

รายงานโครงการวิจัย
(1 ตุลาคม 2538-30 กันยายน 2541)

การวิเคราะห์ความหลากหลายของโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอइट
(MSP1, MSP2) และโปรตีนบนผิวสปอร์โรซอइट (CSP, TRAP)
ของพลาสมาเดียมฟัลซิพารัมจากผู้ป่วยในประเทศไทย

RSA 3880008

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. สมชาย งามวิวัฒน์
หัวหน้าโครงการ
(เมธีวิจัย สกว. รุ่นที่ 2)

RSA 3880008

ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานโครงการวิจัย
(1 ตุลาคม 2538-30 กันยายน 2541)

การวิเคราะห์ความหลากหลายของโปรตีนบนผิวเมมบริโรซอมต์
(MSP1, MSP2) และโปรตีนบนผิวสปอร์โรซอมต์ (CSP, TRAP)
ของพลาสมาเดียมฟิลาเรียจากผู้ป่วยในในประเทศไทย

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. สมชาย จรุงจิตตกุล
หัวหน้าโครงการ
(เมธีวิจัย สกว. รุ่นที่ 2)

ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนหลักจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2538-2541 และบางส่วนของการงานวิจัยจาก The Hitachi Scholarship Foundation (1997-1998) The Asahi Glass Foundation (1996) โครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ และฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการวิจัยครั้งนี้ตลอดจนอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความร่วมมือ และสนับสนุนอย่างต่อเนื่อง

Abstract

Analysis of polymorphism in merozoite surface protein 1 (MSP1) merozoite surface protein 2 (MSP2), circumsporozoite protein (CSP) and thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* Thai isolates.

Molecular epidemiological study on potential malaria vaccine candidates is crucial for the basis of malaria vaccine development in order to avoid possible vaccine escape by parasites expressing different variant epitopes. To investigate the extent of sequence variations in the major vaccine candidates for *Plasmodium falciparum*, the merozoite surface protein 1 (MSP1), the merozoite surface protein 2 (MSP2), circumsporozoite protein (CSP) and thrombospondin-related anonymous protein (TRAP), blood samples were collected from malaria patients at Mae Sot District in Tak Province during 1988-1989, 1992 and 1995. Sequence analysis of the MSP1 gene has shown that polymorphism is confined to the 5' portion with sequence association between block 3 and blocks 6-16. Typing of the MSP1 gene has revealed stable patterns of allelic diversity and predominance of certain alleles among Thai isolates. Extensive sequence variation within the 2 allelic families (FC27 and 3D7/Camp) of the MSP2 gene was detected in the central repeat regions. Sequence encoding the T cell epitopes (Th2R and Th3R) in the CSP gene exhibits extensive sequence variation. It is of note that the predominant allele in CSP does not show temporal variation. On the other hand, the TRAP gene contains microheterogeneity of sequence without extensive sequence changes. Therefore, polymorphism occurs in these major malaria vaccine candidates among Thai isolates. However, the extent of sequence variation is confined to certain domains of these malaria genes. Identification of protective epitopes in the conserved regions of these proteins would be of prime importance for an effective malaria vaccine development.

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ความหลากหลายของโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอช (MSP1, MSP2) และโปรตีนบนผิวสปอร์โรซอช (CSP, TRAP) ของพลาสมาเดียมฟีลิจิปารัมจากผู้ป่วยในประเทศไทย

การศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของโปรตีนที่น่าจะเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียมมีความสำคัญในการเป็นข้อมูลพื้นฐานอย่างมากเพื่อป้องกันการหลบเลี่ยงการถูกทำลายของวัคซีนโดยเชื้อมาลาเรียที่มี epitope ต่างออกไปจากวัคซีน เพื่อเป็นการศึกษาขอบเขตความหลากหลายของโปรตีนที่สำคัญในการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียมชนิดฟีลิจิปารัม ได้แก่ โปรตีนบนผิวเมอร์โรซอช (MSP1, MSP2) และโปรตีนบนผิวสปอร์โรซอช (CSP, TRAP) ได้ใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมาลาเรียที่เก็บรวบรวมได้ที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ในช่วงปี ค.ศ. 1988-1989, 1992 และ 1995 การศึกษาลำดับเบสของยีน MSP1 พบว่าความหลากหลายในรูปแบบโปรตีน หรือยีนจำกัดอยู่บริเวณด้าน 5' เท่านั้น และพบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสใน block 3 กับ block 6-16 ของยีนดังกล่าว จากการตรวจสอบยีน MSP1 จากตัวอย่างเชื้อที่เก็บรวบรวมในเวลาต่างกัน พบว่าความหลากหลายในรูปแบบของยีน (อัลลีล) มีความคงที่ในช่วงเวลาที่ศึกษาและพบบางอัลลีลบ่อยกว่าอัลลีลอื่น ๆ สำหรับความหลากหลายในลำดับเบสของยีน MSP2 พบว่า สามารถจัดเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (FC27 และ 3D7/Camp) ซึ่งส่วนใหญ่ปรากฏในบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กันตรงกลางของยีน ในการศึกษาลำดับเบสบริเวณที่ตรงกับ T cell epitopes (Th2R และ Th3R) ในยีน CSP พบว่า มีความหลากหลายสูง อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่ามีบางอัลลีลพบบ่อยอย่างต่อเนื่องในแต่ละปี ในทางตรงข้ามพบว่ายีน TRAP มีความหลากหลายในลำดับเบสน้อย ดังนั้นความหลากหลายในรูปแบบโปรตีนสามารถตรวจพบได้ในยีนดังกล่าวจากเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย อย่างไรก็ตาม ขอบเขตของความหลากหลายเหล่านี้จำกัดอยู่เฉพาะบางบริเวณของยีน การตรวจหา epitope ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพในบริเวณเหล่านี้จึงน่าจะมีประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรีย

สารบัญ

		หน้า
1.	บทนำ	1
2.	วิธีการทดลอง	9
3.	ผลการทดลอง	18
4.	บทวิจารณ์	58
5.	หนังสืออ้างอิง	64
6.	ผลงานทางวิชาการ	70
7.	ภาคผนวก	71

มาลาเรีย ยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย และประเทศในเขตร้อนทั่วโลก แม้ว่ามาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่รักษาได้ แต่ปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคในการรักษาป้องกันและควบคุมโรค คือการดื้อยาหลายชนิดของมาลาเรียที่เคยใช้รักษาได้ผล โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Plasmodium falciparum* นอกจากนี้ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะของโรคยังเกิดการดื้อยาร่วมมาหลายชนิด ดังนั้นมาตรการอันหนึ่งที่น่าจะมีประโยชน์ในการควบคุมการแพร่กระจายของโรคนี้คือการผลิตวัคซีนสำหรับป้องกันโรคมาลาเรีย

อุปสรรคสำคัญในการผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียยังมีอยู่มาก เนื่องจากภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียมีความจำเพาะกับ ชนิด สายพันธุ์ และ ระยะต่าง ๆ ของมาลาเรีย (species-, strain- and stage-specific) ดังนั้นแนวทางในการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียเพื่อให้มีประสิทธิภาพอาจจำเป็นต้องใช้โปรตีนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อที่ได้จากหลายระยะ และควรจะมาจากโปรตีนบริเวณที่มี sequence conservation สูง หรือมีความหลากหลายต่ำ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้ผลกับคนทั่วโลก

ทิศทางการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามระยะการเจริญและกลวิธีป้องกันมาลาเรียดังนี้ (Nussenzweig & Long, 1994)

1. วัคซีนป้องกันมาลาเรียในระยะก่อนที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (pre-erythrocytic stage vaccine) โปรตีนที่สำคัญได้แก่ circumsporozoite protein (CSP) และ thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) หรือ sporozoite surface protein 2 (SSP2) วัตถุประสงค์คือ การยับยั้งหรือป้องกันไม่ให้สปอร์โรรอยด์เข้าสู่เซลล์ตับจึงเป็นการป้องกันตั้งแต่เริ่มต้นของการได้รับระยะติดต่อจากยุงก้นปล่อง นอกจากนี้มีผู้ให้ความสนใจเกี่ยวกับแอนติเจนที่จำเพาะต่อระยะที่มาลาเรียอยู่ในตับ (liver-stage specific antigens) มากขึ้น โดยมุ่งหวังไม่ให้สปอร์โรรอยด์ที่เข้าสู่เซลล์ตับแล้วมีการเจริญต่อไปอีก

2. วัคซีนป้องกันมาลาเรียระยะที่มีการ เจริญโดยไม่ใช้เพศในเม็ดเลือดแดง (asexual erythrocytic stage vaccine) โปรตีนที่สำคัญได้แก่ merozoite surface protein 1 (MSP1), merozoite surface protein 2 (MSP2), ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA/Pf155) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่อาจมีส่วนสำคัญ เช่น rhoptry proteins, serine repeat antigen (SERA), erythrocyte binding antigen (EBA-175) และ apical membrane antigen (AMA-1) วัตถุประสงค์คือ การยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อมาลาเรียในระยะที่มีการเจริญในเม็ดเลือดแดงแบบไม่ใช้เพศ ตลอดจนการป้องกัน การลุกลามของเมอริโรรอยด์สู่เม็ดเลือดแดง ทำให้ง่วงของการเจริญในเม็ดเลือดแดงสิ้นสุดลง

3. วัคซีนยับยั้งการแพร่กระจายของมาลาเรียระยะที่มีการสืบพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual stage vaccine) โปรตีนที่สำคัญได้จากระยะแกมมาโตไซต์และแกมมาตของมาลาเรีย โดยภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น

ไม่สามารถป้องกันผู้ได้รับวัคซีนจากการติดเชื้อมาลาเรีย แต่จะยับยั้งการเจริญของแกมมาในถุงเป็นการป้องกันไม่ให้มาลาเรียแพร่กระจายต่อไป วัคซีนระยะนี้จึงมีชื่อเรียกว่า transmission blocking vaccine (Kaslow et al, 1988)

นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิกำเนิดของโรคมาลาเรีย (pathogenesis) ที่รุนแรงโดยเฉพาะอย่างยิ่งมาลาเรียขั้นรุนแรง โปรตีนดังกล่าวแม้ว่าจะไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคหรือแพร่กระจายของโรคมาลาเรียแต่จะป้องกันไม่ให้ผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มีอาการที่รุนแรงหรือเรียกว่าเป็น anti-disease vaccine (Wahlgren et al, 1994)

บนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ ของ *P. falciparum* มีโปรตีนอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งน่าจะมีบทบาทสำคัญในการนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย ชนิดแรกเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 185 ถึง 200 KD เรียกว่า MSP1 (Holder, 1988) ในการทดลองใช้ purified MSP1 ติดเชื้อลิง Aotus พบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *P. falciparum* ได้เป็นผลสำเร็จ (Siddiqui et al., 1987) นอกจากนี้ monoclonal และ polyclonal antibodies ต่อโปรตีนนี้ยังสามารถป้องกันการลุกลามของเมอร์โรซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ (Blackman et al., 1990) และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง (Chang et al., 1992) ดังนั้น MSP1 จึงเป็น malaria vaccine candidate ที่ชนิดหนึ่ง อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญประการหนึ่งในการนำโปรตีนชนิดนี้มาใช้เป็นองค์ประกอบของมาลาเรียวัคซีน เนื่องจาก MSP1 เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ และมีความหลากหลายในรูปแบบของ antigen (antigenic diversity) แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อ (McBride et al., 1985) ในระยะต่อมา จากการศึกษา MSP1 ในระดับ DNA sequence และเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ พบว่าโปรตีนดังกล่าวถูกสร้างขึ้นจาก gene ที่มีลักษณะ dimorphic และสามารถแบ่ง MSP1 ออกเป็น conserved blocks, semiconserved blocks และ variable blocks ดังแสดงในรูปที่ 1 (Tanabe et al., 1987) ความรู้ดังกล่าวสามารถอธิบายการเกิด antigenic diversity ของ MSP1 ได้จากขบวนการเกิด intragenic recombination (Tanabe et al., 1987; Jongwutiwes et al., 1992; Jongwutiwes et al., 1993; Kerr et al., 1994)

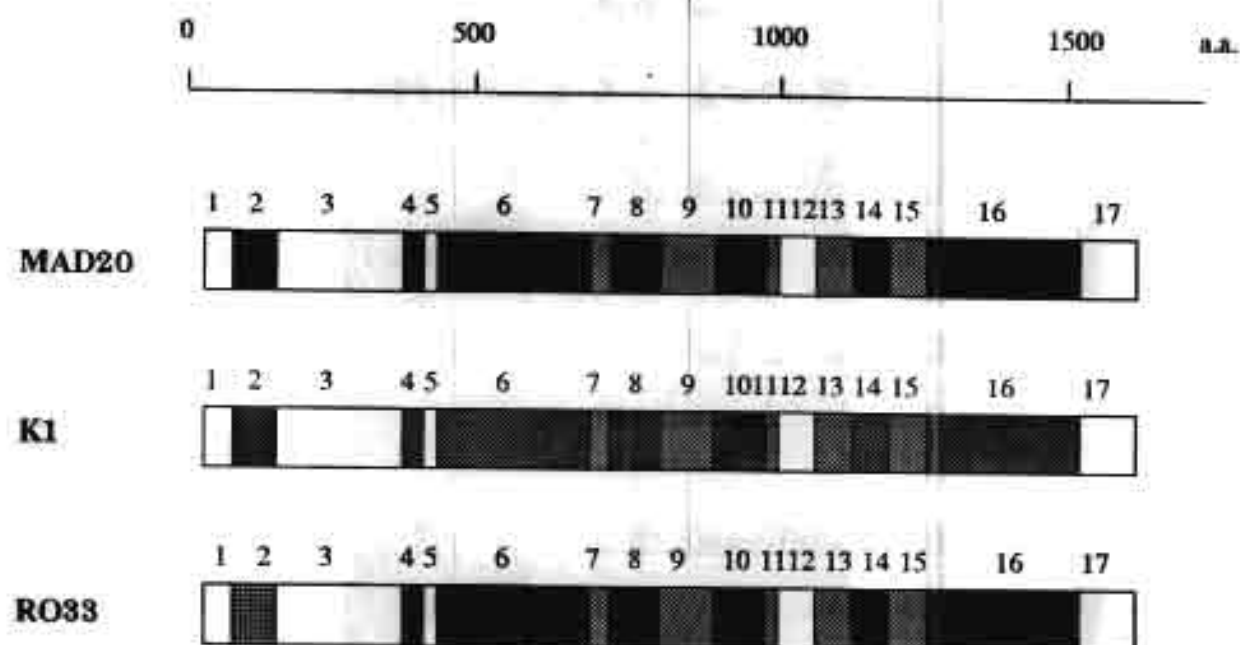
สำหรับการศึกษากำหนดการตอบสนอง antibodies ต่อทั้ง conserved blocks และ variable blocks ต่างมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคมาลาเรียหรือลดความรุนแรงของโรคลง (Riley et al., 1992; Tolle et al., 1993) การตรวจสอบอัลติสของ MSP1 สามารถทำได้โดยวิธี indirect immunofluorescence ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของอัลลิลได้ดี แต่จำเป็นต้องใช้ monoclonal antibodies มากถึง 10 ชนิด และจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองอย่างน้อย 24 ชั่วโมง (Conway & McBride, 1991) จึงเป็นวิธีที่ใช้เวลาหลายวัน สำหรับการตรวจสอบโดยวิธี Southern hybridization มักจำกัดอยู่เฉพาะบางส่วนของ MSP1 gene โดยเฉพาะบริเวณ block 2 (Kimura et al., 1990; Scherf et al., 1991) และวิธีการที่ใช้มีหลายขั้นตอน ดังนั้นโดยอาศัยข้อมูลของ MSP1 gene จากหลาย ๆ ตัวอย่าง พบว่า ในแต่ละส่วนของอัลลิลต้นแบบ (parental allele) มี restriction sites ต่างกัน ดังนั้นอาศัยเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA โดยปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) เพื่อเพิ่ม

ปริมาณ DNA ใน ส่วนต่าง ๆ ของ MSP1 gene จึงน่าจะสามารถวิเคราะห์ allele โดยใช้ restriction enzymes ที่เหมาะสม

โปรตีนที่อยู่บนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์อีกชนิดหนึ่งเรียกว่า MSP2 มีน้ำหนักโมเลกุลราว 36 ถึง 56 KD โปรตีนชนิดนี้ตรวจพบได้ตั้งแต่ระยะ late ring, trophozoite, schizont และไปปรากฏที่ผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ ในที่สุด (Smythe et al., 1991) จากการศึกษาความหลากหลายของ MSP2 โดยใช้ monoclonal antibodies พบว่ามี antigenic diversity คล้ายคลึงกับ MSP1 (Fenton et al., 1991) นอกจากนี้ในเขตปรากฏโรคมalaria ผู้ที่มี antibodies ต่อ MSP2 จะมีความรุนแรงของโรคน้อยกว่าผู้ที่ไม่มี antibodies ดังกล่าว (Al-Yaman et al., 1994) การศึกษาโดยใช้ peptide epitope mapping พบว่า MSP2 ประกอบด้วย T cell epitope อย่างน้อย 4 ตำแหน่ง (Rzepczyk et al., 1989) และ polypeptide จาก N-terminus และ C-terminus ของ MSP2 สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้ (Saul et al., 1992) ซึ่งจัดว่า MSP2 มีความสำคัญในการนำไปใช้เป็นองค์ประกอบหนึ่งของ asexual blood stage vaccine ร่วมกับ MSP1 คาดว่าน่าจะทำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการใช้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง อย่างไรก็ตามในระดับ DNA sequence พบว่า MSP2 ประกอบด้วยส่วนที่เป็น repetitive sequence และ nonrepetitive sequence อยู่บริเวณตอนกลางของ gene ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่ง sequence ของ *P. falciparum* จากตัวอย่างเชื้อที่ได้จากผู้ป่วยโดยตรงในบริเวณที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย ยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อน นอกจากนี้การศึกษานี้เปรียบเทียบกับ MSP1 อาจพบความสัมพันธ์ในทางโครงสร้างของโมเลกุลทั้งสอง ซึ่งอาจนำไปสู่ความเข้าใจในหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าว ข้อมูลเหล่านี้จึงน่าจะมีประโยชน์ในการผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียในอนาคต

สำหรับโปรตีน CSP และ TRAP ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญบนผิวของระยะสปอร์โรซอยต์นั้น CSP เป็นโปรตีนที่มีผู้ทำการศึกษอย่างกว้างขวางในการเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย (Nussenzweig & Nussenzweig, 1989) ลักษณะโครงสร้างของ CSP ประกอบด้วยส่วน N-terminus ที่มีความคงที่ระหว่างสายพันธุ์สูง และมีส่วนของกรดอะมิโนที่มีความคงที่ระหว่างชนิดของมาลาเรีย เรียกว่า RI ถัดมาเป็นบริเวณ tetrapeptide repeats แยกต่างไปตามสายพันธุ์ของเชื้อ (Jongwutiwes et al., 1994) antibodies ต่อ tetrapeptide repeats สามารถยับยั้งการถูกกลืนของสปอร์โรซอยต์ไม่ให้เข้าสู่เซลล์ได้ (Nussenzweig & Nussenzweig, 1989) บริเวณ C-terminus ประกอบด้วย cell-adhesive motif ในส่วนของ RII ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคงที่ และบริเวณ T cell epitope ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างไปตามสายพันธุ์ ดังนั้นบริเวณ C-terminus จึงเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบสูง (Doolan et al., 1992; Shi et al., 1992; Jongwutiwes et al., 1994) บริเวณดังกล่าวยังมีความสำคัญในการกระตุ้น cytotoxic T cell ให้ทำลาย infected hepatocytes ได้ (Weiss et al., 1990) โครงสร้างของอิน CSP แสดงในรูปที่ 3

รูปที่ 1 โครงสร้างของ merozoite surface protein 1 (MSP1) ของ *Plasmodium falciparum* ประกอบด้วย MAD20 และ K1 เป็นอัลลีลค้นแบบ



Conserved block
(intraspecies)

Semiconserved block
(MAD20 allele)

MAD20

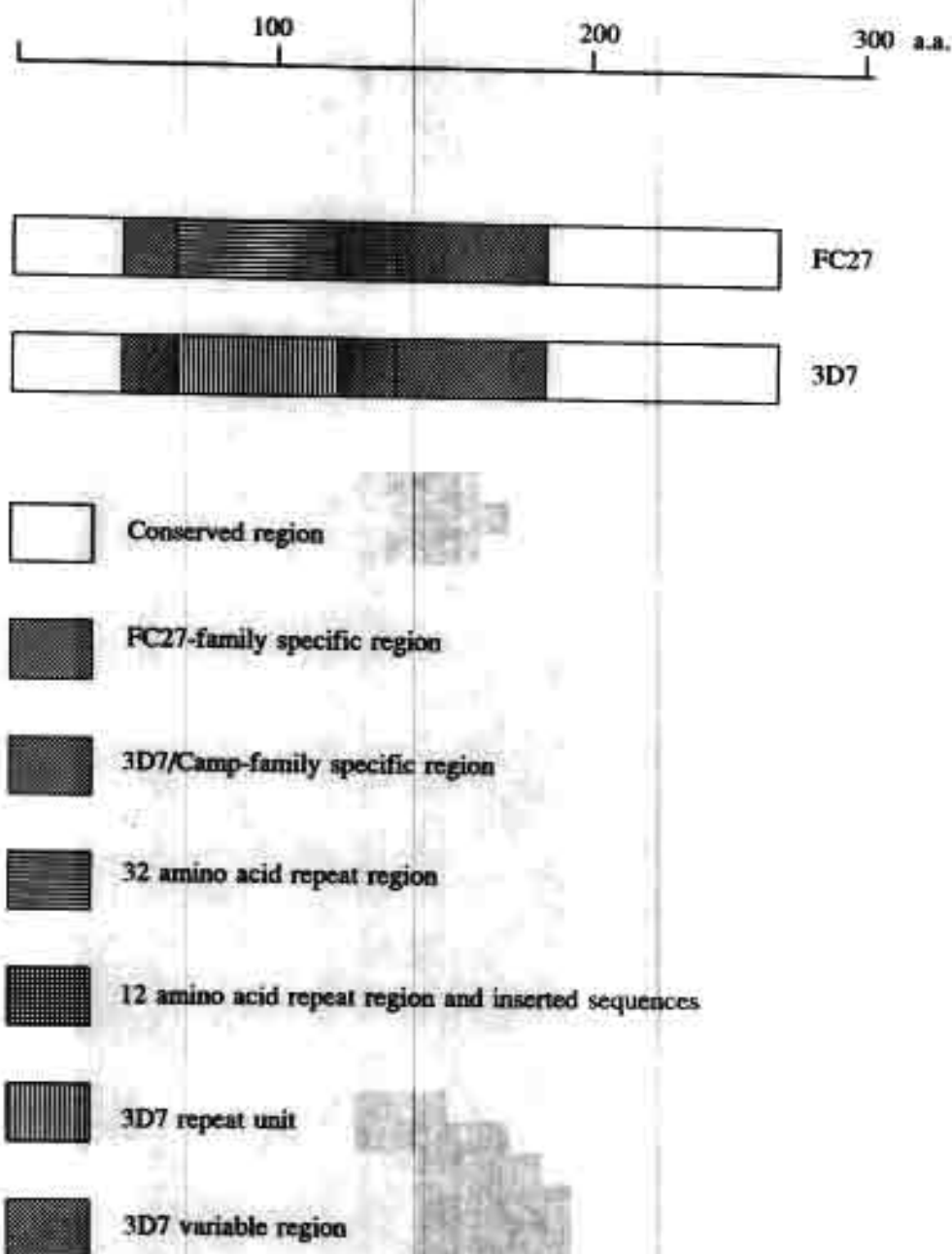
Semiconserved block
(K1 allele)

K1

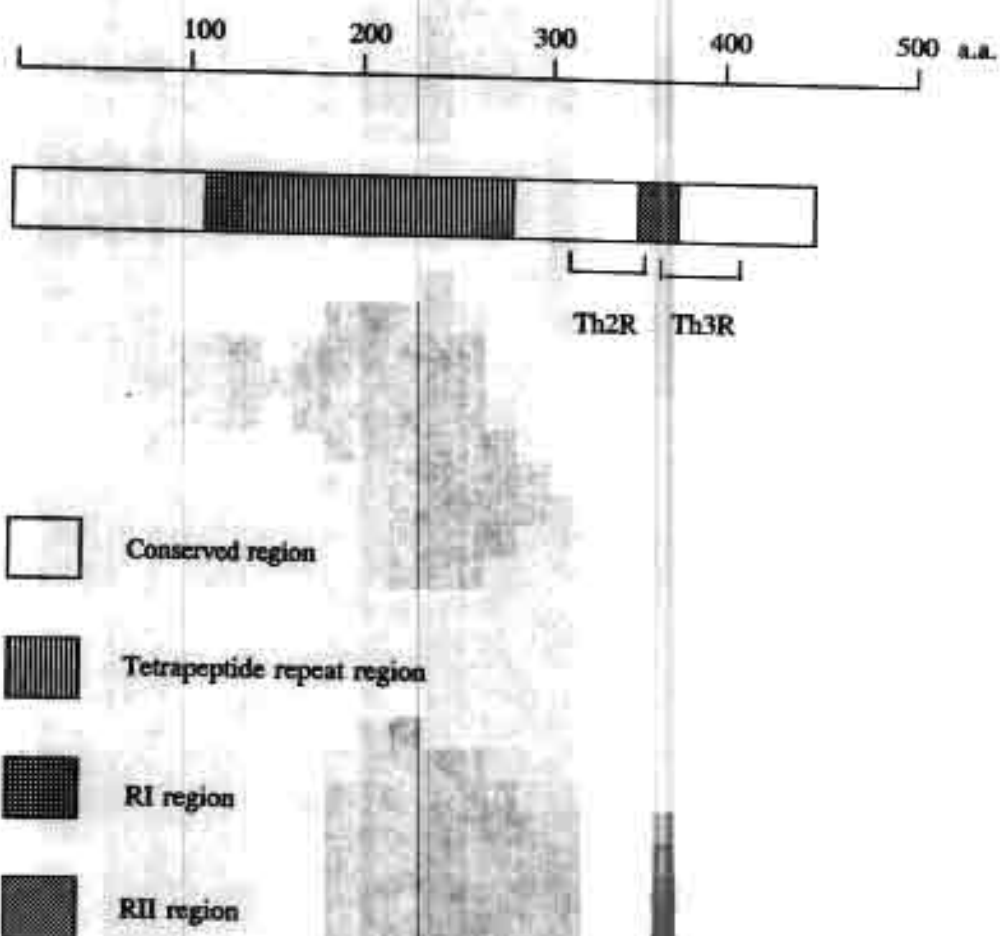
RO33

รูปที่ 2

โครงสร้างของ merozoite surface protein 2 (MSP2) ของ
Plasmodium falciparum ประกอบด้วย FC27 และ 3D7/Camp เป็นอัลลีลต้นแบบ



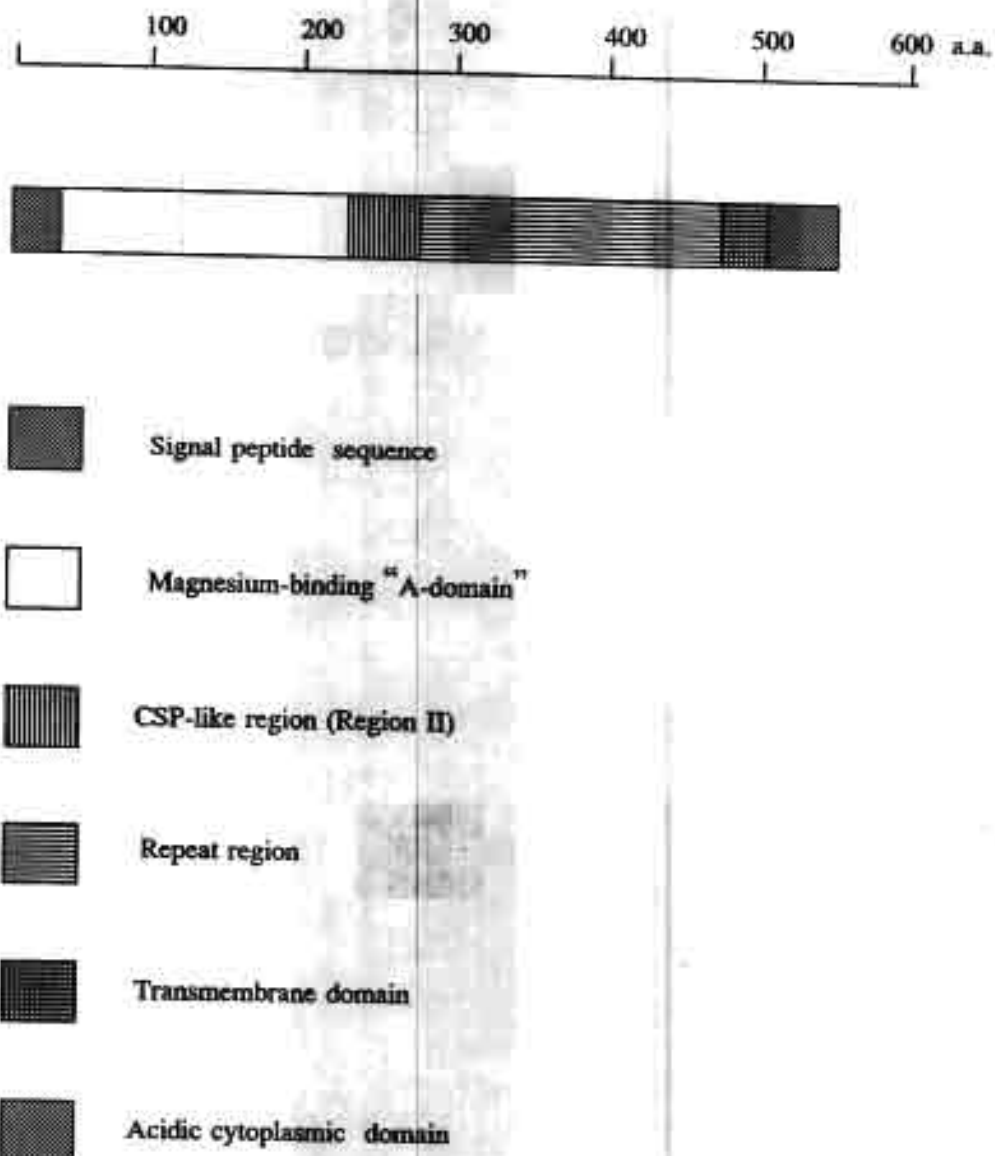
รูปที่ 3

โครงสร้างของ circumsporozoite protein (CSP) ของ *Plasmodium falciparum*

แม้ว่าการศึกษา TRAP มีอย่างจำกัด แต่พบว่าโปรตีนชนิดนี้มีองค์ประกอบของ cell adhesive motif คล้ายกับ thrombospondin และ properdin (Robson et al., 1988) ดังนั้นจึงอาจมีความสำคัญในกระบวนการที่สปอร์โรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับเช่นกัน เนื่องจาก antibodies ต่อ TRAP สามารถป้องกันการถูกกลืนของสปอร์โรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับได้ และผู้ที่อยู่ในแหล่งระบาดของมาลาเรียซึ่งมี antibodies ต่อ TRAP มีอัตราการติดเชื้อมาลาเรียในเลือด (parasitemia) ต่ำกว่าผู้ไม่มี antibodies ดังกล่าว (Scarselli et al., 1993) นอกจากนี้การศึกษานี้ในสัตว์ทดลองพบว่า CSP และ TRAP เมื่อใช้ร่วมกันสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์ (Khusmith et al., 1991) TRAP ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 559 ตัว จากการศึกษาคือด้วยตัวอย่างเชื้อ *P. falciparum* ในหลอดทดลองพบการแทนที่ของกรดอะมิโนในโปรตีนดังกล่าวหลายตำแหน่ง (Robson et al., 1990) โครงสร้างของ TRAP แสดงในรูปที่ 4 ดังนั้นการศึกษา TRAP gene โดยใช้ตัวอย่างเชื้อจากผู้ป่วยโดยตรงจะมีประโยชน์ในการวางแผนพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียในอนาคต ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีอย่างจำกัดเฉพาะเชื้อที่เจริญได้ดีในหลอดทดลอง และตัวอย่างจากผู้ป่วยในประเทศกัมพูชาเพียง 3 ตัวอย่างเท่านั้น

อย่างไรก็ตามโปรตีนดังกล่าวมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อ ดังนั้นข้อมูลในด้านขอบเขตความหลากหลาย (extent of sequence variation) ในแต่ละส่วนของโปรตีนดังกล่าว โดยเฉพาะตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยในบริเวณที่มีการกระจายของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยซึ่งมีอัตราการเสียชีวิตสูง จึงมีประโยชน์เพื่อเป็นพื้นฐานการออกแบบ วัคซีนที่เหมาะสม อนึ่งโปรตีนดังกล่าวปรากฏบนผิวของมาลาเรียจึงอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการถูกกลืน เข้าสู่เซลล์ แม้ว่าหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ยังไม่ทราบชัดเจน แต่จากการวิเคราะห์ allele หรือ ลำดับเบส ของ DNA อาจทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนดังกล่าว การศึกษาความหลากหลายของโปรตีนในกลุ่มประชากรเดียวกันจะเป็นพื้นฐานของการเข้าใจพันธุประชากร (population genetics) ของมาลาเรียในธรรมชาติอีกด้วย นอกจากนี้ยังเป็นพื้นฐานในการศึกษาภาวะการตอบสนองต่อโปรตีนดังกล่าวจากการติดเชื้อในธรรมชาติ ตลอดจนการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนในอนาคตจึงจำเป็นต้องทราบคุณลักษณะของเชื้อในเขตปรากฏโรค ตลอดจนการเข้าใจกลไกทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม

โครงสร้างของ thrombospondin-related anonymous protein (TRAP)
ของ *Plasmodium falciparum*



1. ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย ชนิด *P. falciparum*

1.1 ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่ได้จาก อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก เก็บรวบรวมในปี ค.ศ. 1988-1989 จำนวน 19 isolates ซึ่งได้ผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อและเก็บรวบรวมไว้ใน liquid nitrogen ทั้งนี้ isolates ดังกล่าวได้เคยวิเคราะห์ลำดับเบสใน block 2 และบางส่วนของ block 3 ของ MSP1 gene และ 3' portion ของ MSP1 gene ซึ่งครอบคลุมประมาณ 1.6-1.7 kb (Jongwutiwes S, et al. 1992; Jongwutiwes S, et al. 1993) และ CSP gene (Jongwutiwes S, et al. 1994)

1.2 ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่ได้จาก อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก เก็บรวบรวมในปี ค.ศ. 1992 จำนวน 22 isolates และในปี ค.ศ. 1995 จำนวนประมาณ 50 isolates เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลง alleles ของ CSP gene และ MSP1 gene ทั้งนี้ isolates ดังกล่าวไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงมาก่อน และ isolates บางส่วนในกลุ่มนี้ใช้ศึกษาลำดับเบสของ MSP2 และ TRAP genes โดย isolate เหล่านี้เก็บที่ -20°C

1.3 ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่ได้จากผู้ป่วยใน Rondonia ประเทศบราซิล ประมาณ 15 isolates ซึ่งเก็บรวบรวมในปี ค.ศ. 1995 เพื่อใช้ศึกษา CSP gene เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในประเทศไทย และ บราซิลในอดีตที่เคยมีผู้ศึกษามาก่อน (Yoshida et al. 1990) นอกจากนี้ยังคัดเลือกบาง isolates สำหรับศึกษา MSP2 gene

2. การเตรียม DNA

2.1 นำตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย ซึ่งถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C มาทิ้งไว้ให้ละลายที่ อุณหภูมิห้อง เติมน้ำสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.8 ที่เย็น (อุณหภูมิประมาณ 4°C) ลงไป 2 เท่า ผสมให้เข้ากันเพื่อล้างพลาสมาออก แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

2.2 ใช้พลาสติกเยื่อรีปีเมนต์ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนส่วนล่างซ้ำด้วย PBS อีก 2 ครั้ง จะได้ตะกอนของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ก้นหลอด

2.3 เติมน้ำสารละลาย 0.05 % saponin ใน PBS ปริมาตร 500 μl ลงไปผสมกับตะกอนให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C จนเม็ดเลือดแดงแตก โดยจะสังเกตเห็นสีของสารละลายเป็นสีแดงใส

2.4 นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนที่มีอีโมโกลบินทิ้งไป ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลาย PBS ที่เย็นปริมาตร 500 μl (อุณหภูมิประมาณ 4°C) ซ้ำอีก 2 ครั้งหรือจนสารละลายส่วนบนใส

2.5 นำตะกอนส่วนล่างที่ได้มาเติมสารละลาย lysis buffer 500 μl ประกอบด้วย sodium lauryl sulfate (SDS) ร้อยละ 5, 0.01 M EDTA pH 8.0 และ proteinase K 4 mg นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 50°C นาน 4 ชั่วโมง

2.6 นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี phenol-chloroform extraction โดยเติม saturated phenol ลงไป

500 μ l (1 เท่าของปริมาตรเดิม) เขย่าให้เข้ากันอย่างแรงด้วย vortex mixer นาน 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องจะได้สารละลายสองส่วนแยกชั้นกัน

2.7 คัดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดทดลองใหม่แล้วเติม สารละลาย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25: 24: 1) ลงไปปริมาตร 500 μ l (1 เท่าของปริมาตรเดิม) เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วคัดสารละลายส่วนบนลงในหลอดทดลองใหม่ ทำซ้ำเช่นเดียวกันนี้อีกครั้ง

2.8 เติม chloroform ลงในสารละลายส่วนบนที่ได้ครั้งสุดท้ายในหลอดทดลองใหม่ปริมาตร 500 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture นาน 5 นาที แล้วปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

