TGTAGACAAA TATAAAATTA ATTATGAAAA TGATGATGAT GATGAAGAAG AAGATGATTT TGTTTATTTT
1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
HB3 1001 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1 1001 AATTTTAATA AAGAAAAAGA AGAGAAAAAT AAAAATTCTA TACATCCAAA TGATTTTCAA ATATATAATA GCTTGAAATA TAAATATCAT CCTGAATACC
FCR3 1001 AATTTTAATA AAGAAAAAGA AGAGAAAAAT AAAAATTCTA TACATCCAAA TGATTTTCAA ATATATAATA GCTTGAAATA TAAATATCAT CCTGAATACC
7G8 1001 AATTTTAATA AAGAAAAAGA AGAGAAAAAT AAAAATTCTA TACATCCAAA TGATTTTCAA ATATATAATA GCTTGAAATA TAAATATCAT CCTGAATACC
1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
HB3 1101 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1 1101 AATATTTAAA TATTATTTAT GATATTATGA TGAATGGAAA TAAACAAAGT GATCGAACGG GAGTAGGTGT TTTAAGTAAA TTCGGATATA TTATGAAATT
FCR3 1101 AATATTTAAA TATTATTTAT GATATTATGA TGAATGGAAA TAAACAAAGT GATCGAACGG GAGTAGGTGT TTTAAGTAAA TTCGGATATA TTATGAAATT
7G8 1101 AATATTTAAA TATTATTTAT GATATTATGA TGAATGGAAA TAAACAAAGT GATCGAACGG GAGTAGGTGT TTTAAGTAAA TTCGGATATA TTATGAAATT
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
HB3 1201 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1 1201 TGATTTAAGT CAATATTTCC CATTATTAAC TACGAAGAAA TTATTTTTAA GAGGAATTAT TGAAGAATTG CTTTGGTTTA TTAGAGGAGA AACAAATGGT
FCR3 1201 TGATTTAAGT CAATATTTCC CATTATTAAC TACGAAGAAA TTATTTTTAA GAGGAATTAT TGAAGAATTG CTTTGGTTTA TTAGAGGAGA AACAAATGGT
7G8 1201 TGATTTAAGT CAATATTTCC CATTATTAAC TACGAAGAAA TTATTTTTAA GAGGAATTAT TGAAGAATTG CTTTGGTTTA TTAGAGGAGA AACAAATGGT
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
HB3 1301 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1 1301 AATACGTTGT TAAATAAGAA TGTAAGGATA TGGGAAGCTA ATGGTACTAG GGAATTTTTA GATAATAGAA AATTATTTCA TAGAGAAGTT AACGATTTAG
FCR3 1301 AATACGTTGT TAAATAAGAA TGTAAGGATA TGGGAAGCTA ATGGTACTAG GGAATTTTTA GATAATAGAA AATTATTTCA TAGAGAAGTT AACGATTTAG
7G8 1301 AATACGTTGT TAAATAAGAA TGTAAGGATA TGGGAAGCTA ATGGTACTAG GGAATTTTTA GATAATAGAA AATTATTTCA TAGAGAAGTT AACGATTTAG
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
HB3 1401 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1 1401 GACCTATTTA TGGTTTTCAA TGGAGACATT TCGGTGCTGA ATATACAAAT ATGTATGATA ATTATGAAAA TAAAGGAGTG GATCAATTAA AAAATATAAT
FCR3 1401 GACCTATTTA TGGTTTTCAA TGGAGACATT TCGGTGCTGA ATATACAAAT ATGTATGATA ATTATGAAAA TAAAGGAGTG GATCAATTAA AAAATATAAT
7G8 1401 GACCTATTTA TGGTTTTCAA TGGAGACATT TCGGTGCTGA ATATACAAAT ATGTATGATA ATTATGAAAA TAAAGGAGTG GATCAATTAA AAAATATAAT
1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
HB3 1501 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1 1501 AAATTTAATT AAAAATGATC CTACAAGTAG AAGAATTCTT TTGTGTGCAT GGAATGTAAA AGATCTTGAC CAAATGGCAT TACCTCCTTG TCATATTTTA
FCR3 1501 AAATTTAATT AAAAATGATC CTACAAGTAG AAGAATTCTT TTGTGTGCAT GGAATGTAAA AGATCTTGAC CAAATGGCAT TACCTCCTTG TCATATTTTA
7G8 1501 AAATTTAATT AAAAATGATC CTACAAGTAG AAGAATTCTT TTGTGTGCAT GGAATGTAAA AGATCTTGAC CAAATGGCAT TACCTCCTTG TCATATTTTA
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
HB3 1601 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1 1601 TGTCAGTTTT ATGTTTTCGA TGGGAAATTA TCATGTATTA TGTATCAAAG ATCATGTGAT TTAGGGCTAG GAGTACCTTT TAATATTGCT TCTTATTCTA
FCR3 1601 TGTCAGTTTT ATGTTTTCGA TGGGAAATTA TCATGTATTA TGTATCAAAG ATCATGTGAT TTAGGGCTAG GAGTACCTTT TAATATTGCT TCTTATTCTA
7G8 1601 TGTCAGTTTT ATGTTTTCGA TGGGAAATTA TCATGTATTA TGTATCAAAG ATCATGTGAT TTAGGGCTAG GAGTACCTTT TAATATTGCT TCTTATTCTA
1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
HB3 1701 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1 1701 TTTTTACTCA TATGATTGCA CAAGTCTGTA ATTTGCAACC TGCGCAGTTC ATACACGTTT TAGGAAATGC ACATGTTTAT AATAATCACA TTGATAGTTT
FCR3 1701 TTTTTACTCA TATGATTGCA CAAGTCTGTA ATTTGCAACC TGCGCAGTTC ATACACGTTT TAGGAAATGC ACATGTTTAT AATAATCACA TTGATAGTTT
7G8 1701 TTTTTACTCA TATGATTGCA CAAGTCTGTA ATTTGCAACC TGCGCAGTTC ATACACGTTT TAGGAAATGC ACATGTTTAT AATAATCACA TTGATAGTTT



