รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ (ภาษาไทย): การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่สร้างโปรตีนชนิดที่ 1 ใน Rhoptry ออร์กาแนลล์ (RhopH1) และการตอบสนองของแอนตีบอดีของเชื้อ *Plasmodium vivax*

(ภาษาอังกฤษ): *Plasmodium vivax*: sequence analysis and naturally acquired antibody recognition of the rhoptry high molecular mass protein-1 RhopH1

โดย ดร. ธนาภรณ์ รุ่งเรือง

พฤษภาคม 2552

สัญญาเลขที่ MRG5080011

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ (ภาษาไทย): การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่สร้างโปรตีนชนิดที่ 1 ใน Rhoptry ออร์กาแนลล์ (RhopH1) และการตอบสนองของแอนติบอดีของเชื้อ *Plasmodium vivax*

(ภาษาอังกฤษ): *Plasmodium vivax*: sequence analysis and naturally acquired antibody recognition of the rhoptry high molecular mass protein-1 RhopH1

ผู้วิจัย ดร. ธนาภรณ์ รุ่งเรือง
สังกัด ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ ศาสตราจารย์ นพ. ดร.สมชาย จงวุฒิเวศน์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาหลักคนไทย และ Professor Dr. Osamu Kaneko จาก Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki ประเทศญี่ปุ่น ที่ปรึกษาหลักต่างชาติ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ และความช่วยเหลือทุกด้าน และมอบกำลังกายและกำลังใจจนกระทั่งโครงการลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จตุรงค์ พุทธพรทิพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความกรุณาในการเป็นอาจารย์พี่เลี้ยงในการทำการทดลอง แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของงานวิจัยรวมทั้งให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิกทุกท่านจาก Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki ประเทศญี่ปุ่นที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือตลอดงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้การสนับสนุนในทุกด้านของงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ให้ทุนอุดหนุน ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) และ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ) เป็นอย่างสูง ถ้าปราศจากท่านงานวิจัยนี้ก็ไม่สามารถดำเนินการได้

ขอบคุณเพื่อนร่วมงานและขอบใจ พี่ และ เพื่อน ที่คอยถามไถ่ด้วยความห่วงไย

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณ พ่อและแม่ บุพการีผู้ให้ทุกสิ่งทุกอย่างกับผู้วิจัย และขอบใจน้องชาย ผู้ให้กำลังกายกำลังใจกับผู้วิจัยตลอดมา

ดร. ธนาภรณ์ รุ่งเรือง

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5080011
(รหัสโครงการ)

Project Title : **(ภาษาไทย):** การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่สร้างโปรตีนชนิดที่ 1 ใน Rhoptry
(ชื่อโครงการ) ออร์กาแนลล์ (RhopH1) และการตอบสนองของแอนตีบอดีของเชื้อ *Plasmodium vivax*
(ภาษาอังกฤษ): Plasmodium vivax: sequence analysis and naturally acquired antibody recognition of the rhoptry high molecular mass protein-1 RhopH1

Investigator : ดร. ธนาภรณ์ รุ่งเรือง
(ชื่อนักวิจัย) ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : sitrr@mahidol.ac.th

Project Period : 2 ปี 6 เดือน
(ระยะเวลาโครงการ)

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญในปัจจุบันอันเนื่องมาจากสาเหตุหนึ่งคือไม่มีวัคซีนรักษาหรือป้องกันโรค การที่จะผลิตวัคซีนนั้นความรู้พื้นฐานที่สำคัญคือวิวัฒนาการของเชื้อและความหลากหลายของยีนในธรรมชาติ เพื่อที่จะเข้าใจกลไกของเชื้อและช่วยในการหาสารพันธุกรรมหรือยีนที่มีแนวโน้มสำหรับพัฒนาเป็นวัคซีน ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน การศึกษาแอนติเจนของเชื้อมักจะศึกษาในมาลาเรียฟาลซิพารัมซึ่งเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรง ในขณะที่มาลาเรียไวแวกซ์ที่พบบ่อยกลับมีข้อมูลน้อยมาก โปรตีน rhoptry (RhopH complex) เป็นโปรตีนหนึ่งที่มีการศึกษาในฟาลซิพารัมแล้วพบว่าโปรตีนนี้มีความสำคัญในการชักนำภูมิคุ้มกันของผู้ถูกอาศัยให้ต่อต้านการติดเชื้อ ดังนั้น RhopH complex เป็นโปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้พัฒนาวัคซีน ในปัจจุบันข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน RhopH มีน้อยมากในมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมจึงได้ทำการหาลำดับเบสของยีน 3 ชนิดของยีน rhoptry ชนิดที่ 1 ของมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ คือ *Pv*RhopH1_1047, _3844 และ _3944 โดยใช้เลือดจากผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อสายพันธ์เดียว 4 ตัวอย่าง ทำการเพิ่มจำนวนยีนโดยออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะเจาะจงของแต่ละยีนและทำพีซีอาร์ เรียงและเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งสายของยีนทั้งสามโดยเทียบกับยีน rhoptry ชนิดที่ 1 ของ เชื้อมาลาเรีย *P. knowlesi* สายพันธุ์ Sal-I และ El Salvador จาก genome data base โดยใช้โปรแกรม Clustal W คำนวณความหลากหลายของนิวคลีโอไทน์โดยใช้ซอฟแวร์ MEGA 3.1 จากการทดลองพบความหลากหลายของยีน *Pv*RhopH1_3944 มากที่สุดจากทั้งหมดสามยีนและในตลอดความยาวของสายยีนนั้นพบความหลากหลายมากที่สุดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 1000-1200 (last exon) จากความหลากหลายที่พบนี้ จึงสรุปได้ว่า *Pv*RhopH1_3944 น่าจะเป็นยีนที่มีแนวโน้มสำหรับเป็นแอนติเจนในการผลิตวัคซีน ดังนั้นจึงนำยีน *Pv*RhopH1_3944 ทั้งสายแบ่งเป็น 5 ส่วนแล้วทำการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant proteins) โดยใช้วิธีใหม่คือวิธี Gateway System เพื่อไว้สำหรับทดสอบหาการแสดงออกของยีนในการศึกษา immunogenicity ในซีรัมของผู้ป่วย เริ่มด้วยทำการเพิ่มจำนวนยีนในแต่ละส่วนด้วยวิธีพีซีอาร์ หลังจากนั้นนำยีนใส่ในพลาสมิด pB12 แล้วทำ BP-LR reaction โดยใส่พลาสมิด pB12 ที่มียีนแต่ส่วนที่ insert เรียบร้อยแล้วเข้าสู่พลาสมิด pDONR 221โดยใช้เอ็นไซม์ BP clonase และหลังจากนั้นนำผลิตผลที่ได้เข้าสู่พลาสมิด pBAD-DEST49 โดยใช้เอ็นไซม์ LR clonase ท้ายสุดของปฏิกิริยาจะได้ expression clone ที่เป็น final construct ของทั้ง 5 ส่วนของยีน นำ final construct ของแต่ละส่วนทั้ง 5 นั้นเข้าไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย Rosetta-gami2 และทำการพิสูจน์ลำดับเบสของยีนแต่ละส่วนว่าถูกต้อง จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าเป็นการรายงานครั้งแรกที่สามารถหาความหลากหลายของยีน RhopH ชนิดที่ 1 ในมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วยในประเทศไทย และยังเป็นรายงานแรกที่ประสบความสำเร็จในการสร้าง construct ของยีน RhopH ชนิดที่ 1 ของเชื้อมาลาเรียไวแวกซ์โดยวิธี Gateway system