2.9 คัดสารละลายส่วนบนที่ได้ใส่ในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นนำไปตกตะกอนโดยเติมสารละลาย 3M sodium acetate pH 5.2 ลงไปปริมาตร 50 μ l (ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลายที่มีอยู่) และ absolute ethanol ปริมาตร 1,000 μ l (ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย) ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C นาน 1 ชั่วโมง

2.10 เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสข้างบนทิ้ง จะได้ตะกอนสีขาวของ DNA ติดอยู่ที่ก้นหลอด

2.11 ล้างตะกอน DNA โดยเติม 70% ethyl alcohol ปริมาตร 500 μ l แล้วนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เทส่วนใสข้างบนทิ้ง ตะกอน DNA จะอยู่ที่ก้นหลอด คราวหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องจน DNA แห้ง นำ DNA ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

8. การเพิ่มปริมาณ DNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR)

การเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายโดย PCR เพื่อใช้สำหรับเชื่อมเข้ากับ DNA ของ vector ซึ่งใช้ phagemid pUC118 หรือ pUC119 นั้น ใช้ PCR mixture ปริมาตรรวม 100 μ l ประกอบด้วย DNA template ประมาณ 3-5 μ l, dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) อย่างละ 200 μM ใน buffer ซึ่งประกอบด้วย 10 mM Tris-HCL, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.0 mM MgCl_2 , Taq polymerase 2.5 units (Promega, USA) และ primers จากส่วน 5' sequence และ 3' sequence ซึ่งเป็น complementary strand อย่างละ 1.0 μM สำหรับลำดับเบสใน primers แต่ละชนิดและ PCR condition สำหรับแต่ละ gene มีดังนี้

3.1 MSP1 gene (ตำแหน่งและลำดับเบสตาม MAD20 sequence, Tanabe et al. 1987)

Primers สำหรับ blocks 1-5

P1 5'-CACAATGTGTAACACATGAAAGTTATC -3' (nucleotides 185-211)

P2 5'-TCTTAAATAGTATTCGAATTCAAGTGGATC -3'

(nucleotides 1234 -1263)

Primers สำหรับ blocks 5-13

P3 5' -GTTTATTTACGGATCCACTTG -3' (nucleotides 1223-1243)

P4 5' -GGCATAATTATCTTCTGTTTGAATTG -3' (nucleotides 3554-3579)

Primers สำหรับ blocks 12-17

P5 5' -CTCCATTAAAACTTTAAGTG -3' (nucleotides 3527-3547)

P6 5' -GTAACATATTTTAACTCCTAC -3' (nucleotides 5247-5267)

3.2 MSP2 gene (ตำแหน่งและลำดับเบสตาม FC27 sequence, Smythe et al., 1988)

SJ-1 5' -CTTAACATATTATATTAGTCGACATGAAGG -3' (nucleotides 71-100)

โดยมี A/G และ A/C mismatches ในตำแหน่งที่ 91 และ 93 ตามลำดับเพื่อทำให้เกิด *Sal* I site

SJ-2 5' -GTTTTAAAATGAAGAGAATTCTATGAATATG -3' (nucleotides

876-906) โดยมี A/C mismatch ในตำแหน่งที่ 886 เพื่อทำให้เกิด *Eco* RI site

สำหรับ PCR condition ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 50 °C 1 นาที และ extension อุณหภูมิ 72 °C 2 นาที โดยทำซ้ำ 35 รอบ

3.3 TRAP gene (ตำแหน่งและลำดับเบสตาม T9/96 sequence, Robson et al., 1990)

TRAP-F 5' GTATGTGCAAGCTTACAAGAAAATATTATC -3'

(nucleotides -84 ถึง -55 จาก start codon) โดยมี mismatches ในตำแหน่งที่ -75 และ -72 เพื่อทำให้เกิด *Hin* dIII site

TRAP-R 5' TTATTCTAQAATTATATTTAATTCCACTCGTTTTTC -3'

(nucleotides 1974-2008) โดยมี mismatches ในตำแหน่งที่ 1999 และ 2002 เพื่อทำให้เกิด *Xba* I site

3.4 CSP gene (ตำแหน่งและลำดับเบสตาม 7G8 sequence, Dame et al., 1984)

CSP-P2 5' -ACTCAAGCTTAGATGTGTTCT -3' (nucleotides 1321-1341)

CSP-P3 5' -AATCAAGCTTATGGACAAGGT -3' (nucleotides 948-968) โดยมี mismatches ในตำแหน่งที่ 1327 และ 1330 ใน CSP-P2 และตำแหน่งที่ 959 และ 962 ใน CSP-P3 เพื่อให้เกิด *Hin* dIII sites

4. agarose gel electrophoresis

เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1 % และ 1.7 % ใน TAE buffer สำหรับความเข้มข้นของ agarose ขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการแยกแยะ DNA ที่ได้จาก PCR โดยทั่วไปในการวิจัยนี้ใช้ gel ขนาด 5.5 x 10.5 cm ความหนาของ gel ประมาณ 0.5 cm

ในการแยกแยะ DNA ออกจากกันนั้น ใช้ไฟฟ้ากระแสตรงความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 V. ใช้เวลาประมาณ 40 นาที ภายหลังจากการแยกแยะ DNA โดยกระแสไฟฟ้าแล้วนำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 µg/ml ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที แล้วนำ gel ไปล้างน้ำกลั่นประมาณ 5 นาที ตรวจสอบ DNA ซึ่งจะเรืองแสงภายใต้ UV ในห้องมืด

5. การตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย restriction endonucleases

เตรียมส่วนผสมในการย่อยผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย endonucleases ในปริมาตรทั้งหมด 20 μ l ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ PCR 5-10 μ l 10 x buffer 2 μ l enzyme 1 μ l และเติมน้ำในส่วนที่ขาดผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นให้สารละลายที่ติดข้างหลอด 1.5 ml ลงด้านล่างแล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานแต่ละชนิด ซึ่งในการวิจัยนี้ใช้อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปผสมกับ loading dye และแยกแถบ DNA ขนาดต่าง ๆ ออกจากกันโดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ชนิดและความเข้มข้นของ gel ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการศึกษาแต่ละ gene

6. การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับ pUC118/119

6.1 ทำการย่อยปลายผลิตภัณฑ์ PCR และ pUC118/119 โดยใช้ enzymes ที่เหมาะสมดังนี้

- (1) MSP1 gene ในส่วน blocks 1-6 ใช้ enzymes *Hin* dIII และ *Eco* RI
- (2) MSP2 gene ใช้ enzymes *Sal* I และ *Eco* RI
- (3) TRAP gene ใช้ enzymes *Hin* dIII และ *Xba* I

(4) CSP gene ในส่วน 3' portion ซึ่งครอบคลุมด้านปลายสุดของ gene จนถึงส่วนต่อกับ tetrapeptide repeats ใช้ enzyme *Hin* dIII ทั้งนี้ pUC ที่ใช้นอกจากจะต้องย่อยด้วย enzyme *Hin* dIII แล้วยังต้องใช้ alkaline phosphatase เพื่อกำจัด phosphate group ออกไปทั้ง 2 ปลายของ vector เพื่อป้องกันการเชื่อมกันเองของปลายทั้ง 2 ข้าง (self-ligation)

6.2 ทำการแยกผลิตภัณฑ์ PCR และ pUC118/119 ที่ผ่านขั้นตอนการย่อยดังกล่าวข้างต้นให้บริสุทธิ์โดยใช้ low melting agarose gel electrophoresis ภายหลังจากย้อมด้วย ethidium bromide นำ gel ที่ได้วางบนแผ่นพลาสติกที่สะอาดในโถที่มีสะอาดคัดแยก DNA ที่ต้องการ ภายใต้อุปกรณ์ long wave length UV transilluminator ใต้อากาศ 1.5 ml.

6.3 ทำการแยกแถบ DNA ออกจาก agarose โดยใช้ Wizard PCR prep kit (Promega, USA) โดยละลาย agarose ที่แยกแถบ DNA ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำ DNA binding resin 1 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที นำ Resin/DNA mixture ใส่ใน syringe barrel ซึ่งปลายด้านหนึ่งติดกับ minicolumn ใช้ syringe plunger ดัน mixture ดังกล่าวให้ผ่าน column ซ้ำ ๆ ทำซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ isopropanol 2 ml เป็นตัวล้าง column ซึ่งมี DNA ติดอยู่ นำ minicolumn สวมบนหลอด 1.5 ml นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 rpm. เพื่อทำให้ resin แห้ง แล้วสวม minicolumn เข้ากับหลอด 1.5 ml หลอดใหม่ เติมน้ำบริสุทธิ์ 50 μ l ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นอีกครั้งที่ความเร็วเดิมจะได้ DNA แยกมาบนน้ำ

6.4 สำหรับ ligation reaction ใช้ปริมาตร 15 μ l ประกอบด้วย pUC118/119 ประมาณ 50-100 ng, amplified target gene ที่เตรียมแล้วประมาณ 100-300 ng, 10x ligation buffer 1.5 μ l, T4 DNA ligase (1 unit/ μ l) 1 μ l เติมน้ำบริสุทธิ์ให้มีปริมาตรครบ 5 μ l นำไป incubate ข้ามคืนที่

อุณหภูมิ 15 °C

6.5 ทำการตกตะกอน ligation mixture ในวันถัดไปโดยเติม 3 M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 1.5 μ l และ absolute ethanol 30 μ l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C 15 นาที ปั่นล้างอีกครั้งภายหลังจากล้างด้วย 70% ethanol ทั้งให้แห้ง

7. การนำ DNA เข้าสู่แบคทีเรีย (Transformation)

7.1 เลี้ยง *Escherichia coli* strain XL-blue ใน Luria-Bertani (LB) broth จนถึง early หรือ mid-log phase ทำการปั่นเซลล์ให้เหลือเฉพาะ pellet

7.2 เติม ice-cold 10% glycerol ให้ได้เซลล์ประมาณ $1-3 \times 10^{10}$ cells/ml

7.3 เติมเซลล์ที่ได้ในข้อ 6.2 ปริมาตร 40 μ l ลงใน DNA 5 μ l ที่เตรียมไว้ ซึ่งอยู่ในสถานะที่เย็นบนน้ำแข็ง เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน

7.4 เติมส่วนผสมในข้อ 6.3 ลงใน cuvette (BioRad, USA) ขนาดระยะห่าง electrode 0.1 cm ซึ่งแช่ในน้ำแข็งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที

7.5 ผ่านไฟฟ้ากระแสตรงแรงเคลื่อนไฟฟ้า 1.80 kilovolts โดยใช้เครื่อง *E. coli* Pulser apparatus (BioRad, USA)

7.6 เติม LB broth 1 ml แล้วดูดถ่ายเปลี่ยนใส่หลอดทดลองขนาด 10 ml incubate พร้อมเขย่าเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.7 นำ suspension ในข้อ 6.6 ปริมาตร 300 μ l เพาะเลี้ยงบน LB agar plate ซึ่งมี ampicillin 50 μ g/ml, 0.4 % X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) และ 2 μ M IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) โดยใช้ glass spreader เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอบน plate

7.8 incubate 37 °C จุ่มคืน

8. การตรวจสอบ recombinant subclones

เลือก colony สีขาวที่อยู่เดี่ยว ๆ ให้มีกวงเป็นเครื่องหมายและเขียนหมายเลขไว้ที่ด้านนอกของ plate เลือกประมาณ 20 colonies ต่อ 1 plate ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จิ้มบางส่วนของ colony ใส่ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ml ที่มี ampicillin 100 μ g/ml ทำเครื่องหมายให้ตรงแต่ละหลอด นำไปใส่ในตู้เขย่าเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าจุ่มคืนด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที วันรุ่งขึ้น *E. coli* จะเจริญเต็มที่จนอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น ใช้พาสเจอร์บีเปิดขวดด้วยหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มีฝาปิดนำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที *E. coli* จะตกตะกอนแน่นบริเวณก้นหลอด เทสารละลายข้างบนทิ้ง เติมสารละลาย GTE ซึ่งประกอบด้วย glucose 50 mM, Tris-HCl pH 8.0, 25 mM และ EDTA pH 8.0, 10 mM ลงไป 500 μ l เขย่าอย่างแรงเพื่อให้ *E. coli* กระจายตัวในสารละลาย นำไปปั่นอีกครั้งที่สถานะเดิมและเทสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วเติมสารละลาย GTE 50 μ l เขย่าอย่างแรงเพื่อให้ *E. coli* กระจายในสารละลาย เติม GTE ที่มี lysozyme 200 μ g/ml ในปริมาณ 50 μ l ตัดก้นหลอดเบา ๆ ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลาย 0.2

N NaOH/SDS ร้อยละ 1 จำนวน 200 μ l คีดกันหลอดมา ๆ ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วเติม 3M sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 150 μ l คว่ำหลอดไปมาให้เข้ากัน นำไปแช่ ในน้ำแข็ง 20 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm 4 °C 10 นาที สูดสารละลายส่วนบนที่มี DNA ใส่ในหลอด 1.5 ml ใหม่ ทำการสกัด DNA ออกจากสิ่งเจือปนอื่นด้วย phenol/chloroform extraction และ ethanol precipitation หลังจาก DNA แห้ง แล้วเติม TE buffer 30 μ l ทำการตรวจสอบขนาด DNA ที่ได้โดย agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ pUC 118/119 ที่ไม่มี DNA เชื่อมอยู่

9. การเตรียม DNA template สำหรับ DNA sequencing

ใช้ DNA ที่ได้จากข้อ 8 เติม RNase 10 units incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 2 NaCl/20 % polyethylene glycol 30 μ l เขย่าให้เข้ากัน นำไปแช่น้ำแข็ง 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm 4 °C 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างเกลียวที่ปะปนอยู่ด้วย คอกอนข้างล่างหลอดด้วย 70 % ethanol ทิ้งให้แห้งแล้วเติม TE buffer 16 μ l, 0.2 mM EDTA pH 8.0 2 μ l และ 2N NaOH 2 μ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติม 3 M sodium acetate pH 5.2 จำนวน 8 μ l และ absolute ethanol 100 μ l เก็บไว้ที่ -80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm 4 °C 15 นาที ล้างเกลียวที่เหลือออกด้วย 70 % ethanol ทิ้งให้แห้งจะได้ DNA สายเดี่ยวพร้อมสำหรับขึ้นคอนต่อไป

10. DNA sequencing

10.1 ขึ้นคอน annealing

นำ DNA template สายเดี่ยวที่ได้จากข้อ 9 ละลายน้ำ 7 μ l เติม 5x Sequenase buffer 2 μ l และ sequencing primer 0.5 pmole/ μ l ปริมาณ 1 μ l ในการศึกษานี้ใช้ sequencing primers สำหรับแต่ละ gene ดังนี้

(1) MSP1 gene ใช้ Forward M13 primer (-40) : 5' -GTTTTTCCCAGTCACGAC -3' และ Reverse M13 primer : 5' -CAGGAAACAGCTATATGAC -3'

(2) MSP2 gene ใช้ Forward M13 primer (-40) , Reverse M13 primer CP-1 : 5' -GCTTATAATATGACTAT -3' (nucleotides 193-209) และ CP-2 : 5' -TGTTGTCTGTACCTTT-3' (nucleotides 676-692)

(3) TRAP gene ใช้ Forward M13 primer (-40), Reverse M13 primer T1: 5' -CTCTTAAGTACAAATCTTCC -3' (nucleotides 461-480), T2: 5' -CTCTTAAGTACAAATCTTCCA -3' (nucleotides 672-692), T3: 5' -GATTTCCTGTAGGTTCTCA -3' (nucleotides 910-928), T4: 5' -GAACAATGTGAAGAAGAAAC -3' (nucleotides 1146-1168), T5: 5' -CTTTGTTTCCTTTCATTATC -3' (nucleotides 1581-1600) และ T6: 5' -CCTCCAGCTATTCCACCTGC -3' (nucleotides 1803-1822)

(4) CSP gene ใช้ Forward M13 primer (-40) และ Reverse M13 primer

ทำการผสม annealing mixture ดังกล่าวให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 2 นาที ทำให้เย็นลงช้า ๆ จนถึง 30°C โดยใช้เวลาประมาณ 15-30 นาที แล้วเก็บไว้ ในน้ำแข็งเพื่อขั้นตอนต่อไป

10.2 การเตรียม labeling reaction

ประกอบด้วย annealed DNA mixture 10 μl , 0.1 MDTT 1 μl labeling mixture (1.25 μM dNTP) 2 μl , ^{35}S αdATP 0.1 μl และ enzyme modified T7 DNA polymerase (Sequenase version 2.0) 2 μl เมื่อผสมทุกอย่างเข้ากันดีแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที

10.3 การดำเนินปฏิกิริยา extension และ termination

แบ่ง mixture ในข้อ 9.2 เป็น 4 ส่วน นำไปเติมในหลอด 1.5 ml หลอดละ 3.5 μl ซึ่งมี 80 μM dNTP, 50 mM NaCl โดยแต่ละหลอดมีองค์ประกอบของ dideoxynucleotide ต่างกันดังนี้

หลอดที่ 1 ddG termination mix ประกอบด้วย 8M ddGTP

หลอดที่ 2 ddA termination mix ประกอบด้วย 8M ddATP

หลอดที่ 3 ddT termination mix ประกอบด้วย 8M ddTTP

หลอดที่ 4 ddC termination mix ประกอบด้วย 8M ddCTP

ทำปฏิกิริยา extension/termination ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม stop solution 4 μl ซึ่งประกอบด้วย 95% formamide, 25 mM EDTA 0.05 % bromophenol blue และ 0.05 % xylene cyanole FF เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นสามารถนำไปวิเคราะห์แถบ DNA หรือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

11. การตรวจสอบแถบ DNA เพื่อหาลำดับเบส

ทำการแยกแถบ DNA ในข้อ 10.3 โดย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer โดยใช้ไฟฟ้ากระแสตรงแรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 1,200-1,800 V โดยกำหนดให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 25 mA ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้ gel คงสภาพโดยใช้ 10 % methanol ผสมกับ 10 % acetic acid เป็นเวลา 15 นาที นำกระดาษกรอง Whatman 3 MM วางบนแผ่น gel เพื่อลอก gel ออกจากกระจก ทำให้ gel แห้งโดยใช้ gel dryer อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที นำไปประกบกับแผ่นฟิล์ม X-ray ใน cassette เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ทำการล้างฟิล์มและอ่านผลต่อไป

12. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR โดย Southern blot hybridization ด้วย ECL-3-oligolabelling และ detection system

ภายหลังจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดย agarose gel electrophoresis ย้าย gel นี้สู่ภาชนะที่มี 0.25N HCl พกท่วม gel นาน 15 นาที เพื่อเป็นการทำให้ DNA เป็นสายสั้นลง เทสารละลายกรดนี้ ออก ล้าง gel ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เติม 0.5 N NaOH พกท่วม gel นาน 30 นาที เพื่อเป็นการทำให้ DNA แยกเป็นสายเดี่ยว เทสารละลายนี้ออกเติม 10XSSC ลงไปให้ท่วม gel นาน 5 นาที

12.1 การขนถ่าย DNA

นำไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) และกระดาษกรองขนาดเท่าแผ่นเจลจุ่มในน้ำ ให้เปียกแล้วแช่ใน 10XSSC จัดอุปกรณ์การขนถ่ายโดยวางแผ่นกระดาษกรอง 2 แผ่น ลงไปตรงกลางของแผ่นพลาสติกที่ช่องตรงกลาง (window gasket) วางแผ่นไนลอนเมมเบรนทับบนกระดาษกรอง ซึ่งอยู่ในตำแหน่งช่องตรงกลางของแผ่นพลาสติก นำแผ่น gel วางทับบนแผ่น nylon membrane เติม 10XSSC พกท่วม gel เปิดเครื่องดูดสุญญากาศค่อย ๆ หมุนให้ความดันเท่ากับ 5 นิ้วของปรอท เมื่อครบ 90 นาที ปิดเครื่องดูดสุญญากาศนำ nylon membrane ไปแช่ใน 2XSSC นาน 5 นาที ใช้ปากคีบจับแผ่น nylon membrane วางลงบนกระดาษกรอง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หุ้มแผ่น nylon membrane ด้วยแผ่นพลาสติกใส ทำให้ DNA เป็นสายสั้นลงและยึดติดแน่นกับแผ่น nylon membrane (cross linking) โดยผ่านแสงอุลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 nm นาน 2 นาที นำไปเก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อรอขึ้นคอนต่อไป (Sambrook et al., 1989)

12.2 การติดฉลากบน oligonucleotide โดยวิธี enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham)

เตรียม reaction mixture ที่มีส่วนประกอบดังนี้

น้ำกลั่นบริสุทธิ์	117	μl
oligonucleotide probe (100 pmole)	1	μl
10 X cacodylate buffer	16	μl
fluorescein-11-dUTP	10	μl
Terminal transferase	16	μl
ปริมาตรรวม	160	μl

ผสมให้เข้ากันนำไปอุ่นที่ 37 °C นาน 90 นาที เก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อรอ hybridize ต่อไป

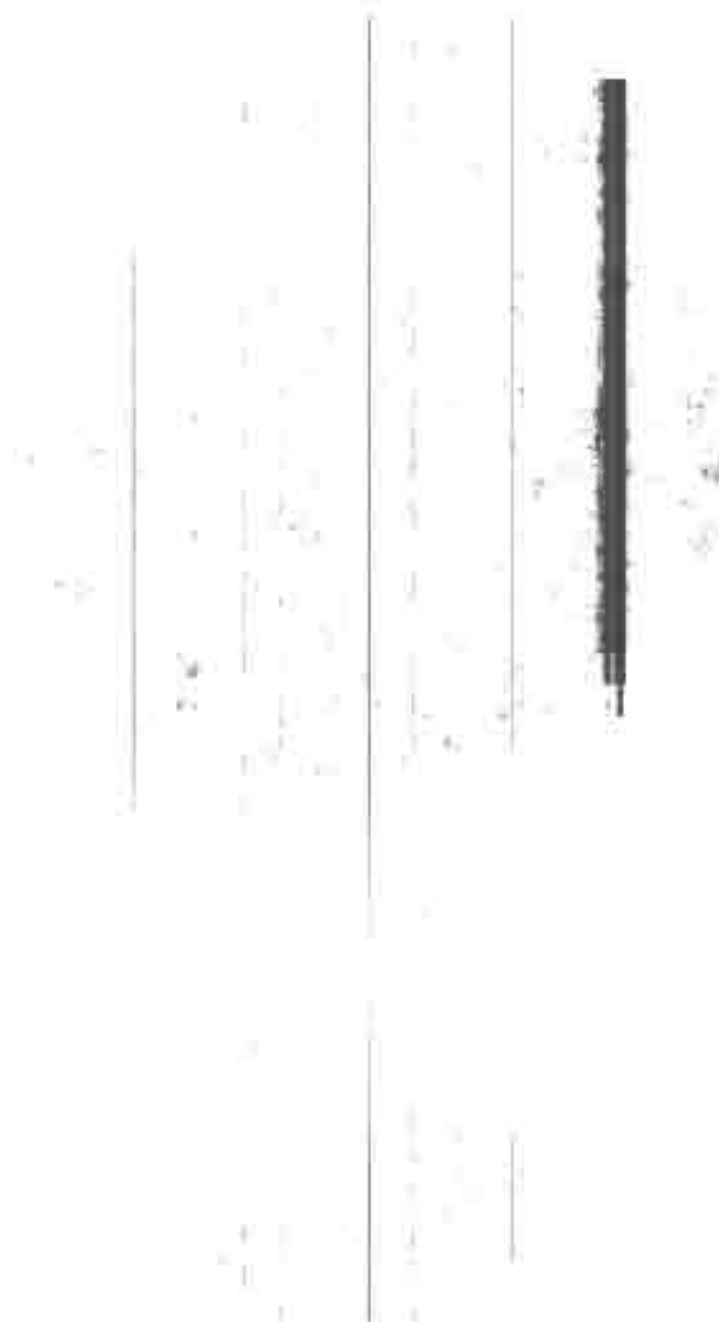
12.3 การทำ hybridization

เท hybridization buffer ซึ่งประกอบด้วย blocking agent ร้อยละ 0.5, hybridization buffer component ร้อยละ 0.1, 5XSSC และ SDS ร้อยละ 0.02 จำนวน 20 ml ลงในกล่องพลาสติกอุ่นที่อุณหภูมิ 50 °C ผสมให้เข้ากันโดยใช้ตู้เขย่า วางแผ่น nylon membrane ลงไปเปิดให้เครื่องทำงานต่อจนครบ 30 นาที เติม oligonucleotide probe ที่ติดฉลากแล้วลงไปในสารละลาย โดยให้ความเข้มข้น 5 ถึง 10 ng/ml เขย่าต่อจนครบ 1 ชั่วโมงในตู้เขย่า หลังจากนั้นล้างแผ่น nylon membrane ด้วยสารละลาย ซึ่งประกอบด้วย 5 X SSC และ SDS ร้อยละ 1 นาน 5 นาที 2 ครั้ง ล้างต่อด้วย buffer 1 ซึ่งประกอบด้วย 0.15 M NaCl และ 0.1 M Tris, pH 7.5 เป็นเวลา 1 นาที และ blocking solution ประกอบด้วย blocking agent ร้อยละ 0.5 ในสารละลาย buffer 1 เขย่าต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างด้วย buffer 1 อีกครั้งประมาณ 1 นาที แล้วจึงนำแผ่น nylon membrane ไปใส่ในสารละลาย antibody-conjugate ที่เจือจางซึ่งมีส่วนประกอบคือ antifluorescein HRP conjugate 1 ส่วน ใน 1,000 ส่วนของ bovine serum albumin (fraction V) ใน buffer 2 ซึ่งประกอบด้วย 0.4 M NaCl และ 0.1 M

Tris, pH 7.5 เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วล้างแผ่น nylon membrane ด้วย buffer 2 นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จนครบ 4 ครั้ง

12.4 การตรวจสอบสัญญาณ (detection)

ผสมสารละลาย detection 1 และสารละลาย detection 2 ในสัดส่วน เท่า ๆ กันโดยใช้ปริมาตร 0.1 ml/cm³ ของแผ่น nylon membrane ในกล่องพลาสติก นำ nylon membrane จาก buffer 2 วางลงไป ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที หุ้มแผ่น membrane ด้วยแผ่นพลาสติกใส แล้ววางใน X-ray cassette โดยให้ด้านที่มี DNA อยู่ด้านบน ประกบด้วยแผ่นฟิล์ม X-ray ในที่มืด นาน 5 นาที ล้างแผ่นฟิล์มด้วยน้ำยา developer และ fixer ตามลำดับ ล้างแผ่นฟิล์มด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป



ผลการทดลอง

(1) การศึกษา MSP1 gene

ในการศึกษาก่อนหน้านี้โดยหาลำดับเบสของ MSP1 gene ในส่วน 5' ซึ่งครอบคลุม block 1 ถึง block 3 ความยาวประมาณ 900-950 bp ใน *P. falciparum* isolates จาก อ.แม่สอด จ.ตาก ซึ่งเก็บรวบรวมในปี ค.ศ. 1988-1989 จำนวน 19 isolates และจากการศึกษา DNA-based typing โดย Southern blot hybridization (Jongwutiwes et al., 1991; Jongwutiwes et al., 1992) เปรียบเทียบกับ การใช้ monoclonal antibodies ต่อ MSP1 เพื่อศึกษา serotyping โดย Dr. Jana S. McBride, ICAPB, University of Edinburgh พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน ยกเว้น block 4 ซึ่งมีผลขัดแย้งกันถึง 10 subclones คือ 807, 815, 834A, 835A, 835B, 836, 837, 841C, 842 และ 843 ดูตารางที่ 1 ทั้งนี้ MSP1 gene ในส่วนต่าง ๆ ของ gene ทำที่ศึกษานั้นพบว่ามีลักษณะของ allelic dimorphism กล่าวคือการแทนที่ของ nucleotide ในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งมีเพียง 2 รูปแบบ (ชนิด) เท่านั้น ยกเว้นบริเวณ block 2 ซึ่งมี tripeptide repeats 3 รูปแบบคือ MAD20 type, K1 type สำหรับ RO33 type แม้จะไม่พบ tripeptide repeats ชัดเจน แต่มีลักษณะของ nucleotide repeats ปรากฏอยู่

ดังนั้นเพื่อหาข้อสรุปจากผลการศึกษาดังกล่าวที่ไม่สอดคล้องกัน จึงทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของ MSP1 gene ในส่วน 5' ของ isolates เดิม โดย PCR ซึ่งครอบคลุมตั้งแต่ block 1 ถึง block 5 ใช้ primers P1 และ P2 ภายหลังจาก ligate กับ pUC118/119 แล้วทำการ transform ใน *E. coli* strain XL-blue เพื่อเตรียมเป็น template สำหรับ DNA sequencing ต่อไป สาเหตุที่ต้องใช้วิธีนี้เนื่องจากการทำ direct PCR sequencing ไม่สามารถใช้แยก clonal mixture ในแต่ละ isolate ได้

ผลการหาลำดับเบสในส่วน block 3 และ block 4 แสดงในรูปที่ 5 และ 6 ตามลำดับ เนื่องจากลำดับเบสใน block 1 และ 2 พบว่าเหมือนเดิมกับที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (Jongwutiwes S. et al., 1992) ดังนั้นรูปที่ 1 จึงแสดงเพียง dimorphic nucleotide substitutions และ linkage of nucleotide substitutions เท่านั้น พบว่ามีการแทนที่ของ nucleotide ใน block 3 ทั้งสิ้น 39 ตำแหน่ง ทุกตำแหน่งเป็น dimorphic นอกจากนี้จากการพิจารณา dimorphic nucleotide substitutions และ nucleotide linkage พบว่าใน block 3 มี potential cross-over site ทั้งสิ้น 10 ตำแหน่ง สำหรับการแทนที่ของ nucleotide แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (nonsynonymous substitution) พบ 25 ตำแหน่ง (64.1 %) และ การแทนที่ที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง (synonymous substitution) 14 ตำแหน่ง (35.9%) ในการทดลองเพื่อศึกษา genetic cross ระหว่างอัลลีลที่ต่างกัน ในอีน MSP1 พบว่า recombination เกิดขึ้นจริงใน block 3 และ ตรงกับตำแหน่งที่ได้ตั้งข้อสังเกตไว้ (Kerr et al., 1994)

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษา MSP1 โดย DNA typing เปรียบเทียบกับ monoclonal antibody typing โดยวิธี indirect immunofluorescent antibody test (IFAT)

Parasite	Content	BLOCK SROTYPE ^a					DNA TYPES ^a						
		2	3	4	5-16	17	2	3	4-5	4-7	6	8	16
MAD 10	ad	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD ^{10A}	I	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD
B15	ad	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD ^{12B}	VRO33	K1	MAD	MAD	MAD	MAD
B35A	-46%	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD ^{10C}	VI	K1	MAD	MAD	MAD	MAD
B35C	-34%	MAD	MAD	MAD	MAD	K1							
T9-101	ad	MAD	MAD	K1	MAD	MAD			MAD	K1			
B22A	-30%	MAD	MAD	K1	MAD	MAD	MAD ^{10A}	III	MAD	K1	MAD	MAD	MAD
B34A	<5%		MAD	K1	MAD		MAD ^{11A}	VRO33	MAD		MAD	MAD	MAD
B35B	-20%	MAD	MAD	K1	MAD	MAD	MAD ^{12B}		MAD	K1	MAD	MAD	MAD
B07	ad	MAD	MAD	K1	MAD	K1	MAD ^{12B}	VRO33	MAD	K1	MAD	MAD	MAD
B36	ad	MAD	MAD	K1	MAD	K1	MAD ^{12B}	VRO33	MAD	K1	MAD	MAD	MAD
B42	ad	MAD	MAD	K1	MAD	MAD	MAD ^{10C}	VI	MAD	K1	MAD	MAD	MAD
B43	ad	MAD	MAD	K1	MAD	MAD	MAD ⁵	VI	MAD	K1	MAD	MAD	MAD
R033	ad	R033	MAD	R033	MAD	K1	R033	VRO33	MAD	R033	MAD	MAD	
B14B	-3%	R033	MAD	MAD	MAD	MAD	R033	VI					
B38	ad	R033	MAD	MAD	MAD	MAD	R033	VI	K1	MAD	MAD	MAD	MAD
B41C	-75%	R033	MAD	K1	MAD	MAD	R033	H8707	MAD	K1	MAD	MAD	MAD
CAMP	ad	[3D7] CAMP	K1	K1	MAD	MAD	CAMP ¹⁹	IV	CAMP	K1	K1	MAD	MAD
Palo Alto	ad	[3D7] CAMP	K1	K1	MAD	MAD	CAMP ¹⁹	IV	CAMP	K1	K1	MAD	MAD
T9-102	ad	[3D7] CAMP	T9-102	MAD	MAD	MAD							
B14A	-97%	[3D7] CAMP	T9-102	MAD	MAD	MAD	CAMP ¹⁹	IV	CAMP	MAD	MAD	MAD	MAD
B41A&B	-25%	[3D7] CAMP	T9-102	MAD	MAD	MAD	CAMP ¹⁹	??	MAD	MAD	??	??	??
946	ad	[3D7] CAMP	T9-102	MAD	MAD	MAD	CAMP ¹⁹	IV	CAMP	MAD	MAD	MAD	MAD
B06B	-2%	[3D7] CAMP		MAD	MAD								
T9-96	ad	3D7	K1	MAD	MAD	MAD	ad		MAD	MAD			
NF7	ad	3D7	K1	MAD	MAD	MAD	3D7 ¹¹	IV	CAMP	MAD		MAD	MAD
3D7	ad	3D7	K1	K1	MAD	MAD	3D7 ¹⁷		K1		MAD	MAD	MAD
K1	ad	[3D7] CAMP	K1	K1	K1	K1	CAMP ⁷	II	K1A	K1	K1	K1	K1
B34B	-95%	[3D7] CAMP	K1	K1	K1	K1	CAMP ⁷	II	K1A	K1	K1	K1	K1
B44	ad	[3D7] CAMP	K1	K1	K1	MAD	CAMP ⁴	II	K1A	K1	K1	K1	K1
Wellcome	ad	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
T9-94	ad	MAD	K1	K1	K1	K1							K1
HB3	ad	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
B06A	-98%	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
B08	ad	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
B22B	-70%	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
B27	ad	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
B37	ad	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
B38	ad	MAD	K1	K1	K1	MAD	MAD ^{12C}	II	K1B	K1	K1	K1	K1

a. Block 2 of the field isolates determined by complete DNA sequencing (Jongwutiwes *et al.* 1992); blocks 6, 8 & 16 with DNA probes (Jongwutiwes *et al.* 1991). For sequences in blocks 3-4 of the field isolates see Table 3.

DNA types of reference parasites based on publications: Wellcome (Holder *et al.* 1985), Camp (Weber *et al.* 1986, 1988), MAD20 & K1 (Tanabe *et al.* 1987), R033 (Certa *et al.* 1987), Palo Alto (Chang *et al.* 1988), NF7, 3D7, & HB3 (Peterson *et al.* 1988; Renford-Cartwright *et al.* 1991), T9-96 & T9-101 (Conway *et al.* 1991), T9-94 (Blackman *et al.* 1991). Left open where typing information is not available.

รูปที่ 5

การแทนที่ของ nucleotide ใน block 3 ของยีน MSP1 และเปรียบเทียบกับอัลลล์
ใน block 6 ถึง block 16

SEQUENCE OF BLOCK III
NUCLEOTIDE LINEAGES AND POTENTIAL CROSSOVER SITES

	MAD-SPECIFIC										MAD-SPECIFIC																										
	510	517	520	526	546	552	554	567	573	582	609	621	629	631	633	637	639	709	725	729	746	750	751	783	894	903	919	949	969	977	1006	1013	1033	1101	1105		
MAD-I	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	A	C-T-CG-C	xxx	G-A-C-A-A-G-G	xxx	S	R	V	D	Y	A	S	I	T	A	G	Q	B	M	C	C-C-G-C-GA-T-G	xxx	A	xxx	T	xxx	C	xxx	A-A	
MAD-II	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
MAD-III	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
MAD-IV	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
MAD-V	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
MAD-VI	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
MAD-VII	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
MAD-VIII	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
MAD-IX	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
MAD-X	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
MAD-Y	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
EL-I	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
EL-II	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T
EL-III	T	xxx	A	xxx	T	T-T	xxx	Q	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T	xxx	T-T

EL-SPECIFIC

EL-SPECIFIC

EL-I = EL, 834B, 844
EL-II = WELLCOME, 805, 806, 822B, 827, 837
EL-III = 828

MAD-I = MAD20, FC27
MAD-II = 822A
MAD-III = 814B, 835A, 838, 842, 843
MAD-IV = 807, 815, 834A, 836, 947
MAD-V = 803
MAD-VI = 841C
MAD-VII = 841B
MAD-VIII = 814A, 841A/B, 946
MAD-IX = 8071
MAD-X = CAMP, PALO ALTO/FUP

--- = nucleotide linkage

xxx = potential crossover site

* Positions for sts and amino acid after scheme I of Tanabe et al are shown above and beneath the alignments, respectively.

รูปที่ 6 ลำดับเบสของยีน MSP1 ในบริเวณ block 4

A Nucleotide Sequence

MAD20 GAAGATATAGATAAAATTAAACAGATGCGGAAACCCCACTACTGGAAGTAAACCAATCTCTCCCTGAGAATAAGAAAAAAGAAGTCGAAGGA
 K1 ..TG.G...A..G.....---..C..CC.CCGG...A.T.....A..C.....A.....T..T..G..C.....--A.....A.
 IA.T.....
 II ..TG.G...A..G.....---..C..CC.CCGG...A.T.....A..C.....A.....T..T..G..C.....--A.....A.
 III ..TG.G...A..G.....---..C..CC.CCGG...A.T.....A..C.....
 IVaA.T.....A.....T..T..G..C.....--A.....A.
 IVbA.....A.....T..T..G..C.....--A.....A.