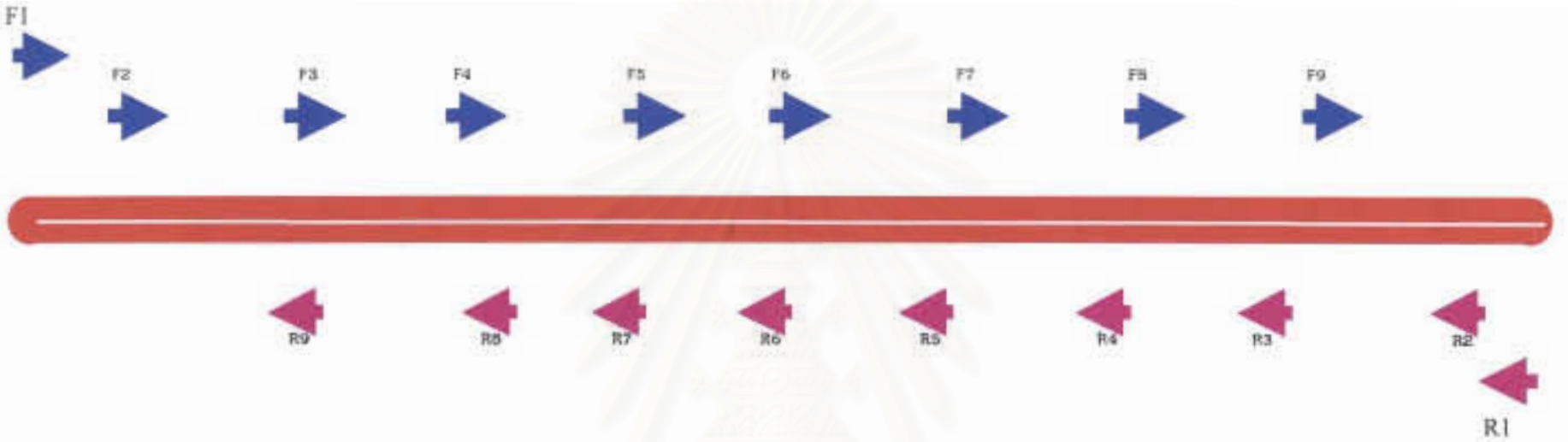
```
                    1810        1820        1830        1840        1850        1860        1870        1880        1890        1900
HB3       1801 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1        1801 AAAAATTCAA CTTAACAGAA TACCCTATCC ATTCCCAACA CTTAAATTAA ATCCAGATAT TAAAAATATT GAAGATTTTA CAATTTCGGA TTTTACAATA
FCR3      1801 AAAAATTCAA CTTAACAGAA TACCCTATCC ATTCCCAACA CTTAAATTAA ATCCAGATAT TAAAAATATT GAAGATTTTA CAATTTCGGA TTTTACAATA
7G8       1801 AAAAATTCAA CTTAACAGAA TACCCTATCC ATTCCCAACA CTTAAATTAA ATCCAGATAT TAAAAATATT GAAGATTTTA CAATTTCGGA TTTTACAATA
                    1910        1920        1930        1940        1950        1960        1970        1980        1990        2000
HB3       1901 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
K1        1901 CAAAATTATG TTCATCATGA AAAAATTTCA ATGGATATGG CTGCTTAATA TTGAAATTAA AAAAATATAT GAACAAATGA TGACAAAATT ACCTGAACGG
FCR3      1901 CAAAATTATG TTCATCATGA AAAAATTTCA ATGGATATGG CTGCTTAATA TTGAAATTAA AAAAATATAT GAACAAATGA TGACAAAATT ACCTGAACGG
7G8       1901 CAAAATTATG TTCATCATGA AAAAATTTCA ATGGATATGG CTGCTTAA-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
                    2010        2020        2030        2040        2050
HB3       2001 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------.      2050
K1        2001 TTAAGAATTT TTTTTTT--- ---------- ---------- ----------.      2050
FCR3      2001 TTAAGAATTT TTTTTTTTCT TTTTTGTATA CACATAAATA TATATAATG.      2050
7G8       2001 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------.      2050
```