Keywords : *Plasmodium vivax*, rhoptry, RhopH1, Gateway system
(คำหลัก)

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5080011
(รหัสโครงการ)

Project Title : **(ภาษาไทย):** การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่สร้างโปรตีนชนิดที่ 1 ใน Rhoptry
(ชื่อโครงการ) ออร์กาแนลล์ (RhopH1) และการตอบสนองของแอนตีบอดีของเชื้อ *Plasmodium vivax*
(ภาษาอังกฤษ): Plasmodium vivax: sequence analysis and naturally acquired antibody recognition of the rhoptry high molecular mass protein-1 RhopH1

Investigator : Dr. Thanaporn Rungruang
(ชื่อนักวิจัย) Department of Anatomy, Faculty of Medicine Siriraj Hospital
Mahidol University

E-mail Address: sitrr@mahidol.ac.th

Project Period: 2 years and six months
(ระยะเวลาโครงการ)

Malaria is now severe the world because there is no vaccine available. In order to produce vaccine, decoding evolutionary and genetic variation information is critical for understanding mechanism of parasite and identifying potential vaccine antigens. So far, most of antigens are studied in *P. falciparum*, the fatal species but not *P. vivax*, the species most commonly seen. Among the antigens, RhopH complex is rhoptry proteins in *P. falciparum* that were found to induce host immunity against infection. To date, little is known about RhopH complex in *P. vivax* genetic information. Thus we sequenced 3 *Pv*RhopH genes; *Pv*RhopH1_1047, _3844 and _3944 by using 4-singly Thai isolates. All 3 genes in all 4 samples were amplified by PCR using specific oligonucletide primers. Open reading frame (ORF) of all genes were aligned and compared with genome data base of *P. knowlesi* (Sal I and El Salvador strains) by using Clustal W. Nucleotide diversity was computed by using MEGA 3.1 software. The results showed the most polymorphic occurred in *Pv*RhopH1_3944 around amino acid position 1000 -1200 and potentially be the vaccine candidate antigen. Consequently, *Pv*RhopH1_3944 was taken to construct recombinant protein by using Gateway System for future testing of the human sera in nature. *Pv*RhopH1_3944 was divided into 5 blocks, PCR amplified each block and inserted into pB12 plasmid. Later, BP-LR reaction had been performed by inserting pB12 plasmid carrying gene of each block into the donor plasmid, pDONR 221, by the help of BP clonase. Further, these entry clones were inserted into pBAD-DEST49 plasmid by the help of LR clonase to get the expression clones, the final constructs. Transforming the final constructs of each block of *Pv*RhopH1_3944 gene into Rosetta-gami2 competent cells was performed. Colony PCR and gene sequences had been checked for confirming the right insertion and sequences. In the conclusion, our study is the first report to study diversity of RhopH1 gene of *P.vivax* in Thai isolates. Moreover, our finding is also the first succeed report using Gateway system to help constructing the *Pv*rhopH1 gene.

Keywords : *Plasmodium vivax*, rhoptry, RhopH1, Gateway system
(คำหลัก)

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มาลาเรียเป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตของประชากรในเขตปรากฏโรค กว่า 1 ล้านคนต่อปี และมีผู้ติดเชื้อในแต่ละปีประมาณ 300-500 ล้านคนแม้ว่าสาเหตุสำคัญเกิดจากการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ซึ่งส่วนใหญ่ปรากฏอยู่ในทวีปแอฟริกา แต่การติดเชื้อ *Plasmodium vivax* นับเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยในประชากรโลกมากถึง 70-80 ล้านคนซึ่งส่วนใหญ่พบในทวีปอเมริกาใต้ เอเชีย รวมทั้งประเทศไทย อันส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและการพัฒนาประเทศ มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่รักษาได้แต่ปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคในการรักษาป้องกันและควบคุมโรคคือ การดื้อยาหลายชนิดของเชื้อมาลาเรียที่เคยรักษาได้ผลซึ่งพบอุบัติการณ์สูงใน *P. falciparum* และในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาเริ่มพบว่า *P. vivax* เกิดการดื้อยา chloroquine อันอาจส่งผลกระทบต่อการรักษาตลอดจนการแพร่กระจายของสายพันธุ์ดังกล่าวตามเขตปรากฏโรคหลายแห่งในอนาคตคล้ายกับสภาวะที่เกิดขึ้นกับ *P. falciparum* นอกจากนั้น พาหะนำโรคคือ ยุงก้นปล่อง เกิดการดื้อต่อยาฆ่าแมลง ดังนั้นมาตรการอันหนึ่งที่น่าจะเป็นประโยชน์ในการควบคุมการแพร่กระจายของโรคมาลาเรีย คือ การผลิตวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของการควบคุมโรคมาลาเรียคือขาดองค์ความรู้เกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมประชากรของเชื้อ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะมีประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรคตลอดจนเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญต่อการออกแบบวัคซีนป้องกันมาลาเรียต่อไป