I = isolates 814, 841C, 946

II = isolates 806, 808, 822, 827, 828, 834B, 837, 844

III = isolates 815, 835B, 838

IVa = isolates 807, 836, 835A, 842, 947

IVb = isolates 841B, 843

B Amino Acid Sequence

Type	Thai clones and known Isolates	Sequence
K1/K1	K1 Thai-806, 808, 822B, 827, 828, 837, 844	344* ← (Block 4A) → ← (Block 4P) → 378 EILDNINEIK-NPPFANSHTPTLLDNKK-IEE
K1/MAD20	Thai-815, 835B, 838	K·DK·NE··-NPPFANS·WT·P·PENK·EV·G
MAD20/K1	RO71	K·ED·DK·TDAEKPTTESK·T·LDN··-I·E
	Gambia, T9/101, Thai-807, 836B, 835A, 836, 841A, 841B, 842, 947	K·ED·DK·TDAEKPTT·SK·T·LDN··-I·E
	Thai-814C, 942	K·ED·DK·TDAEKLT·SK·T·LDN··-I·E
MAD20/MAD20	MAD20	K·ED·DK·TDAEKPTT·SK·P·PENK·EV·G
	Thai-814A, 841D, 948	K·ED·DK·TDAEKLT·SK·P·PENK·EV·G
RO33	RO33	K·ED·DK·IDAEPPT··-VNCILSLRLEKER

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการแทนที่ของ nucleotide ใน block 3 เปรียบเทียบกับ block อื่น ๆ ซึ่งจากการศึกษาโดยใช้ isolates ดังกล่าวจาก serotyping, Southern blot hybridization (Jongwutiwes et al., 1990) และการหาลำดับเบสตั้งแต่ block 13 ถึง block 17 จนสุด 3' noncoding region (Jongwutiwes et al., 1993) พบว่าไม่มี recombination ระหว่างอัลลีลต้นแบบ (K1 และ MAD20) ของ gene ใน block 6 ถึง 16 ยกเว้นการพบ sequence microheterogeneity และ potential cross-over ภายในอัลลีลต้นแบบเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบการแทนที่ของ nucleotide ใน block 3 กับอัลลีลของ block 6-block 16 พบว่า nucleotide linkage ตำแหน่ง 567, 573, 591, 592 และ 609 ซึ่งเป็น C-T-CG-C จะมีความสัมพันธ์กับ MAD20 type ใน block 6-block 16 และ A-C-TC-T สัมพันธ์กับ K1 type ใน block 6-block 16 เช่นกัน นอกจากนี้ nucleotide linkage C-C-G-C-GA-T-G ในตำแหน่ง 894, 903, 919, 949, 964, 965, 969 และ 977 ตามลำดับมีความสัมพันธ์กับ MAD20 type ใน block 6-block 16 และในตำแหน่งเดียวกันนี้พบว่า nucleotide linkage A-A-A-A-AC-A-A สัมพันธ์กับ K1 type ใน block 6-block 16 เช่นกัน

ลำดับเบสของ block 4 แสดงในรูปที่ 6 นั้นอธิบายได้ว่าสาเหตุที่ทำให้เกิดผลขัดแย้งระหว่าง serotyping และ DNA-based method เนื่องจาก monoclonal antibodies ต่อ block 4 recognize sequence ในส่วน 3' ในขณะที่ oligonucleotide probe recognize sequence ในส่วน 5' ซึ่งพบว่าบริเวณตอนกลางของ block 4 มี recombination site ระหว่างอัลลีล MAD20 และ อัลลีล K1 ทำให้ block 4 มี 5 แบบคือ (1) 5'-MAD20/K1-3' (2) 5'-K1/MAD20-3' (3) 5'-K1/K1-3' (4) 5'-MAD20/MAD20-3' และ (5) RO33 type ซึ่งมี frameshift mutation แต่ยังไม่เคยมีการพบ sequence ดังกล่าวใน isolate หรือ clone อื่น ๆ อีกเลย อย่างไรก็ตามบริเวณที่น่าจะเป็น hot spot สำหรับ recombination เป็น conserved sequence ประกอบด้วย nucleotide 7 ตัวคือ 5'-ACCAAAT-3' ตำแหน่ง 1167-1173 ของ MAD20 sequence

ในการศึกษาอุบัติการณ์ของ allelic recombination ใน block 4 จาก isolate ในธรรมชาติ ได้ศึกษาร่วมกับ Prof. Dr. Tanabe และ Dr. Kaneko ที่ Laboratory of Biology, Osaka Institute of Technology โดยดัดแปลงเทคนิค nested PCR โดยใช้ primers จาก block 3 คือ MSP237F.B3: 5'-TTCGTGCAAATGAATTAGACGTAC-3' และจาก block 5 คือ MSP395R.B5: 5'-GGATCA GTAAATAAACTATCAATGT-3' ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณของ MSP1 gene ได้ทุกอัลลีล โดย PCR reaction ทำในปริมาตร 25 μ l ใช้ primer อย่างละ 0.8 μ M, 200 μ M dNTP, 0.3 unit Vent DNA polymerase (New England Biolabs, UK), 10 X Vent buffer 2.5 μ l และ DNA template 10 μ l PCR condition ประกอบด้วย 91 °C 30 วินาที 50 °C 40 วินาที และ 70 °C 40 วินาที ทำทั้งหมด 40 รอบ หลังจากนั้นให้ผลิตผล PCR ในรอบแรก 1 μ l เป็น template สำหรับ PCR รอบหลังซึ่งแบ่งเป็น 4 reactions ประกอบด้วย primers ดังนี้ 5'-MAD20-specific (MAD356F.B4A: 5'-TTGAA GATATAGATAAAATTAAAACAGATG-3') 5' K1-specific

(K1-359F.B4A: 5'-AATGAAATTAAAAATCCCCCACC GG-3') 3'-MAD20-specific (MAD377R.B4P: 5'-TCGACTTCTTTTTTCTTATTCTCAG-3') และ 3'-K1-specific (K1-378R.B4P: 5'-TCCTCGATTTTTTTGTTCTTATCAAG-3') โดยใช้ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากผู้ป่วยในหมู่เกาะโซโลมอน จำนวน 23 isolate พบว่า 15 isolates พบ MSP1 อัลลีลใน block 4 เพียงอัลลีลเดียว และ 8 isolates พบมากกว่า 1 อัลลีลในแต่ละ isolate โดยพบ 2 อัลลีลใน 2 isolates, 3 อัลลีล ใน 5 isolates และ 4 อัลลีลใน 1 isolate ทั้งนี้พบ 5'-MAD20/MAD20-3' มากที่สุดถึง 17 clones ส่วน 5'-K1/K1-3' พบรองลงมาคือ 11 clones สำหรับ recombinant type พบ 5'-K1/MAD20-3' จำนวน 6 clones และ 5'-MAD20/K1-3' เพียง 4 clones ส่วน RO33 นั้นไม่พบเลย เมื่อเปรียบเทียบกับ การกระจายของอัลลีล จากการศึกษาดำรงตัวอย่างในประเทศไทยโดยวิธี DNA sequencing ดังกล่าวพบ ว่าในจำนวน 23 clones ที่พบนั้นมี recombinant type คือ 5'-MAD20/K1-3' มากที่สุดคือ 10 clones 5'-K1/K1-3' พบ 7 clones ส่วน 5'-K1/MAD20-3' และ 5'-MAD20/MAD20-3' พบเท่ากัน คืออย่างละ 3 clones

ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบ MSP1 alleles โดยรวมอย่างรวดเร็วโดยวิธี PCR-RFLP นั้น ขั้นแรกได้ใช้ isolates ที่เคยตรวจสอบและทราบ alleles มาก่อนจำนวน 16 isolates ได้แก่ isolates 806, 807, 815, 822, 827, 834, 836, 837, 838, 841, 842, 843, 946, 947, K1 และ T9/94 และ isolates หรือ clones ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อมาก่อนแต่ยังไม่ทราบอัลลีล อีก 14 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อจาก ศ.สศศิริ ไทยทอง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวม 30 ตัวอย่างเพื่อทดสอบความถูกต้องของเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้น

จากการใช้ PCR primers เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ใน block ต่าง ๆ ของ MSP1 gene พบว่า เมื่อใช้ primers P1 และ P2 (block 1-block 5) จะให้ผลผลิต PCR ความยาว ประมาณ 1,000-1,100 bp เมื่อใช้ PCR primers P3 และ P4 (block 5-block 13) พบว่าผลผลิต PCR มีขนาดแตกต่างกันเพียง 2 ขนาดคือ มีความยาวประมาณ 2,250 bp และ 2,350 bp ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ PCR primers P5 และ P6 (block 12-block 17) ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน 2 ขนาดคือประมาณ 1,650 bp และ 1,750 bp เมื่อใช้ oligonucleotide probes ที่มีความจำเพาะต่อแต่ละอัลลีล ตรวจสอบโดย Southern blot hybridization พบว่าผลผลิต PCR ขนาด 2,250 bp จาก block 5- block 13 และ 1,650 bp จาก block 12-17 มีความจำเพาะต่ออัลลีล K1 และพบว่าขนาดผลผลิต PCR จากทั้ง 2 ส่วนมีความสัมพันธ์กันเสมอ แสดงว่าไม่มี recombination ระหว่าง block เหล่านี้ ส่วนผลผลิต PCR ขนาด 2,350 bp และ 1,750 bp มีความจำเพาะต่ออัลลีล MAD20 และไม่พบ recombination ระหว่าง block ดังกล่าวเช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 7 จากการศึกษาดังกล่าวแสดงว่าสามารถเลือกใช้ PCR reaction อย่างใดอย่างหนึ่งเพื่อตรวจสอบอัลลีลของ block 6-16 ได้ นอกจากนี้ในกรณีที่ไม่น่าสนใจในเรื่องขนาดของผลผลิต PCR อาจใช้ enzyme *Dra* I ย่อยผลผลิต PCR จาก block 5- block 13 โดย K1 allele จะมีตำแหน่งตัด 4 ตำแหน่งใน block 6, 7, 9 และ 10 ทำให้ได้ fragment ขนาด 160, 423, 432,

รูปที่ 7 แสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของอิน MSP1 จาก block 5-block 13 เปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก Southern blot hybridization โดยใช้ allele-specific probes (MAD20 และ K1) และผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยการตัดด้วย *Dra* I

7A แสดงแถบดีเอ็นเอบน 1% อะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์จาก PCR ในช่วง block 5 ถึง block 13 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน *Lambda/HindIII* เรียงลำดับดังนี้

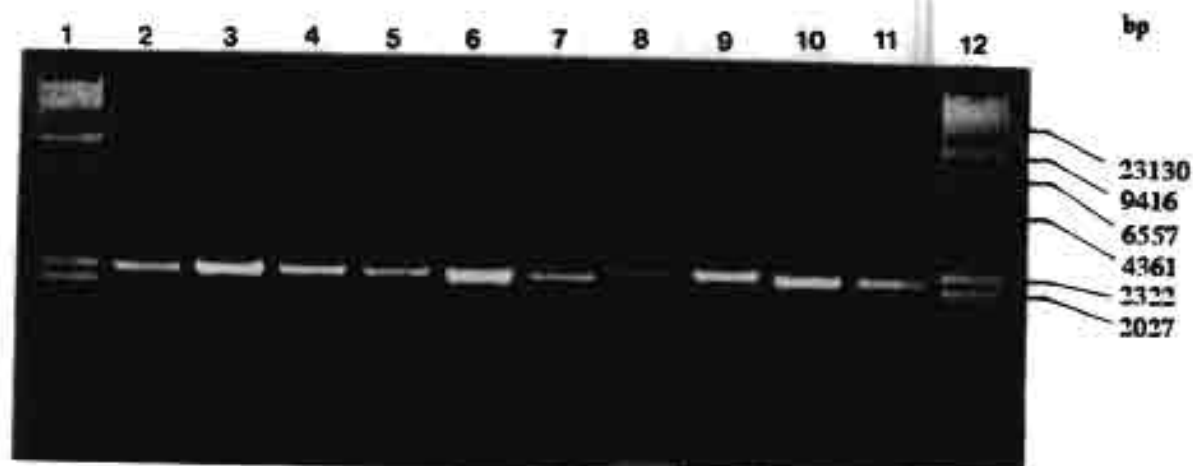
แถวที่ 1	<i>Lambda/HindIII</i>
แถวที่ 2	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 806
แถวที่ 3	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 807
แถวที่ 4	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 815
แถวที่ 5	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 822
แถวที่ 6	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 827
แถวที่ 7	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 834
แถวที่ 8	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 836
แถวที่ 9	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 837
แถวที่ 10	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 838
แถวที่ 11	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 841
แถวที่ 12	<i>Lambda/HindIII</i>

7B แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างใน 7A บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe K216

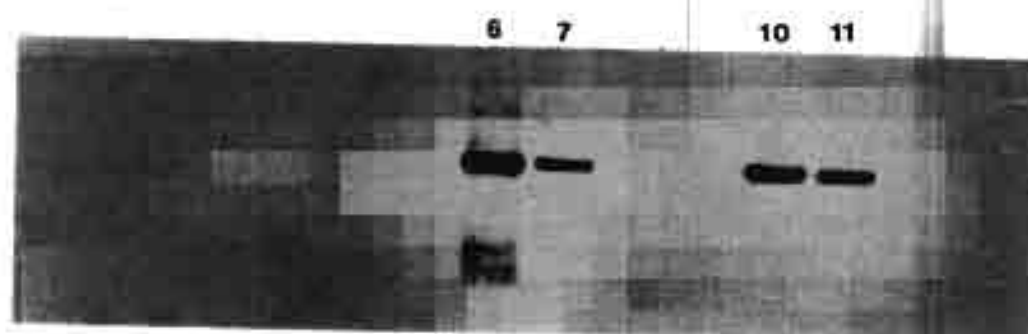
7C แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่าง 7B บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe M534

7D แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างใน 7C ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Dra* I บน 1% อะกาโรสเจล เทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน *Lambda/Hind III/Eco RI*

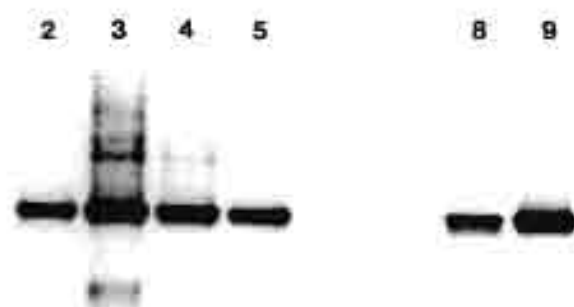
7A



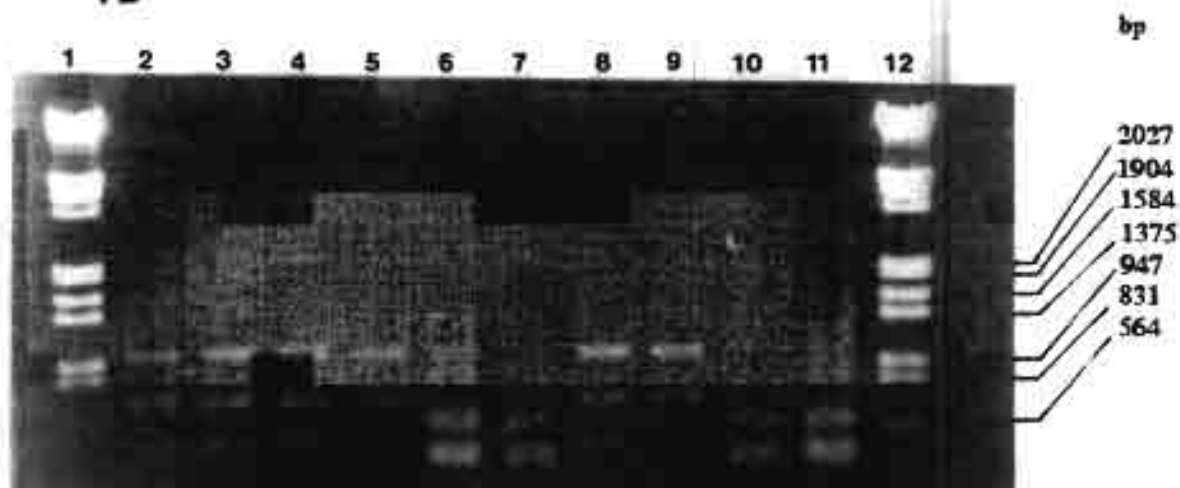
7B



7C



7D



583 และ 654 bp สำหรับ MAD20 allele จะมีตำแหน่งตัด 3 ตำแหน่งใน block 6, 7, และ 10 ได้ fragment ขนาด 119, 481, 710 และ 1047 bp ส่วนผลผลิต PCR จาก block 12- block 17 สามารถตรวจสอบยืนยันอีกครั้งด้วย enzyme *Hin* dIII โดย MAD20 allele มีตำแหน่งตัด 2 ตำแหน่งใน block 13 และ 15 ได้ fragment ขนาด 241, 379, และ 1121 bp ในขณะที่ K1 allele ไม่มีตำแหน่งตัดของ *Hin* dIII เลย ดังแสดงในรูปที่ 8

การวิเคราะห์รายละเอียด block 2 จากผลผลิต PCR block 1 ถึง block 5 พบว่าสามารถใช้ restriction endonucleases แยกความแตกต่างของอัลลีลได้ ซึ่ง K1 type มีตำแหน่งตัดของ *Afu* I ใน block 1 (nucleotides ที่ 99-102) และใน block 3 มีตำแหน่งตัด 2 ตำแหน่ง (nucleotides 315-318 และ 813-816) ดังนั้น K1 type จึงมีขนาด 51, 216, 299 และ 498 bp ซึ่ง fragment ขนาด 216 bp จะมีขนาดเปลี่ยนแปลงตามจำนวน repeats ใน block 2 สำหรับ MAD20 มีตำแหน่งตัดของ *Afu* I ใน block 1, 2 และ 3 อย่างละตำแหน่ง ทำให้ได้ fragment ขนาด 51, 81, 305 และ 642 bp ส่วน RO33 มีตำแหน่งตัดของ *Afu* I ใน block 1 และ 3 (nucleotides 435-438 และ 1,140-1,143) ทำให้ได้ fragment ขนาด 51, 299 และ 705 bp ในการวิเคราะห์ RO33 type พบว่ามีตำแหน่งตัดของ *Pst* I ใน block 2 เท่านั้น ทำให้ได้ fragment ขนาด 145 และ 906 bp โดยไม่พบตำแหน่งตัดของ *Pst* I ใน MAD20 type และ K1 type เลย การตรวจสอบดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจโดย Southern blot hybridization ด้วย allele-specific probe ของ block 2 ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 9

การวิเคราะห์รายละเอียด block 4 จากผลผลิต PCR พบว่าด้าน 5' ของ K1 type จะมีตำแหน่งตัดโดย *Hae* III ในตำแหน่งที่ 963-966 ทำให้ได้ fragment ของผลผลิต PCR จาก block 1- block 5 แยกออกเป็น 2 ขนาดคือ 149 และ 915 bp ส่วน MAD20 type ไม่พบตำแหน่งตัดด้วย enzyme ดังกล่าว ได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องกับวิธี Southern blot hybridization ด้วย allele-specific probes ใน block 4 พบว่าให้ผลสอดคล้องกันทุกประการ (รูปที่ 10 และรูปที่ 11)

ได้นำวิธีการ PCR-RFLP ตรวจสอบอัลลีลใน variable block 2 block 4 และ block 6 (ถึง block 16) จากตัวอย่างที่ได้จากอำเภอมะนัง จังหวัดตาก ในปี 1992 จำนวน 20 isolate และในปี 1995 จำนวน 50 isolates พบการกระจายของอัลลีลต่าง ๆ ดังตารางที่ 2 ซึ่งเปรียบเทียบอัลลีลที่พบ ในปี 1988-1989 จะเห็นว่า block 2 พบ MAD20 type มากกว่า K1 และ RO33 เสมอ โดย K1 type และ RO33 type อัตราการพบใกล้เคียงกัน ส่วน block 4 ในปี 1988-1989 และปี 1992 พบ K1 type และ MAD20 มากกว่า K1 ถึงร้อยละ 21.6 สำหรับ block 6-16 นั้น เชื่อที่ได้ในแต่ละปีจะพบ MAD20 type มากกว่า K1 type เสมอโดยในปี 1995 พบ MAD20 type มากกว่า K1 type ถึงร้อยละ 46 เมื่อคำนึงถึงอัตราการตรวจพบ mixed population ในแต่ละปีพบร้อยละ 26.3 ถึงร้อยละ 45 อย่างไรก็ตาม การที่เชื่อในปี 1988-1989 มี clonal mixture น้อยกว่าปีอื่น ๆ น่าจะเนื่องจาก isolates ดังกล่าวได้ผ่านการเพาะเลี้ยงในห้องทดลองมาก่อน

รูปที่ 8 แสดงตัวอย่างผลผลิต PCR ของยีน MSP1 จาก block 12 -block 17 เปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก Southern blot hybridization โดยใช้ allele-specific probes (MAA20 และ K1) และผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยการตัดด้วย *Hin* dIII

8A แสดงแถบดีเอ็นเอบน 1% อะกาโรสเจลของผลผลิตจาก PCR ในช่วง block 12 ถึง block 17 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda/*Hin* dIII/*Eco* RI เรียงลำดับดังนี้

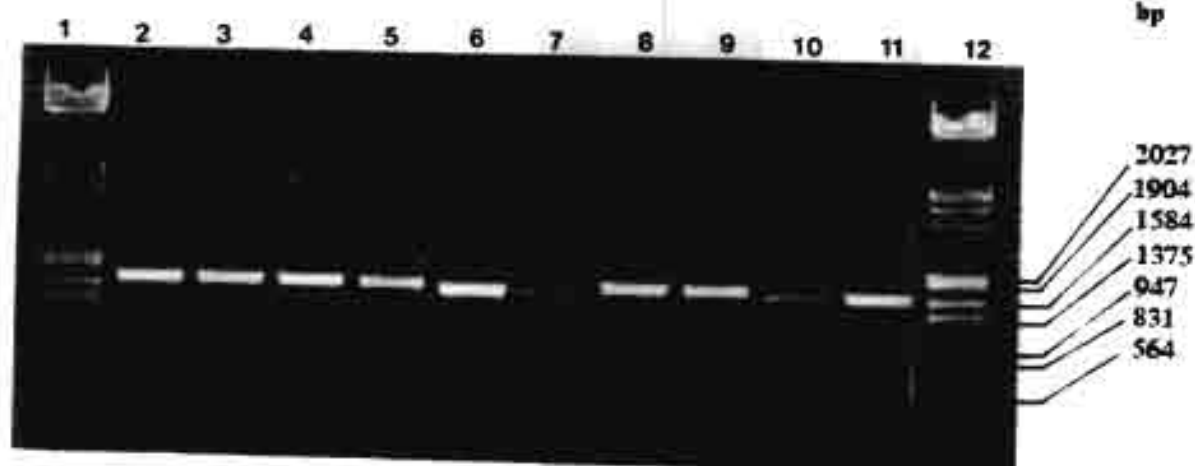
แถวที่ 1	Lambda/ <i>Hin</i> dIII/ <i>Eco</i> RI
แถวที่ 2	ผลผลิต PCR ของ 806
แถวที่ 3	ผลผลิต PCR ของ 807
แถวที่ 4	ผลผลิต PCR ของ 815
แถวที่ 5	ผลผลิต PCR ของ 822
แถวที่ 6	ผลผลิต PCR ของ 827
แถวที่ 7	ผลผลิต PCR ของ 834
แถวที่ 8	ผลผลิต PCR ของ 836
แถวที่ 9	ผลผลิต PCR ของ 837
แถวที่ 10	ผลผลิต PCR ของ 838
แถวที่ 11	ผลผลิต PCR ของ 841
แถวที่ 12	Lambda/ <i>Hin</i> dIII/ <i>Eco</i> RI

8 B แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างในรูป 8A บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe K16

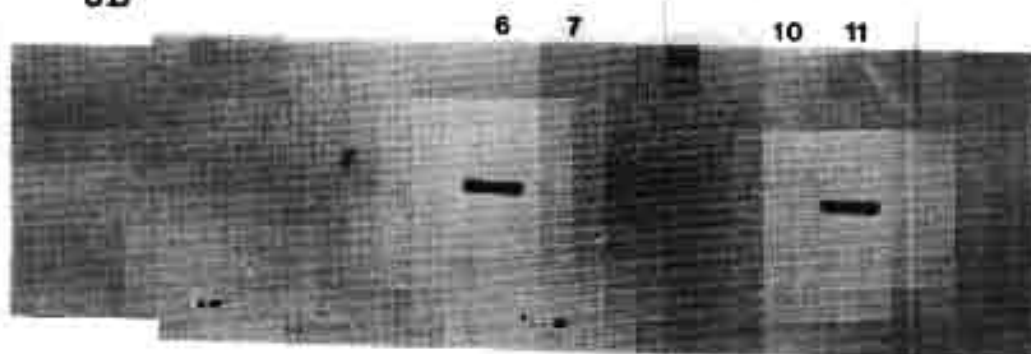
8C แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างในรูป 8A บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe M16

8D แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างในรูป 8A ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hin* dIII บน 1.7 % อะกาโรสเจล เทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda/ *Hin*dIII/*Eco*RI

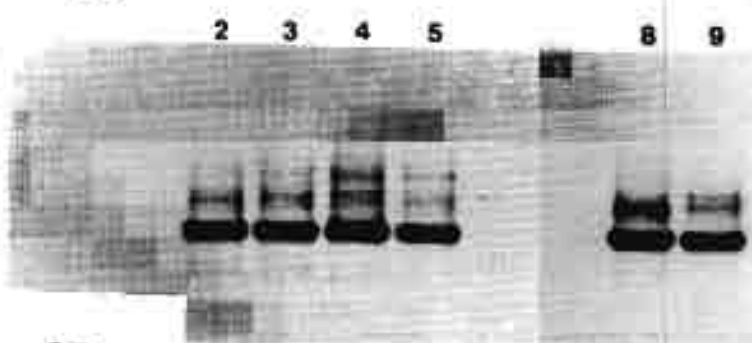
8A



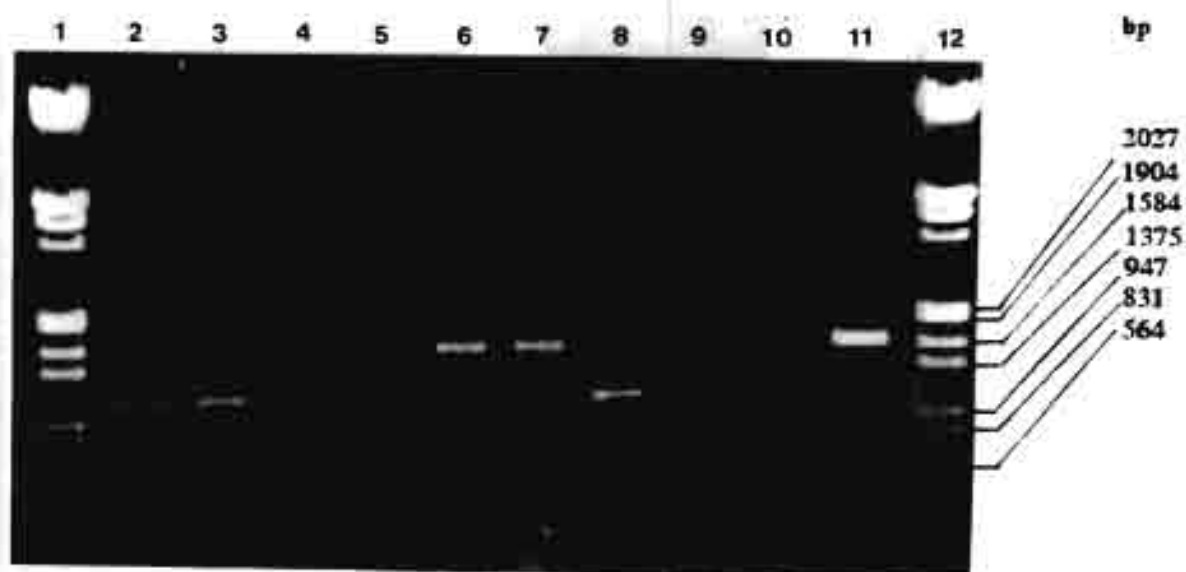
8B



8C



8D



รูปที่ 9

แสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน MSP1 จาก block 1- block 5 เปรียบเทียบผลที่ได้จาก Southern blot hybridization โดยใช้ allele-specific probes ใน block 2 (MAD20, K1 และ R033 และผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยการตัดด้วย *Alu* I หรือ *Pst* I

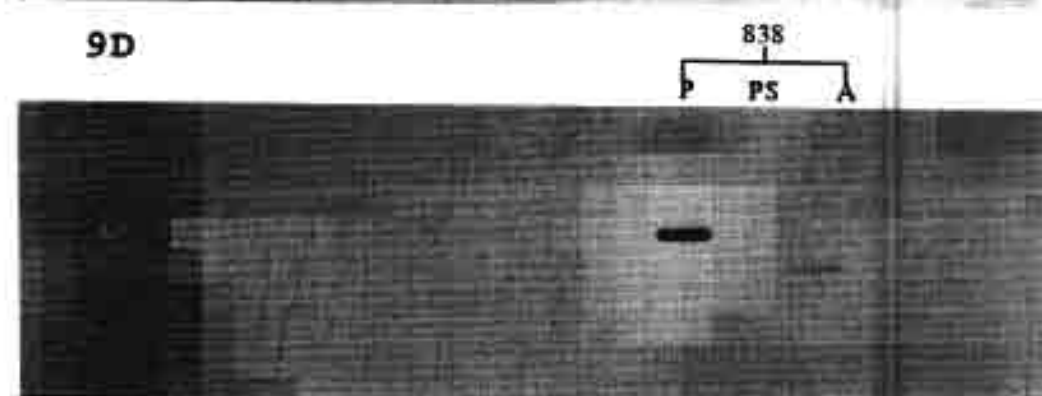
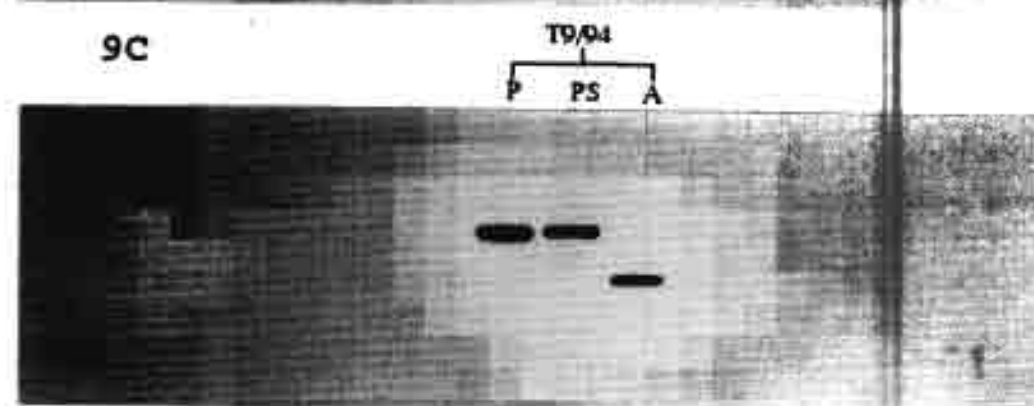
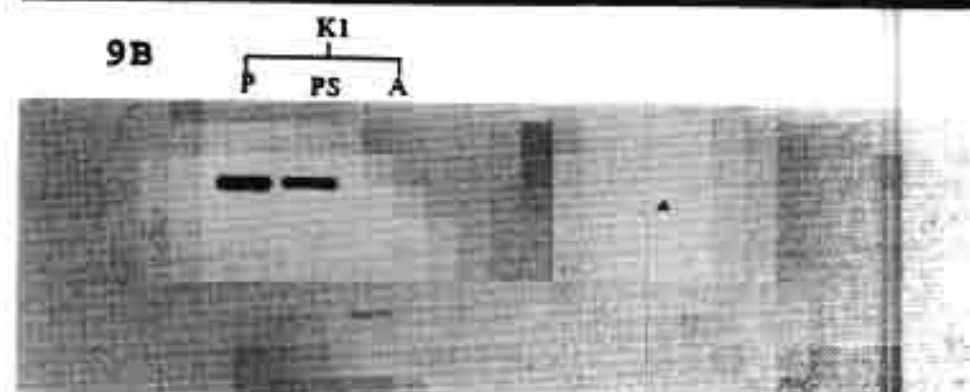
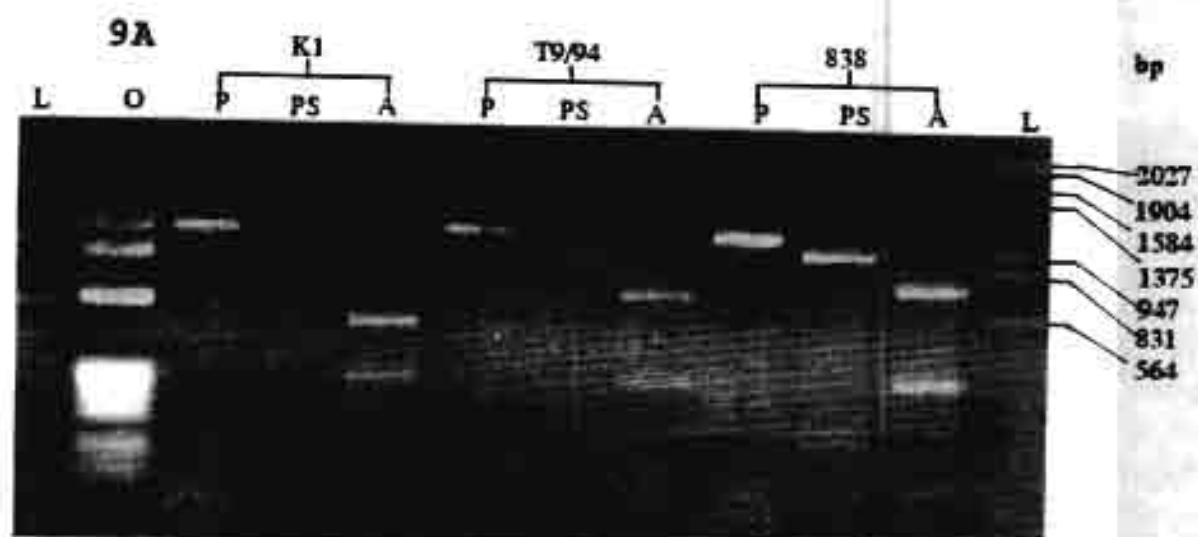
- 9A แสดงแถบดีเอ็นเอแบบ 1.7 % อะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์จาก PCR และแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Alu*I เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda/*Hin* dIII/*Eco* RI และ Φ X174/*Hae* III เรียงลำดับดังนี้

แถวที่ 1	Lambda/ <i>Hin</i> dIII/ <i>Eco</i> RI
แถวที่ 2	Φ X174/ <i>Hae</i> III
แถวที่ 3	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ K1
แถวที่ 4, 5	ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ตัดด้วย <i>Pst</i> I และ <i>Alu</i> I ของ K1
แถวที่ 6	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ T9/94
แถวที่ 7, 8	ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ตัดด้วย <i>Pst</i> I และ <i>Alu</i> I ของ T9/94
แถวที่ 9	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 838
แถวที่ 10, 11	ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ตัดด้วย <i>Pst</i> I และ <i>Alu</i> I ของ 838
แถวที่ 12	Lambda/ <i>Hin</i> dIII/ <i>Eco</i> RI

- 9B แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างใน 9A บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe K2

- 9C แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างใน 9A บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe M2

- 9D แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างใน 9A บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe R2



L = Lambda/*Hind*III/*Eco*RI
O = ØX174/*Hae*III

P = PCR
PS = PCR digested with *Pst*I
A = PCR digested with *Alu*I

รูปที่ 10

แสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้น MSP1 จาก block 1 - block 5 เปรียบเทียบผลที่ได้จาก Southern blot hybridization โดยใช้ allele-specific probes ใน block 4 ด้าน 5' (MAD20 และ K1) และผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยการตัดด้วย *Hae* III

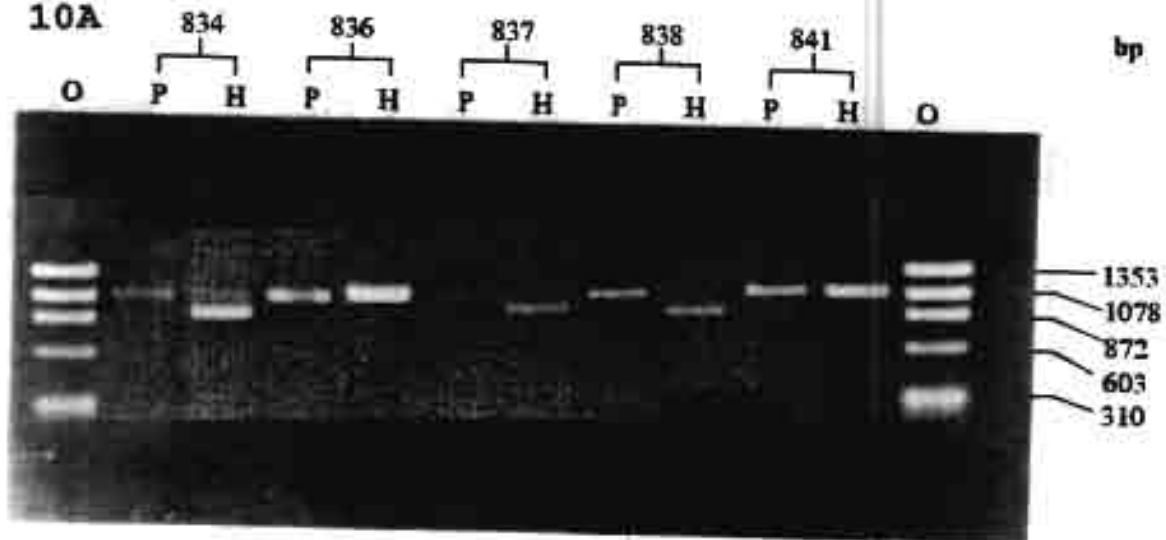
10A แสดงแถบดีเอ็นเอบน 1.7% อะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์ PCR และแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Φ X174/*Hae* III เรียงลำดับดังนี้