**รูปที่ 3** แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน DHFR-TS จากสายพันธุ์ต่างๆของเชื้อมาลาเรียด้วยโปรแกรม DNASIS ลำดับเบสของสายพันธุ์ K1[a], FCR-3[b] และ 7G8[c] ได้มาจากฐานข้อมูลซึ่งค้นโดยใช้โปรแกรม Entrez ส่วนลำดับเบสด้านปลาย 5' นอกยีน DHFR-TS สายพันธุ์ HB3 ได้จาก Prof. Cowman[d] กรอบสี่เหลี่ยมแสดงprimer ที่ใช้ในการทำ PCR และ การหาลำดับเบส เพื่อใช้เปรียบเทียบกับรูปที่ 4

แสดง Forward primers แสดง Reverse primers แสดง codon ที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียที่มีความทนต่อยาไพริเมทามีนต่างกัน

a Snewin et.al., 1989
b Bzik et.al., 1987
c Zolg et.al., 1989
d Crabb and Cowman 1996

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 4** แสดงแผนภาพของตำแหน่ง primers ต่างๆที่ใช้ในการ Polymerase Chain Reaction (F1 และ R1) และ การหาลำดับเบสโดยตรง (F2-9 และ R2-9) ลูกศรสีฟ้าแสดง Forward primers ลูกศรสีชมพูแสดง Reverse primers

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR

ผลิตภัณฑ์ PCR ถูกนำมาหาลำดับเบสด้วยวิธี cycle sequencing (ดูปัญหาของการหาลำดับเบสในภาคผนวก) เมื่อหาลำดับเบสของสายพันธุ์ทั้งสามแล้ว ลำดับเบสทั้งหมดจะถูกนำมารวบรวมและเปรียบเทียบต่อไป

5. เปรียบเทียบลำดับเบสของสายพันธุ์ที่ใช้ คือ T9/94/M1-1-(b3) T9/94/300.300 และ T9/94/RC17

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของสายพันธุ์ทั้งสามที่ได้จากการอ่าน autoradiograph พบว่า สายพันธุ์ทั้งสามมีลำดับเบสในส่วนของ DHFR มีความแตกต่างกันเล็กน้อยเช่นเดียวกับที่ได้รายงานไว้ใน Thaithong และ Beale (1992) (ดูในตารางที่ 4) และ ส่วนลำดับเบสในส่วนของจีน TS ไม่มีความแตกต่างกับลำดับเบสของจีนที่ได้รายงานไว้ (ดูลำดับเบสของจีน DHFR –TS ได้ในรูปที่ 3)

แสดงให้เห็นว่า กลไกการดื้อยาของสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/300.300 อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในจีนส่วน DHFR แต่ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงแบบอื่นๆร่วมด้วยหรือไม่ ส่วนการดื้อยาของสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M1-1-(b3) ไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสภายในจีน DHFR-TS ดังนั้น การดื้อยาของสายพันธุ์บริสุทธิ์นี้น่าจะเกิดจากการเพิ่มจำนวนจีนที่สร้าง DHFR-TS ของเชื้อมาลาเรีย หรือมีการเปลี่ยนแปลงของกลไกในการถอด และ/หรือ แปลรหัส หรือมีการเปลี่ยนแปลงร่วมกันทั้งสองแบบทำให้เชื้อมาลาเรียสามารถสร้างเอนไซม์ได้มากขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M1-1-(b3) มีปริมาณเอนไซม์สูงกว่า สายพันธุ์ T9/94 ประมาณ 2 เท่าและไม่มีการเพิ่มจำนวนของจีน DHFR แต่อย่างใด (Thaithong และ Beale, 1992) ดังนั้นการดื้อยาของสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M1-1-(b3) น่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกลไกการถอดและ/หรือ แปลรหัส ทำให้เชื้อมาลาเรียสามารถสร้างเอนไซม์ได้มากขึ้น และการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M1-1-(b3) และ T9/94/300.300 นี้เอง ทำให้ระดับของการดื้อยาระหว่างสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้งสองแตกต่างกัน