สำหรับเชื้อมาลาเรีย ระยะเมอร์โรซอยต์ (Merozoite) เป็นระยะที่ลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่เพื่อการเจริญเติบโตในวงชีวิตแบบไม่อาศัยเพศ ในขณะที่เมอร์โรซอยต์ลุกลาม (invasion) เข้าสู่เม็ดเลือดแดง ตัวเมอร์โรซอยต์จะปลดปล่อยโปรตีนที่เก็บไว้ใน organelle 3 ชนิดที่ส่วน Apical pole ของเชื้อ คือ ไมโครนีม (Microneme) ร็อบทรี (Rhoptry) และ เดนส์แกรนูล (Dense granule) โมเลกุลที่ถูกปล่อยมาจากออร์กาแนลดังกล่าวมีความสำคัญต่อการเกาะติด (binding) และการ invasion ของเชื้อเข้าสู่เม็ดเลือดแดง โปรตีนของ Rhoptry ที่น่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนดังกล่าวคือ โปรตีนโมเลกุลใหญ่ซึ่งเรียกว่า RhopH complex ซึ่งประกอบ 3 polypeptides ได้แก่ RhopH1, RhopH2 และ RhopH3 ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 150, 140 และ 100 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ทั้งนี้แต่ละ polypeptides ถูกสร้างจากยีนที่แตกต่างกัน และจากการศึกษาคุณสมบัติและศักยภาพ RhopH complex ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน พบว่า แอนตีบอดีต่อ *P.falciparum* RhopH complex สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อมาลาเรียในสิ่งมีชีวิตและในหลอดทดลองได้บางส่วน โดยหลักฐานนี้จึงเชื่อว่า RhopH complex มีแนวโน้มที่จะเป็น vaccine candidates ที่สำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่า *Pf*RhopH complex เกาะและกระจายบนเม็ดเลือดแดง พร้อมทั้งกระจายไปสู่ parasitophorous vacuole ซึ่งเป็นที่อยู่ของเชื้อในเม็ดเลือดแดงเพื่อการเจริญเติบโต มากไปกว่านั้นหลักฐานที่แสดงว่า RhopH complex น่าที่จะเป็น vaccine candidate คือ ยีน *pfrhoph3* ไม่สามารถที่จะทำ knock out ได้ ซึ่งปรากฏการณ์นี้แสดงให้เห็นว่ายีน *pfrhoph3* มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเชื้อมาลาเรีย

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น RhopH complex มีแนวโน้มที่จะเป็นโปรตีนหนึ่งสำหรับการสร้างวัคซีน อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญประการหนึ่งของการสร้างวัคซีนคือภาวะความหลากหลายของรูปแบบของแอนติเจนยีน ดังนั้นการทราบขอบเขตความหลากหลายของลำดับเบสของยีนดังกล่าวจึงมีความสำคัญ ปัจจุบันข้อมูลสำหรับยีน RhopH complex ยังมีอยู่อย่างจำกัด จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *P.faliparum* RhopH complex ชนิดที่ 1 (PfRhopH 1) พบความหลากหลายของอัลลีลสูง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่อัลลีลของ RhopH 1 ของ *P. vivax* จะมีความหลากหลายในประชากรเชื้อมาลาเรียใน

ธรรมชาติเช่นเดียวกัน ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์สำหรับการออกแบบวัคซีนในอนาคตและการประยุกต์ใช้ในงานการเฝ้าระวังโรคต่อไป นอกจากนี้ การศึกษานี้จะทดสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันธรรมชาติ (antibody) ต่อการติดเชื้อมาลาเรีย โดยจะเลือกรูปแบบของ *Pv*RhopH1 ที่พบได้บ่อยและมีความหลากหลายสูง แล้วทำการสร้าง construct โปรตีนลูกผสม (recombinant proteins) เพื่อเป็นตัวตรวจสอบการแสดงออกของยีนในแง่ของ immunogenicity ในซีรัมผู้ป่วย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาความหลากหลายของโปรตีน RhopH1_1047, _3844 และ _3944 ของ rhoptry ในระยะเมอร์โรซอยต์ของ *P.vivax* จากตัวอย่างที่ได้จากประเทศไทย
2. เลือกอัลลีลที่พบบ่อย มีความหลากหลายสูง สร้าง construct ให้เกิดรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อดูการแสดงออกของยีนและ เพื่อศึกษาภูมิคุ้มกันในธรรมชาติ

3. ระเบียบวิธีวิจัย (ระบุขั้นตอน วิธีการ และระยะเวลาที่ชัดเจน)

3.1 ประชากรของเชื้อ *Plasmodium vivax*

(1) ตัวอย่าง DNA ของ *P. vivax* ที่ได้จากผู้ป่วยจังหวัดตากระหว่างปี ค.ศ. 1997-1998 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.นพ.ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ ได้เก็บตัวอย่างเลือดและซีรั่มไว้แล้ว จำนวนประมาณ 50 ตัวอย่าง ซึ่งมีข้อมูลทางคลินิกและอัตราการพบเชื้อในผู้ป่วยแต่ละราย

(2) คัดเลือกตัวอย่างที่มีการติดเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียวจากการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยใช้ยีน *Pv*Msp-1 (Putaporntip et al, 2002)

3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA (Polymerase Chain Reaction (PCR))

- การเพิ่มปริมาณ DNA ที่ครอบคลุมยีนทั้งสายของ *Pv*RhopH1_1047, _3844, _3944 ที่มีความยาวประมาณ 4-5 kb โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพรีเมอร์เรส (PCR)