แถวที่ 1	Φ X174/ <i>Hae</i> III
แถวที่ 2	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 806
แถวที่ 3	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 806 ที่ตัดด้วย <i>Hae</i> III
แถวที่ 4	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 807
แถวที่ 5	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 807 ที่ตัดด้วย <i>Hae</i> III
แถวที่ 6	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 815
แถวที่ 7	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 815 ที่ตัดด้วย <i>Hae</i> III
แถวที่ 8	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 822
แถวที่ 9	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 822 ที่ตัดด้วย <i>Hae</i> III
แถวที่ 10	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 827
แถวที่ 11	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 827 ที่ตัดด้วย <i>Hae</i> III
แถวที่ 12	Φ X174/ <i>Hae</i> III

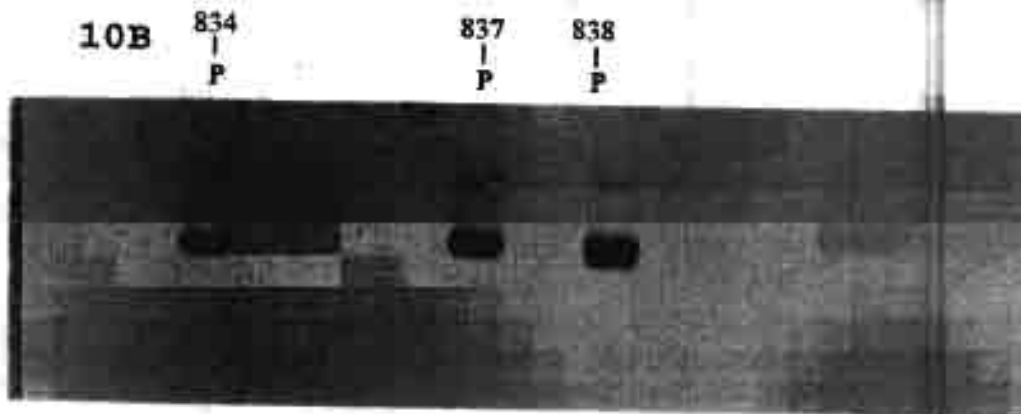
10B แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างในรูปที่ 20 บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe K4

10C แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างในรูปที่ 20 บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe M4

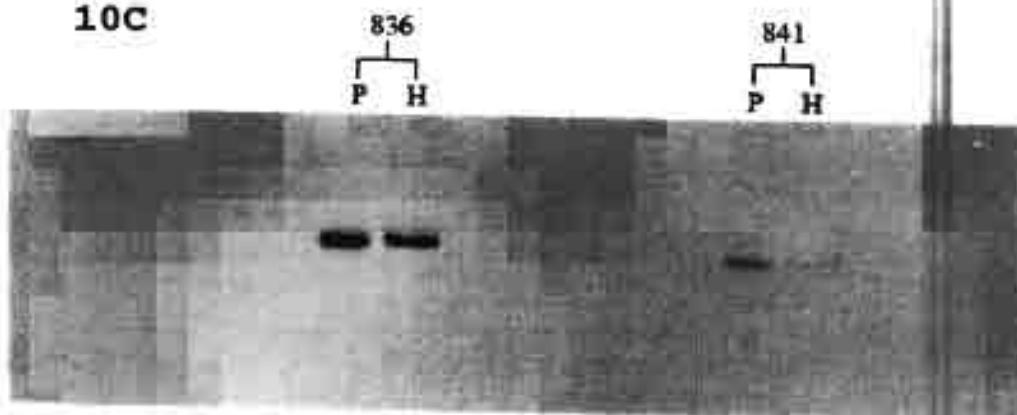
10A



10B



10C

O = ϕ X174/*Hae*III

P = PCR

H = PCR digested with *Hae*III

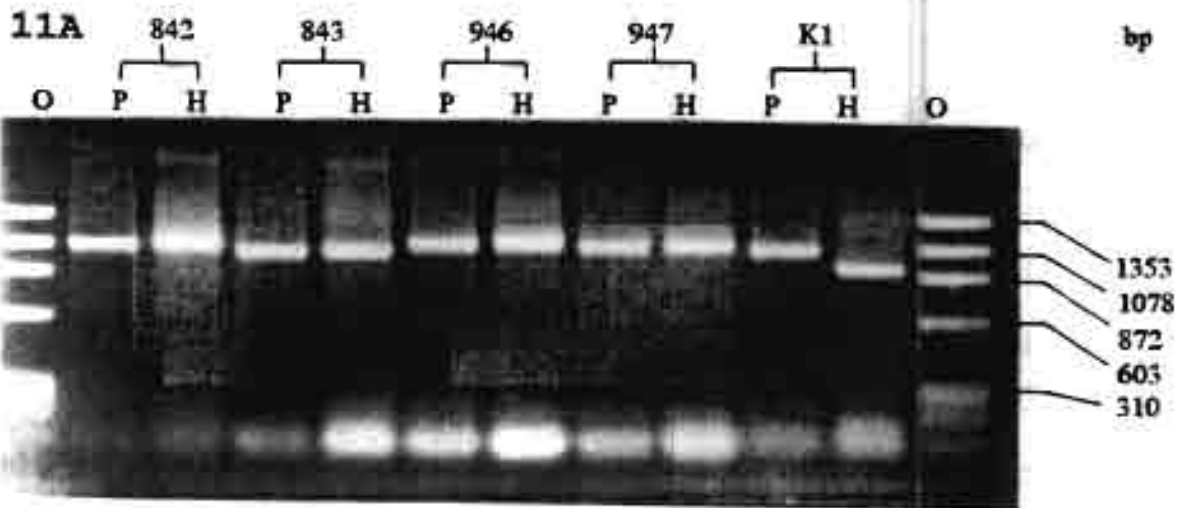
รูปที่ 11 แสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน MSP1 จาก block 1 - block 5 เปรียบเทียบผลที่ได้จาก Southern blot hybridization โดยใช้ allele-specific probes ใน block x 4 ด้าน 5' (MAD20 และ K1) และผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยการตัดด้วย *Hae* III

11A แสดงแถบดีเอ็นเอบน 1.7% อะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์จาก PCR และแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Φ X174/*Hae* III เรียงลำดับดังนี้

แถวที่ 1	Φ X174/ <i>Hae</i> III
แถวที่ 2	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 834
แถวที่ 3	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 834 ที่ตัดด้วย <i>Hae</i> III
แถวที่ 4	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 836
แถวที่ 5	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 836 ที่ตัดด้วย <i>Hae</i> III
แถวที่ 6	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 837
แถวที่ 7	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 837 ที่ตัดด้วย <i>Hae</i> III
แถวที่ 8	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 838
แถวที่ 9	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 838 ที่ตัดด้วย <i>Hae</i> III
แถวที่ 10	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 814
แถวที่ 11	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 814 ที่ตัดด้วย <i>Hae</i> III
แถวที่ 12	Φ X174/ <i>Hae</i> III

11B แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างในรูปที่ 21 บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe K4

11C แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างในรูปที่ 21 บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe M4



11B

K1
|
P



11C

842 843 946 947

P H P H P H P H



O = ØX174/*Hae*III

P = PCR

H = PCR digested with *Hae*III

ตารางที่ 2 แสดงการกระจายของ alleles ใน block 2 block 4 และ block 6-16 ของ MSP1 gene จากตัวอย่างที่ได้จากอำเภอมะนัง จังหวัดตาก ในปี ค.ศ. 1988-1989 ในปี ค.ศ. 1992 และในปี ค.ศ. 1995 ตัวเลขในตารางแสดงจำนวน clone ทั้งหมดที่พบในแต่ละ block

ปีเก็บ	1988-1989 (19 isolates)	1992 (20 isolates)	1995 (50 isolates)
Block 2*	25	35	72
K1	6 (24 %)	5 (14.3 %)	14 (19.4 %)
MAD20	16 (64 %)	25 (71.4 %)	47 (65.3 %)
RO33	3 (12 %)	5 (14.3 %)	11 (15.3 %)
Block 4 (5')*	23	33	74
K1	10 (43.5 %)	14 (42.4 %)	29 (39.2 %)
MAD20	13 (56.5 %)	19 (57.6 %)	45 (60.8 %)
Block 6-16*	20	33	74
K1	8 (40 %)	13 (39.4 %)	24 (32.4 %)
MAD20	12 (60 %)	20 (60.6 %)	50 (67.6 %)
จำนวน Isolate ที่พบ clonal mixture **	5 (26.3 %)	9 (45 %)	18 (36 %)

* ไม่พบความแตกต่างในการกระจายของแต่ละอัลลีลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** บาง isolates พบ clonal mixture มากกว่า 2 clones

(2) การศึกษา MSP2 gene

จากการหาลำดับเบสของ MSP2 gene โดยใช้ isolates ที่เคยศึกษา MSP1 gene มาก่อนจำนวน 19 isolates ได้แก่ isolates 806, 807, 808, 814, 815, 822, 827, 828, 834, 835, 836, 837, 838, 841, 843, 843, 844, 946, และ 947 ซึ่งเก็บรวบรวมจาก อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ในปี ค.ศ. 1988-1989 และ isolate OC, OD, DE, OF, OG, OH, OK, OL, OM, OP, OQ และ OR ที่เก็บรวบรวมในปี 1992 นอกจากนี้ได้ศึกษา isolates Jrbr, M12br, P6br P34br และ P62 br ซึ่งได้จาก Rondonia ประเทศบราซิล ในปี ค.ศ. 1995 รวมทั้งสิ้น 35 isolates พบว่า MSP2 gene สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 families เหมือนที่เคยมีผู้ทำการศึกษามาก่อนคือ FC27 families ประกอบด้วย isolates/clones 808B, 814, 834 A, 837, OE, OF-B, JRbr และ P62br สำหรับ 3D7/Camp families ประกอบด้วย isolates/clones ที่เหลือจำนวน (31 isolates/clones) โดยจำนวน nucleotide ตั้งแต่ start codon ถึง stop codon มีความแตกต่างกันตั้งแต่ 735 bp ใน isolates Jrbr และ P62br ถึง 990 bp ใน isolate OM

ในส่วน N-terminus ของ MSP2 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 43 ตัว หรือประกอบด้วย 126 nucleotides พบว่ามีความคงที่ทุกตำแหน่งในทุก isolates/clone ที่ศึกษา และในทำนองเดียวกัน ส่วน C-terminus ประกอบด้วยกรดอะมิโน 73 ตัวหรือ 219 nucleotides พบการแทนที่ของ nucleotides 6 ตำแหน่ง โดยทุกตำแหน่งทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไป (รูปที่ 12)

ในกลุ่ม FC27 นั้นลำดับเบสบริเวณ non-repeat dimorphic ในส่วน 5' คือ repeats มีการแทนที่ของ nucleotide ใน codon ที่ 48, 51, 52, 54 และ 59 และทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงทุกตำแหน่ง ในทางตรงข้ามไม่พบการแทนที่ของ nucleotide ในบริเวณ non-repeat dimorphic ส่วน 3' คือ repeats สำหรับบริเวณ variable repeats ส่วนกลางประกอบด้วย 32 codon repeats และ 12 codon repeats ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนพื้นฐานคือ ADTI(V)ASGSQSSTNSASTSTINNGESQTTTPA และ E(K) SNS P(R) SPPITTT โดยพบว่า isolates ที่ศึกษามี 32 codon repeats เพียงชุดเดียว ส่วน 12 codon repeats พบตั้งแต่ 2-5 repeat units (รูปที่ 13)

ในกลุ่ม 3D7/Camp บริเวณ non-repeat dimorphic ในส่วน 5' คือ repeats มีลำดับกรดอะมิโน A(T,E)E(V)SK(N)P(T)PT (รูปที่ 14) ถัดจากบริเวณดังกล่าวเป็น repeats ที่มีลำดับกรดอะมิโนพื้นฐาน แบ่งเป็น 8 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ (1) (GA)_nAVAGS ได้แก่ isolate 806, 807, 808A, 827, 828, 835, OH, OL, OG, OR และ M12 br (2) (GSGAGASGSA)_n ได้แก่ isolate 842, P6 br และ P34 br (3) GASGSAGSGAVA. ได้แก่ isolate 822, 834B, 946 และ 838 (4) (SGSAGSGA)_n ได้แก่ isolate OD และ OF-A (5) (GGSa)_n ได้แก่ isolate OC-A, OC-B และ OK (6) (GSRDGAVASA)_n ได้แก่ isolate 815, 836, 947 และ OM (รูปที่ 15) (7) (GGSGSA)_n ได้แก่ isolate 844 และ (8) (GASGSAGA)_n (GASGSA)_n ได้แก่ isolate 842 สำหรับบริเวณ

รูปที่ 12

ลำดับกรดอะมิโนของ MSP2 ในส่วน N- และ C-terminal regions

- หมายถึง กรดอะมิโนที่เหมือนกับ PC27 sequence

(A) N-Terminus (43 amino acids)

FC27	MKVIKTLIIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSTIRSM
3D7	-----
All	-----

(B) C-Terminus (73 amino acids)

FC27	ENKGTGQHGHHMHSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATSL
3D7	-----A-----
OP	-S-----
OQ	-----S-----
835	-----Y-----
807, 808A, 836,	-----P-----
M12br, P6br,	
P34br	
Other Thai	-----

FC27	LSNSSNIASINKFVVLISATLVSPAIFI
3D7	-N-----
OP	-N-----
OQ	-N-----
835	-N-----
807, 808B, 836,	-----
M12br, P6br,	
P34br	
Other Thai	-N-----

รูปที่ 13 ลำดับกรดอะมิโนใน MSP2 ของ FC27 family บริเวณ non-repeat dimorphic
 ด้าน N- และ C-terminal region
 - หมายถึง กรดอะมิโนที่เหมือนกับ FC27 sequence

(A) FC27 non-repeat dimorphic N-terminal region

FC27	A N E G S N T N S V G A N A P N
808B, JRbr, P62br	- - - - - R - D - - - - K
814, OF-B	- - - - - R - - - - - K
834A, OP, OQ	- - - - - T - - - - - -
837	- - - - - K - - - - - K
OE	- - - - P - - - R - - - - K

(B) FC27, 32 amino acid repeat region

FC27	(unit 1) ADTIASGSQRSTNSASTSTTNGESQTTTPTA
	(unit 2) -----ADTPTATAT
808B, JRbr, P62br	---V---S-----
814, 834A, 837, 843	-----S-----
OE, OP, OQ, OF-B	

(C) FC27, 12 amino acid repeat region

FC27	ESISPSPPITTT
JRbr, P62br	(unit 1) --N-----
	(unit 2) K-N-----
808B	(unit 1) --N-----
	(unit 2) K-N-----
	(unit 3) --N-----
814, OE	(unit 1) K-N-----
	(unit 2) --N-----
	(unit 3) --N-----
834A, OP, OQ	(unit 1) K-N-----
	(unit 2) --N-----
	(unit 3) --N-----
	(unit 4) --N-----
834A, OP, OQ	(unit 1) --N-R-----
	(unit 2) --N-R-----
	(unit 3) --N-R-----
	(unit 4) --N-R-----
	(unit 5) --N-R-----

(D) FC27, non-repeat dimorphic C-terminal region

FC27	ESSSSGNAPNKTGKGEESEKQNELNESTEEGPKAPQEPQTAENENPAAP
All	-----

- รูปที่ 14 ลำดับกรดอะมิโนใน MSP2 ของ 3D7/Camp family บริเวณ non-repeat dimorphic ด้าน N- และ C- terminal regions
- หมายถึง กรดอะมิโนที่เหมือนกับ 3D7 sequence
 - หมายถึง ไม่มีกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าว

(A) 3D7/Camp non-repeat dimorphic N-terminal region

3D7	A E S K P S T
CAMP	- - - - - P -
807, 836	E - - N - P -
842, OC-A, OC-B, OK	T - - N - P -
815, 947, OD, OF-A, OM	T - - - - P -
822, 838, 844, M12, P6br, P34br	- - - - T P -
806, 808A, 827, 828, 835, OG, OH, OL, OR	- V - N - P -

(B) 3D7/Camp non-repeat dimorphic C-terminal region

3D7	GNGA...DAEGSSSTPATTTTTK
CAMP	----NPGA---R-P-----PA-PA
822, 838	----NPGA-----T
OF-A	R--NPGA-----T
OC-A, OC-B, OK, M12	----NPGA---R-P-----
815, 947, OD, OM	R--NPGA-----
844	----NPGA---KR-P-----
806, 807, 827, 828, 835, OG, OH, OR, OL	----...KR-P-----
808A	----...R-P-----
842	GA---R-P-----
3D7	TTTTTTTNDAEASTSTSSSENPNHKNAETNPKGKGELQEPNQANKETQNNNS
CAMP	-----V-K-----
806	-----G-N-----V-----
OC-A, OC-B, OK	-----N-----
947	-----S-N-----N-GV-----
822, 834B, 838, 946	-----N-K-----N-GV-----
844, OD, OF-A	-----N-----V-Q-----
P6br, P34br	-----N-----V-K-----
827, 828	-----KV-K-----
835, OG, OH	-----V-K-----
842	-----N-K-----N-GV-K-----
808A	-----N-----KV-K-----
807	-----N-----QV-----
OR	-----N-----N-KV-----
OL	-----S-N-----N-KV-----
M12br	-----N-----V-K-----
815	-----S-N-----N-KV-----
OM	-----S-N-----N-V-----
3D7	NVQQDSQTKSNVPPTQDADTKSPTAQPEQAENSAPTAEQTESPELQSAPE
CAMP	-----P-----
806	-----I-----
M12br	-----I-----
Other Thai	-----

รูปที่ 15

ลำดับกรดอะมิโน MSP21 ของ 3D7/Camp family บริเวณ repeats
ตัวเลขหลังวงเล็บ หมายถึง จำนวนชุดของ repeat unit

3D7 CAMP	GAGGTAGGSAGGSAGGSAGGSAGGSAGGSAGSGAG GTGGSGSAGSGAGASAG
806	GAGAVASAG
807, 836	[(GA)2 VAGS]4 [(GA)4 VAGS]2 (GA)3 VAGS (GA)2 SA
808A	[(GA)2 VAGS]2 (GA)7 VAGS (GA)5 VAGS (GA)3 VAGS (GA)3 V
827	GAVAGS [(GA)3 VAGS]2 [(GA)4 VAGS]2 (GA)2 VASA
828	GAVAGS [(GA)3 VAGS]2 (GA)4 VAGS (GA)3 VAGS (GA)2 VASA
835	GAVAS (GA)3 VAGS (GA)4 VAGS (GA)3 VAGS GDGAVASA
OG	[(GA)2 VAGS]3 (GA)4 VAGS (GA)3 VAVAGS (GA)2 VASA
OH	GAVAGS [(GA)3 VAGS]4 (GA)2 VASA
OR, OL	(GA)2 VAGS[(GA)3 VAGS]2 (GA)6 VAGS[(GA)3 VAGS]2 GAGAVA
M12br	(GA)2 VAGS [(GA)3VAGS]2 (GA)5 VAGS [(GA)2 VAGS]2 GAVAS
P6br, P34br	(GSGAGASGSA)4 (GSGDGAVASA)
822, 834B, 946	GASG (SAGSGAVA)3 SA
838	GASG (SAGSGAVA)2 SA
OD, OF-A	GTGA (SGSAGSGA)2 (SGSAGSGD) GAVASA
OC-A, OC-B	GASGSA (GGSA)5 GSGD
OK	GASGSA (GGSA)12 GSGD
815	GAGAGASGSA (GSRDGAVASA)7
947	GAGAGASGSA (GSRDGAVASA)
OM	GAGAGASGSA (GSRDGAVASA)8
844	GA (GGSGSA)8 GGGGSAGSGA
842	(GASGSAGA)3 (GASGSA)7 GS

non-repeat dimorphic ส่วน 3' ต่อ repeat พบว่า isolate OC-A, OC-B และ OK มี deletion ของ codon สำหรับกรดอะมิโนดังนี้ NPKNGKGVQEP และพบ deletion ของ 1 codon ใน isolate 815, 947 และ OM (รูปที่ 13)

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของอัลลีล ต่าง ๆ ในแต่ละ families พบว่า isolate/clone ใน 3D7/Camp family มีการกระจายใน evolutionary tree มากกว่า FC27 family ดังรูปที่ 16 และ 17 ทั้งนี้อาจเนื่องจากลักษณะของ repeats ใน 3D7/Camp family มักมี degeneracy ของ codon และการพบ incomplete repeat unit แทรกอยู่ทั่วไปในแต่ละ allele นอกจากนี้ repeat ของ FC27 family มีขนาดยาวกว่า

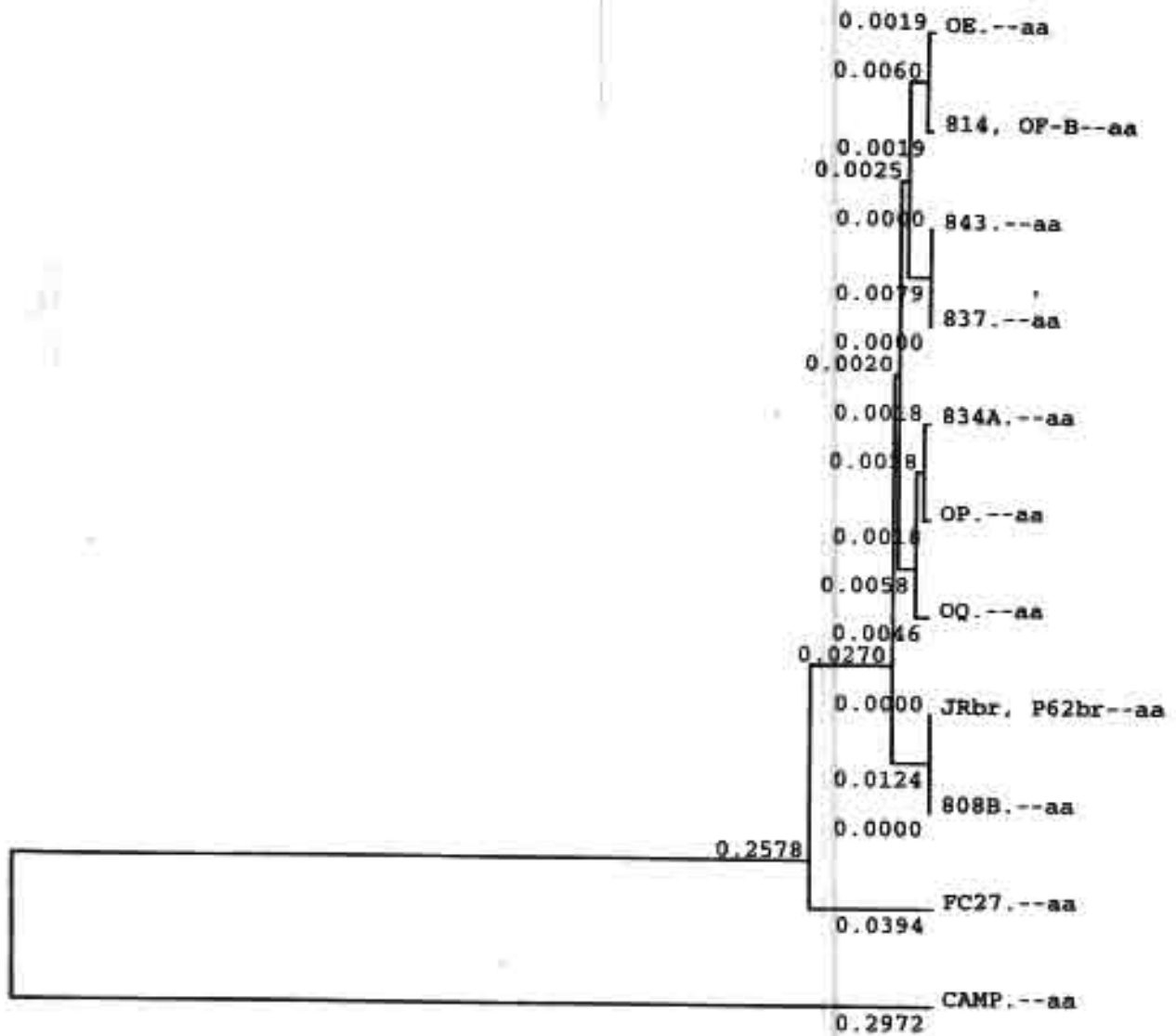
เป็นที่น่าสังเกตว่า MSP1 gene ใน family เดียวกัน แม้จะมีจำนวน nucleotide เท่ากัน อาจไม่จำเป็นต้องเป็น allele เดียวกันเสมอ เช่น isolate 808B, 814 และ OF-B ประกอบด้วย codon ทั้งหมด 256 codon พบว่า allele 814 และ OF-B เหมือนกันแต่แตกต่างจาก 808 เป็นต้น และในการศึกษานี้พบ isolate ที่มี allele เหมือนกันทุกประการเพียง 9 isolate/clone จากทั้งหมด 35 isolates (39 clones) หรือร้อยละ 25 ดังนั้นเชื่อมาลาเรียในธรรมชาติที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงน่าจะพบความหลากหลายมากกว่าที่ทำการศึกษานี้ จากการศึกษา MSP2 gene ในส่วน repeats โดยใช้ primer หรือ probe จำเพาะสำหรับแต่ละ family จึงน่าจะให้ผลการตรวจสอบการกระจายของ allele ได้ต่ำกว่าที่มีอยู่จริง อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่า isolates ที่ได้จากประเทศไทยและประเทศบราซิล แม้จะมีความหลากหลายในรูปแบบ allele ของ MSP2 gene แต่ทั้งหมดสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 families เท่านั้นคือ FC27 และ 3D7/Camp

(3) การศึกษา TRAP gene

ได้ทำการศึกษาลำดับเบสของ TRAP gene ทั้งหมดจำนวน 26 isolates ได้แก่ isolates 806, 807, 808, 814, 815, 822, 827, 828, 834, 835, 836, 837, 838, 841, 842, 843, 844, 946, 947, OA, OB, OC, OD, OF, OM และ OR พบว่าประกอบด้วย TRAP gene ทั้งหมด 27 อัลลีลโดยตรวจสอบพบมีการติดเชื่อปะปนกันระหว่างอัลลีล TRAP ที่แตกต่างกันใน 2 isolates คือ 822 และ 841 โดยพบถึง 4 alleles ใน isolate 841 ในทางตรงข้ามพบว่าบาง isolates มีอัลลีลของ TRAP เหมือนกันทุกประการคือ isolates 807 และ 836, isolates 814 และ 842, และ isolates OF และ OR (รูปที่ 18) allele 841C และ 841D แตกต่างกัน 2 nucleotides ซึ่งเป็น synonymous substitution คือ codon AAA → AAG (Lys) และ TCT → TCA (Ser) ในตำแหน่งที่ 605 และ 1,247 เมื่อเทียบกับ T9/96 sequence ตามลำดับ

รูปที่ 17

แสดง evolutionary tree ของ FC27 family ของ isolates ในประเทศไทยและ
 บราซิล ในการศึกษานี้



เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ isolates จากประเทศไทยกับ isolates จากต่างประเทศ (Robson et al 1990) พบการแทนที่ของ nucleotide ทั้งหมด 67 ตำแหน่ง หรือ 57 codons ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบการแทนที่ของ nucleotide ตำแหน่งใหม่ 14 ตำแหน่ง ซึ่งการแทนที่ดังกล่าวเกิดขึ้นตรงกับ nucleotide ตัวแรกของ codon 3 ตำแหน่ง ตัวที่สอง 7 ตำแหน่ง และตัวที่สาม 4 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามไม่พบการแทนที่ของ nucleotide ใน 24 codon ที่มีรายงานมาก่อน สำหรับจำนวนชุดของลำดับเบสสำหรับ Pro (Glu)-Asn-Pro tandem repeats มีความแตกต่างกันไปในแต่ละอัลลีลโดยพบตั้งแต่ 3 ถึง 8 ชุด ดังแสดงในรูปที่ 18

ในการวิเคราะห์การแทนที่ของ nucleotide ใน TRAP gene พบว่าส่วนใหญ่เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ nonsynonymous พบ 56 codons จากทั้งหมด 61 codons โดยการแทนที่ดังกล่าวเป็น transition (เปลี่ยนจาก purine เป็น purine หรือจาก pyrimidine เป็น pyrimidine) ใกล้เคียงกับ transversion (เปลี่ยนระหว่าง pyrimidine กับ purine) โดยพบ 30 และ 33 codons ตามลำดับ ทั้งนี้กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่ (30 codons จาก 56 codons) ไม่เปลี่ยน polarity ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4

ในปัจจุบันมีการค้นพบ cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope ใน TRAP ของ *P. falciparum* จำนวน 4 epitopes ได้แก่ (1) ASKNKEKAL (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 107-115) (2) KNKEKALII (ตำแหน่งที่ 109-117) ซึ่งเป็น HLA.B8-restricted epitopes และ (3) HLGNVKYLIV (ตำแหน่งที่ 3-11) (4) GIAGGLALL (ตำแหน่งที่ 500-508) ซึ่งเป็น HLA-A2.1-restricted epitopes พบว่าบริเวณ epitopes เหล่านี้ไม่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนหรือ nucleotide เลย

TRAP เป็นโปรตีนที่มี putative functional domain 3 บริเวณ ที่น่าจะมีส่วนสำคัญที่เกี่ยวกับบทบาทในการที่สปอร์โรซอยด์ จะเข้าสู่เซลล์ ได้แก่ Arg-Gly-Asp (ตำแหน่งที่ 307-309) Trp-Ser-Pro-Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly (ตำแหน่งที่ 250-258) และ Ile-Glu-Glu (ตำแหน่งที่ 76-78) ซึ่งบริเวณดังกล่าวไม่พบการแทนที่ของกรดอะมิโนหรือ nucleotide เช่นกันในทุก isolate ที่ศึกษา

4. การศึกษา CSP gene

ได้ทำการศึกษา CSP gene โดยการหาลำดับเบสในส่วน 3' ของ gene ซึ่งครอบคลุมทั้งหมด 352 bp ในบริเวณดังกล่าวประกอบด้วย T helper epitope ได้แก่ Th2R และ Th3R นอกจากนี้ยังมี CTL epitopes ที่มีบางส่วนของกรดอะมิโนซ้ำซ้อนกันกับ Th3R ตัวอย่างที่ศึกษาได้จากอำเภอมะนัง จ.สตูล จังหวัดตาก ในปี ค.ศ. 1992 จำนวน 22 isolates และจากบริเวณเดียวกันในปี ค.ศ. 1995 จำนวน 50 isolates รูปที่ 19 แสดงลำดับเบสและกรดอะมิโน Th2R และ Th3R โดยแยกเป็นอัลลีลตาม T cell epitopes ดังกล่าว และได้เปรียบเทียบกับอัลลีล ที่เคยมีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในบริเวณเดียวกันในปี ค.ศ. 1988-1989 คลอดจน isolate/clone จากที่ต่าง ๆ ทั่วโลกพบว่าการแทนที่ของ nucleotide ทุกตำแหน่ง มีผลทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปทุกตำแหน่ง (absolute nonsynonymous

ตารางที่ 3 แสดงการแทนที่ของ nucleotides และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนใน TRAP

Amino acid residue No.	Amino acid	Codon	Type of change
39*	Serine Arginine	AGT CGT	Transversion
46	Glutamine Glutamic acid	CAG GAG	Transversion
(49)	Leucine Valine	CTT GTT	Transversion
66	Asparagine Lysine	AAC AAG	Transversion
83	Aspartic acid Glutamic acid	GAT GAA	Transversion
84*	Asparagine Serine	AAT AGT	Transition
90	Valine Leucine	GTT CTT	Transversion
(91)	Asparagine Serine	ATT AGT	Transition
92	Valine Isoleucine	GTT ATT	Transition
98	Lysine Arginine	AAA AGA	Transition
(116)	Isoleucine Serine	ATT	Transversion
119	Arginine Lysine	AGG AAG	Transition
123*	Serine Asparagine	AGT AAT	Transition

Amino acid residue No.	Amino acid	Codon	Type of change
(128)	Tyrosine Phenylalanine	TAT TTT	Transversion
(130)	Arginine Lysine	AGA AAA	Transition
134	Threonine Serine	ACT AGT	Transversion
(139)	Glutamine Glutamic acid	CAA GAA	Transversion
154*	Asparagine Serine	AAT AGT	Transition
161*	Threonine Isoleucine	ACA ATA	Transversion
(177)	Lysine Asparagine	AAA AAT	Transversion
(179)	Serine Asparagine	AGT AAT	Transition
181	Arginine Leucine	CGT CTT	Transversion
272*	Glycine Glycine	GGA GGT	Transversion
273	Cysteine Cysteine	TGT TGC	Transition
277	Isoleucine Leucine Serine	ATA TTA TCA	Transversion Transition
(287)	Proline Leucine	CCT CTT	Transition

Amino acid residue No.	Amino acid	Codon	Type of change
290	Tryptophan Arginine	TGG CGG	Transition
295	Valine Valine	GTT GTC	Transition
297	Aspartic acid Histidine Glutamine	GAT CAT CAA	Transversion Transversion
311	Serine Phenylalanine	TCT TTT	Transition
312*	Serine Alanine Valine	TCT GCT GTT	Transversion Transition
313*	Valine Phenylalanine	GTC TTC	Transversion
314	Glutamine Glutamic acid	CAA GAA	Transversion
(317)	Glutamic acid Lysine	GAA AAA	Transition
(319)	Asparagine Histidine	AAT CAT	Transversion
337	Aspartic acid Glycine	GAT GGT	Transition
(340)	Proline Arginine	CCA CGA	Transversion
341	Asparagine Lysine	AAC AAA	Transversion
353	Proline Serine	CCA TCA	Transition

Amino acid residue No.	Amino acid	Codon	Type of change
359	Glutamic acid Glutamine	GAA CAA	Transversion
(360)	Glutamine Arginine	CAA CGA	Transition
(361)	Lysine Glutamic acid	AAA GAA	Transition
368	Serine Serine	TCA TCG	Transition
(398)	Histidine Leucine	CAC CTC	Transversion
412	Asparagine Tyrosine Serine	AAT TAT TCT	Transversion Transversion
(419)	Proline Alanine	CCT GCT	Transversion
(421)	Lysine Asparagine	AAA AAT	Transversion
(452)	Arginine Histidine	CGT CAT	Transition
(461)	Arginine Isoleucine	AGA ATA	Transversion
467	Tyrosine Histidine	TAT CAT	Transition
468*	Asparagine Asparagine	AAC AAT	Transition
469	Aspartic acid Asparagine	GAT AAT	Transition

Amino acid residue No.	Amino acid	Codon	Type of change
473	Histidine Tyrosine	CAT TAT	Transition
(474)	Proline Histidine	CCT CAT	Transversion
487	Lysine Glutamine	AAA CAA	Transversion
(489)	Glycine Alanine	GGA GCA	Transversion
(490)	Glutamic acid Glycine	GAA GGA	Transition
(494)	Lysine Arginine	AAA AGA	Transversion
497*	Isoleucine Valine	ATT GTT	Transition
520	Proline Proline	CCA CCG	Transition
526	Tyrosine Phenylalanine	TAT TTT	Transversion

ตารางที่ 4 แสดงการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนใน TRAP และการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์

Residue	Amino acid	Classification				Amino acid pair distance
		Nonpolar	Polar	Charged Basidic	Polar Acidic	
39	Serine		+			
	Arginine			+		2.74
46	Glutamine		+			
	Glutamic acid				+	0.84
49	Leucine	+				
	Valine	+				0.91
66	Asparagine		+			
	Lysine			+		1.84
83	Aspartic acid				+	
	Glutamic acid				+	0.90
84	Asparagine		+			
	Serine		+			1.31
90	Valine	+				
	Leucine	+				0.91
91	Asparagine		+			
	Serine		+			1.31
92	Valine	+				
	Isoleucine	+				0.85
98	Lysine			+		
	Arginine			+		0.40
116	Isoleucine	+				
	Serine		+			2.95
119	Arginine			+		
	Lysine			+		0.40
123	Serine		+			
	Asparagine		+			1.31
128	Tyrosine		+			
	Phenylalanine	+				0.48
130	Arginine			+		
	Lysine			+		0.40
134	Threonine		+			
	Serine		+			0.89
139	Glutamine		+			
	Glutamic acid				+	0.84
154	Asparagine		+			
	Serine		+			1.31
161	Threonine		+			
	Isoleucine	+				2.14

Residue	Amino acid	Classification				Amino acid pair distance
		Nonpolar	Polar	Charged Polar Basic	Acidic	
177	Lysine			+		
	Arginine			+		0.40
179	Serine		+			
	Asparagine		+			1.31
181	Arginine			+		
	Leucine	+				2.62
277	Isoleucine	+				
	Leucine	+				0.14
	Serine		+			2.95
287	Proline	+				
	Leucine	+				2.70
290	Tryptophan	+				
	Arginine			+		2.72
297	Aspartic acid				+	
	Histidine			+		1.72
	Glutamine		+			0.90
311	Serine		+			
	Phenylalanine	+				3.45
312	Serine		+			
	Alanine	+				0.51
	Valine	+				2.15
313	Valine	+				
	Phenylalanine	+				1.43
314	Glutamine		+			
	Glutamic acid				+	0.84
317	Glutamic acid				+	
	Lysine			+		1.14
319	Asparagine		+			
	Histidine			+		1.72
337	Aspartic acid				+	
	Glycine	+				2.37
340	Proline	+				
	Arginine			+		2.90
341	Asparagine		+			
	Lysine			+		1.84
353	Proline	+				
	Serine		+			0.56
356	Aspartic acid				+	
	Asparagine		+			0.65