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการตรวจลำดับเบสจะสามารถบอกได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในจีนเกิดขึ้นหรือไม่ วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้างเนื่องจากถ้าเชื้อมาลาเรียสามารถเพิ่มจำนวนจีนได้มากกว่า 1 ชุดและมีจีนชุดหนึ่งที่มีเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม การตรวจหาลำดับเบสด้วยวิธีนี้อาจจะไม่สามารถตรวจพบได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| สายพันธุ์บริสุทธิ์ | ตำแหน่งที่ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 16 | 51 | 59 | 108 | 164 |
| T9/94/RC17 | GTA (V) | AAT (N) | TGT (C) | ACC (T) | ATA (I) |
| T9/94/M 1-1-(b3) | GTA (V) | AAT (N) | TGT (C) | ACC (T) | ATA (I) |
| T9/94/300.300 | GTA (V) | AAT (N) | TGT (C) | ACC (T) | ATG (M) |

<u>ตารางที่ 4</u> แสดงเบสภายในจีน DHFR-TS ในสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่นำมาทำการทดลอง (เฉพาะตำแหน่งที่เชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงของจีนที่บริเวณดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการดื้อยาไพริเมทามีน) ตัวอักษรในวงเล็บแสดงกรดอะมิโนที่ได้เมื่อมีการแปลรหัส (translation)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 4

## ข้อสรุปของการวิจัย

จากผลการวิจัยพบว่า เมื่อแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา Polymerase chain reaction โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit สามารถนำผลิตภัณฑ์นั้นมาใช้ในการหาลำดับเบสด้วย CircumVent™ Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing kit เพื่อหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอย่างได้ผล แต่ต้องผ่านการตกตะกอนเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสายดีเอ็นเอก่อนนำมาแยกด้วย Polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการทำ autoradiography ลงได้มาก ข้อดีของการหาลำดับเบสโดยตรงแบบนี้คือ สามารถให้ข้อมูลของลำดับเบสได้ อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนในการเชื่อมต่อกับพาหะเพื่อเพิ่มจำนวนจีนให้มากพอในแบคทีเรียก่อน ทำให้ลดขั้นตอนและเวลาในการทำงานวิจัย

จากข้อมูลของการหาลำดับเบสที่ได้จากสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/RC17 T9/94/M 1-1-(b3) และ T9/94/300.300 เมื่อนำมาเปรียบเทียบพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทั้งในส่วนของจีน DHFR และจีน TS แสดงให้เห็นว่า จีน DHFR ของสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/RC17 เหมือนกับสายพันธุ์ต้นกำเนิด คือ T9/94 และมีลำดับเบสของจีน TS เหมือนกับสายพันธุ์ HB3 (Cowman *et al.*, 1988) และ FCR3 (Bzik *et al.*, 1987) เมื่อแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M 1-1-(b3) และ T9/94/300.300 ออกจากสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/RC17 ภายหลังชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีแล้วลำดับเบสของจีน DHFR ของ T9/94/300.300 ที่ตำแหน่ง 164 มีการเปลี่ยนแปลงจาก Isoleucine เป็น methionine ซึ่งไม่พบในธรรมชาติ ส่วนจีน TS ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด(ใช้ EMS เป็นตัวชักนำ) ในขณะที่ สายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M 1-1-(b3) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสทั้งในส่วนของจีน DHFR และ TS (ใช้ MNNG เป็นตัวชักนำ) ความแตกต่างของกลไกการดื้อต่อยาไพริเมทามีนของสายพันธุ์ทั้งสองอาจเกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีที่ชักนำการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันก็เป็นได้ แต่ยังขาดหลักฐานสนับสนุนแนวคิดดังกล่าว

กลไกการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/300.300 อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่ง 164 ส่วนการดื้อยาไพริเมทามีนของสายพันธุ์บริสุทธิ์ T9/94/M 1-1-(b3) แม้ว่าผลการทดลองที่มีมาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าอาจเป็นผลมาจากการเกิดการเปลี่ยนแปลงของการถอดและ/หรือแปลรหัส ทำให้สามารถสร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ T9/94 เกือบ 2 เท่า (Thaithong และ Beale, 1992) แต่ผลจากการศึกษาจีนและโปรตีนของทั้งสองสายพันธุ์จนถึงปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปได้ว่ามีกลไกอื่นร่วมด้วยหรือไม่ เนื่องจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี อาจมีผลให้จีนอื่นๆมีการเปลี่ยนแปลงไปได้เช่นกัน เช่น จีนที่เกี่ยวข้องกับการนำยาไพริเมทามีนเข้าหรือออกจากเซลล์ จีนของโปรตีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการถอดหรือแปลรหัส หรือจีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายโปรตีนอื่นๆภายในเซลล์ อันอาจเป็นสาเหตุให้สายพันธุ์ดังกล่าวดื้อต่อยาไพริเมทามีน หรือมีโปรตีน DHFR-TS มากกว่าปกติได้เช่นกัน

### ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยในครั้งนี้คือ

งานวิจัยชิ้นนี้ทำให้ทราบถึงลำดับเบสทั้งหมดของจีน DHFR-TS ภายในสายพันธุ์ที่ทำการทดลอง โดยเฉพาะจีนในส่วน TS ส่วนต่อระหว่างจีน DHFR-TS และปลายด้าน 5' ของจีน DHFR ซึ่งยังไม่ได้รับความสนใจ

เท่าที่ควร นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเทคนิคในการหาลำดับเบสโดยตรงเพื่อใช้สำหรับหาลำดับเบสในงานวิจัยของฝ่ายวิจัยมาลาเรียต่อไป ในกรณีที่ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

การดื้อต่อยาไพริเมทามีนที่เพิ่มขึ้นภายหลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี อาจเกิดขึ้นได้หลายระดับ ทั้งในระดับของการถอดรหัส(การเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดของจีน หรือ การเปลี่ยนแปลงบางส่วนของจีนที่มีผลต่ออัตราของการถอดรหัส เช่น promotor) หรือ ระดับของการแปลรหัส (การเปลี่ยนแปลงที่ทำให้อัตราการสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้น หรือ ทำให้โปรตีนถูกทำลายช้าลง) รวมทั้งจีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของยาไพริเมทามีนซึ่งควรจะได้รับการศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดต่อไป เพื่อให้ทราบถึงกลไกต่อการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย อันจะเป็นประโยชน์ต่อการรักษาโรคมาลาเรียและวางแผนหาวิธีป้องกันการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>เอกสารอ้างอิง</u>


1. กรองทอง ทิมาสาร (2540) ระบาดวิทยาและสถานการณ์ไข้มาลาเรียในประเทศไทย. มาลาเรีย. ศักดิ์โสภาการพิมพ์ กรุงเทพฯ
2. Bhattacharya, P., Malhotra, P., Sharma, P., Okenu, D.M.N. and Chauhan, V.S. (1995) Merozoite surface antigen 2 (MSA-2) gene of *Plasmodium falciparum* strains from India. Mol. Biochem. Parasitol. 74: 125-127.
3. Bzik, D.J., Li, W., Horii, T., and Inselburg, J. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 8360-8364.
4. Cowman, A.F., Morry, M.J., Biggs, B.A., Cross, G.A.M., and Foote, S.J. (1988) Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 9109-9113.
5. Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (1996) Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:7289-7294.
6. Foote, S.J., Galatis, D. and Cowman, A.F. (1990) Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 3014-3017.
7. Inselburg, J., Bzik, D.J. and Horii, T. (1987) Pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum*: overproduction of dihydrofolate reductase by a gene duplication. Mol. Biochem. Parasitol. 26: 121-134.
8. Murray, V. (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. Nucl. Acids Res. 17: 8889
9. Oliveira, D.A., Udhayakumar, V., Bloland, P., Shi, Y.P., Nahlen, B.L., Oloo, A.J., Hawley, W.E. and Lal, A.A. (1996) Genetic conservation of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1 (AMA-1). Mol. Biochem. Parasitol. 76: 333-336.
10. Peterson, D.S., Milhous, W.K. and Wellems, T.E. (1990) Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 3018-3022.
11. Peterson, D.S., Walliker, D. and Wellems, T.E. (1988) Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 9114-9118.
12. Plowe, C.V., Djimde, A., Bouare, M., Doumbo, O., and Wellems, T.E. (1995) Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: Polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 52: 565-568.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


13. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stofels, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer directed enzyme amplification of DNA with a thermostable polymerase. Science 239: 487-491.

14. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.

15. Sirawaraporn, W., Sirawaraporn, R., Cowman, A.F., Yuthavong, Y. and Santi, D. (1990) Heterologous Expression of Active Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase from *Plasmodium falciparum*. Biochemistry 29: 10779-10785.

16. Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, w., Thaithong, S. and Brown, K.N. (1993) Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mix infections. Mol. Biochem. Parasitol. 58, 283-292.

17. Tolle, R., Bujard, H. and Cooper, J.A. (1995) *Plasmodium falciparum*: Variations within the C-Terminal Region of Merozoite Surface Antigen-1. Exp. Parasitol. 81: 47-54.

18. Tanaka, M., Gu, H.M., Bzik, D.J., Li, W.B. and Inselburg, J.W. (1990) Dihydrofolate reductase mutations and chromosomal changes associated with pyrimethamine resistance of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 39: 127-134.

19. Thaithong, S., Chan, S., Songsomboon, S., Wilairat, P., Seesod, N., Sueblinwong, T., Goman, M., Ridley, R., and Beale, G. (1992) Pyrimethamine resistant mutations in *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 52: 149-158.