3.3 การหาลำดับเบสของยีน *Pv*RhopH_1047, _3844 and _3944

1. ใช้ผลิตผล PCR จากข้อ 3.2 มาหาลำดับเบสของแต่ละยีน โดยใช้ sequencing primers ที่จำเพาะเจาะจงและครอบคลุมลำดับเบส

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. เรียงลำดับเบสของยีน *Pv*RhopH1_1047, _3844 and _3944, เปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนจากตัวอย่างทั้งหมด และใช้ *P. knowlesi* RhopH1 (เป็น outgroup) โดยอาศัยโปรแกรม Clustal W
2. วิเคราะห์ค่า nucleotide diversity โดยใช้โปรแกรม DnaSP 4.0

3.5 ดูการแสดงออก (expression) ของยีนโดยเลือกจากยีนที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด โดยการสร้าง construct ของยีนนั้นด้วยวิธี Gateway System เพื่อให้ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน และในอนาคตเพื่อศึกษาดูการแสดงออกของยีนเพื่อวิเคราะห์ดู immunogenicity ของยีนแต่ละตัวในซีรัมของผู้ป่วย

โดยมีระเบียบวิธีวิจัยดังนี้

1. สร้าง Recombinant protein expression โดยวิธี Gateway System ดดยเริ่มจาก
    - การ insert DNA ของแต่ละยีนเข้าสู่พลาสมิด pB12
    - ทำ BP-LR reaction โดยการผสม pB12-carrying gene of interest เข้าสู่พลาสมิด pDONR และ pDEST โดยเอ็นไซม์ BP clonase และ LR clonase

ตามลำดับ

- ยืนยันความถูกต้องของ DNA insertion โดยวิธีหาลำดับเบส (sequencing)
- เลือก clones ของแต่ละยีน
- เพิ่มจำนวนยีนโดยวิธี colony PCR และ
- ยืนยันความถูกต้องของ DNA insertion โดยวิธีหาลำดับเบส (sequencing)

4. สรุปผล

4.แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

แผนการดำเนินการเดือนที่ 1-6

1. คัดเลือกตัวอย่าง DNA ออกแบบ primer สำหรับ PCR และ Sequencing
2. เพิ่มปริมาณยีน *Pv*RhopH1_1047, _3844, and _3944 โดยวิธี PCR
3. หาลำดับเบสบริเวณที่มีความหลากหลายสูงและตรวจสอบความถูกต้อง

แผนการดำเนินการเดือนที่ 7-12

1. หาลำดับเบสบริเวณที่มีความหลากหลายสูงและตรวจสอบความถูกต้อง
2. วิเคราะห์ความหลากหลายของยีน

แผนการดำเนินการเดือนที่ 13-18

1. สร้าง construct ของยีนที่มีความหลากหลายมากที่สุดในจำนวน 3 ยีนโดยวิธี Gateway System

แผนการดำเนินการเดือนที่ 19-24

1. สร้าง construct ของยีนที่มีความหลากหลายมากที่สุดในจำนวน 3 ยีนโดยวิธี Gateway System (ต่อ)
2. วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมด

แผนการดำเนินการเดือนที่ 25-30

1. วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมด (ต่อ)
2. เขียนรายงาน

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Genetic diversity of *Plasmodium vivax* rhoptry high molecular mass protein - 1 (RhopH 1) from populations in Thailand and establishment of *P. vivax* RhopH1 recombinant protein construct producing from Gateway system

: ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

เนื้อหางานวิจัย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความหลากหลายของโปรตีน RhopH1_1047, _3844 และ _3944 ของ rhoptry ในระยะเมอร์โรซอยต์ของ *P.vivax* จากตัวอย่างที่ได้จากประเทศไทย
2. เลือกอัลลีลที่พบบ่อย มีความหลากหลายสูง สร้าง construct ให้เกิด รีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อดูการแสดงออกของยีนและเพื่อศึกษาภูมิคุ้มกันในธรรมชาติ

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่าง DNA ของ *P. vivax* ได้มาจากผู้ป่วยจังหวัดตากระหว่างปี ค.ศ. 1997-1998 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.นพ.ดร. สมชาย จงวุฒิเวศน์ ได้เก็บตัวอย่างเลือดบน filter papers และซีรั่มไว้แล้ว จำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งมีข้อมูลทางคลินิกและอัตราการพบเชื้อในผู้ป่วยแต่ละราย ตัวอย่าง 4 ตัวอย่างนี้ เป็นตัวอย่างที่มีการติดเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียวได้พิสูจน์โดยใช้ยีน *Pv*Msp-1 แล้ว โดย Putaporntip C. และคณะในปี ค.ศ. 2002
2. สกัด DNA จากตัวอย่างเลือดทั้งสี่ตัวอย่างจาก filter papers และทำการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ครอบคลุมยีน *Pv*RhopH1_1047, _3844 และ _3944 ของทั้ง 4 ตัวอย่างตลอดสายความยาวซึ่งประมาณ 4-5 kilo bp จาก start codon ถึง stop codon (open reading frame) โดยออกแบบ oligonucleotide primers ที่จำเพาะเจาะจงให้ครอบคลุมทั้งสาย และ เพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เอ็นไซม์ DNA polymerase
3. Run gel electrophoresis ใน 1% agarose gel โหลด PCR product ที่ได้ในกระแสไฟฟ้า 100 Vเป็นเวลา 30 นาทีแล้วย้อมด้วย ethidium bromide ประมาณ 15 นาที เก็บข้อมูลโดยการถ่ายรูปภายใต้ UV และทำการตัดเจลที่มี target DNA เพื่อ purification
4. ทำ DNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากในข้อ (3) ให้มีความบริสุทธิ์ (DNA purification) โดยใช้ QiaEX II kit (Qiagen)
5. หาลำดับเบส (SEQUENCE) ของยีน *Pv*RhopH_1047, _3844 and _3944 ที่ได้จากผลิตผลข้อ (4) โดยออกแบบและใช้ oligonucleotide sequencing primers ที่ครอบคลุมลำดับเบสทั้งหมดของแต่ละยีนโดยใช้ ABI PRISM 310® genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)
6. วิเคราะห์ข้อมูลโดยเรียงลำดับเบสของยีน *Pv*RhopH1_1047, _3844 and _3944 โดยเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน (alignment) จากตัวอย่างทั้งหมดโดยใช้ *P.knowlesi* RhopH 1 (Sal I และ El Salvador strains) เป็น outgroup (ข้อมูล *P. knowlesi* RhopH 1 genome data base ได้มาจาก www.sanger.ac.uk; Sanger Center, UK) sequence ที่เปรียบเทียบกันนั้นจะอาศัยโปรแกรม Clustal W และ correct sequence ทั้งหมดนั้นโดยมือ (manually)
7. ค่า nucleotide diversity และค่า standard error ถูกวิเคราะห์โดยใช้ซอฟแวร์ MEGA 3.1 และคำนวณหาค่า mean numbers of synonymous substitutions per synonymous site (dS) และ mean numbers of nonsynonymous per nonsynonymmous site (dN) โดยวิธี Nei and Gojobori method (ค่า SNPs หรือ single nucleotide substitution polymorphism; synonymous substitution หมายถึง ถึงแม้จะมี substitute โดย single nucleotide แต่กรดอะมิโนยังคงไม่เปลี่ยนแปลง, nonsynonymous substitution หมายถึง มี substitute โดย single nucleotide เพียงหนึ่งตัว

กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง คือมีการแทนที่เป็นกรดอะมิโนตัวใหม่) อัตราส่วนของ dN/dS ถูกวิเคราะห์โดยใช้วิธี sliding window (50 bases with a step size of 10 bases) โดยใช้โปรแกรม DnaSP 4.0

8. จากการคำนวณค่า nucleotide diversity พบว่า ยีน *Pv*RhopH1_3944 มีความหลากหลายในอัลลีลสูงมากกว่ายีนอื่น วิธีต่อไปที่ทำการทดลองคือสร้าง recombinant *Pv*RhopH1_3944 protein โดยวิธี Gateway System (Invitrogen, Japan) เพื่อใช้สำหรับตรวจหา immunogenicity ของยีนนั้นในซีรัมของผู้ป่วย
9. *Pv*RhopH1_3944 ถูกแบ่งออกเป็น 5 ส่วน (figure 3); a, b, c, d และ e (a -ขนาดประมาณ 705 bp, b-ขนาดประมาณ 612 bp, c-ขนาดประมาณ 591 bp, d-ขนาดประมาณ 768 bp และ e-ขนาดประมาณ 1289 bp) โดยแต่ละส่วนจะนำไปเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ซึ่งมีการออกแบบและใช้ oligonucleotide primers ของแต่ละส่วนที่จำเพาะเจาะจงและครอบคลุม และใช้ DNA polymerase เป็นเอ็นไซม์ในปฏิกิริยา
10. Run gel electrophoresis ใน 1.5% agarose gel โหลด PCR product ที่ได้ในกระแสไฟฟ้า 100Vเป็นเวลา 30 นาทีแล้วย้อมด้วย ethidium bromide ประมาณ 15 นาที เก็บข้อมูลโดยการถ่ายรูปภายใต้ UV และทำการตัดเจลที่มี target DNA เพื่อ purification
11. Purify PCR product ที่ได้ โดยใช้ DNA Fragment Purification Kit และ MagExtractor (TOYOBO, Japan)
12. ใส่ (insert) DNA ของยีนแต่ละส่วนเข้าสู่ pB12 plasmid โดย restriction enzyme ที่ใช้คือ EcoRV หลังจากนั้นยืนยันความถูกต้องของการ insertion โดยวิธีหาลำดับเบส (sequencing)
13. เพิ่มจำนวนของยีนแต่ละส่วนให้มีจำนวนมากขึ้นโดยการ transform เข้าสู่ TOP10 E.coli host cell Ampicillin resistance ที่ 37C เป็นเวลาข้ามคืนหรือ 12 ชั่วโมง
14. ทำ Colony PCR เพื่อ pick E.coli colony ที่มียีนแต่ละส่วนของเรา โดยใช้ Ex TaQ DNA Polymerase HS เป็น enzyme ในปฏิกิริยา
15. Run gel electrophoresis ใน 1.5% agarose gel โหลด PCR product ที่ได้ในกระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 30 นาทีแล้วย้อมด้วย ethidium bromide ประมาณ 15 นาที เก็บข้อมูลโดยการถ่ายรูปภายใต้ UV
16. ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสของ colony PCR ที่ให้ผล positive เพื่อให้แน่ใจว่าได้ยีนที่ต้องการแต่ละส่วนจริงๆ และยีนแต่ละส่วนที่ได้มีลำดับเบสที่ถูกต้อง
17. เมื่อได้ยีนที่มีจำนวนมากขึ้นแล้ว จึงนำไปสู่วิธีสร้าง recombinant protein ที่เรียกว่า Gateways recombination reaction (commercial) โดยวิธี BP-LP reaction ในหลอดทดลอง โดยการใส่ชิ้นส่วนของยีนนั้นเข้าสู่ pDONR 221 plasmid ที่ตัดด้วย restriction enzyme คือ HINDIII และ ใส่ เอ็นไซม์ BP clonase เข้าไป ผสมให้เข้ากันและตั้งไว้ที่ภายใต้อุณหภูมิ 37C ทิ้งไว้ข้ามคืนหรือประมาณ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นก่อนทำขั้นตอนต่อไปต้องทำการ deactivate enzyme ที่คาดว่าจะหลงเหลือในหลอดทดลองอีกที่อุณหภูมิ 65C เป็นเวลา 30 นาที ท้ายสุด product ที่ได้เรียกว่า Entry clone
18. นำ entry clone ที่ได้ ไปผสมกับ pBAD-DEST49 plasmid แล้วใส่เอ็นไซม์ LR-Clonase เพื่อทำปฏิกิริยา ตั้งทิ้งไว้ที่ 25C ประมาณข้ามคืนหรือ 12 ชั่วโมง เพื่อที่จะสร้าง expression clone
19 ตรวจสอบ product ที่ได้โดย gel electrophoresis ใน 1.5% agarose gel ในกระแสไฟฟ้า 100V และย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที
20. นำ product ที่ได้ transform เข้าไปใน Rosetta-gami 2 competent cells 37C เป็นเวลาข้ามคืน หรือ 12 ชั่วโมง