Residue	Amino acid	Classification				Amino acid pair distance
		Nonpolar	Polar	Charged Basic	Polar Acidic	
359	Glutamic acid				+	
	Glutamine		+			0.84
360	Glutamine		+			
	Arginine			+		1.45
361	Lysine			+		
	Glutamic acid				+	1.14
398	Histidine			+		
	Leucine	+				2.59
412	Asparagine		+			
	Tyrosine		+			3.42
	Serine		+			1.31
419	Proline	+				
	Alanine	+				0.06
421	Lysine			+		
	Asparagine		+			2.05
452	Arginine			+		
	Histidine			+		0.82
461	Arginine			+		
	Isoleucine	+				2.49
467	Tyrosine		+			
	Histidine			+		2.27
469	Aspartic acid				+	
	Asparagine		+			0.65
473	Histidine			+		
	Tyrosine		+			2.27
474	Proline	+				
	Histidine			+		2.15
487	Lysine			+		
	Glutamic acid				+	1.14
489	Glycine	+				
	Alanine	+				0.91
490	Glutamic acid				+	
	Glycine	+				2.78
494	Lysine			+		
	Arginine		+			0.40
497	Isoleucine	+				
	Valine	+				0.85
526	Tyrosine		+			
	Phenylalanine	+				0.48

substitutions) ทั้งนี้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 330, 331, 334, 335, 338, และ 341 ใน Th2R และตำแหน่งที่ 368, 371, 373, และ 375 ใน Th3R ยังไม่พบการแทนที่ของ nucleotide จาก isolate/clone ที่ศึกษาหรือรายงานอื่น ๆ เลย

เมื่อพิจารณาถึงความบ่อยที่พบ Th2R และ Th3R อัลลีลในแต่ละปีที่ศึกษาจาก isolate ในอำเภอแม่สอด จังหวัดตากคือในปี ค.ศ. 1988-1989, 1992 และ 1995 พบว่า isolate จากบริเวณดังกล่าวมีลำดับเบส (และลำดับกรดอะมิโน) สำหรับ Th2R อยู่ 8 อัลลีลและ Th3R พบ 9 อัลลีลโดยเมื่อรวมอัลลีลระหว่าง Th2R และ Th3R พบทั้งหมด 19 alleles สำหรับ clonal mixture พบตั้งแต่ร้อยละ 15.8-31.8 และเป็นที่น่าสนใจว่า allele Th2R และ Th3R แบบที่ 1 พบบ่อยที่สุดในแต่ละปีคือ ร้อยละ 41.4 ถึง 68.9 และแบบที่พบบ่อยรองลงมาคือแบบที่ 3 และ 4 ส่วนแบบอื่น ๆ ที่พบมีการเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละปีการศึกษาและมีความถี่ในการตรวจพบค่อนข้างต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 5

ในการศึกษานี้พบ allele ใหม่สำหรับ Th2R คือ การแทนที่ nucleotide ใน codon 337 คือ เปลี่ยนจาก AAA (lys) เป็น AAT (gln) ส่วนอัลลีลใหม่สำหรับ Th3R คือ codon AAT (glu) เป็น GGT (gly) ร่วมกับ codon GAT (asp) เป็น AAT (gln) และพบอัลลีลระหว่าง Th2R และ Th3R เพิ่มขึ้นอีก 8 อัลลีล ดังแสดงในรูปที่ 19

เพื่อเป็นการเปรียบเทียบว่าการเปลี่ยนแปลงของเวลาตลอดจนวิธีการศึกษาอัลลีล ของ CSP ในบริเวณ 3' นั้นแตกต่างกันในแหล่งระบาดมาลาเรียอื่นอย่างไร จึงได้ศึกษาโดยวิธีดังกล่าว isolate ที่ได้จาก Rondonia ประเทศบราซิล จำนวนทั้งสิ้น 15 isolates พบ isolate ที่อัลลีลต่างกันปะปนกันอยู่ 3 isolates และอัลลีลที่พบแสดงในรูปที่ 20 เป็นที่น่าสนใจว่าการศึกษาของ Yoshida และคณะในปี ค.ศ. 1991 พบว่าอัลลีลของ Th2R และ Th3R มีเพียง 2 แบบ เท่านั้น ซึ่งต่างจากการศึกษานี้ชัดเจน (ตารางที่ 5)

รูปที่ 19

การแทนที่ของ nucleotide และการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนของ Th2R
และ Th3R ใน CSP และอัลลีลที่พบในประเทศไทย

Th2R														Th3R													
329	K	H	I	E	Q	Y	L	K	K	I	R	N	S	342	367	N	K	P	K	D	E	L	D	Y	E	377	
7GSAAG	CAC	ATA	GAA	CAA	TAT	TTA	AAG	AAA	ATA	AAA	AAT	TCT	ATT	AAI	AAA	OCT	AAA	GAC	GAA	TTA	GAT	TAT	GAA	AAT			
985														1099													
1											Q		L														
2				T	E						Q		L		G		S										
				AC	G						C		C		GG		T										
3											Q		L		D					Q							
											C		C		G					C							
4											Q	Y	L		D					Q							
											C	T	C		G					C							
5					B						Q		L									N					
					G						C		C									A					
6											Q		L												D		
											C		C												G		
7				K	E			T			Q				G							B					
				A	G			C			C				GG							A					
8											Q	Y	L							Q							
											C	T	C							C							
9								N			Q		L		D					Q							
								T			C		C		G					C							
11											Q	Y	L														
											C	T	C														
12								N			Q	Y	L		D					Q							
								T			C	T	C		G					C							
13				T	E						Q		L														
				AC	G						C		C														
14											Q		L		G		S										
											C		C		GG		T										
15								N			Q		L														
								T			C		C														
16											Q		L									N					
											C		C									A					

ตารางที่ 5 การกระจายของอัลลีล Th2R และ Th3R ใน CSP ของ isolates ในประเทศไทย และประเทศบราซิลในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

Thailand (Brazil)

Year Collected			1988-89 *	1992	1995
Total Isolates			19 (23)	22	50 (15)
Total Subclones			23 (23)	29	61 (19)
Isolates with Mixture			3 (-)	7	11 (3)
CSP	Type 7G8		- (19)	2	- (10)
	Type 1		12 (-)	12	42 (1)
	Type 2		3 (-)	2	5 (-)
	Type 3		1 (-)	2	1 (1)
	Type 4		3 (-)	5	4 (1)
	Type 5		1 (-)	-	2 (-)
	Type 6		1 (-)	-	- (-)
	Type 7		1 (-)	-	- (-)
	Type 8		1 (-)	-	- (-)
	Type 9		- (-)	3	- (-)
	Type 10		- (-)	1	- (-)
	Type 11		- (-)	1	- (-)
	Type 12		- (-)	1	- (-)
	Type 13		- (-)	1	1 (-)
	Type 14		- (-)	-	2 (2)
	Type 15		- (-)	-	3 (1)
	Type 16		- (-)	-	1 (-)
	Type 17		- (4)	-	- (-)
	Type 18		- (-)	-	- (3)

* ข้อมูลจาก Jongwutiwes et al, 1994 และ Yoshida et al, 1990

วิจารณ์ผลการทดลอง

นับเป็นเวลาหลายปีที่มีการพยายามผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคมาลาเรีย อย่างไรก็ตามการที่จะบรรลุผลสำเร็จจำเป็นต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจหลายด้าน เพื่อประยุกต์เข้าด้วยกันทั้งด้านชีววิทยาของเชื้อมาลาเรีย ลักษณะทางพันธุกรรม การเลือกโปรตีนของมาลาเรียที่น่าจะมีบทบาทกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพ กลไกของระบบภูมิคุ้มกันในการตอบสนองต่อการติดเชื้อทั้งที่มีและไม่มีประสิทธิภาพ หน้าที่ของโปรตีนต่าง ๆ ของเชื้อมาลาเรีย ตลอดจนความแตกต่างในแต่ละบุคคลที่อาจทำให้เกิดการตอบสนองหรือไม่ตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อ และสารกระตุ้นหรือส่งเสริมการตอบสนองของ immunogen เพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในการพยายามแสวงหาโปรตีนบนผิวของเชื้อมาลาเรีย ที่น่าจะมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองชนิดที่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้นั้น พบว่าในระยะสปอร์โรรอยด์และระยะเมอร์โรซอยด์ ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด แต่ชนิดที่พบมากและมีหลักฐานจากการทดลองทั้งในหลอดทดลอง สัตว์ทดลอง และมนุษย์ คือ MSP1, MSP2, CSP และ TRAP อย่างไรก็ตาม ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญประการหนึ่งคือ ความหลากหลายในรูปแบบของ antigen ในโปรตีนดังกล่าว เพราะวัคซีนที่ผลิตโดยอาศัยพื้นฐานของลำดับกรดอะมิโนจากอัลลีลหนึ่งอาจไม่สามารถกระตุ้น ภูมิคุ้มกันที่สามารถทำลายเชื้อมาลาเรียอัลลีล อื่น ๆ ในแหล่งปรากฏโรคที่แตกต่างกันได้ ดังนั้น การศึกษาการกระจายของอัลลีลในระยะเวลาที่แตกต่างกัน จึงมีประโยชน์พื้นฐานอย่างมาก ในการออกแบบวัคซีนป้องกันมาลาเรีย แม้จำนวนตัวอย่างที่ศึกษาอาจจะไม่มากนัก ข้อจำกัดเกี่ยวกับวิธีการที่ศึกษาก็ตาม

การศึกษาลำดับเบสของ MSP1 gene ในส่วน 5' ตั้งแต่ block 1 ถึง block 5 พบว่าใน block 3 มีการแทนที่ของ nucleotide และพบ linkage ที่น่าจะเป็น potential cross-over sites ซึ่งพบอยู่ถึง 10 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตาม cross-over site ไม่จำเป็นต้องอยู่ในบริเวณที่เป็น conserved block เท่านั้น เนื่องจากบริเวณกึ่งกลาง ของ block 4 ซึ่งเป็น variable block พบความเป็นไปได้ทุกรูปแบบของการเกิด crossing over ระหว่างอัลลีล MAD20 และอัลลีล K1

เนื่องจาก MSP1 gene มีขนาดใหญ่ ดังนั้นการศึกษาอัลลีลของ MSP1 โดยทั่วไปมักอาศัย PCR ร่วมกับ Southern blot hybridization โดยใช้ allele-specific probe ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงได้พัฒนาการตรวจสอบอัลลีลของ MSP1 ใน block 2 ร่วมกับ block 4 ด้าน 5' โดย PCR-RFLP พบว่าสามารถบอกความแตกต่างของอัลลีลในทั้ง 2 block ได้ถูกต้องเช่นเดียวกับวิธี hybridization วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบอัลลีล ดังกล่าวได้ ภายใน 1 วัน ตลอดจนค่าใช้จ่ายไม่สูงจนเกินไป นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนาม หรืออาศัยบุคลากรที่ไม่ต้องมีทักษะทางด้าน molecular biology มากนัก ภายหลังจากการ

ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี PCR-PFLP แล้ว ได้ทดสอบกับเชื้อมาลาเรียที่ได้จากแหล่งระบาดเดียวกันแต่ด้วยเชื้อได้จากช่วงเวลาต่างกัน พบว่าการกระจายของอัลลีล KI, MAD20 และ RO33 ใน block 2 ของแต่ละปีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ลักษณะดังกล่าวพบได้เช่นกันใน block 4 ด้าน 5' และ block 6 ถึง 16 นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการกระจายของอัลลีล ใน block 2 จากเชื้อมาลาเรียในค่ายอพยพ shoklo ในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จากการศึกษาอัลลีลเฉพาะใน block 2 โดยวิธี hybridization โดย Paul และคณะ ซึ่งเก็บรวบรวมเชื้อที่ศึกษาในปี ค.ศ. 1994 พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 55 isolates ประกอบด้วย KI 18 isolates, MAD20 29 isolates และ RO33 8 isolates หรือร้อยละ 32.7, 52.8 และ 14.5 ตามลำดับ ซึ่งคล้ายคลึงกับผลที่ได้จากการศึกษานี้แม้วิธีการจะแตกต่างกัน แต่น่าจะมีข้อสรุปร่วมกันว่าในแหล่งระบาดของมาลาเรียหนึ่ง ๆ การกระจายของ allele ในแต่ละปีมีค่าใกล้เคียงกันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ferreira และคณะ โดยใช้ตัวอย่างจากประเทศเวียดนามก็พบปรากฏการณ์ทำนองเดียวกัน

แม้ว่าปัจจัยที่ทำให้เกิดความหลากหลายของอัลลีล MSP1 ยังไม่ทราบชัดเจนแต่จากการที่พบความสัมพันธ์ระหว่าง block 6 ถึง 16 กับบาง domain ใน block 3 จึงน่าจะเป็นไปได้ว่า MSP1 มี structural constraint เนื่องจากความหลายที่เกิดขึ้นระหว่าง block 3 มีได้หลายรูปแบบ ดังนั้นหน้าที่ของ MSP1 จึงน่าจะต้องอาศัยการเรียงตัวในรูปร่างสามมิติที่ถูกต้อง อย่างไรก็ตามการพบการกระจายของอัลลีลในแต่ละท้องถิ่นที่ต่างกัมนั้นอาจมีปัจจัยทางชีววิทยา หรืออิมมูโนวิทยาของโฮสต์และยุงที่ปล่องมาเกี่ยวข้องด้วยซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาคต่อไป

สำหรับ MSP2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า MSP1 และปรากฏที่ผิวของระยะเมอร์โรซอยต์เช่นกัน โปรตีนดังกล่าวมีลักษณะความหลากหลายในรูปแบบของ antigen ค่อนข้างสูง จากการศึกษาลำดับเบสของ MSP2 gene จาก isolate ที่ได้จากที่ต่างๆ ทั่วโลก พบว่ามีพื้นฐานความหลากหลายของ antigen เพียง 2 กลุ่มใหญ่ ๆ จึงจัดเป็น allelic families โดยต้นแบบคือ FC27 และ Camp (รวมทั้ง IC1 และ 3D7) โดยทั้ง 2 families จัดอยู่ใน serogroup ต่างกันเนื่องจาก monoclonal antibodies ต่อส่วน repeats มีความแตกต่างกันในการเกิดปฏิกิริยา (Fenton et al, 1991)

ลักษณะโครงสร้างของ MSP2 ประกอบด้วย conserved N- และ C-terminal regions ตรวจกลางเป็น repeats ซึ่งมีความแตกต่างกันใน FC27 family ประกอบด้วย 32 codon repeats และ 12 codon repeats ส่วน 3D7/Camp family ประกอบด้วย 8 codon repeats ซึ่งมักจะมี ความหลากหลายในองค์ประกอบของกรดอะมิโนและความสมบูรณ์ของ repeats ถัดจากส่วนกลางซึ่งเป็น repeats ทางด้าน N- และ C- flanking region ประกอบด้วย family-specific regions ซึ่งเป็น non-repeat sequence

เพื่อเป็นการศึกษาขอบเขตความหลากหลายของ MSP2 gene จากตัวอย่างในประเทศไทย จำนวน 30 isolates และ 5 isolates จากประเทศบราซิล พบความหลากหลายของอัลลีลใน FC27

family น้อยกว่าใน 3D7/Camp family ซึ่งความแตกต่างที่พบมักเกิดขึ้นใน 12 codon repeats โดย มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน และจำนวนชุดของ repeats แตกต่างกัน สำหรับอัลลีลใน 3D7/Camp family พบว่าสามารถจัดเป็น 6 กลุ่มใหญ่ ซึ่งมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า evolutionary tree ของอัลลีลใน 3D7/Camp family มีการกระจายมากกว่า ใน FC27 family ดังแสดงในรูปที่ 16 และ 17 ทั้งนี้อาจเนื่องจากลักษณะของ nucleotide repeats ใน 3D7/Camp family น่าจะเกิดจาก mutation คลอดจน duplication/deletion ใน repeat unit ได้ ง่ายกว่าใน FC27 family เช่น isolate 815 ถ้ามี duplication ของ repeat unit คือ 5'-TGTT CTCGTGATGGTGCTGTGCTAGTGC-3' จะเป็น allele ใน isolate OM หรือในทางตรงกันข้ามอัลลีลใน isolate 806 น่าจะเกิดจาก multiple deletion ของ repeat unit จนเกิด repeat ที่สั้นที่สุดเท่าที่เคยมีรายงานมาก่อนคือมีเพียง codon ใน repeat เป็น GAGAVASAG เท่านั้น อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่า isolate ใดมีการขาดหายไปของ repeats เหล่านี้เลย ดังนั้น repeat unit ดังกล่าว น่าจะมีบทบาทสำคัญในหน้าที่ของ MSP2 สำหรับ recombinant allele ระหว่าง FC27 และ 3D7/Camp นั้นไม่พบในการศึกษานี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่างใช้ศึกษามีจำนวนไม่มากหรือ อัลลีลดังกล่าวไม่น่าจะพบบ่อยในธรรมชาติดังเช่น จากการศึกษาของ Irion และคณะในปี 1997 พบอัลลีล recombinant ไม่เกินร้อยละ 3 ของ isolate ที่ศึกษาจาก isolate ทั้งหมดกว่า 1,000 isolates ดังนั้น recombinant type ระหว่างทั้ง 2 families ไม่น่าจะมีบทบาทสำคัญในการอยู่รอดที่ดีกว่าอัลลีลอื่น ๆ หรือไม่จะได้เปรียบในเชิงชีววิทยาหรือการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ แม้ว่าบทบาทและหน้าที่ของ MSP2 จะยังไม่ทราบชัดเจน แต่พบว่าผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียมีการสร้าง antibodies ต่อส่วน repeats มากกว่าบริเวณที่เป็น conserved sequence (Taylor et al, 1995)

โปรตีนบนผิวสปอร์โรซอยต์ที่สำคัญชนิดหนึ่งคือ TRAP ซึ่งน่าจะมีบทบาทในการเกาะติดของสปอร์โรซอยต์ก่อนที่จะเข้าสู่เซลล์ตับ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของสปอร์โรซอยต์และความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) จากการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนที่ผลิตจากระยะสปอร์โรซอยต์ของ *P. falciparum* ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ในขนาดที่เหมาะสม พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อในระยะสปอร์โรซอยต์ได้เป็นผลสำเร็จ ภาวะภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น cytotoxic CD8+ T cell ซึ่งจดจำ TRAP และ CSP นอกจากนี้ยังพบว่า antibodies ต่อ CSP หรือ TRAP ต่างก็สามารถป้องกันการถูกกลืนของสปอร์โรซอยต์ไม่ให้เข้าสู่เซลล์ตับได้ ทั้งนี้ antibodies ต่อ region II ของ TRAP ยังป้องกันไม่ให้เมอร์โรซอยต์ถูกกลืนเข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ และจากการศึกษา antibodies ของผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ พบว่าผู้ที่ไม่มี antibodies ต่อ TRAP มีความสัมพันธ์ผกผันกับปริมาณเชื้อมาลาเรียในเด็กที่อยู่ในเขตป्राภูมิโรคที่ทุกขุมของมาลาเรีย ดังนั้น TRAP จึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจ

อย่างอื่นในการ เป็นองค์ประกอบของวัคซีน (Sharma et al, 1996; Muller et al, 1993; Scarselle et al, 1993; Wize et al, 1994)

TRAP ประกอบด้วย 6 domains ได้แก่ (1) N-terminal signal sequence (2) integrin-like magnesium A-domain (3) thrombospondin-like sulfatide-binding region (ตรงกับ region II ของ CSP) (4) acidic proline/asparagine-rich repeat region (5) transmembrane domain และ (6) short acidic cytoplasmic domain (Templeton et al, 1997) จากการศึกษพบว่า domain ต่อไปนี้มี sequence conservation สูงคือ domain 1, domain 2 นับจากด้าน C-terminus 60 residues, domain 3, domain 4 จำนวน 50 residues เรียงติดต่อกัน domain 5 และ 6 นอกจากนี้ putative functional sequence motifs คือ RGD (ตำแหน่งที่ 307-309) IQQ (76-78) และ WSPCSVTCG (250-258) มีความคงที่ของ nucleotide ในทุก isolate ดังนั้นบริเวณดังกล่าวจึงน่าจะมีบทบาทสำคัญใน ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสปอร์โรซอยต์และเซลล์ของโฮสต์ ในระหว่างการจดจำหรือการถูกลำเลาะเข้าสู่ เซลล์ นอกจากนี้ความ หลากหลายของกรดอะมิโนที่พบต่อจาก RGD motif จากตำแหน่งที่ 311-314 ประกอบด้วย SSVQ, FAVE, FVVE และ FAFE น่าจะมีบทบาทสำคัญใน โครงสร้างและน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับ RGD motif ที่อยู่บนอกเซลล์

จากการวิเคราะห์การแทนที่ของ nucleotide ใน TRAP gene ทั้งหมดพบว่าในแต่ละ ตำแหน่งที่มีการแทนที่นั้นจะเป็นลักษณะของ dimorphic substitution เช่นเดียวกับที่พบใน MSP1 gene ดังนั้นความหลากหลายใน TRAP gene อาจเกิดจาก interallelic recombination

ภาวะภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพในการทำลายระยะ pre-erythrocytic stages ขึ้นกับทั้ง ระบบ humoral และ cellular โดย antibodies จะปิดกั้นการถูกลำเลาะของสปอร์โรซอยต์ไม่ให้เข้าสู่ เซลล์ตับหรือทำลายสปอร์โรซอยต์โดยกระบวนการ opsonization นอกจากนี้เซลล์ตับที่มีระยะ สปอร์โรซอยต์อยู่อาจถูกทำลายโดย CD8+CTL หรือ CD4+ T cell- และ interferon- γ -dependent effector mechanism (Wang et al, 1994; Wize et al, 1995) จากการศึกษานี้ปัจจุบันพบว่า TRAP มี CTL epitopes อยู่ 4 epitopes ซึ่งเป็น HLA-A2.1-restricted epitopes และ HLA-B8-restricted epitopes (Wize et al, 1994; Aidoo et al, 1995) ในการศึกษาพบความผันแปรใน CTL epitopes ทุกตำแหน่ง อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์ของ HLA-B8 ในอำเภอแม่สอดพบน้อยกว่าร้อยละ 2 (Hirayama & Kikuchi, ข้อมูลติดต่ส่วนตัว) ส่วน HLA-A2.1 ยังไม่ทราบในปัจจุบัน ดังนั้น อาจจะเป็นไปได้ที่จะมี CTL epitopes อื่น ๆ ใน TRAP ที่สามารถมีปฏิสัมพันธ์กับ HLA ของผู้คน ในท้องถิ่น ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมไป อย่างไรก็ตามความหลากหลายในรูปแบบ antigen ของ TRAP มีไม่มากจึงไม่น่าจะเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการนำไปเป็นองค์ประกอบของวัคซีน

โปรตีนบนผิวสปอร์โรซอยต์อีกชนิดหนึ่งที่มีการศึกษามากและน่าจะยังมีประโยชน์ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียคือ CSP ในการศึกษาวัคซีนป้องกันมาลาเรียโดยใช้ tetrapeptide repeats เป็น immunogen พบว่าให้ผลการป้องกันการติดเชื้อในระยะสปอร์โร

ขอคิดไม่ได้ผลดี ทั้งที่ถ้าใช้สปอร์โรซอยด์ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ในปริมาณที่เหมาะสมโดยทำให้โปรตีนบนผิวสปอร์โรซอยด์คือ CSP คงสภาพอยู่นั้นจะให้ผลการป้องกันการติดเชื้อได้สูง ปัญหาที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจาก tetrapeptide repeats ไม่ใช่ protective epitope ที่ดีหรืออาจเนื่องจากขาด T-B cooperation ที่เหมาะสมที่จะสร้าง antibodies ที่มีประสิทธิภาพ แต่การศึกษาของ Stoute และคณะในปี ค.ศ. 1997 พบว่า immunogen ที่ได้จาก tetrapeptide repeats และบริเวณ C-terminus ที่ประกอบด้วย T cell epitopes เมื่อใช้ adjuvant ที่เหมาะสมพบว่าสามารถกระตุ้นให้อาสาสมัครสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อในระยะสปอร์โรซอยด์ได้ผลดี ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่การใช้ adjuvant ที่เหมาะสมร่วมกับการใช้ T cell epitope จากโปรตีนของมาลาเรียจะยังผลให้ประสิทธิภาพของวัคซีนดีขึ้น

เป็นที่น่าสังเกตว่าการแทนที่ของ nucleotide ทุกตำแหน่งในบริเวณ Th2R และ Th3R ส่วนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบางตำแหน่งอาจทำให้บริเวณดังกล่าวไม่สามารถกระตุ้น T cell ในผู้ที่มี HLA แยกต่างกัน จึงมีผู้ให้ข้อคิดว่าการแทนที่ของ nucleotide ดังกล่าวน่าจะเป็นผลจาก immune selection pressure (Hughes, 1991; Jongwutiwes et al, 1994) และพบว่า Th2R และ Th3R ของเชื้อที่ได้จากแหล่งปรากฏโรคต่างกัน มักจะมีความหลากหลายแตกต่างกันด้วย จากการศึกษาของ Lockyer และคณะในปี ค.ศ. 1989 พบว่า Th2R และ Th3R มีการแทนที่ของ nucleotide หลายรูปแบบใน isolate ที่ศึกษาที่ได้จากประเทศแอฟริกา ซึ่งต่างจากการ ศึกษาของ Yoshida ซึ่ง ใช้ isolates จากประเทศบราซิล จำนวน 23 isolates พบว่า 19 isolates มี Th2R และ Th3R เหมือน clone 7G8 โดยมีเพียง 4 isolates เท่านั้นที่พบการแทนที่ของ nucleotide 5 ตำแหน่งใน Th2R และเหมือนกันทั้ง 4 isolates แต่จากการศึกษานี้พบว่า 15 isolates ที่ได้จากประเทศบราซิล Th2R และ Th3R เหมือน clone 7G8 เพียง 9 isolates ส่วน isolates ที่เหลือพบการเปลี่ยนแปลงถึง 6 อัลลิลทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการศึกษาแตกต่างกัน กล่าวคือในการศึกษาก่อนหน้านี้ใช้ direct sequencing จาก single stranded DNA ที่ได้จาก asymmetric PCR ซึ่งย่อมไม่สามารถตรวจสอบ clonal mixture ได้หรืออาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของอัลลิลในแต่ละปีจะเปลี่ยนไปตามเวลาที่ศึกษาอันอาจเกิดจากอิทธิพลภายนอกเช่น immune selection pressure หรือปัจจัยอื่น ๆ

สำหรับการศึกษาดังกล่าวในอำเภอแม่สอด จังหวัดตากในระยะเวลาแตกต่างกันกลับพบว่า มี allele ของ Th2R และ Th3R คือ Type 1 พบมากที่สุดอย่างคงที่ และ อัลลิลที่พบบ่อยรองลงมาคือ Types 2 และ 4 ทั้งนี้อัลลิลอื่น ๆ จะปรากฏในปริมาณน้อย ๆ และหายไปในแต่ละปี การพบว่าบางอัลลิลพบบ่อยกว่าอัลลิลอื่น ๆ อาจเป็นผลจาก immune selection โดยที่อัลลิลดังกล่าวน่าจะมีข้อได้เปรียบในการหลบหนีกระบวนการภูมิคุ้มกันของโฮสต์ หรืออาจเกิดจาก clonal population structure ของมาลาเรียโดยที่อัลลิล ดังกล่าวอาจมีข้อได้เปรียบด้านชีววิทยาทำให้คงอยู่ได้เป็น

เวลานาน แต่จากการพบว่า อัลลีลที่พบในความถี่ต่ำ ๆ จะถูกแทนที่โดยอัลลีลใหม่ในช่วงเวลาที่แตกต่างกันอาจเป็นผลจาก immune selection โดยที่ อัลลีลเหล่านี้อาจถูกกำจัดโดยภูมิคุ้มกันของโฮสต์และโดยกลไกทางพันธุกรรมเช่น mutation หรือ recombination ทำให้เกิดอัลลีลใหม่ ๆ เกิดขึ้นจนกว่าจะมีการปรับตัวให้อยู่รอดเช่น สามารถหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ แม้ว่าจะยังไม่มีข้อสรุปชัดเจนจากผลที่ได้ แต่ข้อมูลในส่วน 3' ของ CSP gene แสดงให้เห็นว่า มาลาเรียในท้องที่ต่างกันจะพบความหลากหลายต่างกัน และสำหรับในประเทศไทยพบว่าบางอัลลีลมีความถี่ในการพบสูงกว่า อัลลีลอื่น ๆ และคงอยู่เป็นเวลานานติดต่อกัน

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง domains ต่างๆ ใน MSP1 และ MSP2 และระหว่าง CSP และ TRAP ไม่พบว่ามี domains ใดมีความสัมพันธ์กันชัดเจนทั้งนี้อาจเนื่องจากโมเลกุลเหล่านี้มีหน้าที่แตกต่างกันและไม่ขึ้นต่อกันชัดเจน หรืออาจเนื่องจากการที่ gene ทั้ง 4 อยู่บนคนละโครโมโซมกล่าวคือ MSP1 gene อยู่บนโครโมโซมที่ 9 ส่วน MSP2 gene อยู่บนโครโมโซมที่ 2 TRAP gene อยู่บนโครโมโซมที่ 13 และ CSP gene อยู่บนโครโมโซมที่ 3 (Wellems et al, 1991) ดังนั้นระหว่างการเกิด meiosis โครโมโซมเหล่านี้จึงแยกเป็นอิสระต่อกันในการถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ สู่รุ่นลูกหลานต่อไป

โดยสรุปความหลากหลายในรูปแบบโปรตีนที่น่าจะมีประโยชน์สำหรับวัคซีนป้องกันมาลาเรีย (MSP1, MSP2, CSP และ TRAP) ปรากฏในเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย อย่างไรก็ตามขอบเขตของความหลากหลายเหล่านี้จำกัดอยู่เฉพาะบางบริเวณของโปรตีน การศึกษา epitope ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพในบริเวณเหล่านี้จึงน่าจะมีประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Aidoo, M., Lalvani, A., Allsopp, C.E.M., et al. Identification of conserved antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte-inducing vaccine against malaria. *Lancet*, 1995, 345, 1003-1007.
- Al-Yaman, F., Genton, B., Anders, R.F., Falk, M., Triglia, T., Lewis, D., Hii, J., Beck, H. and Alpers, M.P. Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 51, 593-6002.
- Blackman, M.J., Heidrich, H.G., Donachie, S., McBride, J.S. and Holder, A.A. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J. Exp. Med.*, 1990, 172, 379-382.
- Chang, S.P., Gibson, H.L., Lee-ng, C.T., Barr, P.J. and Hui, G.S.N. A carboxy-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* pg195 expressed by recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. *J. Immunol.*, 1992, 149, 548-555.
- Conway, D.J. and McBride, J.S. Population genetics of *Plasmodium falciparum* within a malaria hyperendemic area. *Parasitol.*, 1991, 13, 7-16.
- Doolan, D.L., Saul, A.L. and Good, M.F. Geographically restricted heterogeneity of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein: relevance for vaccine development. *Infect. Immun.*, 1992, 60, 675-682.
- Fenton, B., Clark, J.T., Khan, C.M.A., Robinson, J.V., Walliker, D., Ridely, R., Scaife, J.G. and McBride, J.S. Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48- kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 11, 963-971.
- Ferreira, M.U., Liu, Q., Zhou, M., Kimura, M., Kaneko, O., Thien, H.V., Isomura, S., Tanabe, K. and Kawamoto, F. Stable patterns of allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from Southern Vietnam. *J. Euk. Microbiol.*, 1998, 45, 131-136.

- Holder, A.A. The precursor to major merozoite surface antigens : structure and role in immunity. *Prog. Allergy*, 1988, 41, 72-97.
- Hughes, A.L. Circumsporozoite protein genes of malaria parasites (*Plasmodium* spp.): evidence for positive selection on immunogenic regions. *Genetics*, 1991, 127, 345-353.
- Irion, A., Beck, H. and Felger, I. New repeat unit and hot spot of recombination in FC27-type alleles of the gene coding for *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2. *Mol. biochem. Parasitol.*, 1997, 90, 367-370.
- Jongwutiwes, S., Tanabe, K., Nakazawa, S., Yanagi, T. and Kanbara, H. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in p190 (MSA1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, 51, 81-90.
- Jongwutiwes, S., Tanabe, K. and Kanbara, H. Sequence conservation in the C-terminal part of the precursor to the major merozoite surface proteins (MSP1) of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1993, 59, 95-100.
- Jongwutiwes, S., Tanabe, K., Hughes, M.K., Kanbara, H. and Hughes, A.L. Allelic variation in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 51, 659-668.
- Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. A vaccine candidate from the asexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature*, 1998, 333, 74-76.
- Kerr, P.J., Ranford-Cartwright, L. and Walliker, D. Proof of intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1994, 241-248.
- Khusmith, S., Charoenvit, Y., Kumar, S., Sedegah, M., Beaudoin, R.L. and Hoffman, S.L. Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science*, 1991, 252, 715-718.
- Kimura, E., Mattei, D., Di Santi, S.M. and Scherf, A. Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* : high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived from malaria patients. *Gene*, 1990, 91, 57-62.

- Lockyer, M.J., Marsh, K. and Newbold, C.J. Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1989, 37, 275-280.
- Marshall, V.M., Coppel, R.L., Anders, R.F. and Kemp, D.J. Two novel alleles within subfamilies of the merozoite surface antigen 2 (MSA-2) of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, 50, 181-184.
- McBride, J.S., Newbold, C.I. and Anand, r. Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Exp. Med.*, 1985, 161, 160-180.
- Nussenzweig, R.S. and Long, C.A. Malaria vaccines : multiple targets. *Science*, 1994, 265, 1381-1383.
- Muller, H.M., Reckmann, I., Hollingdale, M.R., Bujard, H., Robson, K.J.H. and Crisanti, A. Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *EMBO. J.*, 1993, 12, 2881-2889.
- Nussenzweig, V. and Nussenzweig, R.S. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv. Immunol.*, 1989, 45, 283-334.
- Paul, R.E.L., Hackford, I., Brockman, A., Muller-Graf, C., Price, R., Luxemberger, C., White, N.J., Nosten, F. and Day, K.P. Transmission intensity and *Plasmodium falciparum* diversity on the northwestern border of Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1998, 58, 13-95-203.
- Riley, E.M., Allen, S.J., Wheeler, J.G., Blackman, M.J., Bennett, S., Takacs, B., Schonfeld, H.J., Holder, A.A., and Greenwood, B.M. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.*, 1992, 14, 321-337.
- Robson, K.J.H., Hall, J.R.S., Davies, L.C., Crisanti, A., Hill, A.V.S. and Wellems, T.E. Polymorphism of the TRAP gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc. R. Soc. Lond.*, 1990, 242, 205-216.

- Robson, K.J.H., Hall, J.R.S., Jennings, M.W., Harris, T.J.R., March, K., Newbold, C.I., Tate, V.E. and Weatherall, D.J. A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin, and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature*, 1988, 335, 79-82.
- Rzepczyk, C.M., Ramasamy, R., Mutch, D.A., Ho, P.C., Battistutta, D., Anderson, K.L., Parkinson, D., Doran, T.J. and Honeyman, M. Analysis of human T cell response to two *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigens. *Eur. J. Immunol.*, 1989, 19, 1797-1802.
- Saul, A., Lord, r., Jones, G.L. and Spencer, L. Protective immunization with invariant peptides of the *Plasmodium falciparum* antigen MSA2. *J. Immunol.*, 1992, 148, 208-211.
- Scarselli, E., Tolle, R., Knita, O., Diallo, M., Muller, H., Fruh, K., Doumbo, O., Crisanti, A. and Bujard, H. Analysis of the human antibody response to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.*, 1993, 61, 3490-3495.
- Scherf, A., Mattei, D. and Sarthou, J.L. Multiple infections and unusual distribution of block 2 of the MSA1 gene of *Plasmodium falciparum* detected in West Africa clinical isolates by polymerase chain reaction analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1991, 44, 297-300.
- Sharma, P., Gharadwaj, A., Bhasin, V.K., Sailaja, V.N. Chauhan, V.S. Antibodies to a conserved-motif peptide sequence of the *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein and circumsporozoite protein recognize a 78-kilodalton protein in the asexual blood stages of the parasite and inhibit merozoite invasion in vitro. *Infect. Immun.*, 1996, 64, 2172-2179.
- Shi, Y., Alpers, M.P., Poveda, M.M. and Lal, A.A. Diversity of the immunodominant determinants of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* parasites from malaria-endemic regions of Papua New Guinea and Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992, 47, 844-851.

- Siddiqui, W.A., Tam, L.Q., Kramer, K.J., Hui, G.S.N., Case, S.E., Yamaga, K.M., Chang, S.P., Chan, E.B.T. and Kan, S.C. Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1987, 84, 3014-3018.
- Smythe, J.A., Coppel, R.L., Day, K.P., Martin, R.K., Oduola, A.M.J., Kemp, D.J. and Anders, R.F. Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1991, 88, 1751-1755.
- Stoute, J.A., Slaoui, M., Heppner, G., et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Eng. J. Med.*, 1997, 336, 86-91.
- Tanabe, K., MacKay, M., goman, M. and Scaife, J. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.*, 1987, 195, 273-287.
- Taylor, r.r., Smith, D.B., Robinson, V.J., McBride, J.G. and Riley, E.M. Human antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the IgG 3 subclass. *Infect. Immun.*, 1995, 63, 4382-4388.
- Templeton, t.J. and Kaslow, D.C. Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. *Mol. Biochem. Parasitology.*, 1997, 84, 13-24.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F. and Ayala, F.J. A clonal theory of parasitic protozoa. The population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and toxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990, 87, 2414-2418.
- Tolle, R., Fruh, K., dumbo, O., Koita, O., N'diaye, M., Fischer, A., Dietz, K. and Bujard, H. Association between the humoral immune response against *P. falciparum* blood stage antigen gp195 and control of malaria infections: a prospective study. *Infect. Immun.*, 1993, 61, 40-47.