20. Thaithong, S. and Beale, G. (1992) Malaria parasites. Research Dissemination Project, Research Division, Chulalongkorn University. Bangkok

21. Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. Science. 193: 673-675.

22. Walter, R.D. (1986) Altered dihydrofolate reductase in pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 19: 61-66.

23. Wu, Y.M., Sifri, C.D., Lei, H.H., Su, X.Z., Wellems T.E. (1995) Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 973-977.

## ภาคผนวก

### ปัญหาในการหาลำดับเบสด้วยวิธี cycle sequencing

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีการปนเปื้อนของสารต่างๆในปฏิกิริยาจำนวนมาก การนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปใช้ในการหาลำดับเบสทันทีจะทำให้คุณภาพของลำดับเบสที่อ่านได้ด้อยลง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ PCR จะต้องถูกทำให้บริสุทธิ์ก่อน ในการทดลองนี้ได้ทดลองเปรียบเทียบการทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ ด้วยวิธีที่ต่างกัน 3 วิธี คือ

1. ตกตะกอนด้วย sodium acetate หรือ ammonium acetate
2. GeneCleanII kit
3. QIAquick column

ผลการศึกษา พบว่า วิธีที่ใช้ QIAquick column เป็นวิธีที่ใช้ได้ผลดีที่สุด เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้สามารถนำไปหาลำดับเบสด้วยวิธี cycle sequencing วิธีตกตะกอนด้วย sodium acetate หรือ ammonium acetate ไม่สามารถนำไปใช้ในการหาลำดับเบสด้วยวิธีดังกล่าวได้

สภาวะที่ใช้ในการทำ cycle sequencing คือ

| | | | |
|---|---|---|---|
| denaturation | 95 องศาเซลเซียส | 1 นาที | |
| annealing | 55 องศาเซลเซียส | 1 นาที | |
| extension | 72 องศาเซลเซียส | 1 นาที | ทำ 1 รอบ |
| | | | |
| denaturation | 95 องศาเซลเซียส | 20 วินาที | |
| annealing | 55 องศาเซลเซียส | 20 วินาที | |
| extension | 72 องศาเซลเซียส | 20 วินาที | ทำซ้ำ 19 รอบ |

จากการทดสอบโดยนำเอาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จาก primer คู่ F1-R6(ส่วนของจีน DHFR) และ คู่ F5-R1 (ส่วนของจีน TS) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างๆมาหาลำดับเบสด้วย CircumVent™ Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing kit พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนและ GeneCleanII kit ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอบน Polyacrylamide gel ด้วยวิธี autoradiograph ส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ QIAquick column ให้สัญญาณที่จางมากต้องใช้เวลาในการทำ autoradiograph ถึง 4 วันจึงจะสามารถเห็นสัญญาณของแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน แต่ปัญหานี้ได้รับการแก้ไขโดยการตกตะกอนดีเอ็นเอสายเดี่ยวหลังปฏิกิริยาด้วย ethanol (sodium acetate) ทำให้สัญญาณของแถบดีเอ็นเอที่ได้เข้มขึ้นเมื่อทำการ autoradiograph เพียง 2 วัน (รูปที่ 5)

เมื่อพิจารณาจากแผ่นฟิล์มจะเห็นว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอภายในเจลเดียวกันจะมีความเข้มแตกต่างกันดังนี้

1. แถบ C แถบแรกจะเข้มกว่าแถบที่อยู่ถัดไป
2. แถบ A แถบที่สองจะมีความเข้มกว่าแถบที่หนึ่งหรือแถบถัดไป(ในกรณีที่มี แถบ T ติดกันหลายแถบ)

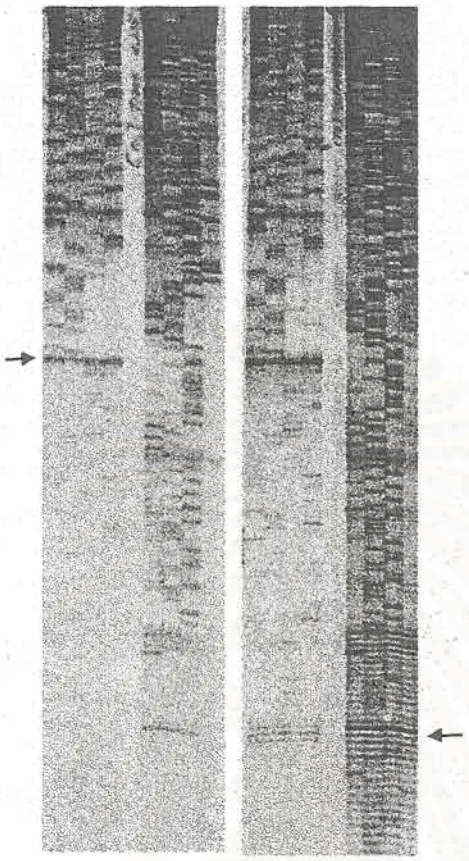
3. แถบ G ที่อยู่ถัดจากแถบ A จะเข้มกว่าแถบ G อื่นๆ
4. แถบ T ที่อยู่ถัดจากแถบ A จะเข้มกว่าแถบ T อื่นๆ