21. pick up colony บางส่วนไปทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส
22. ในขณะที่บางส่วน pick up แล้วนำไปเลี้ยงต่อใน LB blot ที่ 37C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วใส่ L-arabinose ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (ตั้งแต่ 0-0.2%) L-arabinose จะทำหน้าที่ induce การแสดงออกของยีนนั้นออกมา

ผลการทดลอง

1. จากการทำการทดลองจาก ข้อ (1-7) พบว่า
    1.1 ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1000 – 1200 พบความหลากหลายมากที่สุด (Figure 1)
    1.2 เมื่อเทียบความหลากหลายของยีนทั้งสาม *Pv*RhopH1_1047, _3844 และ _3944 พบว่า *Pv*RhopH1_3944 พบความหลากหลายมากที่สุด (Figure 2)
    1.3 ความหลากหลายนั้นเกิดมาจาก positive selection ของยีน *Pv*RhopH1_3944
2. หลังจากสรุปได้ว่า *Pv*RhopH1_3944 พบความหลากหลายมากที่สุด จึงมีการนำยีน *Pv*RhopH1_3944 มาสร้าง recombinant protein โดยแบ่ง *Pv*RhopH1_3944 ออกเป็น 5 ส่วน (a, b, c, d และ e) (Figure 3 และ 4) ตามวิธีการทดลองข้อ (8-22)
    2.1 ผลการทดลองที่ได้คือ สามารถประสบความสำเร็จในการสร้าง construct ของยีน *Pv*RhopH1_3944 โดยวิธีใหม่คือ วิธี Gateway system (Figure 5) คือสามารถนำยีนแต่ละชิ้นของ *Pv*RhopH1_3944 ligate เข้าสู่พลาสมิด pB12 และสามารถได้ PCR product มากมาย
    2.2 PCR product ที่ได้ สามารถนำเข้าสู่ commercial plasmids (Gateway System) ได้อย่างราบรื่นและมีความถูกต้องในลำดับเบสของยีน (Figure 6)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลองหาความหลากหลายของ RhopH1_1047, _3844 และ _3944 ของ rhoptry ในระยะเมอร์โรซอยต์ของ *P.vivax* จากตัวอย่างที่ได้จากประเทศไทย พบว่า

1. ความหลากหลาย (polymorphism) พบได้ประมาณที่ตำแหน่ง amino acid ที่ 1000 -1200 (last exon) ของยีน *Pv*RhopH1_1047 และ _3944 ในขณะที่ไม่พบความหลากหลายและการแทนที่ของเบส (substitution) ใน *Pv*RhopH1_3844 (Figure 1)

2. ถึงแม้ว่า จะพบ single nucleotide substitution ใน *Pv*RhopH1_1047 แต่ลักษณะการเกิดเป็น synnomymous substitution ซึ่งไม่มีผลกับ amino acid code ซึ่งตรงข้ามกับ การพบ single nucleotide substitution ใน *Pv*RhopH1_3944 ที่เกิด nonsynonymous substitution มาก ซึ่งจะมีผลโดยตรงกับ amino acid code (Figure 2)

3. ความหลากหลาย (polymorphism) ที่พบและสามารถ maintain ในยีน *Pv*RhopH1_3944 ได้มีสาเหตุมาจาก positive selection

4. ดังนั้น *Pv*RhopH1_3944 มีแนวโน้มที่จะเป็น target molecule สำหรับพัฒนาวัคซีนของโรคมาลาเรีย ผลการทดลองนี้เป็นผลการทดลองแรกในการศึกษาข้อมูลเชิงลึกในแง่ชีววิทยาโมเลกุลของ Rhoptry ออร์การ์แนลล์

สรุปผลการทดลองจากการสร้าง construct ของยีน *Pv*RhopH1_3944 ทั้ง 5 ส่วน โดยระบบ commercial system คือ Gateway System ข้อดี พบว่ามีสะดวก ใช้เวลาไม่มาก และมีประสิทธิภาพ แต่ข้อเสียคือ Gateway System ราคาแพงมาก และ ระบบ Gateway System อาจจะไม่เหมาะสมกับยีนทุกชนิด

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด งานวิจัยในอนาคตต้องมีการต่อยอดในการใช้ construct ที่ได้ไปทดสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้กับ sera ของผู้ป่วย
2. เพื่อให้ผลการทดลองเข้มแข็งขึ้น ในอนาคตควรมีการเพิ่มจำนวนของตัวอย่างให้มากขึ้น
3. เพื่อให้ได้ผลสรุปมากที่สุดสำหรับ RhopH complex protein ในการเป็น vaccine candidate, ควรมีการศึกษากับโปรตีน RhopH ตัวอื่นนอกเหนือจาก RhopH1 ที่ประกอบเป็น complex ด้วย

References

1. Invitrogen Life technologies. Multisite Gateway three-Fragment vector construction kit and manual, ver C, California USA, 2004.

2. Kaneko O, Tsuboi T, Ling IT, et al. The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the *clag* multigene family in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. Mol Biochem Parasitol 2001; 118: 237–45.

3. Kaneko O, Yim Lim BY, Iriko H, et al. Apical expression of three RhopH1/Clag proteins as components of the *Plasmodium falciparum* RhopH complex. Mol Biochem Parasitol 2005; 143: 20–8.

4. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 2004;5: 150–63.

5. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Mol Biol Evol 1986:3; 418–26.

6. Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 2003:19; 2496–7.