- Wizel, B., Rogers, W.O., Houghton, R.A., Lanar, D.E., Tine, J.A. and Hoffman, S.L.
Induction of murine cytotoxic T lymphocytes against *Plasmodium falciparum*
sporozoite surface protein 2. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 1487-1495.
- Wizel, B., Houghton, R.A., Parker, K.C., Coligan, J.E., Church, P., Gordon, D.M.,
Ballou, W.R. and Hoffman, S. Irradiated sporozoite vaccine induces HLA-B8-
restricted cytotoxic T lymphocyte responses against two overlapping epitopes of the
Plasmodium falciparum sporozoite surface protein 2. *J. Exp. Med.*, 1995, 182, 1435-
1445.
- Wahlgren, M., Fernandez, V., Scholander, C. and Carlson, J. Rosetting. *Parasitol. Today*,
1994, 10, 73-79.
- Wang, R., Charoenvit, Y., Corradin, G., De La Vega, P., Franke, E.D. and Hoffman, S.L.
Protection against malaria by *Plasmodium yoelli* sporozoite surface protein 2 linear
peptide induction of CD4+T cell-and IFN- γ - dependent elimination of infected
hepatocytes. *J. Immunol.*, 1996, 157, 4061-4067.
- Weiss, W.R., Mellouk, S., Houghton, R.A., Sedegah, M., Kumar, S., Good, M.F., Berzofsky,
J.A., Miller, L.H. and Hoffman, S.L. Cytotoxic T cells recognize a peptide from the
circumsporozoite protein on malaria-infected hepatocytes. *J. Exp. Med.*, 1990,
171, 763-773.
- Wellems, T.E., Walker-Jonah, A. and Panton, L.J. Genetic mapping of the chloroquin-
resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA., 1991, 88, 3382-3386.
- Yoshida, N., Di Santi, S.M., Dutra, A.P., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V. and
Enea, V. *Plasmodium falciparum*: restricted polymorphism of T cell epitopes of
the circumsporozoite protein in Brazil. *Exp. Parasitol.*, 1990, 71, 386-392.

Output ที่ได้

ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

- (1) Jongwutiwes S, Putapornpip C, Kanbara H and Tanabe K. Variation in the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1998, 92, 349-353.
- (2) Jongwutiwes S and Putapornpip C. The merozoite surface protein 2(MSP2) gene of *Plasmodium falciparum* from a Thai isolate. *Journal of the Medical Association of Thailand* 1996, 79(suppl1), S33-S39.
- (3) Kaneko O, Jongwutiwes S, Kimura K, Kanbara H, Ishii A and Tanabe K. *Plasmodium falciparum* : Variation in block 4 of the precursor to the major merozoite surface proteins in natural populations. *Experimental Parasitology* 1996, 84, 92-95.

ผลงานอื่นที่เกี่ยวข้องที่อาศัยเงินทุน สกว. บางส่วนในโครงการ และได้กล่าวถึงในกิตติกรรมประกาศ

- (4) Putapornpip C, Jongwutiwes S, Tanabe K and Thaithong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates, *Molecular and Biochemical Parasitology* 1997, 84, 49-56.

ผลงานที่กำลังเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ (ชื่อเรื่องอาจมีการแก้ไขตามความเหมาะสมต่อไป)

5. Jongwutiwes S, et al. Sequence diversity of the merozoite surface protein 2 (MSP2) gene of *Plasmodium falciparum* from Thailand and Brazil.
6. Jongwutiwes S, et al. Stable patterns of sequence diversity in T cell epitopes (Th2R, Th3R) in circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium falciparum* from an endemic area in Thailand.

ผลงานที่เป็นผู้วิจัยร่วมที่กำลังเตรียมต้นฉบับเพื่อการตีพิมพ์

7. Tanabe K, et al. Allelic recombination and linkage disequilibrium in MSP-1 of *Plasmodium falciparum*, the malignant human malaria parasite.

ภาคผนวก

Amino Acid Sequence of Merozoite Surface Protein 2, 3D7/Camp Family

3D7.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAESKPSTGAGGTA----	56
CAMP.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAESKPPTG-T-----	52
806.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAVSNPPT-----	50
OC-B.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMTESNPPT-----	50
947.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMTESKPPT-----	50
OC-A.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMTESNPPT-----	50
838.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAESKTPT-----	50
822, 834B, 946--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAESKTPTGAS-----	53
OD.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMTESKPPTG-T-G-A--S	55
OF-A--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMTESKPPTG-T-G-A--S	55
OK.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMTESNPPTGA-SGSAG--	57
P6br, P34br.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAESKTPTG--SG--A	54
828.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAVSNPPT--G--AVA	54
835.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAVSNPPT--G--AVA	54
OH.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAVSNPPT--G--AVA	54
827.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAVSNPPT--G--AVA	54
OG.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAVSNPPTG--AG--AVA	56
842.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMTESNPPTGAS-G-SAGA	58
844.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAESKTPTG-AGG-SGSA	58
808A.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAVSNPPTG--AG--AVA	56
807, 836.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMEESNPPTG--AG--AVA	56
OR.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAVSNPPTG--AG--AVA	56
OL.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAVSNPPTG--AG--AVA	56
M12br.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMAESKTPTG--AG--AVA	56
815.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMTESKPPTGAGAGA----	56
OM.--aa	1:MKVIKTLISIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIRRSMTESKPPTGAGAGASGSA	60

3D7.--aa	57:G--G--SAG--G--SAG--G--SAG--G--SA--G--GSAG--SG--AGN	82
CAMP.--aa	53:G--G--S--G--SA--G--S--G--A--G--ASAG--NG--ANP	72
806.--aa	51:-----	
OC-B.--aa	51:-----G-A--S--GSAGG--SAG--GS-A--	64
947.--aa	51:-----G--A--G--A--G--A--	56
OC-A.--aa	51:-----G-A-S--GSAGGSAGG--SAG--GS-A--	68
838.--aa	51:G-A--S-G--SAG--SG--A-V-ASA-G-S--GAVASA--GNG--A--	76
822, 834B, 946--aa	54:G-SAG--S-GA--V-ASAG--SG--A-V-ASA-G-S--GAVASA--GNG--A--	84
OD.--aa	56:G-SAG--S-GA--GASGSAG--SG--AGASGSA-G-SG--DGAVASA--RNG--A--	92
OF-A--aa	56:G-SAG--S-GA--GASGSAG--SG--AGASGSA-G-SG--DGAVASA--RNG--A--	92
OK.--aa	58:GS-AG--GSAG--GS-A-GGS-AG--GSAGGSAG--GSAGGSAGG--SAG--GS-A--	96
P6br, P34br.--aa	55:--GA--SGS-AG--S--GA-GA-SG--S-AG--SGA--GA--SGS--AGS--GAG--A-S	87
828.--aa	55:GSGAGAGAVAG--S--GAG--AGA--VAG--S--GAGAGAGAVAGS	88
835.--aa	55:GSGAGAGAVAG--S--GAG--AGA--VAG--S--GAGAGAGAVAGS	88
OH.--aa	55:GSGAGAGAVAG--S--GAG--AGA--VAG--S--GAGAGAGAVAGS	88
827.--aa	55:GSGAGAGAVAG--S--GAG--AGA--VAG--SG--AGAGAGAGAVAGS	90
OG.--aa	57:GS--GAGAVAG--S--GA-GAVAG--S--G--AGA--GAG--AG--AVAGSGAGAGAV--	95
842.--aa	59:G-ASG--SAGA--GASGSAG--ASG--SAGASGSA--GASG--SAGASGSAG--ASGS-A--	102
844.--aa	59:G-GSG--SAG--G-SGSAG--GSG--SAGGSGSA--GSG--SAGGSAGSAG--GSGS-A--	100
808A.--aa	57:GSGAGAGAVAG--SG-AGA-G--AG--AGAG--AGA--VAG--SG--AGAGAGAGAVAGS	100
807, 836.--aa	57:GSGAGAVAGSG--AG-AVA-GSGAG--AVAG--SGA--GAG--AGAVAGSGAGAGAGAVA	104
OR.--aa	57:GSGAGAGAVAG--SG-AGA-GAVAG--SGAG--AGA--GAG--AG--AVAGSGAGAGAVA	102
OL.--aa	57:GSGAGAGAVAG--SG-AGA-GAVAG--SGAG--AGA--GAG--AG--AVAGSGAGAGAVA	102
M12br.--aa	57:GSGAGAGAVAG--SG-AGA-GAVAG--SGAG--AGA--GAG--AGAVAGSGAGAGAVAGS	104
815.--aa	57:--S--G--SAGSRDGAVASAGSRDGAVASAGSRDGAVASAGSRDGAVASAGSRDGAVASA	110
OM.--aa	61:GSRDGAVASAGSRDGAVASAGSRDGAVASAGSRDGAVASAGSRDGAVASAGSRDGAVASA	120

3D7.--aa
 CAMP.--aa
 806.--aa
 OC-B.--aa
 947.--aa
 OC-A.--aa
 838.--aa
 822, 834B, 946--aa
 OD.--aa
 OF-A--aa
 OK.--aa
 P6br, P34br.--aa
 828.--aa
 835.--aa
 OH.--aa
 827.--aa
 OG.--aa
 842.--aa
 844.--aa
 808A.--aa
 807, 836.--aa
 OR.--aa
 OL.--aa
 M12br.--aa
 815.--aa
 OM.--aa

83:GA-D---A---E---GS---SST-P---A---TTTTTNTTTTTTINDAEASTSTSSNP 122
 73:GA-D---A---E---RS---PST-P---A---TPATPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 112
 51:-----GAGAVASAG-N-GADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 94
 65:GGSAG--GSAGS--GD-GNG---ANPGADAERSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 116
 57:-S-G---SAGSRDGAVASARNGANPGADAEGSSSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 110
 69:GGSAG--GSAGS--GD-GNG---ANPGADAERSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 120
 77:--NPG---ADA-EG-----S-S--ST-PA-TTTTTTTTTTTTTINDAEASTSTSSNP 118
 85:--NPG---ADA-EG-----S-S--ST-PA-TTTTTTTTTTTTTINDAEASTSTSSNP 126
 93:--NPG---ADA-EG-----S-S--ST-PA-TTTTTTTTTTTTTINDAEASTSTSSNP 128
 93:--NPG---ADA-EG-----S-S--ST-PA-TTTTTTTTTTTTTINDAEASTSTSSNP 134
 97:GGSAG--GSAGS--GD-GNG---ANPGADAERSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 148
 88:-----GS-AGSGDGAVASARNGANPGADAERSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 140
 89:G--AGAGAVAGS--GAGAVASAG-N-GADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 142
 89:G--AGAGAVAGS--GAGAVASAG-N-GADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 142
 89:G--AGAGAVAGS--GAGAVASAG-N-GADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 142
 91:G--AGAGAVAGS--GAGAVASAG-N-GADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 144
 96:-----AVAGSGAGAVASAG-N-GADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 144
 103:G-ASG---SAG-ASG-----SAGSGADAERSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 150
 101:G-GGG---SAGSGAG-----NGANPGADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 150
 101:G--AGAGAVAGSGAGAGAVASAG-N-GADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 156
 105:G--SGAGAGAVAGSGAGASA--G-N-GADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 158
 103:G--SGAGAGAVAGSGAGAVASAG-N-GADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 158
 103:G--SGAGAGAVAGSGAGAVASAG-N-GADAKRSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 158
 105:G--AGAGAVAGSGAGAVASAGNGANPGADAERSPSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 162
 111:GSRDGAVASAGSRDGAVASARNGANPGADAEGSSSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 170
 121:GSRDGAVASAGSRDGAVASARNGANPGADAEGSSSTPATTTTTTINDAEASTSTSSNP 180

3D7.--aa
 CAMP.--aa
 806.--aa
 OC-B.--aa
 947.--aa
 OC-A.--aa
 838.--aa
 822, 834B, 946--aa
 OD.--aa
 OF-A--aa
 OK.--aa
 P6br, P34br.--aa
 828.--aa
 835.--aa
 OH.--aa
 827.--aa
 OG.--aa
 842.--aa
 844.--aa
 808A.--aa
 807, 836.--aa
 OR.--aa
 OL.--aa
 M12br.--aa
 815.--aa
 OM.--aa

123:NHKNAETNPKGKGEVQEPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 182
 113:NHKNAETNPKGKGEVQKPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 172
 95:NHKNAETNPKGKGEVQEPNQANKETQNNNSNVQDDPQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 154
 117:NHKNAET-----NQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 165
 111:NHKNAETNPKGNGGVQ--PNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 169
 121:NHKNAET-----NQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 169
 119:NHKNAETNPKGNGGVQEPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 178
 127:NHKNAETNPKGNGGVQEPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 186
 129:NHKNAETNPKGKGEVQEPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 188
 135:NHKNAETNPKGKGEVQEPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 194
 149:NHKNAET-----NQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 197
 141:NHKNAETNPKGKGEVQKPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 200
 143:NHKNAETNPKGKGEVQKPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 202
 143:NHKNAETNPKGKGEVQKPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 202
 143:NHKNAETNPKGKGEVQKPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 202
 145:NHKNAETNPKGKGEVQKPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 204
 145:NHKNAETNPKGKGEVQKPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 204
 151:NHKNAETNPKGNGGVQKPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 210
 151:NHKNAETNPKGKGEVQEPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 210
 157:NHKNAETNPKGKGEVQKPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 216
 159:NHKNAETNPKGKGEVQEPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 218
 159:NHKNAETNPKGNGKVQEPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 218
 159:NHKNAETNPKGNGKVQEPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 218
 163:NHKNAETNPKGKGEVQKPNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 222
 171:NHKNAETNPKGNGKVQ--PNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 229
 181:NHKNAETNPKGNGEVQ--PNQANKETQNNNSNVQDSQTKSNVPPPTQDADTKSPTAQPEQAE 239

3D7.--aa	183: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	242
CAMP.--aa	173: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	232
806.--aa	155: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	214
OC-B.--aa	166: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	225
947.--aa	170: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	229
OC-A.--aa	170: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	229
838.--aa	179: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	238
822, 834B, 946--aa	187: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	246
OD.--aa	189: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	248
OF-A--aa	195: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	254
OK.--aa	198: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	257
P6br, P34br.--aa	201: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	260
828.--aa	203: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	262
835.--aa	203: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	262
OH.--aa	203: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	262
827.--aa	205: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	264
OG.--aa	205: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	264
842.--aa	211: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	270
844.--aa	211: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	270
808A.--aa	217: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	276
807, 836.--aa	219: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	278
OR.--aa	219: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	278
OL.--aa	219: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	278
M12br.--aa	223: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	282
815.--aa	230: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	289
OM.--aa	240: NSAPTAEQTESPELQSAPENKGTGQHGHHMGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATS	299

**** *****

3D7.--aa	243: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	272
CAMP.--aa	233: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	262
806.--aa	215: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	244
OC-B.--aa	226: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	255
947.--aa	230: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	259
OC-A.--aa	230: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	259
838.--aa	239: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	268
822, 834B, 946--aa	247: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	276
OD.--aa	249: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	278
OF-A--aa	255: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	284
OK.--aa	258: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	287
P6br, P34br.--aa	261: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	290
828.--aa	263: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	292
835.--aa	263: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	292
OH.--aa	263: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	292
827.--aa	265: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	294
OG.--aa	265: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	294
842.--aa	271: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	300
844.--aa	271: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	300
808A.--aa	277: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	306
807, 836.--aa	279: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	308
OR.--aa	279: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	308
OL.--aa	279: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	308
M12br.--aa	283: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	312
815.--aa	290: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	319
OM.--aa	300: LLNNSNIAAINKFVVLISATLVLSFAIFI	329

** *****

Nucleotide Sequence of Merozoite Surface Protein 2, 3D7/Camp Family

3D7	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
CAMP	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
806	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
OC-B	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
947	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
OC-A	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
838	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
822, 834B, 946	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
OD	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
OF-A	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
OK	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
P6br, P34br	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
828	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
835	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
OH	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
827	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
OG	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
842	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
844	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
808A	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
807, 836	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
OR	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
OL	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
M12br	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
815	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60
OM	1: ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGGTTACCTTTAATATT	60

3D7	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
CAMP	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
806	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OC-B	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
947	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OC-A	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
838	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
822, 834B, 946	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OD	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OF-A	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OK	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
P6br, P34br	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
828	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
835	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OH	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
827	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OG	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
842	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
844	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
808A	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
807, 836	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OR	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OL	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
M12br	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
815	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OM	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120

3D7
CAMP
806
OC-B
947
OC-A
838
822, 834B, 946
OD
OF-A
OK
P6br, P34br
828
835
OH
827
OG
842
844
808A
807, 836
OR
OL
M12br
815
OM

152:	-G-T-G-CT-G-G-TGGT-A--C-----	-----TGCTGG-TG-----	172
203:	-----A-TG-G-TGCTA-----	-----A-T-C-----CT-----	216
149:	-----	-----	
144:	---T---C-----C-----	---T-A---C---T---	150
136:	-----A-----G-TA-----	-----A-----GC-----	142
190:	-GC---T-G-----GT-G-G-TAGTGC---T-G-----	-----G-T-G-G-TA-----	211
161:	---G-----T-AG-TGC-----T-G-----GT-----T-C---T---	-----	174
183:	---T-G-C-----T-AG-TGC-----T-G-----GT-----T-C---T---	-----	198
172:	-GCTGG-T-TC-----TG-G-TGCT-G-G-T-G-----C-T-A-----G-T-G-G-TA-----	-----	199
172:	-GCTGG-T-TC-----TG-G-TGCT-G-G-T-G-----C-T-A-----G-T-G-G-TA-----	-----	199
199:	AG-T-G-CT-G-G-TGGT-AG-TGCT-G-G-T-G-----GT-A-GTGCTGG-TG-----	-----	232
208:	-GCTGG-T-TC-----TG-G-TGCT-G-G-T-G-----C-T-A-----G-T-G-G-TA-----	-----	235
219:	---T-G-CTGG---T-T-C---TG-----G-T-G---C-----TGGTGCT-GGTGCTG	-----	247
219:	---T-G-CTGG---T-T-C---TG-----G-T-G---C-----TGGTGCT-GGTGCTG	-----	247
219:	---T-G-CTGG---T-T-C---TG-----G-T-G---C-----TGGTGCT-GGTGCTG	-----	247
219:	---T-G-CTGGTTCTGGTGC---TG-----G-T-G---C-----TGGTGCT-GGTGCTG	-----	253
213:	---T-G-CTGGTTCTGGTGC---TG-----G-T-G---C-----TGGTGCT-GGTGCTG	-----	247
214:	-GCTGG-T-GC-T-A-GT---G-G-TAGTGCTGG-T-GC-T-A-----G-T-G-G-TA-----	-----	247
205:	AG-T-G-CT-G-G-TGGT-AG-TGGTAGTGCT-G-----GT-----G-G-TAG-TG-----	-----	238
226:	-GCTGGTCTGGTGCTGGTGC---TG-T---TGCTGGTT-C-----TGGTGCT-GGTGCTG	-----	271
214:	-GCTGGTTCTGGTCTGGTGC---TG-T---TGCTGGTT-C-----TGGTGCT-GGTGCTG	-----	259
225:	---T-G-CTGGTTCTGGTGC---TG-----G-T-G---C-----TGGTGCT-GGTGCTG	-----	259
225:	---T-G-CTGGTTCTGGTGC---TG-----G-T-G---C-----TGGTGCT-GGTGCTG	-----	259
225:	---T-G-CTGGTTCTGGTGC---TG-----G-T-G---C-----TGGTGCT-GGTGCTG	-----	259
238:	-GCTGGTTCTCGTGATGGTGCTGTTGCTAGTGCTGGTTCTCGTGATGGTGCT-GTTGCTA	-----	295
238:	-GCTGGTTCTCGTGATGGTGCTGTTGCTAGTGCTGGTTCTCGTGATGGTGCT-GTTGCTA	-----	295

3D7
CAMP
806
OC-B
947
OC-A
838
822, 834B, 946
OD
OF-A
OK
P6br, P34br
828
835
OH
827
OG
842
844
808A
807, 836
OR
OL
M12br
815
OM

173:GTAG-T-G-CT-G-G-T-GGT-AG-TGCT-G-G-T-G-----GT-A-GTGCTGG-TG	208
217:G-G-T-G-----C-A-----G-A-----T-G-----C-TGA-----G	231
149:-----	
151:G-G-T-G-C-----T-A-----G-T-G-----GT-A-GTGCTGG-TG	172
143:-----C-----TC-C-T-A-----CT-G-G-T-G-----C-----TG-----G-TG	160
212:GT-GC-----T-G-----GT-G-G-TA-----G-T-GC-----T-G-G	230
175:G-G-T-G-C-----T-GT-----TGC-----T-A-GTGC-----TG	193
199:G-G-T-G-C-----T-GT-----TGC-----T-A-GTGC-----TG	217
200:GT-GCTGG-T-TC-----TG-G-TGCT-G-G-T-G-----C-T-A-----G-T-G-G	227
200:GT-GCTGG-T-TC-----TG-G-TGCT-G-G-T-G-----C-T-A-----G-T-G-G	227
233:GTAG-T-G-CT-G-G-T-GGT-AG-TGCT-G-G-T-G-----GT-A-GTGCTGG-TG	268
236:GT-GCTGG-T-TC-----TG-G-TGCT-G-G-T-G-----C-T-A-----G-T-G-G	263
248:GT-GC-----T-G-T-T-GCT-G-G-T-T-CTGGTGCTGGTGC-----TG-G-TG	280
248:GT-GC-----T-G-T-T-GCT-G-G-T-T-CTGGTGCTGGTGC-----TG-G-TG	280
248:GT-GC-----T-G-T-T-GCT-G-G-T-T-CTGGTGCTGGTGC-----TG-G-TG	280
254:GT-GC-----T-G-T-T-GCT-G-G-T-T-CTGGTGCTGGTGC-----TG-G-TG	286
248:GT-GC-----T-G-T-T-GCT-G-G-T-T-CTGGTGCTGGTGC-----TG-G-TG	286
248:GT-GCTGG-T-GC-T-A--GT-G-G-TAGTGCTGG-T-GC-T-A-----G-T-G-G	281
239:GTAG-T-G-CT-G-G-T-GGT-AG-TGGTAGTCT-G-----GT-----G-G-TAG-TG	274
272:GT-GCTGG-T-GC-TGGT-GCT--GTTGCTGGTTCTGGTGCTGGTGCTGGTGCT-GTTG	322
260:GT-GCTGG-T-GC-TGTT-GCTG--GTT-CTGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGTGCT-GTTG	310
260:GT-GCTGG-T-GC-TG-TTGCT--G-G-T-T-CTGGTGCTGGTGCTGGTGCT-GTTG	304
260:GT-GCTGG-T-GC-TG-TTGCT--G-G-T-T-CTGGTGCTGGTGCTGGTGCT-GTTG	304
260:GT-GCTGG-T-GC-TG-T-C-----GCTGGTTCTGGTGCTGGTGCTGGTGCT-GTTG	304
296:GT-GCTGGTTCTCGTGAT--GGTGCTGTTGCTAGTGCTGGTTCTCGTGATGGTGCT-GTTG	352
296:GT-GCTGGTTCTCGTGAT--GGTGCTGTTGCTAGTGCTGGTTCTCGTGATGGTGCT-GTTG	352

3D7
CAMP
806
OC-B
947
OC-A
838
822, 834B, 946
OD
OF-A
OK
P6br, P34br
828
835
OH
827
OG
842
844
808A
807, 836
OR
OL
M12br
815
OM

209:GTAGTGCTGGTGGTAG-TGC-----T-G-----G-T-T-C-----T-G-G-T 237
232:--A-----GA-----A-----G-TC-C--A-AGTAC- 245
149:-----CTG-----G-T-G-CTGGTGC--TG-T 164
173:GTAGTGCTGGTGGTAG-TGCT-G-G-T-G-----G-TAGTGCTGG--T-G-G-TAGTGCT 216
161:CT-G-G-T-G-----C-T-A-----G-T-G-----G-TAGTGCTGGTTCCTGATGGTGGCT 198
231:-T-T-C-----TG-----G-----T-G-A-----T-G-G-TA-----A-----T 246
194:GT-T-C--T-G-G-TGC-----T-----G-T-TGC-----TA--G-T 213
218:GT-T-C--T-G-G-TGC-----T-----G-T-TGC-----TA--G-T 237
228:-TAGTGCTGG-T-TC-----TG--G--TG-A-----T-G-G-T-G--CT 252
228:-TAGTGCTGG-T-TC-----TG--G--TG-A-----T-G-G-T-G--CT 252
269:GTAGTGCTGGTGGTAG-TGCT-G-G-T-G-----G-TAGTGCTGG--T-G-G-TAGTGCT 312
264:-TAGTGCTGG-T-TC-----TG--G--TG-A-----T-G-G-T-G--CT 288
281:CT-G--T-----T-GCT-----G-G-T-T-CTG-----G-T-G-CTGGTGC--TG-T 308
281:CT-G--T-----T-GCT-----G-G-T-T-CTG-----G-T-G-CTGGTGC--TG-T 308
281:CT-G--T-----T-GCT-----G-G-T-T-CTG-----G-T-G-CTGGTGC--TG-T 308
287:CT-G--T-----T-GCT-----G-G-T-T-CTG-----G-T-G-CTGGTGC--TG-T 314
287:CT-G--T-----T-GCT-----G-G-T-T-CTG-----G-T-G-CTGGTGC--TG-T 314
282:-TAGTGC-----TG-----GTGCTAG-----TGCTAGTGCTGGTGGTAGTGCT 324
275:GTAGTGCTGGTGGTAG-TGGTAGTGCT-G-----G-T-G-G-TGG-----T-G-G-TAGTGCT 318
323:CTGG--T-----T-CTG-----GTGCTGGTGGCTG-----G-T-G-C-----TG-----T 350
311:CTGGTTCCTGG--T-GCTG-----GTGCTGGTGGCTG-T--TGCTGGTTCCTGGTGC--TG-- 355
305:CTGGTTCCTGG--T-GCTG-----GTGCTGGTGGCTG-T--TGCTGGTTCCTGGTGC--TG-- 354
305:CTGGTTCCTGG--T-GCTG-----GTGCTGGTGGCTG-T--TGCTGGTTCCTGGTGC--TG-- 354
305:CTGGTTCCTGG--T-GCTG-----GTGCTGGTGGCTG-T--TGCTGGTTCCTGGTGC--TG-- 354
353:CTAGTGCTGGTTCCTGG-TGA--TG--G--TGCT-GT--T-G--C-T-A----- 385
353:CTAGTGCTGGTTCCTGG-TGATGGTGGCT-GT--TGCTAGTGCTGGTTCCTGGTGGTGGCT 408

3D7
CAMP
806
OC-B
947
OC-A
838
822, 834B, 946
OD
OF-A
OK
P6br, P34br
828
835
OH
827
OG
842
844
808A
807, 836
OR
OL
M12br
815
OM

238:-G--C-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTGAGGGAAGTTCAGTAC 275
246:--T-C-----C-C-----GCT-A-C--T-C-----C-----CG--C--TAC 263
165:--T-GCTAGTGC-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTAA--GA-G--AAGT-C 202
217:GGTT-CTGGTGGATGGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGAGAGAAGTCCAAGTAC 275
199:-GTTGCTAGTGCTCGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGAGGGAAGTTCAGTAC 257
247:GG-TGCTA-----A-----T-C-----CTGGTGCAGATGCT--GAGA-G--AAGT-C 280
214:-G--C-----TGGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGAGGGAAGTTCAGTAC 263
238:-G--C-----TGGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGAGGGAAGTTCAGTAC 287
253:-GTTGCTAGTGCTCGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGAGGGAAGTTCAGTAC 311
253:-GTTGCTAGTGCTCGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGAGGGAAGTTCAGTAC 311
313:GGTT-CTGGTGGATGGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGAGAGAAGTCCAAGTAC 371
289:-GTTGCTAGTGCTCGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGAGAGAAGTCCAAGTAC 347
309:--T-GCTAGTGC-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTAA--GA-G--AAGT-C 346
309:--T-GCTAGTGC-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTAA--GA-G--AAGT-C 346
309:--T-GCTAGTGC-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTAA--GA-G--AAGT-C 346
315:--T-GCTAGTGC-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTAA--GA-G--AAGT-C 352
315:--T-GCTAGTGC-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTAA--GA-G--AAGT-C 352
325:GG-TGCTAGTG--GT-A--GTGCTGGTTCCTGGTGCAGATGCT--GAGA-G--AAGT-C 370
319:GGTT-CTGGTGGCTGGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTAAGAGAAGTCCAAGTAC 377
351:--T-GCTAGTGC-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTAA--GA-G--AAGT-C 388
356:-GT-GCTAGTGC-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTAA--GA-G--AAGT-C 394
355:-GTCCTAGTGC-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTAA--GA-G--AAGT-C 394
355:-GTTGCTAGTGC-----T-G-G-TAA--TGGTGCAGATGCTAA--GA-G--AAGT-C 394
355:-GTCGCTAGTGCTGGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGA--GA-G--AAGT-C 406
386:-G-TGC-----C-CGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGAGGGAAGTTCAGTAC 437
409:-GTTGCTAGTGCTCGTAATGGTGGCTAATCCTGGTGCAGATGCTGAGGGAAGTTCAGTAC 467

3D7
CAMP
806
OC-B
947
OC-A
838
822, 834B, 946
OD
OF-A
OK
P6br, P34br
828
835
OH
827
OG
842
844
808A
807, 836
OR
OL
M12br
815
OM

276: TCCCGCTACTACCACAACCTACCAAACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 335
264: TCCCG-----CT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 305
203: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 251
276: TCCCG-----CT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 317
258: TCCCG-----CT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 299
281: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 329
264: TCCCGCTACTACCACAACCTACCACAACCTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 323
288: TCCCGCTACTACCACAACCTACCACAACCTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 347
312: TCCCG-----CT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 353
312: TCCCGCTACTACCACAACCTACCACAACCTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 371
372: TCCCG-----CT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 413
348: TCCCG-----CT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 389
347: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 395
347: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 395
347: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 395
353: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 401
353: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 401
371: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 419
378: TCCCG-----CT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 419
389: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 437
395: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 443
395: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 443
395: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 443
407: -CAAG-TACT-CC-C-GCT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 455
438: TCCCG-----CT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 479
468: TCCCG-----CT-----ACTACCACAACCTACCACAACCTACTAATGATGCAGA 509
* * * * *

3D7
CAMP
806
OC-B
947
OC-A
838
822, 834B, 946
OD
OF-A
OK
P6br, P34br
828
835
OH
827
OG
842
844
808A
807, 836
OR
OL
M12br
815
OM

336: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 395
306: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 365
252: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 311
318: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 363
300: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 359
330: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 375
324: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 383
348: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 407
354: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 413
372: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 431
414: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 459
390: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 449
396: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 455
396: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 455
396: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 455
402: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 461
402: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 461
420: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 479
420: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 479
438: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 497
444: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 503
444: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 503
444: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 503
456: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 515
480: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 539
510: AGCATCTACCAGTACCTCTTCAGAAAATCCAAATCATAAAAAATGCCGAAACAAATCCAAA 569
* * * * *

3D7
CAMP
806
OC-B
947
OC-A
838
822, 834B, 946
OD
OF-A
OK
P6br, P34br
828
835
OH
827
OG
842
844
808A
807, 836
OR
OL
M12br
815
OM

396: AGGTAAGGAGAACTTCAAGAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 455
366: AGGTAAAGGAGAAGTTCAAAAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 425
312: AGGTAATGGAAAAGTTCAAGAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 371
364: -----G-----A-AA-CAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 404
360: AGGTAATGGAGGAGTTC---AACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 416
376: -----G-----AAA-CAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 416
384: AGGTAATGGAGGAGTTCAAGAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 443
408: AGGTAATGGAGGAGTTCAAGAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 467
414: AGGTAAAGGAGAAGTTCAAGAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 473
432: AGGTAAAGGAGAAGTTCAAGAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 491
460: -----G-----A-AA-CAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 500
450: AGGTAAAGGAGAAGTTCAAAAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 509
456: AGGTAAAGGAAAAGTTCAAAAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 515
456: AGGTAAAGGAGAAGTTCAAAAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 515
456: AGGTAAAGGAGAAGTTCAAAAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 515
462: AGGTAAAGGAAAAGTTCAAAAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 521
462: AGGTAAAGGAGAAGTTCAAAAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 521
480: AGGTAATGGAGGAGTTCAAAAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 539
480: AGGTAAAGGAGAAGTTCAAGAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 539
498: AGGTAAAGGAAAAGTTCAAAAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 557
504: AGGTAAAGGACAAGTTCAAGAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 563
504: AGGTAATGGAAAAGTTCAAGAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 563
504: AGGTAAAGGAGAAGTTCAAGAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 563
516: AGGTAAAGGAGAAGTTCAAAAACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 575
540: AGGTAATGGAAAAGTTC---AACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 596
570: AGGTAATGGAGAAGTTC---AACCAATCAAGCAAATAAAGAACTCAAAATAACTCAA 626
** *****

3D7
CAMP
806
OC-B
947
OC-A
838
822, 834B, 946
OD
OF-A
OK
P6br, P34br
828
835
OH
827
OG
842
844
808A
807, 836
OR
OL
M12br
815
OM

456: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 515
426: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 485
372: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 431
405: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 464
417: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 476
417: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 476
444: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 503
468: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 527
474: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 533
492: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 551
501: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 560
510: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 569
516: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 575
516: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 575
516: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 575
522: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 581
522: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 581
540: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 599
540: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 599
558: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 617
564: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 623
564: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 623
564: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 623
576: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 635
597: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 656
627: TGTTCAACAAGACTCTCAAACCTAAATCAAATGTTCCACCCACTCAAGATGCAGACACTAA 686

3D7
 CAMP
 806
 OC-B
 947
 OC-A
 838
 822, 834B, 946
 OD
 OF-A
 OK
 P6br, P34br
 828
 835
 OH
 827
 OG
 842
 844
 808A
 807, 836
 OR
 OL
 M12br
 815
 OM

516: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 575
 486: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 545
 432: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 491
 465: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 524
 477: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 536
 477: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 536
 504: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 563
 528: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 587
 534: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 593
 552: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 611
 561: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 620
 570: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAATAGCCGAACAACTGA 629
 576: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 635
 576: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 635
 576: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 635
 582: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 641
 582: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 641
 600: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 659
 600: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 659
 618: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 677
 624: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 683
 624: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 683
 624: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 683
 636: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAATAGCCGAACAACTGA 695
 657: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 716
 687: AAGTCTTACTGCACAACCTGAACAAGCTGAAAATTCTGCTCCAACAGCCGAACAACTGA 746

3D7
 CAMP
 806
 OC-B
 947
 OC-A
 838
 822, 834B, 946
 OD
 OF-A
 OK
 P6br, P34br
 828
 835
 OH
 827
 OG
 842
 844
 808A
 807, 836
 OR
 OL
 M12br
 815
 OM

576: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 635
 546: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 605
 492: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 551
 525: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 584
 537: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 596
 537: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 596
 564: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 623
 588: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 647
 594: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 653
 612: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 671
 621: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 680
 630: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 689
 636: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 695
 636: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 695
 636: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 695
 642: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 701
 642: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 701
 660: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 719
 660: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 719
 678: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 737
 684: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 743
 684: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 743
 684: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 743
 696: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 755
 717: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 776
 747: ATCCCCCGAATTACAATCTGCACCAGAGAATAAAGGTACAGGACAACATGGACATATGCA 806

3D7
 CAMP
 806
 OC-B
 947
 OC-A
 838
 822, 834B, 946
 OD
 OF-A
 OK
 P6br, P34br
 828
 835
 OH
 827
 OG
 842
 844
 808A
 807, 836
 OR
 OL
 M12br
 815
 OM

636: TGGTGCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 695
 606: TGGTGCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 665
 552: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 611
 585: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 644
 597: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 656
 624: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 683
 648: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 707
 654: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 713
 672: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 731
 681: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 740
 690: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 749
 696: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 755
 696: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 755
 702: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 761
 702: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 761
 720: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 779
 720: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 779
 738: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 797
 744: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 803
 744: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 803
 744: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 803
 756: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 815
 777: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 836
 807: TGGTTCCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTACCGATGG 866

3D7
 CAMP
 806
 OC-B
 947
 OC-A
 838
 822, 834B, 946
 OD
 OF-A
 OK
 P6br, P34br
 828
 835
 OH
 827
 OG
 842
 844
 808A
 807, 836
 OR
 OL
 M12br
 815
 OM

696: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 755
 666: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 725
 612: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 671
 645: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 704
 657: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 716
 657: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 716
 684: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 743
 708: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 767
 714: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 773
 732: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 791
 741: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 800
 750: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 809
 756: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 815
 756: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 815
 756: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 815
 762: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 821
 762: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 821
 780: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 839
 780: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 839
 798: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 857
 804: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 863
 804: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 863
 804: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 863
 816: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 875
 837: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 896
 867: TAACAAAGAAAACCTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATAACTCTAGTAATATTGCTTC 926

3D7	756: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	815
CAMP	726: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	785
806	672: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	731
OC-B	705: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	764
947	717: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	776
OC-A	717: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	776
838	744: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	803
822, 834B, 946	768: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	827
OD	774: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	833
OF-A	792: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	851
OK	801: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	860
P6br, P34br	810: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	869
828	816: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	875
835	816: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	875
OH	816: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	875
827	822: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	881
OG	822: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	881
842	840: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	899
844	840: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	899
808A	858: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	917
807, 836	864: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	923
OR	864: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	923
OL	864: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	923
M12br	876: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	935
815	897: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	956
OM	927: AATAAATAAAATTTGTTGTTTTAAATTTTCAGCAACACTTGTTTTATCTTTTGCCATATTCAT	986

3D7	816: ATAA	819
CAMP	786: ATAA	789
806	732: ATAA	735
OC-B	765: ATAA	768
947	777: ATAA	780
OC-A	777: ATAA	780
838	804: ATAA	807
822, 834B, 946	828: ATAA	831
OD	834: ATAA	837
OF-A	852: ATAA	855
OK	861: ATAA	864
P6br, P34br	870: ATAA	873
828	876: ATAA	879
835	876: ATAA	879
OH	876: ATAA	879
827	882: ATAA	885
OG	882: ATAA	885
842	900: ATAA	903
844	900: ATAA	903
808A	918: ATAA	921
807, 836	924: ATAA	927
OR	924: ATAA	927
OL	924: ATAA	927
M12br	936: ATAA	939
815	957: ATAA	960
OM	987: ATAA	990

Amino Acid Sequence of Merozoite Surface Protein 2, FC27 Family

FC27.--aa	1:MKVIKTLIIINFFIFVTFNLIKESKYSNTFINNAYNMSIRRSMANEGSNTNSVGNANAPNA	60
JRbr, P62br--aa	1:MKVIKTLIIINFFIFVTFNLIKESKYSNTFINNAYNMSIRRSMANEGSNTNRVDANAPKA	60
OE.--aa	1:MKVIKTLIIINFFIFVTFNLIKESKYSNTFINNAYNMSIRRSMANEGPNTNRVGNANAPKA	60
808B.--aa	1:MKVIKTLIIINFFIFVTFNLIKESKYSNTFINNAYNMSIRRSMANEGSNTNRVDANAPKA	60
814, OF-B--aa	1:MKVIKTLIIINFFIFVTFNLIKESKYSNTFINNAYNMSIRRSMANEGSNTNRVGNANAPKA	60
834A.--aa	1:MKVIKTLIIINFFIFVTFNLIKESKYSNTFINNAYNMSIRRSMANEGSNTTSVGNANAPNA	60
OP.--aa	1:MKVIKTLIIINFFIFVTFNLIKESKYSNTFINNAYNMSIRRSMANEGSNTTSVGNANAPNA	60
OQ.--aa	1:MKVIKTLIIINFFIFVTFNLIKESKYSNTFINNAYNMSIRRSMANEGSNTTSVGNANAPNA	60
837.--aa	1:MKVIKTLIIINFFIFVTFNLIKESKYSNTFINNAYNMSIRRSMANEGSNTTSVGNANAPKA	60

FC27.--aa	61:DTIASGSQSRSTNSASTSTINNGESQTTTPTAADTIASGSQSRSTNSASTSTINNGESQTTT	120
JRbr, P62br--aa	61:DIVASGSQSSSTNSASTSTINNGESQTTTPTA-----	91
OE.--aa	61:DTIASGSQSSSTNSASTSTINNGESQTTTPTA-----	91
808B.--aa	61:DIVASGSQSSSTNSASTSTINNGESQTTTPTA-----	91
814, OF-B--aa	61:DTIASGSQSSSTNSASTSTINNGESQTTTPTA-----	91
834A.--aa	61:DTIASGSQSSSTNSASTSTINNGESQTTTPTA-----	91
OP.--aa	61:DTIASGSQSSSTNSASTSTINNGESQTTTPTA-----	91
OQ.--aa	61:DTIASGSQSSSTNSASTSTINNGESQTTTPTA-----	91
837.--aa	61:DTIASGSQSSSTNSASTSTINNGESQTTTPTA-----	91

FC27.--aa	121:PTAADTPTATESISPPSPPIITTT-----	142
JRbr, P62br--aa	92:---ADTPTATESNSPSPPIITTTKSNPSPPIITTT-----	122
OE.--aa	92:---ADTPTATKSNPSPPIITTTESNSPSPPIITTTESNSPSPPIITTT-----	134
808B.--aa	92:---ADTPTATESNSPSPPIITTTKSNPSPPIITTTESNSPSPPIITTT-----	134
814, OF-B--aa	92:---ADTPTATKSNPSPPIITTTESNSPSPPIITTTESNSPSPPIITTT-----	134
834A.--aa	92:---ADTPTATKSNPSPPIITTTESNSPSPPIITTTESNSPSPPIITTTESNSPSPPIITTT--	146
OP.--aa	92:---ADTPTATKSNPSPPIITTTESNSPSPPIITTTESNSPSPPIITTTESNSPSPPIITTT--	146
OQ.--aa	92:---ADTPTATKSNPSPPIITTTESNSPSPPIITTTESNSPSPPIITTTESNSPSPPIITTT--	146
837.--aa	92:---ADTPTATESNSRSPPIITTTESNSRSPPIITTTESNSRSPPIITTTESNSRSPPIITTTES	148

FC27.--aa	143:-----ESSSSGNAPNKTDGKGEESEKQNELNESTEEGPKAPQEPQTAENENPAAP	192
JRbr, P62br--aa	123:-----ESSSSGNAPNKTDGKGEESEKQNELNESTEEGPKAPQEPQTAENENPAAP	172
OE.--aa	135:-----ESSSSGNAPNKTDGKGEESEKQNELNESTEEGPKAPQEPQTAENENPAAP	184
808B.--aa	135:-----ESSSSGNAPNKTDGKGEESEKQNELNESTEEGPKAPQEPQTAENENPAAP	184
814, OF-B--aa	135:-----ESSSSGNAPNKTDGKGEESEKQNELNESTEEGPKAPQEPQTAENENPAAP	184
834A.--aa	147:-----ESSSSGNAPNKTDGKGEESEKQNELNESTEEGPKAPQEPQTAENENPAAP	196
OP.--aa	147:-----ESSSSGNAPNKTDGKGEESEKQNELNESTEEGPKAPQEPQTAENENPAAP	196
OQ.--aa	147:-----ESSSSGNAPNKTDGKGEESEKQNELNESTEEGPKAPQEPQTAENENPAAP	196
837.--aa	149:NSRSPPIITTTESSSGNAPNKTDGKGEESEKQNELNESTEEGPKAPQEPQTAENENPAAP	208

FC27.--aa	193:ENKGTGQHGHHMHSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATSLNNSSNIASINKFVLI	252
JRbr, P62br--aa	173:ENKGTGQHGHHMHSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATSLNNSSNIASINKFVLI	232
OE.--aa	185:ENKGTGQHGHHMHSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATSLNNSSNIASINKFVLI	244
808B.--aa	185:ENKGTGQHGHHMHSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATSLNNSSNIASINKFVLI	244
814, OF-B--aa	185:ENKGTGQHGHHMHSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATSLNNSSNIASINKFVLI	244
834A.--aa	197:ENKGTGQHGHHMHSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATSLNNSSNIASINKFVLI	256
OP.--aa	197:ESKGTGQHGHHMHSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATSLNNSSNIASINKFVLI	256
OQ.--aa	197:ENKGTGQHGHHMHSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATSLNNSSNIASINKFVLI	256
837.--aa	209:ENKGTGQHGHHMHSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGAATSLNNSSNIASINKFVLI	268

FC27.--aa	253:SATLVLSFAIFI	264
JRbr, P62br--aa	233:SATLVLSFAIFI	244
OE.--aa	245:SATLVLSFAIFI	256
808B.--aa	245:SATLVLSFAIFI	256
814, OF-B--aa	245:SATLVLSFAIFI	256
834A.--aa	257:SATLVLSFAIFI	268
OP.--aa	257:SATLVLSFAIFI	268
OQ.--aa	257:SATLVLSFAIFI	268
837.--aa	269:SATLVLSFAIFI	280

Nucleotide Sequence of Merozoite Surface Protein 2, FC27 Family

FC27	1: ATGAAGGTAATTAAAAACATTGTCCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGTACCTTTAATATT	60
JRbr, P62br	1: ATGAAGGTAATTAAAAACATTGTCCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGTACCTTTAATATT	60
OE	1: ATGAAGGTAATTAAAAACATTGTCCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGTACCTTTAATATT	60
808B	1: ATGAAGGTAATTAAAAACATTGTCCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGTACCTTTAATATT	60
814, OF-B	1: ATGAAGGTAATTAAAAACATTGTCCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGTACCTTTAATATT	60
834A	1: ATGAAGGTAATTAAAAACATTGTCCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGTACCTTTAATATT	60
843	1: ATGAAGGTAATTAAAAACATTGTCCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGTACCTTTAATATT	60
OP	1: ATGAAGGTAATTAAAAACATTGTCCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGTACCTTTAATATT	60
OQ	1: ATGAAGGTAATTAAAAACATTGTCCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGTACCTTTAATATT	60
837	1: ATGAAGGTAATTAAAAACATTGTCCTATTATAAAATTTCTTTATTTTGTACCTTTAATATT	60

FC27	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
JRbr, P62br	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OE	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
808B	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
814, OF-B	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
834A	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
843	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OP	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
OQ	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120
837	61: AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGTATAAGG	120

FC27	121: AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGTGTAGGTGCAAATGCTCCAAATGCT	180
JRbr, P62br	121: AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGGTTAGATGCAAATGCTCCAAAGCT	180
OE	121: AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGGTTAGGTGCAAATGCTCCAAAGCT	180
808B	121: AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGGTTAGATGCAAATGCTCCAAAGCT	180
814, OF-B	121: AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGGTTAGGTGCAAATGCTCCAAAGCT	180
834A	121: AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGGTTAGGTGCAAATGCTCCAAATGCT	180
843	121: AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGGTTAGGTGCAAATGCTCCAAAGCT	180
OP	121: AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGGTTAGGTGCAAATGCTCCAAATGCT	180
OQ	121: AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGGTTAGGTGCAAATGCTCCAAATGCT	180
837	121: AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGGTTAGGTGCAAATGCTCCAAAGCT	180

FC27	181: GATACTATTGCTAGTGGAAAGTCAAAGTAGTACAAATAGTGCAAGTACTAGTACTACTAAT	240
JRbr, P62br	181: GATACTATTGCTAGTGGAAAGTCAAAGTAGTACAAATAGTGCAAGTACTAGTACTACTAAT	240
OE	181: GATACTATTGCTAGTGGAAAGTCAAAGTAGTACAAATAGTGCAAGTACTAGTACTACTAAT	240
808B	181: GATACTATTGCTAGTGGAAAGTCAAAGTAGTACAAATAGTGCAAGTACTAGTACTACTAAT	240
814, OF-B	181: GATACTATTGCTAGTGGAAAGTCAAAGTAGTACAAATAGTGCAAGTACTAGTACTACTAAT	240
834A	181: GATACTATTGCTAGTGGAAAGTCAAAGTAGTACAAATAGTGCAAGTACTAGTACTACTAAT	240
843	181: GATACTATTGCTAGTGGAAAGTCAAAGTAGTACAAATAGTGCAAGTACTAGTACTACTAAT	240
OP	181: GATACTATTGCTAGTGGAAAGTCAAAGTAGTACAAATAGTGCAAGTACTAGTACTACTAAT	240
OQ	181: GATACTATTGCTAGTGGAAAGTCAAAGTAGTACAAATAGTGCAAGTACTAGTACTACTAAT	240
837	181: GATACTATTGCTAGTGGAAAGTCAAAGTAGTACAAATAGTGCAAGTACTAGTACTACTAAT	240

FC27	241: AATGGAGAATCAGAACTACTACTCTACCGCTGCTGATA---CTATTGCTAGTGGAAAGT	297
JRbr, P62br	241: AATGGAGAATCAGAACTACTACTCTACCGCTGCTGATACCCCTACTGCTAC---AG-	295
OE	241: AATGGAGAATCAGAACTACTACTCTACCGCTGCTGATACCCCTACTGCTAC---AA-	295
808B	241: AATGGAGAATCAGAACTACTACTCTACCGCTGCTGATACCCCTACTGCTAC---AG-	295
814, OF-B	241: AATGGAGAATCAGAACTACTACTCTACCGCTGCTGATACCCCTACTGCTAC---AA-	295
834A	241: AATGGAGAATCAGAACTACTACTCTACCGCTGCTGATACCCCTACTGCTAC---AA-	295
843	241: AATGGAGAATCAGAACTACTACTCTACCGCTGCTGATA---CC---C---CTAC-----	287
OP	241: AATGGAGAATCAGAACTACTACTCTACCGCTGCTGATACCCCTACTGCTAC---AA-	295
OQ	241: AATGGAGAATCAGAACTACTACTCTACCGCTGCTGATACCCCTACTGCTAC---AA-	295
837	241: AATGGAGAATCAGAACTACTACTCTACCGCTGCTGATACCCCTACTGCTACAGAAAGT	300

FC27	298: CAA---AGGAGT-A-CA---A-A-TAGT---GCAAGT-ACT-A-G-T---A-C-T-A	331
JRbr, P62br	296: -AA---A-G-T-----A-A-T-T-C-----A-C-C-TT-----CA-C-	313
OE	296: -AA---A-G-T-----A-A-T-T-C-----A-C-C-TTCACCAACCCATCA	322
808B	296: -AA---A-G-T-----A-A-T-T-C-----A-C-C-TTCACCAACCCATCA	322
814, OF-B	296: -AA---A-G-T-----A-A-T-T-C-----A-C-C-TTCACCAACCCATCA	322
834A	296: -AA---A-G-T-----A-A-T-T-C-----A-C-C-TTCACCAACCCATCA	322
843	288: ---T---G-----CTACAGAAAGTAATTCAGGTTTCACCAACCCATCA	322
OP	296: -AA---A-G-T-----A-A-T-T-C-----A-C-C-TTCACCAACCCATCA	322
OQ	296: -AA---A-G-T-----A-A-T-T-C-----A-C-C-CTCACCACCCATCA	322
837	301: -AATTCAGG-TTCACCAACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTCAGGTTTCACCAACCCATCA	358

FC27 332:CTAATA-ATG-GAG-AA-TCA----CA--A-AC-T-ACTACT-C-----CT-A--C-OGC 368
 JRbr, P62br 314:C-AC--C-----C-----A----- 319
 OE 323:CTACTAC-----AG-AA--A-G-T-----A--A-T--T-C-----A--C-C-- 344
 808B 323:CTACTAC-----AA-AA--A-G-T-----A--A-T--T-C-----A--C-C-- 344
 814, OF-B 323:CTACTAC-----AG-AA--A-G-T-----A--A-T--T-C-----A--C-C-- 344
 834A 323:CTACTACA-GAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCAC-C 380
 843 323:CTACTACA-GAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCAC-G 380
 OP 323:CTACTACA-GAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCAC-C 380
 OQ 323:CTACTACA-GAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCAC-C 380
 837 359:CTACTACA-GAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCAC-G 416
 * * * * *

FC27 369:TGCTGATAC-CCC-T-ACTGCTACAGAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTAC 425
 JRbr, P62br 320:---T---CA--C-T-ACTAC-A-A-AAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTAC 365
 OE 345:T--TCA-CCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTAC 401
 808B 345:T--TCA-CCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTAC 401
 814, OF-B 345:T--TCA-CCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTAC 401
 834A 381:T--TCA-CCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTAC 437
 843 381:T--TCA-CCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTAC 437
 OP 381:T--TCA-CCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTAC 437
 OQ 381:T--TCA-CCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTAC 437
 837 417:T--TCA-CCACCCATCACTACTACAGAAAGTAATTTCACCTTCACCACCCATCACTACTAC 473
 * * * * *

FC27 426:AGAAAGTTCAGTTCTGGCAATGCACCAAATAAAACAGACGGTAAAGGAGAAGAGAGTGA 485
 JRbr, P62br 366:AGAAAGTTCAGTTCTGGCAATGCACCAAATAAAACAGACGGTAAAGGAGAAGAGAGTGA 425
 OE 402:AGAAAGTTCAGTTCTGGCAATGCACCAAATAAAACAGACGGTAAAGGAGAAGAGAGTGA 461
 808B 402:AGAAAGTTCAGTTCTGGCAATGCACCAAATAAAACAGACGGTAAAGGAGAAGAGAGTGA 461
 814, OF-B 402:AGAAAGTTCAGTTCTGGCAATGCACCAAATAAAACAGACGGTAAAGGAGAAGAGAGTGA 461
 834A 438:AGAAAGTTCAGTTCTGGCAATGCACCAAATAAAACAGACGGTAAAGGAGAAGAGAGTGA 497
 843 438:AGAAAGTTCAGTTCTGGCAATGCACCAAATAAAACAGACGGTAAAGGAGAAGAGAGTGA 497
 OP 438:AGAAAGTTCAGTTCTGGCAATGCACCAAATAAAACAGACGGTAAAGGAGAAGAGAGTGA 497
 OQ 438:AGAAAGTTCAGTTCTGGCAATGCACCAAATAAAACAGACGGTAAAGGAGAAGAGAGTGA 497
 837 474:AGAAAGTTCAGTTCTGGCAATGCACCAAATAAAACAGACGGTAAAGGAGAAGAGAGTGA 533
 * * * * *

FC27 486:AAAACAAAATGAATTAAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAAGCTCCACAAGAACCTCA 545
 JRbr, P62br 426:AAAACAAAATGAATTAAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAAGCTCCACAAGAACCTCA 485
 OE 462:AAAACAAAATGAATTAAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAAGCTCCACAAGAACCTCA 521
 808B 462:AAAACAAAATGAATTAAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAAGCTCCACAAGAACCTCA 521
 814, OF-B 462:AAAACAAAATGAATTAAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAAGCTCCACAAGAACCTCA 521
 834A 498:AAAACAAAATGAATTAAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAAGCTCCACAAGAACCTCA 557
 843 498:AAAACAAAATGAATTAAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAAGCTCCACAAGAACCTCA 557
 OP 498:AAAACAAAATGAATTAAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAAGCTCCACAAGAACCTCA 557
 OQ 498:AAAACAAAATGAATTAAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAAGCTCCACAAGAACCTCA 557
 837 534:AAAACAAAATGAATTAAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAAGCTCCACAAGAACCTCA 593
 * * * * *

FC27 546:AACGGCAGAAAATGAAAATCCTGCTGCACCAGAGAAATAAAGGTACAGGACAACATGGACA 605
 JRbr, P62br 486:AACGGCAGAAAATGAAAATCCTGCTGCACCAGAGAAATAAAGGTACAGGACAACATGGACA 545
 OE 522:AACGGCAGAAAATGAAAATCCTGCTGCACCAGAGAAATAAAGGTACAGGACAACATGGACA 581
 808B 522:AACGGCAGAAAATGAAAATCCTGCTGCACCAGAGAAATAAAGGTACAGGACAACATGGACA 581
 814, OF-B 522:AACGGCAGAAAATGAAAATCCTGCTGCACCAGAGAAATAAAGGTACAGGACAACATGGACA 581
 834A 558:AACGGCAGAAAATGAAAATCCTGCTGCACCAGAGAAATAAAGGTACAGGACAACATGGACA 617
 843 558:AACGGCAGAAAATGAAAATCCTGCTGCACCAGAGAAATAAAGGTACAGGACAACATGGACA 617
 OP 558:AACGGCAGAAAATGAAAATCCTGCTGCACCAGAGAAATAAAGGTACAGGACAACATGGACA 617
 OQ 558:AACGGCAGAAAATGAAAATCCTGCTGCACCAGAGAAATAAAGGTACAGGACAACATGGACA 617
 837 594:AACGGCAGAAAATGAAAATCCTGCTGCACCAGAGAAATAAAGGTACAGGACAACATGGACA 653
 * * * * *

FC27 606:TATGCATGGTTCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTAC 665
 JRbr, P62br 546:TATGCATGGTTCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTAC 605
 OE 582:TATGCATGGTTCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTAC 641
 808B 582:TATGCATGGTTCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTAC 641
 814, OF-B 582:TATGCATGGTTCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTAC 641
 834A 618:TATGCATGGTTCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTAC 677
 843 618:TATGCATGGTTCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTAC 677
 OP 618:TATGCATGGTTCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTAC 677
 OQ 618:TATGCATGGTTCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTAC 677
 837 654:TATGCATGGTTCTAGAAATAATCATCCACAAAATACCTTCTGATAGTCAAAAAGAATGTAC 713
 * * * * *

FC27	666: CGATGGTAACAAAGAAAAC	TGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAAGTAACTCTAGTAATAT	725
JRbr, P62br	606: CGATGGTAACAAAGAAAAC	TGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATTAACCTAGTAATAT	665
OE	642: CGATGGTAACAAAGAAAAC	TGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATTAACCTAGTAATAT	701
808B	642: CGATGGTAACAAAGAAAAC	TGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATTAACCTAGTAATAT	701
814, OF-B	642: CGATGGTAACAAAGAAAAC	TGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATTAACCTAGTAATAT	701
834A	678: CGATGGTAACAAAGAAAAC	TGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATTAACCTAGTAATAT	737
843	678: CGATGGTAACAAAGAAAAC	TGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATTAACCTAGTAATAT	737
OP	678: CGATGGTAACAAAGAAAAC	TGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATTAACCTAGTAATAT	737
OQ	678: CGATGGTAACAAAGAAAAC	TGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATTAACCTAGTAATAT	737
837	714: CGATGGTAACAAAGAAAAC	TGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTAAATTAACCTAGTAATAT	773

FC27	726: TGCTTCAATAAATAAATTTGTTGTTTTAATTTTCAGCAACACTTGT	TTTTATCTTTTGCCAT	785
JRbr, P62br	666: TGCTTCAATAAATAAATTTGTTGTTTTAATTTTCAGCAACACTTGT	TTTTATCTTTTGCCAT	725
OE	702: TGCTTCAATAAATAAATTTGTTGTTTTAATTTTCAGCAACACTTGT	TTTTATCTTTTGCCAT	761
808B	702: TGCTTCAATAAATAAATTTGTTGTTTTAATTTTCAGCAACACTTGT	TTTTATCTTTTGCCAT	761
814, OF-B	702: TGCTTCAATAAATAAATTTGTTGTTTTAATTTTCAGCAACACTTGT	TTTTATCTTTTGCCAT	761
834A	738: TGCTTCAATAAATAAATTTGTTGTTTTAATTTTCAGCAACACTTGT	TTTTATCTTTTGCCAT	797
843	738: TGCTTCAATAAATAAATTTGTTGTTTTAATTTTCAGCAACACTTGT	TTTTATCTTTTGCCAT	797
OP	738: TGCTTCAATAAATAAATTTGTTGTTTTAATTTTCAGCAACACTTGT	TTTTATCTTTTGCCAT	797
OQ	738: TGCTTCAATAAATAAATTTGTTGTTTTAATTTTCAGCAACACTTGT	TTTTATCTTTTGCCAT	797
837	774: TGCTTCAATAAATAAATTTGTTGTTTTAATTTTCAGCAACACTTGT	TTTTATCTTTTGCCAT	833

FC27	786: ATTCATATAA	795
JRbr, P62br	726: ATTCATATAA	735
OE	762: ATTCATATAA	771
808B	762: ATTCATATAA	771
814, OF-B	762: ATTCATATAA	771
834A	798: ATTCATATAA	807
843	798: ATTCATATAA	807
OP	798: ATTCATATAA	807
OQ	798: ATTCATATAA	807
837	834: ATTCATATAA	843

The Merozoite Surface Protein 2 (MSP2) Gene of *Plasmodium Falciparum* from a Thai Isolate

SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D., Ph.D.*,
CHATURONG PUTAPORN TIP, M.Sc.*

The merozoite of *Plasmodium falciparum*, the invasive form of the asexual blood stage, spends a brief period outside the host red blood cell which is vulnerable to immune attack. The surface of merozoite contains a 185-200 kilodalton glycoprotein, and 45-53 kilodalton integral membrane protein, denoted MSP1 and MSP2, respectively (1-3). Vaccine trials in monkeys, using purified MSP1, recombinant polypeptides or synthetic peptides based on MSP1, confer partial to complete protection against parasite challenge (4-6). Therefore, MSP1 has been considered to be a potential asexual blood-stage vaccine candidate against malaria. Serotyping of *P. falciparum* field samples by a panel of monoclonal antibodies against MSP1 has revealed extensive antigenic diversity among isolates (7). However, analysis of the MSP1 genes from culture-adapted parasites has shown that the gene is dimorphic, i.e., only 2 nucleotides are detected at positions where substitutions occur (8). Dimorphism of the MSP1 gene has been subsequently confirmed among several field isolates (9,10).

The MSP2 gene of *P. falciparum* has been cloned and sequenced from a number of geographic diverse isolates (11-18). Analysis of the gene sequence revealed a central variable region flanked by conserved 5' and 3' regions. The variable region consists of non-repetitive sequences surrounding a

repetitive sequence. The non-repetitive sequence exists as two distinct sequence types, designated 3D7/CAMP and FC27 allelic families (11-14). The role of MSP2 antigen for malaria vaccine candidate has been emphasized by the ability of antibodies against MSP2 to inhibit both merozoite invasion and parasite growth *in vitro* (2,3,14). Moreover, the MSP2-derived peptides from the conserved N- and C- terminal regions can elicit cross protective immune response in mice against challenge with *P. chabaudi* (19). Epidemiological study has shown a significant association of antibody prevalence to MSP2 recombinant proteins and less malaria morbidity among individuals in endemic areas (20,21). Importantly, the antibody response is predominantly directed towards the central variable regions of MSP2 (22). Therefore, characterization of MSP2 alleles among natural parasite populations is crucial for a basis of MSP2-based vaccine development.

Here we sequenced the entire MSP2 gene from an isolate as a preliminary study of allelic variation among *P. falciparum* isolates from Thailand.

MATERIAL AND METHOD

P. falciparum DNA preparation

An isolate of *P. falciparum*, designated CU-1, was obtained from a malaria patient admitted

* Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

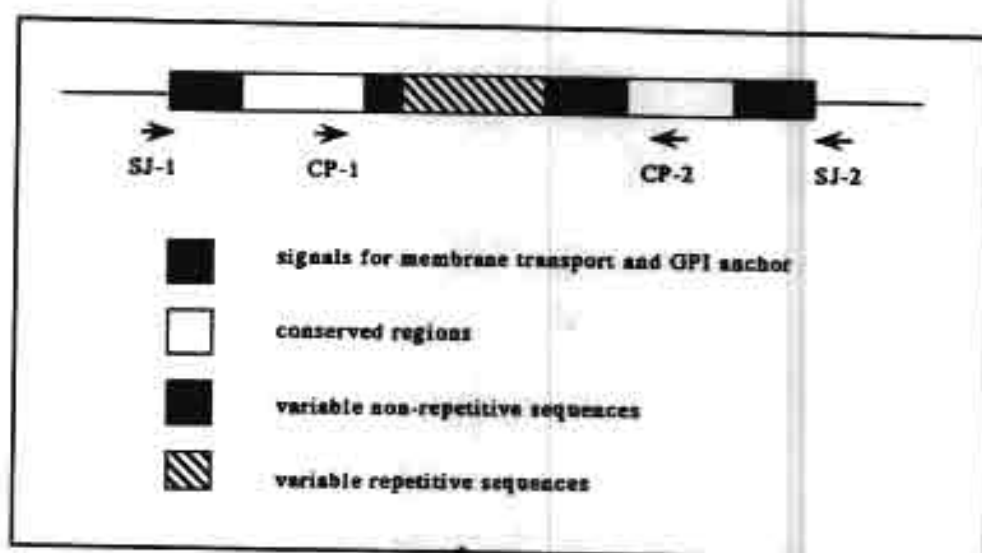


Fig. 1. Structure of the merozoite surface protein 2 gene of *Plasmodium falciparum*. Locations of primers for the polymerase chain reaction (SJ-1, SJ-2) and sequencing (CP-1, CP-2) are indicated by arrows underneath the map. Upstream and downstream untranslated regions are shown as lines.

to Chulalongkorn Hospital in 1993. The DNA extraction was done as previously reported⁽²³⁾.

Polymerase chain reaction⁽²⁴⁾

Schematic representation of the MSP2 gene of *P. falciparum* and PCR-amplified fragment is shown in Fig. 1. Amplification of the entire MSP2 gene was done in 100 µl reaction mixture containing *P. falciparum* mixed /200 µM each dNTP/10 mM Tris-HCl, pH 8.30/50 mM KCl/1.5 mM MgCl₂/0.1% (w/v) gelatin/2.5 units of *Taq* polymerase (Perkin/Elmer-Cetus) and 1.0 µM each primers. The primers used were a 30-mer (SJ-1), 5'-CTTAACATATTATATTAGTCGACATGAAGG-3' (nucleotides 71 to 100 after FC27 sequence)⁽¹²⁾ with A/G and A/C mismatches created for *Sall* site, and a 31-mer complementary strand from the 3' noncoding region (SJ-2), 5' GTTTTAAAA TGAAGAGAATTCTATGAATATG-3' (nucleotides 876 to 906)⁽¹²⁾ with A/C mismatch created for *EcoRI* site. The thermal cycler profile was an initial denaturation at 94°C for 4 minute; 35 cycles of 94°C for 1 minute, 50°C for minute, and 72°C for 2 minutes; and a final primer extension at 72°C for 5 minutes. The MSP2 amplified fragment was digested with *Sall* and *EcoRI* prior to subcloning into the complementary multiple cloning sites of

phagemid pUC119 and was transformed into *Escherichia coli* strain JM109.

DNA sequencing

DNA template for each sequencing reaction was prepared as described elsewhere⁽¹⁰⁾. Synthetic oligonucleotides CP-1, 5'-GCTTATAA TATGAGTAT-3' (positions 193 to 209)⁽¹²⁾ and CP-2, 5'-TGTTGTCCTGTACCTTT-3' (positions 676 to 692, complementary strand)⁽¹²⁾ were used to obtain overlapping sequences. DNA sequencing was performed by the dideoxy chain termination technique using modified T7 DNA polymerase (Sequenase version 2.0, USB)⁽²⁵⁾. Three different recombinant subclones were used as templates for sequencing.

RESULTS

The PCR product of the MSP2 gene showed a single band of approximately 800 base pairs (data not shown). Sequences obtained from three different recombinant subclones were identical. Alignment of the sequence of the MSP2 gene from CU-1 isolate compared with previously reported sequences, has revealed sequence similarity with the FC27 allelic family. Fig. 2 shows that the sequence of the 5' to the central variable region

FC27	ATGAAGGTAATTAACACATTGTCTATTATAAATTCCTTTATTTTGTACCTTAAATATT	60
CU-1		
FC27	AAAAATGAAAGTAAATATAGCAACACATTCATAAACAATGCTTATAATATGAATATAAGG	120
CU-1		
FC27	AGAAGTATGGCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAGTGTAGGTGCAAAATGCTCCAAATGCT	180
CU-1	C.....	
FC27	GATACTATTGCTAGTGGGAAGTCAAAGGAGTACAAATAGTGCAGTACTAGTACTACTAAT	240
CU-1	T.....	
FC27	AATGGAGAATCACAACTACTACTCTCTACCGCTGCTGATactattgttagtggaagtcga	300
CU-1	acccctactgttacagaaagt	
FC27	aggagtacaaatagtgcaggtactagtactactaataatggagatccaaactactact	360
CU-1	aattcaacttcaccccccattactactacagaaagtaattcaacttcaccccccattact	
FC27	cctaacgctgtgtatccctact-----gtacagaaagtaattccactcc	420
CU-1	actacagaaagtaattcaacttcaccccccattactactacagaaagtaattccactcc	
FC27	cccccattactactacaGAAAGTTCAGGTTCTGGCAATGCACCAATATAACAGACGGT	480
CU-1	cccccattactactaca.....	
FC27	AAGGAGAAGAGAGCTGAAAAACAAAATGAATTAATGAATCAACTGAAGAAGGACCCAAA	540
CU-1		
FC27	GCTCCACAGAAACCTCAAAAGGAGAAATGAATATCTGCTCCACAGAGATAAAGGT	600
CU-1		
FC27	ACAGGACAACATGGACATATGCATGGTCTAGAAATAATCATCCACAAATACTTCTGAT	660
CU-1		
FC27	AGTCAAAAAGAAATGTACCGATGGTAACAAAGAAACTGTGGAGCAGCAACATCCCTCTTA	720
CU-1		
FC27	AGTAATCTAGTAATATTGCTTCAATAAATAAATTGTTGTTTAATTTAGCAACACTT	780
CU-1		
FC27	GTTTTATCTTTTGCCATATTCATATAA	807
CU-1		

Fig. 2. Alignment of nucleotide sequences of FC27 allele^(12,16) and CU-1 allele. Dots indicate identical nucleotides. Dashes are inserted in FC27 sequence to optimize the alignment of sequences. Underlined sequences are variable non-repetitive regions. Repetitive sequences are shown in lower case letters.

was perfectly conserved (nucleotides 1 to 132). There were 2 nucleotide substitutions in the variable flanking regions (variable non-repetitive region in CU-1 sequence compared to FC27 sequence, i.e., C/A and T/G at positions 152 and 207, respectively. Both of the substitutions created nonsynonymous amino acid exchanges from asparagine to threonine and arginine to serine, respectively.

The variable region of the MSP2 gene of the CU-1 isolate contained 12 nucleotides more

than the FC27 sequence. There were 3 copies of the repeats encoding the sequence ESNPSPPTTTT in CU-1 allele as shown in Fig. 3. Thus, this sequence is closely related to the repeats of K1 and OKS11L, the isolates from Thailand and Indonesia, respectively^(12,16). However, the repeats of CU-1 and OKS11L alleles shared identical sequence except that one more repeat unit occurred in CU-1 allele. The repeats in the K1 allele contained arginine instead of proline and one more repeat unit than CU-1 allele (see Fig. 3).

FC27	<u>MKVITLSIIINFFIFVITM</u> IKNESKYENTFIMMATMSIRRSMAHEGSENTMSVGNAPNA	60
K1	G.....K.....K.....	
CU-1	T.....	
OKS11L	K.....	
FC27	DTIASGSGRSTNSASTSTTNNGESQTTTPTAADTIASGSGRSTNSASTSTTNNGESQTTT	120
K1	S.....	
CU-1	S.....	
OKS11L	S.....I.....	
FC27	PTAADTPTATESISPSPPITT-----	180
K1	-----N.R.....ESNSRSPFITTEENRSPFITTEENRSPFITTES	
CU-1	-----N.....ESNSPSPFITTESNSPSPFITTESNSPSPFITTT	
OKS11L	-----N.....KSNPSPFITTEKSNPSPFITTT	
FC27	-----ESSSSGNAPMETDGEKESEKQNELNESTEGKAPQEPQTAENENPAAP	240
K1	NSRSPFITTT-----	
CU-1	-----	
OKS11L	-----	
FC27	ENKGTGQRGHEGSRNNHPQNTSDSQECTGDKMKCGAATSLLSNSENIAINK <u>FVVL</u> I	300
K1	-----	
CU-1	-----	
OKS11L	-----N.....	
FC27	<u>SATLVLSFAIFI</u>	312
K1	-----	
CU-1	-----	
OKS11L	...	

Fig. 3. Deduced amino acid sequence comparison among FC27(12,16), K1,(16) CU-1 and OKS11L alleles(15). Dots are identical amino acid residues. Dashes are inserted to optimize the alignment of sequences. Different amino acid residues in the repeats of K1, CU-1 and OKS11L alleles are in bold letters. The predicted signal sequence and the region for glycosylphosphatidylinositol anchor (GPI) are underlined at the N- and C-termini, respectively(12).

DISCUSSION

One of the striking features of several malarial antigen genes is the existence of repeat-encoding sequences(26). The composition of the repeats in *P. falciparum* MSP2 was about 20-30 per cent, depending on clones or isolates. Variation in the number and sequence of the repeats created extensive antigenic polymorphism in MSP2 among parasite isolates. Sequence comparison of the MSP2 genes from a number of clones and isolates has identified two major allelic families,

3D7/CAMP and FC27 families, corresponding to two antigenically distinct serogroups(7,13-16). DNA sequence analysis of the MSP2 gene and serological studies using a panel of MSP2-specific monoclonal antibodies have shown considerable polymorphism among culture-adapted strains and natural parasite isolates(7,13-15). Although MSP2 is naturally immunogenic, the predominant antibody responses to the variable regions (strain-specific) are not crossreactive(27). This issue was proposed to be responsible for the slow develop-

ment of clinical immunity to malaria among individuals living in malaria endemic areas⁽²²⁾.

Our analysis of the MSP2 gene from a Thai isolate, CU-1, revealed sequence similarity but not identical with the previously published sequences of the FC27 allelic family, KI allele and OKSIL allele^(12,16). The repeats in CU-1 allele were more related to OKSIL allele, an isolate from Irian Jaya, suggesting allelic variation in MSP2 among Thai isolates. Extensive sequence variation in the MSP2 gene has reportedly shown geographical variation^(15,16-18). Furthermore, minor sequence variation occurred among isolates from different geographic areas⁽¹⁶⁾. The structural variation in MSP2 resembles *P. falciparum* S-antigen and the circumsporozoite protein (CSP)⁽²⁶⁾. Variation in the repeats of the MSP2 gene with the same allelic family might be due to similar genetic mechanisms to generate repeat sequence variation in the *P. falciparum* CSP gene, i.e., duplication of one or more repeat units, point mutation and intragenic recombination⁽²⁸⁾. As a consequence duplication of one repeat unit in OKSIL allele, ESNPSPP1-TTT, could generate the repeats in CU-1 allele. Previous report of a novel allele of MSP2 has been suggested to generate from intragenic recombination between the two allelic families⁽²⁹⁾.

Recent MSP2 sequence analysis has suggested positive Darwinian selection to promote amino acid sequence diversity in the central variable region⁽³⁰⁾. If the variable region in MSP2 could elicit protective immunity, the region would be under immunological pressure.

Further characterization of the MSP2 genes among parasite populations in endemic areas of malaria in Thailand is under way to see the extent of sequence variation which is important for MSP2-based vaccine design.

SUMMARY

The merozoite surface protein 2 (MSP2) of *Plasmodium falciparum* was a malaria vaccine candidate. The gene encoding MSP2 of a Thai isolate was amplified by polymerase chain reaction followed by subcloning into a phagemid vector and sequencing. Sequence alignment with other previously published sequences revealed that the MSP2 allele in this isolate belonged to FC27 allelic family. The central variable sequence of the MSP2 allele in this study was related to an allele from Indonesia. The flanking sequences of the variable region were highly conserved.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Professor Hiroji Kanbara, Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University for encouragement; to all the members in the Department of Parasitology, Faculty of Medicine for general assistance; and to Dr Ariya Chindamporn and Miss Saowanee Kwanlertjit for their generous support. This work was funded by a Research Grant for Molecular Biology/Rajadapiseksompoj Grant from the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. SJ was a recipient of the Thailand Research Fund (TRF).

(Received for publication on September 2, 1996)

REFERENCES

- Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy* 1988; 41: 72-97.
- Epping RJ, Goldstone SD, Ingram LT, et al. An epitope recognised by inhibitory monoclonal antibodies that react with a 51 kilodalton merozoite surface antigen in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 28: 1-10.
- Clark JT, Donachie S, Anand R, et al. 45-53 kilodalton glycoprotein from the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 32: 15-24.
- Siddiqui WA, Tam LQ, Kramer KJ, et al. Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3014-8.
- Hall R, Hyde JE, Goman M, et al. Major surface antigen gene of a human malaria parasite cloned and expressed in bacteria. *Nature* 1984; 311: 379-82.
- Cheung A, Leban J, Shaw AR, et al. Immunization with synthetic peptides from a *Plasmodium falciparum* surface antigen induces antimerozoite

- antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8328-32.
7. Conway DJ, McBride JS. Population genetics of *Plasmodium falciparum* within a malaria hyper-endemic area. *Parasitol* 1991; 103: 7-16.
 8. Tanabe K, Mackay M, Goman M, et al. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 1987; 195: 273-87.
 9. Jongwutiwes S, Tanabe K, Nakazawa S, et al. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in p190 (MSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 51: 81-90.
 10. Jongwutiwes S, Tanabe K, Kanbara H. Sequence conservation in the C-terminal part of the precursor to the major merozoite surface proteins (MSP1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 59: 95-100.
 11. Smythe JA, Peterson MG, Coppel RL, et al. Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 39: 227-34.
 12. Smythe JA, Coppel RL, Brown GV, et al. Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5195-9.
 13. Fenton B, Clark JT, Khan CMA, et al. Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 963-71.
 14. Thomas AW, Carr DA, Carter M, et al. Sequence comparison of allelic forms of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSA2. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 43: 211-20.
 15. Marshall VM, Anthony RL, Bangs MJ, et al. Allelic variants of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2 (MSA-2) in a geographically restricted area of Irian Jaya. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 63: 13-21.
 16. Marshall VM, Coppel RL, Anders RF, et al. Two novel alleles within subfamilies of the merozoite surface antigen 2 (MSA-2) of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 50: 181-4.
 17. Bhattacharya P, Malhotra P, Sharma P, et al. Merozoite surface antigen 2 (MSA-2) gene of *Plasmodium falciparum* strains from India. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 74: 125-7.
 18. Prescott N, Stowers AW, Cheng Q, et al. *Plasmodium falciparum* genetic diversity can be characterised using the polymorphic merozoite surface antigen 2 (MSA-2) gene as a single locus marker. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 63: 203-12.
 19. Saul A, Lord R, Jones GL, et al. Protective immunisation with invariant peptides of the *Plasmodium falciparum* antigen MSA-2. *J Immunol* 1992; 148: 208-11.
 20. Al-Yaman F, Fenton B, Anders RF, et al. Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 593-602.
 21. Engelbrecht F, Felger I, Genton B, et al. *Plasmodium falciparum*: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface genotypes. *Exp Parasitol* 1995; 81: 90-6.
 22. Taylor RR, Smith DB, Robinson J, et al. Human antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass. *Infect Immun* 1995; 63: 4382-8.
 23. Tanabe K, Murakami K, Doi S. *Plasmodium falciparum*: dimorphism of the p190 alleles. *Exp Parasitol* 1989; 68: 470-3.
 24. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.
 25. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-7.
 26. Weber JL. Molecular biology of malaria. *Exp Parasitol* 1988; 66: 143-70.
 27. Rzepczyk CM, Ramasamy R, Mutch DA, et al. Analysis of human T cell response to two *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigens. *Eur J Immunol* 1989; 19: 1797-802.
 28. Jongwutiwes S, Tanabe K, Hughes MK, et al. Allelic variation in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 659-68.
 29. Marshall VM, Coppel RL, Martin RK, et al. A *Plasmodium falciparum* MSA-2 gene apparently generated by intragenic recombination between the allelic families. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 45: 349-52.
 30. Hughes KM, Hughes AL. Natural selection on *Plasmodium falciparum* surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 71: 99-113.

อินที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอริโรซอดของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมจากตัวอย่างเชื้อ ที่ได้จากประเทศไทย

สมชาย จงวุฒิเวศย์, พ.บ., Ph.D.*, จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์, วท.ม.*

ได้ทำการศึกษานินที่สร้างโปรตีนชนิดที่ 2 บนผิวของเมอริโรซอดของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ซึ่งเป็นโปรตีน
ที่น่าจะเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย โดยการเพิ่มปริมาณของอินคัวปฏิกิริยาอูกโซ่โพลีเมอร์เรส ทำการ
เชื่อมต่อกับพางมิตและหาลำดับดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอที่ได้กับลำดับดีเอ็นเอที่มีการศึกษามาก่อนพบว่าจัด
อยู่ในกลุ่ม FC27 ลำดับดีเอ็นเอในส่วนกลางของอินมีความคล้ายคลึงกับอัลลีลหนึ่งจากประเทศอินโดนีเซีย สำหรับลำดับ
ดีเอ็นเอที่อยู่ข้างเคียงกับลำดับดีเอ็นเอในส่วนกลางพบว่ามีความคงที่ระหว่างอัลลีล

* ภาควิชาปรสิตวิทยา, คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ ๑๐330

RESEARCH BRIEF

Plasmodium falciparum: Variation in Block 4 of the Precursor to the Major Merozoite Surface Proteins in Natural Populations

OSAMU KANEKO,* SOMCHAI JONGWUTTWES,† MASATSUGU KIMURA,‡ HIROH KANBARA,§
AKIRA ISHII,¶ AND KAZUYUKI TANABE¹

*Department of Medical Zoology, †Laboratory of Biophysics, Osaka City University Medical School, 1-4-54, Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545, Japan; ‡Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; §Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, 12-4 Sakamoto-machi, Nagasaki 852; ¶Department of Medical Biology and Parasitology, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-04; and ¹Laboratory of Biology, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Ohmiya, Asahi-ku, Osaka 535, Japan

KANEKO, O., JONGWUTTWES, S., KIMURA, M., KANBARA, H., ISHII, A., AND TANABE, K. 1996. *Plasmodium falciparum*: Variation in block 4 of the precursor to the major merozoite surface proteins in natural populations. *Experimental Parasitology* 84, 92-95. © 1996 Academic Press, Inc.

INDEX DESCRIPTORS AND ABBREVIATIONS: *Plasmodium falciparum*; recombination; polymorphism; PCR, polymerase chain reaction; MSP1, the precursor to the major merozoite surface proteins.

The precursor to the major merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum*, a potential asexual blood-stage malaria vaccine candidate, exhibits antigenic diversity among parasite isolates (Nussenzweig and Long 1994; McBride *et al.* 1985). Sequence studies have revealed that MSP1 consists of several conserved blocks interspersed with semiconserved or variable blocks and that variations in the MSP1 gene are not widely polymorphic but principally dimorphic (Tanabe *et al.* 1987; Miller *et al.* 1993). An experimental cross has shown that recombination occurs within conserved blocks at the sexual stage for generating new MSP1 alleles in the progeny (Kerr *et al.* 1994). The sites for intragenic recombination are confined to the 5' portion of the gene, corresponding to conserved blocks 3 and 5. However, another recombination site has recently been suggested in block 4, a variable block (Conway *et al.* 1991; Miller *et al.* 1993), because some isolates have sequence of one dimorph (MAD20-type) in the 5' part of block 4 and sequence of the other dimorph (K1-type) in the 3' part. Meanwhile, an isolate RO33 has reportedly a unique sequence which is different from dimorphic sequences. These circumstances have urged us to reexamine variations in block 4. All block 4 sequences so far obtained have been derived from laboratory strains and little investigation has been conducted in field isolates. Because long term cultivation of *P. falciparum* sometimes results in loss of MSP1 diversity (Scherf and Kimura 1990; Viriyakosol *et al.* 1994), we consider it important to see the extent of variation in block 4 in field isolates. Here we report that a new chimeric sequence in block 4 that is K1-type sequence at the 5' part and MAD20-type at the 3' part and that the occurrence of chimeric types in block 4 are common in natural populations of *P. falciparum*.

We have first analyzed variation in block 4 of 23 DNA clones derived from isolates collected in Mae Sod District of Tak Province in Thailand. Genomic DNA corresponding to MSP1 blocks 2 to 4 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with two primers, 5'-AACTAGAAAGCTT-TAGAAGAT-3' and 5'-TTCTAATTCAAGTGGATCAG-TAAATAAAC-3' (corresponding to conserved blocks 1 and 5, respectively), and sequenced following subcloning into pUC 119 as described previously (Jongwuttwes *et al.* 1992). Their sequences were registered with the EMBL Data Library, release 43 (Accession Nos. L10380, M77713-77716, M77718-77720, M77722-77734, M77736, and M77737).

To see the prevalence of chimeric types in block 4 in the natural population of *P. falciparum*, we isolated parasite DNA for PCR from 23 thin blood films made from malaria patients in the Solomon Islands as described previously (Kimura *et al.* 1995). This isolation technique allows us to monitor MSP1 alleles without losing antigenic diversity which might occur during *in vitro* cultivation. Oligonucleotide primers are shown in Fig. 1. Preliminary experiments have shown that primers specific for dimorphic alleles represented by K1 and MAD20 sequences yielded amplified DNA with allele-specificity at predicted sizes (data not shown). We used nested PCR to save the blood film-derived template DNA and to determine associations between two subblocks in block 4, 4A and 4P. Initial PCR was done in a 25- μ l reaction mixture containing two primers, MSP237F.B3 and MSP395R.B5 (corresponding to conserved blocks 3 and 5, respectively), at 0.8 μ M each, 200 μ M each dNTP, 0.3 units of Vent DNA polymerase (New England Biolabs, UK), 2.5 μ l of 10 $\times$ Vent buffer, and 10 μ l of the template for 40 cycles (30 sec at 91°C, 40 sec at 50°C,

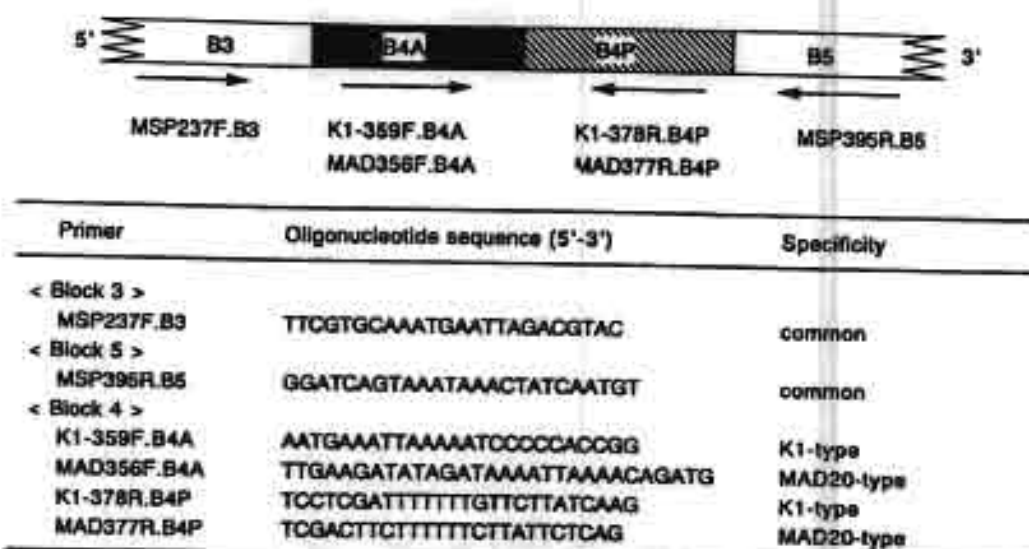


FIG. 1. Schematic representation of blocks 3 to 5 of MSP1 and location of primers used for PCR. Block numbering is after Tanabe *et al.* (1987). Variable block 4 is divided into two subblocks, 4A and 4P.

and 40 sec at 70°C) in a thermal cycler (PC-700, Astec, Japan). Nested PCR was done with block 4A-specific primers, K1-359F.B4A or MAD356F.B4A, and block 4P-specific primers, K1-378R.B4P or MAD377R.B4P, for 12 cycles in a 20- μ l reaction mixture containing 1 μ l of the first PCR products and 0.4 units of Vent (exo⁻) DNA polymerase (New England Biolabs) instead of Vent DNA polymerase in a thermal cycler (Personal Cycler 48, Biometra, Germany). Following each amplification, PCR products

were electrophoresed on 2% agarose gel in 0.5 $\times$ Tris-borate-EDTA buffer and stained with ethidium bromide. PCR amplifications were reproducibly successful when parasitaemia was $\geq 0.01\%$.

Deduced amino acid sequences of block 4 of 23 Thai clones together with 2 representative alleles, K1 and MAD20, and MAD20/K1 chimeric type as well as RO33 are shown in Fig. 2, in which sequences of K1-type and MAD20-type differ drastically from residue 347. Sequences

Type	Thai clones and known Isolates	Sequence
K1/K1	K1 Thai-004, 005, 0210, 027, 028, 027, 044	344* $\leftarrow$ [Block 4A] $\rightarrow$ $\leftarrow$ [Block 4P] $\rightarrow$ 378 ELLDKINNIK-NPPFANSCHTPTNLTDEHKK-YES
K1/MAD20	Thai-015, 0250, 020	K-DK-NR--NPPFANS-RT-P-PENK-EV-G
MAD20/K1	RO71	K-ED-DK-TDAEKPTT-SK-T-LDEN--I-E
	Gambia, T9/101, Thai-007, 0340, 0353, 038, 041A, 041B, 042, 047	K-ED-DK-TDAEKPTT-SK-T-LDEN--I-E
	Thai-014C, 043	K-ED-DK-TDAEKLT-SK-T-LDEN--I-E
MAD20/MAD20	MAD20	K-ED-DK-TDAENPTT-SK-P-PENK-EV-G
	Thai-014B, 0410, 040	K-ED-DK-TDAEKLT-SK-P-PENK-EV-G
RO33	RO33	K-ED-DK-IDAEKPTT--VNCILSLRLKESR

FIG. 2. Deduced amino acid sequences of blocks 3 to 4 of MSP1 of 23 Thai clones with those of K1, MAD20, RO71, Gambia, T9/101, and RO33. Bold and italic letters correspond to K1-type and MAD20-type, respectively. Identical amino acids are represented by dots; deletions are represented by dashes. *, Position of residues are after Miller *et al.* (1993).

of 7 Thai clones were identical to K1 sequence and those of 3 clones to MAD20-type. MAD20/K1 chimeric-type sequence expressed by RO71, Gambia, and T9/101 was also found in 10 clones. K1/MAD20 chimeric type, which has not been reported yet, occurred in 3 clones, with a recombination site being the same as MAD20/K1 chimeric type at residues 365 to 366. A substitution from Glu to Lys at residue 344 may suggest another recombination site at residues 345/347. However, we consider that these residues are included in block 3 but not in block 4 since drastic sequence variation starts from residue 347. Then, we propose block 4 is divided into two subblocks, 4A and 4P, at residue 365 and 366, in which 7 nucleotides (ACCAAT) are conserved correspondingly. Variation from Phe to Leu at residue 359 appears to be a result of point mutation in MAD20-type.

Meanwhile, no RO33 type sequence was detected in our Thai clones. RO33 sequence derives from MAD20-type by introducing deletions into the middle part of block 4 (Certa *et al.* 1987). It should be stressed in this context that some Thai clones have sequences completely identical to RO33 in blocks 2 and 3. Therefore, it may be either that RO33 sequence in block 4 is cloning artifact or that its occurrence is fairly rare.

DNA templates isolated from blood films of patients in the Solomon Islands were subjected to PCR analysis to determine the associations between dimorphs in blocks 4A and 4P. Results showed that 15 samples had only one type among four possible associations (i.e., K1/K1-type, MAD20/MAD20-type, K1/MAD20-type, and MAD20/K1-type) and the remaining 8 samples had more than two types, with two types in 2 samples, three types in 5, and four types in 1. In total, 38 MSP1 block 4 clones were successfully typed. The associations were as follows: K1/K1-type in 11 clones, MAD20/MAD20-type in 17 clones, K1/MAD20-type in 6 clones, and MAD20/K1-type in 4 clones. Thus, it follows that K1/MAD20 chimeric type, as well as MAD20/K1 chimeric type, is common in natural populations of *P. falciparum*.

This study confirms the site of recombination in block 4 of MSP1 and shows the occurrence of two chimeric types, which are derived from recombination between representative dimorphs. Thus, recombination in block 4 apparently increases the extent of diversity of MSP1. From this study it may be questioned whether intragenic recombination occurs in variable blocks other than block 4. Extensive sequence studies will be required to answer this question. However, data available to date from sequencing, hybridization, and serotyping have revealed no combination in variable blocks other than block 4 (Peterson *et al.* 1988; Conway *et al.* 1991; Jongwuttives *et al.* 1991, 1993). Alternatively, it could be argued that recombination in variable blocks occurs as in block 4 at the genetic level but resultant chimeras are precluded from its existence for some reason not yet understood.

We thank Dr. H. Ogura, Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School, for kindly support-

ing our research. This study was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (07457069) and (C) (07670288) from The Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan and Japan-U.S. Medical Science Cooperative Program.

REFERENCES

- CERTA, U., ROTMANN, D., MATILI, H., AND REHER-LISKE, R. 1987. A naturally occurring gene encoding the major surface antigen precursor p190 of *Plasmodium falciparum* lacks tripeptide repeats. *EMBO Journal* 6, 4137-4142.
- CONWAY, D. J., ROSARIO, V., ODOOLA, A. M. J., SALAKO, L. A., GREENWOOD, B. M., AND MCBRIDE, J. S. 1991. *Plasmodium falciparum*: Intragenic recombination and nonrandom associations between polymorphic domains of the precursor to the major merozoite surface antigens. *Experimental Parasitology* 73, 469-480.
- JONGWUTTIVES, S., TANABE, K., NAKAZAWA, S., UEMURA, H., AND KAMBARA, H. 1991. Coexistence of gp195 alleles of *Plasmodium falciparum* in a small endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44, 299-305.
- JONGWUTTIVES, S., TANABE, K., NAKAZAWA, S., YAMAGI, T., AND KAMBARA, H. 1992. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in P190 (MSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 51, 81-90.
- JONGWUTTIVES, S., TANABE, K., AND KAMBARA, H. 1993. Sequence conservation in the C-terminal part of the precursor to the major merozoite surface proteins (MSP1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 59, 95-100.
- KERR, P. J., RANFORD-CARTWRIGHT, L. C., AND WALLIKER, D. 1994. Proof of intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 66, 241-248.
- KIMURA, M., KANEKO, O., INOUE, A., ISHII, A., AND TANABE, K. 1995. Amplification by polymerase chain reaction of *Plasmodium falciparum* DNA from Giemsa-stained thin blood smears. *Molecular and Biochemical Parasitology* 70, 193-197.
- MCBRIDE, J. S., NEWBOLD, C. I., AND ANAND, R. 1985. Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Experimental Medicine* 161, 160-180.
- MILLER, L. H., ROBERTS, T., SHAHABUDDIN, T., AND MCCUTCHAN, T. F. 1993. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Molecular and Biochemical Parasitology* 59, 1-14.
- NUSSENZWEIG, R. S., AND LONG, C. A. 1994. Malaria vaccines: Multiple targets. *Science* 265, 1381-1383.
- PETERSON, M. G., COPPEL, R. L., MOLONEY, M. B., AND KEMP, D. J. 1988. Third form of the precursor to the

- major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Biology* 8, 2664-2667.
- SCHERF, A., AND KIMURA, E. 1990. The major merozoite surface antigen (MSA1) of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today* 6, 391-392.
- TANABE, K., MACKAY, M., GOMAN, M., AND SCARF, J. G. 1986. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Molecular Biology* 195, 273-287.
- VIKITYAKOSOL, S., SREIPOON, N., ZHU, X. P., JARRA, W., SEUDOM, A., BROWN, K. N., AND SHARINOU, G. 1994. *Plasmodium falciparum*: Selective growth of subpopulations from field samples following *in vitro* culture, as detected by the polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology* 79, 517-525.

Received 5 February 1996; accepted with revision 18 June 1996

Short communication

Variation in the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates¹

Somchai Jongwutiwes ^{a,*}, Chaturong Putapornpip ^a, Hiroji Kanbara ^b,
Kazuyuki Tanabe ^c

^a Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^b Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852, Japan

^c Laboratory of Biology, Osaka Institute of Technology, Osaka 535, Japan

Received 1 September 1997; received in revised form 8 December 1997; accepted 15 December 1997

Keywords: Malaria; *Plasmodium falciparum*; Thai isolates; Gene; Thrombospondin-related adhesive protein; Sequence

Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), also termed sporozoite surface protein 2 (SSP2) of *Plasmodium falciparum* is a 90-kDa protein expressed in both the sporozoite stage and the asexual erythrocytic stages [1–3]. TRAP is localized in a microneme and cell surface of mature sporozoites and has been considered to play a critical role in recognition and/or invasion of hepatocyte. Vaccination trials in humans using ir-

radiated *P. falciparum* sporozoites conferred protection against challenge infection with sporozoites. The immunity has been shown to be mediated by cytotoxic CD8⁺ T cells recognizing TRAP and circumsporozoite protein (CSP) [4–6]. Furthermore, antibodies against either CSP or TRAP can block the sporozoite invasion into hepatocyte in vitro [2,4,7]. It has been recently shown that antibodies reacting to the CSP-like region II of TRAP inhibit the erythrocyte entry by the merozoite of *P. falciparum* in vitro [3]. More importantly, naturally acquired antibodies against TRAP correlate inversely with the malaria parasite densities among children in a hyperendemic area [8]. Thus, TRAP has multiple targets by the host immune attack and is an attractive malaria vaccine candidate.

The existence of antigen polymorphism among potential vaccine candidates is one of the obsta-

Abbreviations: CSP, circumsporozoite protein; CTL, cytotoxic T lymphocyte; PCR, polymerase chain reaction; TRAP, thrombospondin-related adhesive protein.

* Corresponding author. Present address: Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. Tel.: +662 2525944; fax: +662 2524963; e-mail: fmedsjw@md2.md.chula.ac.th

¹ Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the EMBL, GenBankTM and DDBJ data bases under the accession numbers AB006331–AB006359.

cles for an effective malaria vaccine development. This issue of the polymorphism might compromise the incorporation of all variants into a vaccine if protective epitopes resided within polymorphic regions of the candidate antigens. Accumulating evidence reveals that antigen polymorphism is generated by several mechanisms at the genetic level: interallelic recombination, insertion and/or deletion or mutation [9–11]. To date, sequence available to document variation in the TRAP gene has been limited: 14 laboratory adapted strains/clones and three field isolates that contained ten different alleles [12]. We have previously reported extensive variations in the *P. falciparum* MSP1 gene and the CSP gene in Thai field isolates as compared with those in laboratory strains [10,11]. Therefore, it is very likely that field isolates exhibit more variations in the TRAP gene than so far known. Here, we report sequences of the entire TRAP gene from 26 Thai field isolates, of which 20 were the same as those previously sequenced for the CSP gene [10].

Twenty *P. falciparum* isolates were obtained from Mae Sot District in Tak Province, northern Thailand as described previously [10,11]. Six isolates were obtained from malaria patients at Chulalongkorn Hospital in Bangkok during June–October, 1993. Results of the entire TRAP gene sequences revealed that our 26 isolates con-

tained 27 distinct subclones: mixed infections with different TRAP alleles were detected in 2 isolates, 822 and 841, the latter contained four different alleles. Identical sequences of the entire gene were found in isolates 807 and 836, isolates 814 and 842, and isolates OF and OR. Clones 841C and 841D differed in two silent nt changes from AAA to AAG (Lys) and from TCT to TCA (Ser) at positions 605 and 1247 of the T9/96 sequence [1], respectively.

Sequence alignment of Thai isolates with those previously published [12] revealed 67 nt substitutions, of which 14 were newly identified here. These new substitutions corresponded to three, seven and four substitutions occurring at codon positions one, two and three, respectively. In total, 57 codon changes and 24 substituted codons reported by others were not detected as shown in Fig. 1. TRAP contains six domains: (1) the N-terminal signal sequence, (2) an integrin-like magnesium binding A-domain, (3) a thrombospondin-like sulfatide-binding region (equivalent to region II of CSP)-containing domain, (4) an acidic proline/asparagine-rich repeat region, (5) transmembrane domain and (6) a short acidic cytoplasmic domain (Fig. 1)[13]. Alignment of deduced amino acids of 27 alleles with previously published sequences revealed pronounced conservation in domain I, a stretch of approximately 60

Fig. 1. Alignment of amino acid substitutions deduced from the *P. falciparum* TRAP gene among Thai isolates comparing with the T9/96 sequence [1]. Identical residues are indicated by dots and deletions by dashes. Asterisks mark new positions for substitutions. Previously reported substituted residues not identified here are listed in parentheses. The boundary of each region marked beneath the alignment denotes I: the N-terminal signal sequence, II: the integrin-like magnesium binding A-domain, III: a thrombospondin-like sulfatide-binding region, IV: an acidic proline/asparagine-rich repeat region, V: a transmembrane domain and VI: a cytoplasmic domain. *P. falciparum* DNA was extracted and purified as described elsewhere [9]. Amplification by the polymerase chain reaction (PCR) of the TRAP gene was done in 100 µl reaction mixture containing *P. falciparum* DNA, 200 µM each dNTP, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂, 2.5 units Taq polymerase (Promega, USA) and 1.0 µM of each primer. The forward primer used was, TRAP-F: 5'-GTATGTGCAAGCTTACAAGAAATATTATC-3' (nt 84–95 from the start codon of the T9/96 clone) and the reverse primer, TRAP-R: 5'-TTATTCATGAGATTATATTTAATTCACCTCGTTT TC-3' (nt 1974–2008). Underlined nucleotides were mismatches artificially introduced to create HindIII and XbaI sites in TRAP-F and TRAP-R, respectively. The PCR profile was 35 cycles of 94°C, 1 min; 50°C, 2 min; 72°C, 3 min. The PCR product was digested with HindIII and XbaI, and was cloned into pUC119. The *Escherichia coli* strain JM109 was used as a host for transformation. The DNA template for sequencing was prepared by using Wizard MiniprepTM (Promega, USA), followed by alkaline denaturation as described previously [11]. The sequence was determined by dideoxy chain termination technique using modified T7 DNA polymerase (Sequenase version 2.0 kit, USA) [13]. Overlapping sequences were obtained by sequencing primers: T1: 5'-CTCTTAAGTACAAATCTTCC-3' (nt 461–480), T2: 5'-CTCTTAAGTACAAATCTTCCA-3' (nt 672–692), T3: 5'-GATTTCTTGTAGGTTGTCA-3' (nt 910–928), T4: 5'-GAACAATGTGAAGAAGAAGAAAG-3' (nt 1146–1168), T5: 5'-CTTTGTTTCCTTCATTATC-3' (nt 1581–1600), and T6: 5'-CCTCCAGCTATTCACCTGC-3' (nt 1803–1822). At least two recombinant subclones were used for obtaining the entire sequence of each allele.

mately 60 carboxy terminal residues in domain 2, domain 3, a stretch of approximately 50 residues in domain 4, stretches of 31 and 21 residues in the N-terminus and C-terminus of domain 5, respectively, and domain 6. Furthermore, the putative functional sequence motifs in TRAP, i.e. RGD (residues 307–309), IQQ (76–78) and WSPCSVTCG (250–258), were perfectly conserved in all isolates in both present and previously published sequences. Sequence conservation of these domains could be crucial for the parasite-cell interaction during the process of cell recognition and invasion. Polymorphism seen after the RGD motif from residues 311 to 314: SSVQ, FAVE, FVVE and FAFE, may have structural importance in determining how exposed the RGD motif is in TRAP. The opposite is true around amino acids 90–92 where ANI, ANV, ASV, LNI, LNV and VNV have been seen. It is not known whether some of these combinations are more immunodominant than others.

The peptide construct containing WSPCSVTCG can specifically inhibit sporozoite invasion of hepatocytes [7] and, recently, the antibodies to this motif also inhibit the merozoite invasion of erythrocytes [3]. The number of P(E)-N-P tandem repeat in domain 4 varied from 3 to 8. It is of note that 21 substituted nucleotides reported by Robson et al [12] were not detected in Thai isolates. In contrast, nine amino acid changes detected in Thai isolates were not found in other isolates, suggesting that polymorphism in the TRAP gene reflects geographical variation. A closer look into the alignment indicates that substitutions are not widely polymorphic but basically dimorphic with a few exceptions. Dimorphic variations have been noted for the MSP1 gene, whose variation is generated principally by interallelic recombination. This indicates that interallelic recombination may occur in TRAP alleles as well.

The protective immunity against pre-erythrocytic stages of malaria parasites depends on both humoral and cellular immunity. Antibodies can block the sporozoite invasion of hepatocyte and may kill sporozoites via opsonization. Infected hepatocytes can be destroyed directly by CD8+ CTL or CD4+ T cell- and interferon- γ -dependent effector mechanism [14–16]. To date, four CTL

epitopes have been identified in TRAP; HLA-B8-restricted epitopes (ASKNKEKAL, residues 107–115 and KNKEKALII, residues 109–117) and HLA-A2.1-restricted epitopes (HLGNVKYLV, residues 3–11 and GIAAGLALL, residues 500–508) [5,16]. These epitopes were invariant in all isolates examined in this study and an amino acid exchange at position 116, Ile (ATT) to Ser (AGT), reported in a Gambian isolate [12] was not found. Aidoo et al. [16] have noted a high prevalence of HLA-B8 and HLA-A2.1 in the populations of sub-Saharan and Caucasian. However, the prevalence of HLA-B8 in Mae Sot is less than 2% (two positives out of 146 examined; Hirayama and Kikuchi, personal communication). The prevalence of HLA-A2.1 is not known to date. Our previous sequence study of Mae Sot isolates has shown that some of amino acid exchanges in the CTL epitope of CSP are either shared with isolates from other geographic areas but others are unique. Typing of individual HLA allotypes in the Mae Sot population along with survey for asymptomatic malaria and search for variations in CTL epitopes in CSP and TRAP in the same endemic area may reveal an association of HLA allotypes with protection against clinical malaria in South-east Asia.

In conclusion, our study has shown micro-heterogeneity of the sequences in the *P. falciparum* TRAP gene among Thai field isolates. The TRAP alleles in these isolates considerably differ from those previously reported. The conservation of the CTL-encoding regions encourages the incorporation of these epitopes into a malaria vaccine.

Acknowledgements

This work received main financial support from The Asahi Glass Foundation, Japan (1994) and partial support from Molecular Biology Project of Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and from Grant-in Aid (No. 08281104 and 07457069) of the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan. Somchai Jongwutiwes is a recipient of The Thailand Research Fund (TRF).

References

- [1] Robson KJH, Hall JRS, Jennings MW, Harris TJR, Marsh K, Newbold CI, Tate VE, Weatherall DJ. A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, proerythrocyte membrane protein 1, and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature* 1988;335:79–82.
- [2] Rogers WO, Malik A, Mellouk S, et al. Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9176–80.
- [3] Sharma P, Bharadwaj A, Bhasin VK, Sailaja VN, Chauhan VS. Antibodies to a conserved-motif peptide sequence of the *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein and circumsporozoite protein recognize a 78-kilodalton protein in the asexual blood stages of the parasite and inhibit merozoite invasion in vitro. *Infect Immun* 1996;64:2172–9.
- [4] Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv Immunol* 1989;45:283–335.
- [5] Wenzel B, Houghton RA, Parker KC, Coligan JE, Church P, Gordon DM, Ballou WR, Hoffman SL. Irradiated sporozoite vaccine induces HLA-B8-restricted cytotoxic T lymphocyte responses against two overlapping epitopes of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *J Exp Med* 1995;182:1435–45.
- [6] Wang R, Charoenvit Y, Corradin G, De La Vega P, Franke ED, Hoffman SL. Protection against malaria by *Plasmodium yoelii* sporozoite surface protein 2 linear peptide induction of CD4+ T cell- and IFN- γ -dependent elimination of infected hepatocytes. *J Immunol* 1996;157:4061–7.
- [7] Muller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, Robson KJH, Crisanti A. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *EMBO J* 1993;12:2881–9.
- [8] Scarcelli E, Tolle R, Koita O, Diallo M, Muller HM, Fruh K, Doumbo O, Crisanti A, Bujard H. Analysis of the human antibody response to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 1993;61:3490–5.
- [9] Putaporntip C, Jongwutiwee S, Tanabe K, Thaitong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1997;84:49–56.
- [10] Jongwutiwee S, Tanabe K, Nakazawa S, Yanagi T, Kanbara H. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in p190 (MSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1992;51:81–90.
- [11] Jongwutiwee S, Tanabe K, Hughes MK, Kanbara H, Hughes AL. Allelic variation in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:659–68.
- [12] Robson KJH, Hall JRS, Davies LC, Crisanti A, Hill AVS, Welles TE. Polymorphism of the TRAP gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Roy Soc London* 1990;242:205–16.
- [13] Templeton TJ, Kaslow DC. Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;84:13–24.
- [14] Khumuth S, Sedegah M, Hoffman SL. Complete protection against *Plasmodium yoelii* by adoptive transfer of a CD8+ cytotoxic T-cell clone recognizing sporozoite surface protein 2. *Infect Immun* 1994;62:2979–83.
- [15] Wenzel B, Rogers WO, Houghton RA, Lanar DE, Tine JA, Hoffman SL. Induction of murine cytotoxic T lymphocytes against *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Eur J Immunol* 1994;24:1487–95.
- [16] Aidoo M, Lalvani A, Allsopp CEM, et al. Identification of conserved antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte-inducing vaccine against malaria. *Lancet* 1995;345:1003–7.

จำนวนเงินที่ได้รับและเงินคงเหลือ

<u>งวดที่ 1</u>	ได้รับจาก สกว.	360,000	บาท
	ได้รับจากมหาวิทยาลัย	120,000	บาท
	อื่น ๆ (เช่น ดอกเบี้ย)	-	บาท
	รวม	480,000	บาท
	รายจ่าย	424,000	บาท
	เหลือ	56,000	บาท
<u>งวดที่ 2</u>	ได้รับจาก สกว.	360,000	บาท
	ได้รับจากมหาวิทยาลัย	120,000	บาท
	อื่น ๆ (เช่น ยกมาจากงวดก่อน หรือ ดอกเบี้ย)	56,000	บาท
	รวม	536,000	บาท
	รายจ่าย	535,000	บาท
	เหลือ	1,000	บาท
<u>งวดที่ 3</u>	ได้รับจาก สกว.	270,000	บาท
	ได้รับจากมหาวิทยาลัย	120,000	บาท
	อื่น ๆ (เช่น ยกมาจากงวดก่อน หรือ ดอกเบี้ย)	1,752.72	บาท
	รวม	391,752.72	บาท
	รายจ่าย	391,000	บาท
	เหลือ	752.72	บาท
<u>งวดที่ 4</u>	ได้รับจาก สกว.		บาท
	ได้รับจากมหาวิทยาลัย		บาท
	อื่น ๆ (เช่น ยกมาจากงวด ก่อนหรือ ดอกเบี้ย)		บาท
	รวม		บาท
	รายจ่าย		บาท
	เหลือ		บาท

04/09/95 12:47:45

S-248087

48087-2

พระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาจุฬาลงกรณ์พระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว
ได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าโปรดกระหม่อมพระราชทานพระนามราชานุญาต ให้
บริษัทธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน)
ใช้ตราแผ่นดินนี้ เป็นตราประจำธนาคาร เมื่อ ร.ศ. 125 (พ.ศ. 2448)

ชื่อบัญชี
NAME

48087-2 เมธีวิชัย สภว.-สมชาย จงวุฒิเวศย์

ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน)
THE Siam Commercial Bank Public Company Limited

สาขาสภาอากาศไทย

บัญชีเงินฝากออมทรัพย์
SAVINGS ACCOUNT

เลขที่บัญชี
ACCOUNT NO.

045-2

48087-2



ลงนามโดย Signatory

7100917

บัตรนี้เป็นทรัพย์สินของธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) กรุณาเก็บรักษาไว้ให้ดี

บัตร - บัตร

7100917

296A.7569

DATE	DESCRIPTION	DEBIT	CREDIT	BALANCE	REMARKS
4/09/95	CDD		*****100.00	*****100.00	0828
28/09/95	DDN		****360,000.00	****360,100.00	0324
9/11/95	XWD	*****30,000.00		****330,100.00	0414
06/12/95	XWD	*****15,000.00		****315,100.00	0410
29/12/95	XWD	*****15,000.00		****300,100.00	0046
31/12/95	T/I	*****0.00	*****4,409.12	****304,509.12	0000A
22/03/96	XWD	*****96,000.00		****208,509.12	0417
20/06/96	CMD	*****45,000.00		****163,509.12	0414
30/06/96	T/I	*****0.00	*****6,195.82	****169,704.94	0000A
25/07/96	CMD	*****113,500.00		****56,204.94	0418
16/09/96	CMD	*****56,100.00		*****104.94	0828
31/12/96	T/I	*****0.00	*****1,072.44	*****1,072.44	0000A

INT	*****26.59		
30/06/97	TAX	*****0.00	*****1,099.03 0000A
23/09/97	CMD	*****1,000.00	*****99.03 0409C
17/12/97	DDP	****360,000.00	****360,099.03 0418
INT	*****753.69		
31/12/97	TAX	*****0.00	****360,852.72 0000A
07/01/98	CMD	****230,000.00	****130,852.72 0409L
17/02/98	CMD	****100,000.00	****30,852.72 0411
06/03/98	DDP	****270,000.00	****300,852.72 0418
24/04/98	CMD	****250,000.00	****50,852.72 0410

7100917

1