ซึ่งในคู่มือของการทำ Cycle sequencing ของ OmniBase™ DNA cycle sequencing system(Promega) ระบุว่าเป็นคุณสมบัติพิเศษของเอนไซม์ตัวที่ใช้ในการหาลำดับเบสนี้ ซึ่งสามารถที่จะช่วยในการตัดสินใจอีกทางหนึ่งด้วย

การอ่านลำดับเบสที่ได้จากเจลบางช่วงจะมีปัญหาในบางกรณี เช่น ช่วงที่มีแถบของดีเอ็นเอในทั้ง 4 คอลัมน์ของตัวอย่างเดียวกัน และมักจะเกิดขึ้นในบริเวณที่มีลำดับเบสเช่นเดียวกันทุกครั้งเมื่อทำปฏิกิริยาในการหาลำดับของเบส(รูปที่ 6) พบว่าบริเวณที่เกิดปรากฏการณ์เช่นนี้มักเกิดกับบริเวณที่มีลำดับเบสประกอบด้วย G และ A และมักจะมีเบสชนิด A หรือ T ต่อกันเป็นสายยาวอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของบริเวณดังกล่าว เช่น บริเวณ $_{1235}$GAAGAAATTATTTTTAA หรือ บริเวณ $_{1670}$GGAGTACCTTTTAATATT (ตัวเลขแสดงตำแหน่งของเบส ส่วนบริเวณที่เกิดแถบในทุกคอลัมน์แสดงด้วยตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้) คู่มือของการทำ Cycle sequencing อธิบายว่าปรากฏการณ์เช่นนี้อาจเกิดจาก ดีเอ็นเอแม่แบบมีโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เกิดขึ้นในบริเวณนั้น ทำให้เอนไซม์หลุดออกจากดีเอ็นเอแม่แบบในระหว่างปฏิกิริยาในหลอดทดลอง ความพยายามในการลดการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ ของดีเอ็นเอโดยการเพิ่มอุณหภูมิในช่วง annealing ของการหาลำดับเบสส่วนที่เป็นจีน DHFR (PCR primer คือ F1-R6) ด้วย primer F1 พบว่า ไม่สามารถกำจัดแถบของดีเอ็นเอในทั้ง 4 คอลัมน์ แต่ในขณะเดียวกันจะทำให้ความเข้มของแถบดีเอ็นเอลดลงอย่างเห็นได้ชัด(รูปที่ 6)

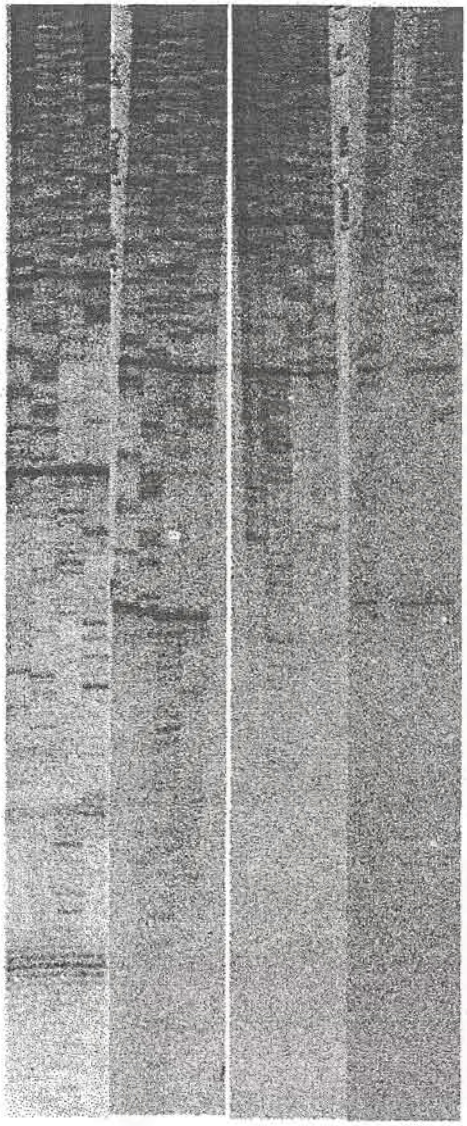
บริเวณที่ใกล้กับ primer (ส่วนล่างของเจล) เป็นอีกบริเวณหนึ่งที่มักพบแถบสัญญาณในทั้ง 4 คอลัมน์ต่อเนื่องกันเป็นช่วง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อ primer ที่ใช้ในการหาลำดับเบสเป็น primer ที่ใช้ในการทำ PCR ในช่วงแรก (รูปที่ 5 และ 7) หรือ เมื่อมีการใช้ F2 เป็น primer (ไม่ได้แสดงผล) ทำให้เบสตัวแรกที่อ่านได้มักอยู่ห่างจาก primer พอสมควร(ประมาณ 60-70 เบส คู่มือของการทำ Cycle sequencing ของ OmniBase™ DNA cycle sequencing system(Promega) อาจเกิดจากดีเอ็นเอแม่แบบมีคุณภาพไม่ดีหรือ primer ไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง แต่เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ของจีนส่วนที่เป็น DHFR-TS (PCR primer F1-R1) มาหาลำดับเบสโดยวิธีเดียวกันแต่ใช้ primer ที่แตกต่างไปจาก primer ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ในช่วงแรก พบว่าไม่เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว ทำให้สามารถเริ่มอ่านเบสได้ในระยะที่ห่างจาก primer ประมาณ 20 เบสเท่านั้น(รูปที่ 8)