Figures and Figure legends

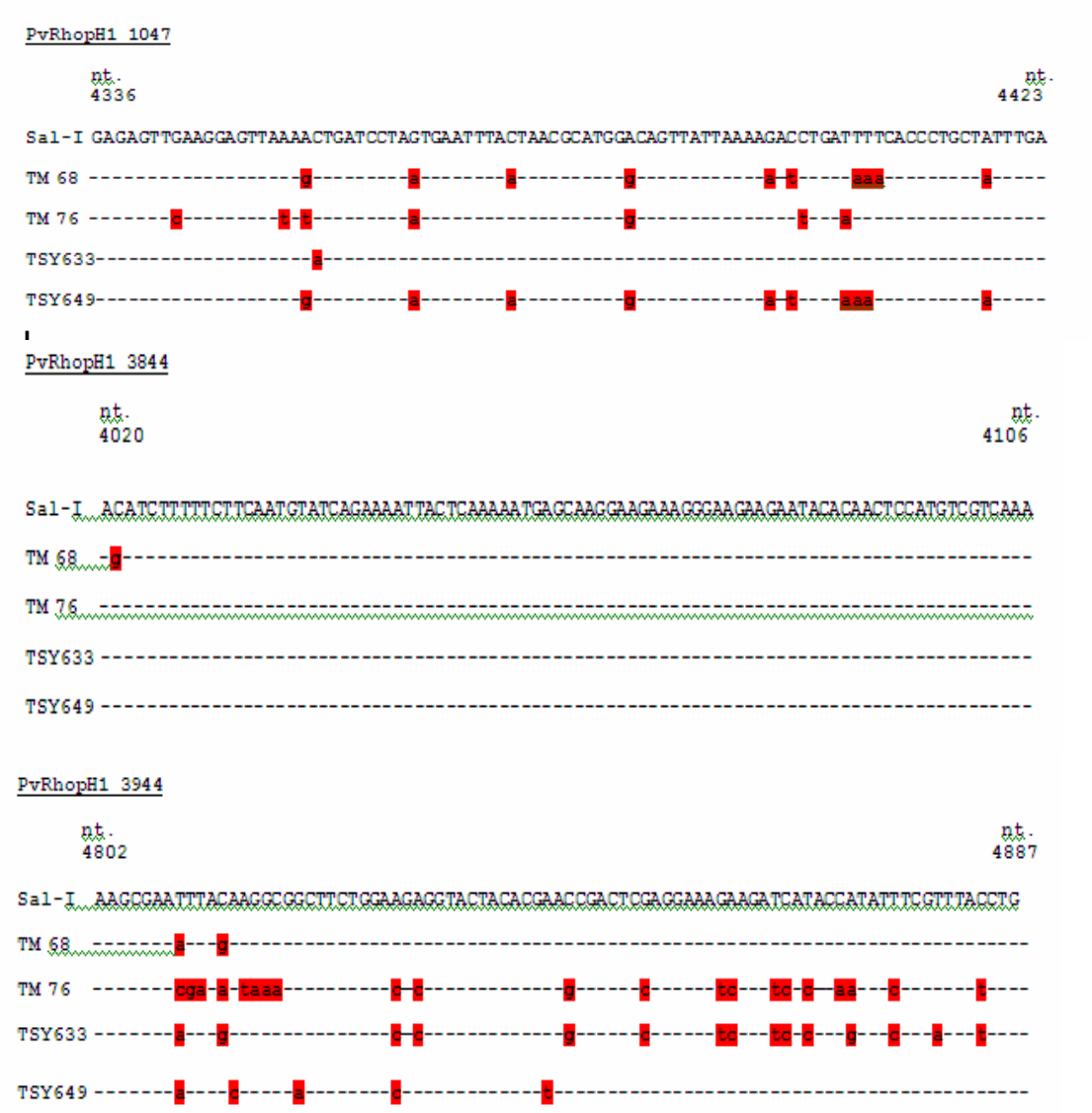

Figure 1 แสดงความหลากหลาย (polymorphism) ของ amino acid ของ *Pv*RhopH1 ทั้ง 3 ยีนจากตัวอย่าง 4 ตัวอย่างเทียบกับ *P. knowlesi* (Sal-I strain) ความหลากหลายเกิดขึ้นใน RhopH1_1047 และ _3944 ที่ตำแหน่ง last exon หรือ ประมาณ amino acid ที่ 1000 -1200 (red mark คือ single nucleotide substitution (SNPs) ในแต่ละตัวอย่างของแต่ละยีน เมื่อเทียบกับ *P. knowlesi* (Sal-I strain)

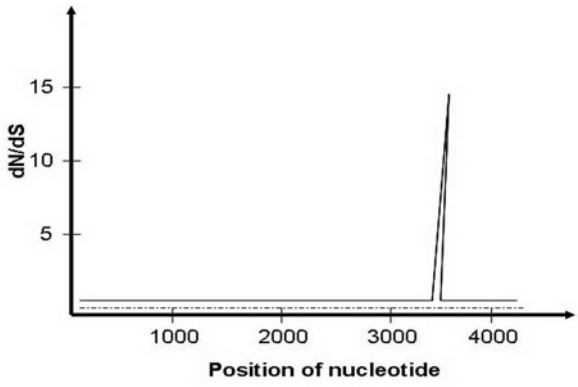

Figure 2 แสดงอัตราส่วนระหว่าง d_N/d_S ของ ยีน *Pv*RhopH1 genes จากทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่า ค่า nonsynnonymous substitution ใน *Pv*RhopH1_3944 พบมากที่สุด และพบมากที่สุดในนิวคลีโอไทน์ตำแหน่งที่ 3000-4000 (last exon) (dot line: *Pv*RhopH1_1047 and _3844; line: *Pv*RhopH1_3944)