ได้ทำการหาลำดับเบสโดยใช้ primer ทั้ง14 อันเพื่อช่วยในการยืนยันลำดับเบสที่ได้ให้มีความแน่นอนยิ่งขึ้น ในบางครั้งหากลำดับเบสที่ได้ไม่ชัดเจนจะนำมาหาลำดับเบสใหม่ ส่วนบริเวณที่มีโครงสร้างทุติยภูมิเกิดขึ้นนั้น พบว่าเมื่อใช้ primer ด้านตรงกันข้าม(reverse primer) จะไม่พบว่ามีปัญหาดังกล่าวเกิดขึ้นทำให้เราสามารถหาลำดับเบสบริเวณนั้นได้




**รูปที่ 5** แสดงแถบของดีเอ็นเอบน sequencing gel ที่ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค autoradiograph แต่ละตัวอย่างประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อย 4 ปฏิกิริยา G, A, C, T เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับในทุกตัวอย่าง บางบริเวณจะมีแถบดีเอ็นเอขวางอยู่ทั้ง 4 แถวของตัวอย่าง(ศรชี้)

| ตัวอย่างที่ | จีนส่วน | PCR primer | Sequencing primer | ตกตะกอนก่อนนำมาแยก | เวลาที่ใช้ประกบฟิล์ม (วัน) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | DHFR | F1-R6 | F1 | ไม่ตกตะกอน | 4 |
| 2 | TS | F5-R1 | F5 | ไม่ตกตะกอน | 4 |
| 3 | DHFR | F1-R6 | F1 | ตกตะกอน | 2 |
| 4 | TS | F5-R1 | F5 | ตกตะกอน | 2 |



1 2 3 4

<u>รูปที่ 6</u> แสดงแถบของดีเอ็นเอบน sequencing gel ที่ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค autoradiograph ของจีน DHFR (PCR primer คือ F1-R6) โดยมี F1 เป็น primer ที่ใช้ในการทำ cycle sequencing

1. annealing temperature = 55 องศาเซลเซียส
2. annealing temperature = 55 องศาเซลเซียส(ทำซ้ำ)
3. annealing temperature = 62 องศาเซลเซียส
4. annealing temperature = 65 องศาเซลเซียส

จะเห็นว่าการเกิดแถบดีเอ็นเอในทั้ง 4 เลนของเจลจะเกิดขึ้นในบริเวณที่มีลำดับของเบสเช่นเดียวกันทุกเจล(ศรชี้)

1 2

<u>รูปที่ 7</u> แสดงแถบของดีเอ็นเอบน sequencing gel ที่ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค autoradiograph

ตัวอย่างที่ 1 แสดงลำดับของเบสของจีนส่วนที่เป็น DHFR (PCR primer คือ F1-R6) เมื่อใช้ R6 เป็น primer ในการทำ cycle sequencing

ตัวอย่างที่ 2 แสดงลำดับของเบสของจีนส่วนที่เป็น TS (PCR primer คือ F5-R1) ) เมื่อใช้ R1 เป็น primer ในการทำ cycle sequencing

สังเกตการเกิดแถบของดีเอ็นเอในคอลัมน์ทั้ง 4 ในบริเวณใกล้กับ primer(ศรชี้)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**รูปที่ 8** แสดงแถบของดีเอ็นเอบน sequencing gel ที่ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค autoradiograph ของจีนส่วนที่เป็น DHFR-TS (PCR primer คือ F1-R1) เมื่อใช้ F5 เป็น primer ในการทำ cycle sequencing