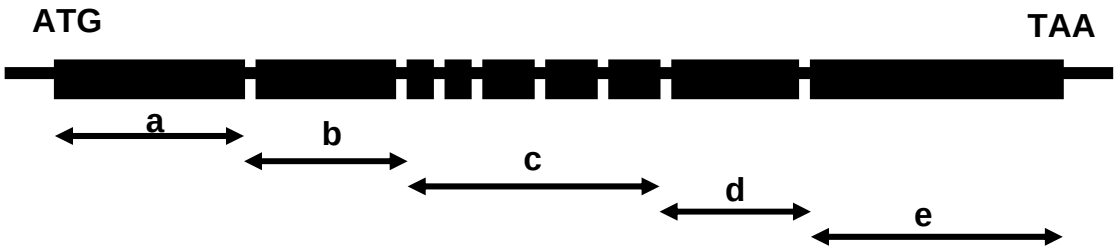

Figure 3 แสดงยีนทั้งสายของ *Pv*RhopH1_3944 ยีน *Pv*RhopH1_3944 ประกอบด้วย 9 exons และ 8 introns ถูกแบ่งเป็น 5 ส่วน ส่วน (a) ประกอบด้วย exon 1 (705 bp) เท่านั้น ส่วน (b) ประกอบด้วย exon 2 (612 bp) เท่านั้น ส่วน (c) ประกอบด้วย exon 3, 4, 5, 6 และ 7 (591 bp) ส่วน (d) ประกอบด้วย exon 8 (768 bp) เท่านั้น และส่วน (e) ประกอบด้วย exon 9 (1,289 bp) เท่านั้น (last exon)

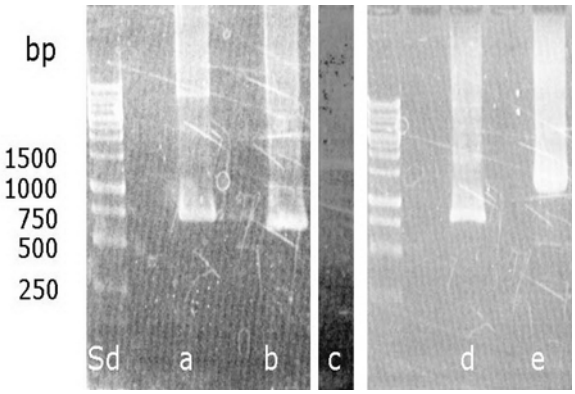

Figure 4 Gel electrophoresis แสดง expected size ของ ยีน *Pv*RhopH1_3944 ในแต่ละส่วน (Sd คือ standard marker; a -ขนาดประมาณ 705 bp, b-ขนาดประมาณ 612 bp, c-ขนาดประมาณ 591 bp, d-ขนาดประมาณ 768 bp และ e-ขนาดประมาณ 1,289 bp)

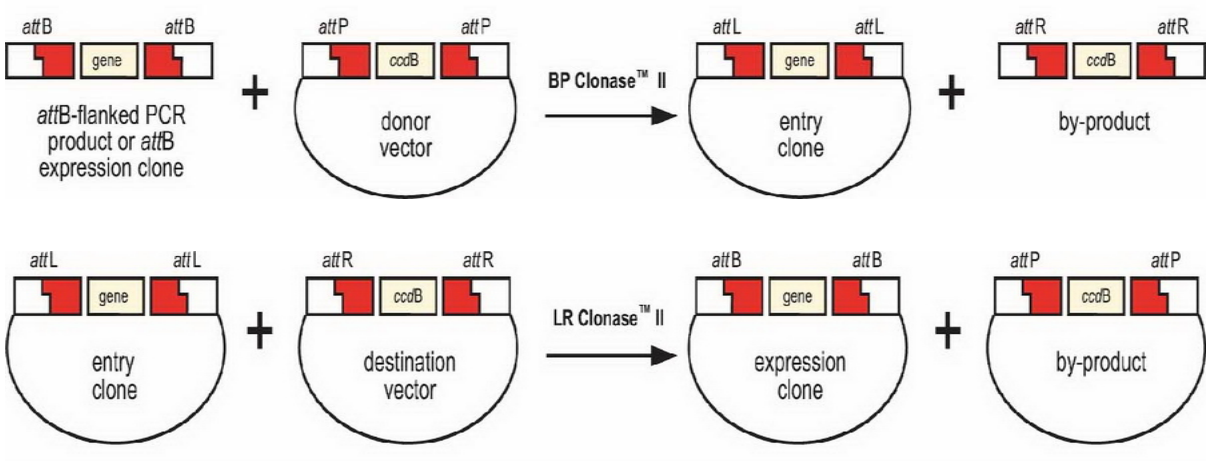

Figure 5 แสดงหลักการอย่างง่ายของ Gateway System

BP Reaction: ใส่ยีนที่เราสนใจเข้าพาสมิดที่ frank โดย attB site หลังจากนั้นนำไปผสมกับ donor vector คือ พลาสมิดที่มี ccdB gene sequence และ frank โดย attP site หลังจากเติมเอ็นไซม์ BP clonase จะมีการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างพลาสมิด ท้ายสุดยีนที่เราสนใจจะไปอยู่บนพลาสมิดของ donor vector ที่ frank โดย attL site (entry clone)

LR Reaction: ผสม entry clone ที่ carry gene ที่เราสนใจ กับ destination vector คือ พลาสมิดที่มี ccdB gene sequence และ frank โดย attR site หลังจากเติมเอ็นไซม์ LR clonase จะมีการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างพลาสมิด ท้ายสุดยีนที่เราสนใจจะไปอยู่บนพลาสมิดของ destination vector ที่ frank โดย attB site (expression clone)

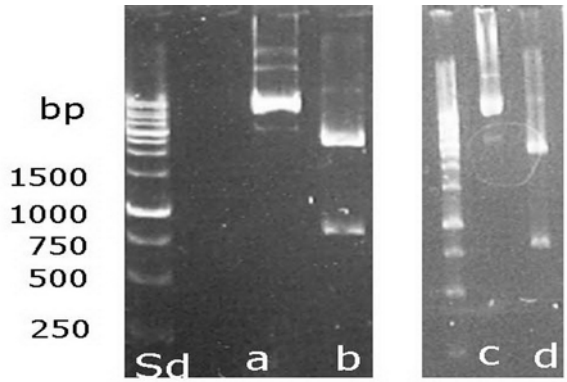

Figure 6 แสดง gel electrophoresis ของส่วน a และส่วน b ก่อนและหลังทำ BP-LR reaction (Sd: standard deviation, a and c: target genes with plasmids (whole plasmid with insertion), b and d: target genes separated from plasmid after cutting by restriction enzyme

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
   - รวบรวมข้อมูล เตรียม manuscript และคาดว่าจะสามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศได้

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
   - เชิงวิชาการ ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานในงานวิจัย