

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

การวิเคราะห์ความหลากหลายของโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอชต์ (MSP1, MSP2) และโปรตีนบนผิวสปอร์โรซอชต์ (CSP, TRAP) ของพลาสมาเดียมฟีลิจิปารัมจากผู้ป่วยในประเทศไทย

การศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของโปรตีนที่น่าจะเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียมมีความสำคัญในการเป็นข้อมูลพื้นฐานอย่างมากเพื่อป้องกันการหลบเลี่ยงการถูกทำลายของวัคซีนโดยเชื้อมาลาเรียที่มี epitope ต่างออกไปจากวัคซีน เพื่อเป็นการศึกษาขอบเขตความหลากหลายของโปรตีนที่สำคัญในการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียมชนิดฟีลิจิปารัม ได้แก่ โปรตีนบนผิวเมอร์โรซอชต์ (MSP1, MSP2) และโปรตีนบนผิวสปอร์โรซอชต์ (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 จากตัวอย่างเชื้อที่เก็บรวบรวมในเวลาที่แตกต่างกัน 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 กลุ่มตามระยะการเจริญและกลวัณป้องกันมาลาเรียดังนี้ (Nussenzweig & Long, 1994)

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

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 การลุกลามของเมอริโรซอยต์สู่เม็ดเลือดแดง 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)

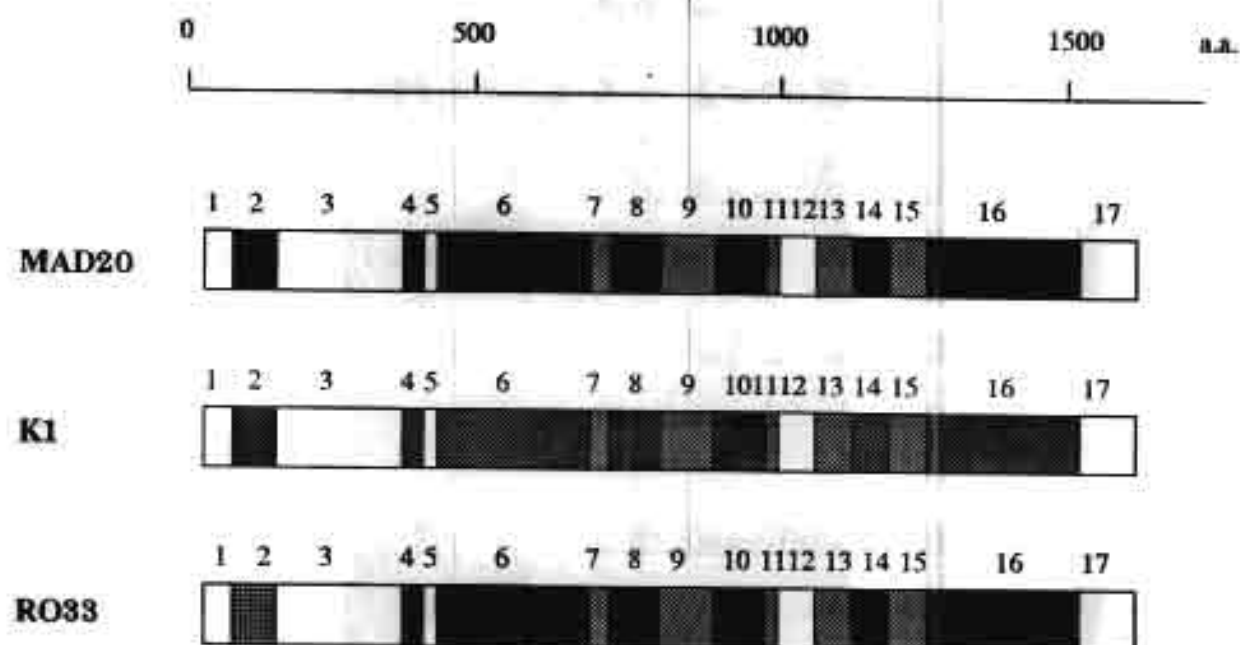
สำหรับการศึกษากำหนดการตอบสนอง antibodies ต่อทั้ง conserved blocks และ variable blocks ต่างมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคมาลาเรียหรือลดความรุนแรงของโรคลง (Riley et al., 1992; Tolle et al., 1993) การตรวจสอบอัลติสของ MSP1 สามารถทำได้โดยวิธี indirect immunofluorescence ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของอัลลิลได้ดี 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 ตัวอย่างพบว่า 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 ยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน นอกจากนี้การศึกษานี้เปรียบเทียบกับ MSP1 อาจพบความสัมพันธ์ในทางโครงสร้างของโมเลกุลทั้งสอง ซึ่งอาจนำไปสู่ความเข้าใจในหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าว ข้อมูลเหล่านี้จึงน่าจะมีประโยชน์ในการผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียในอนาคต

สำหรับโปรตีน CSP และ TRAP ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญบนผิวของระยะสปอร์โรซอยต์นั้น CSP เป็นโปรตีนที่มีผู้ทำการศึกษาอย่างกว้างขวางในการเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย (Nussenzweig & Nussenzweig, 1989) ลักษณะโครงสร้างของ CSP ประกอบด้วยส่วน N-terminus ที่มีความคงที่ระหว่างสายพันธุ์สูง และมีส่วนของกรดอะมิโนที่มีความคงที่ระหว่างชนิดของมาลาเรีย เรียกว่า RI ถัดมาเป็นบริเวณ tetrapeptide repeats แยกต่างไปตามสายพันธุ์ของเชื้อ (Jongwutiwes et al., 1994) antibodies ต่อ tetrapeptide repeats สามารถยับยั้งการกลืนของสปอร์โรซอยต์ไม่ให้เข้าสู่เซลล์ได้ (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

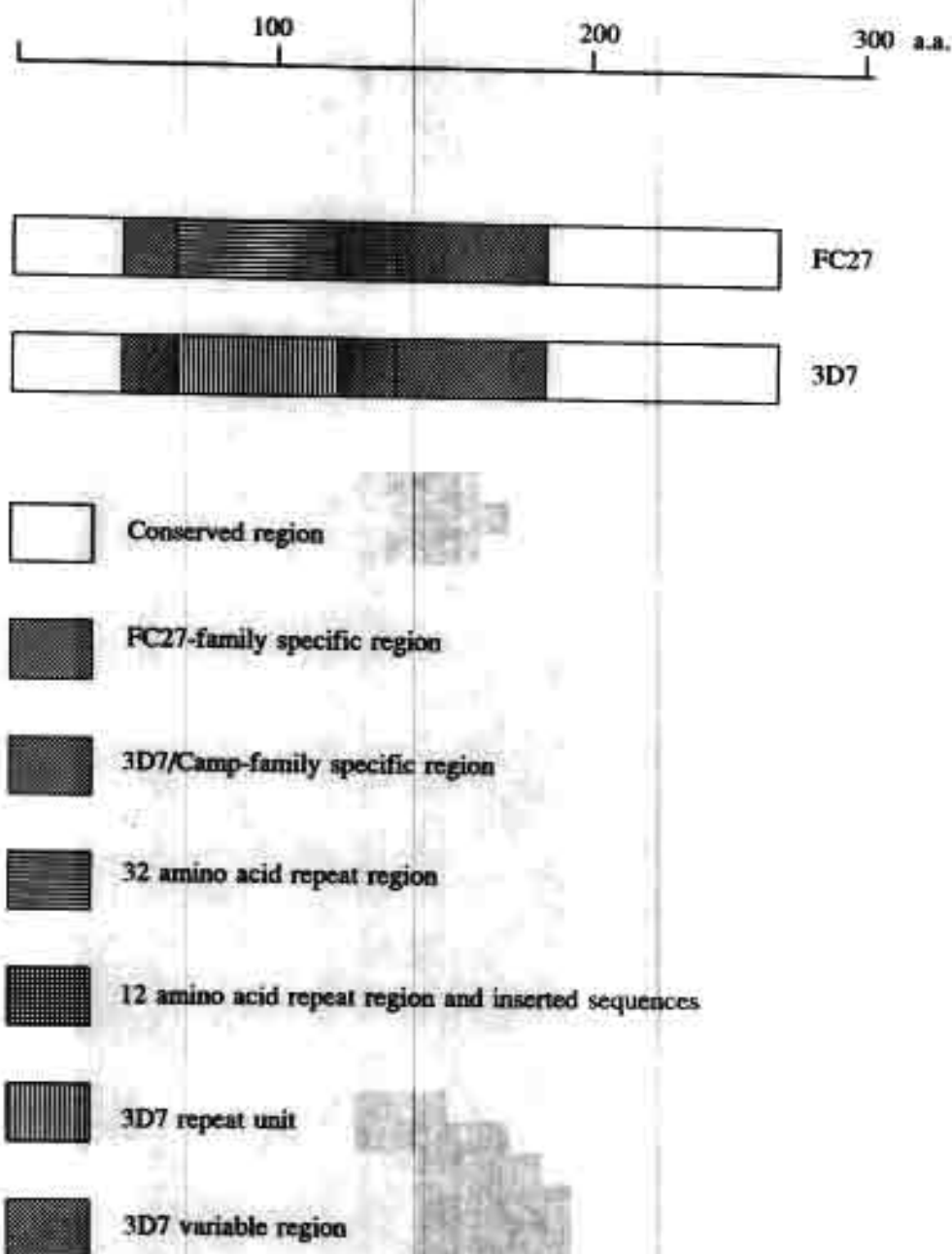
Semiconserved block
(K1 allele)

K1

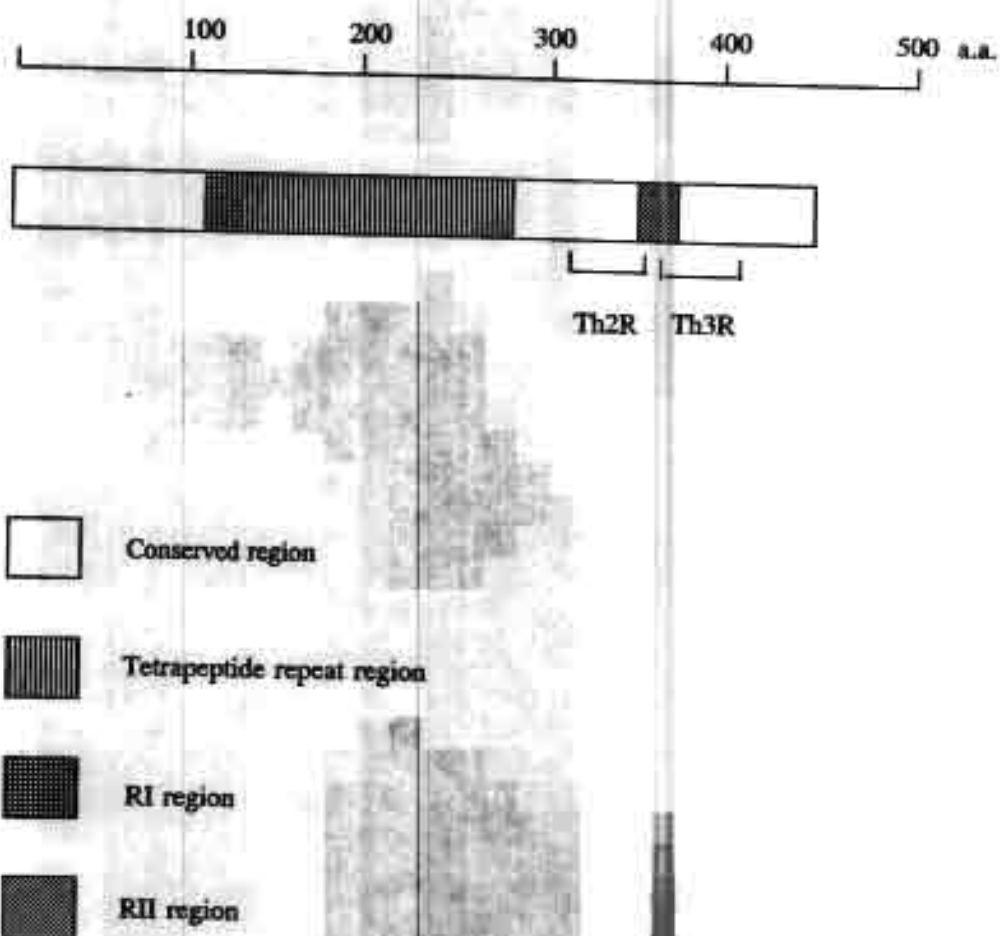
RO33

รูปที่ 2

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



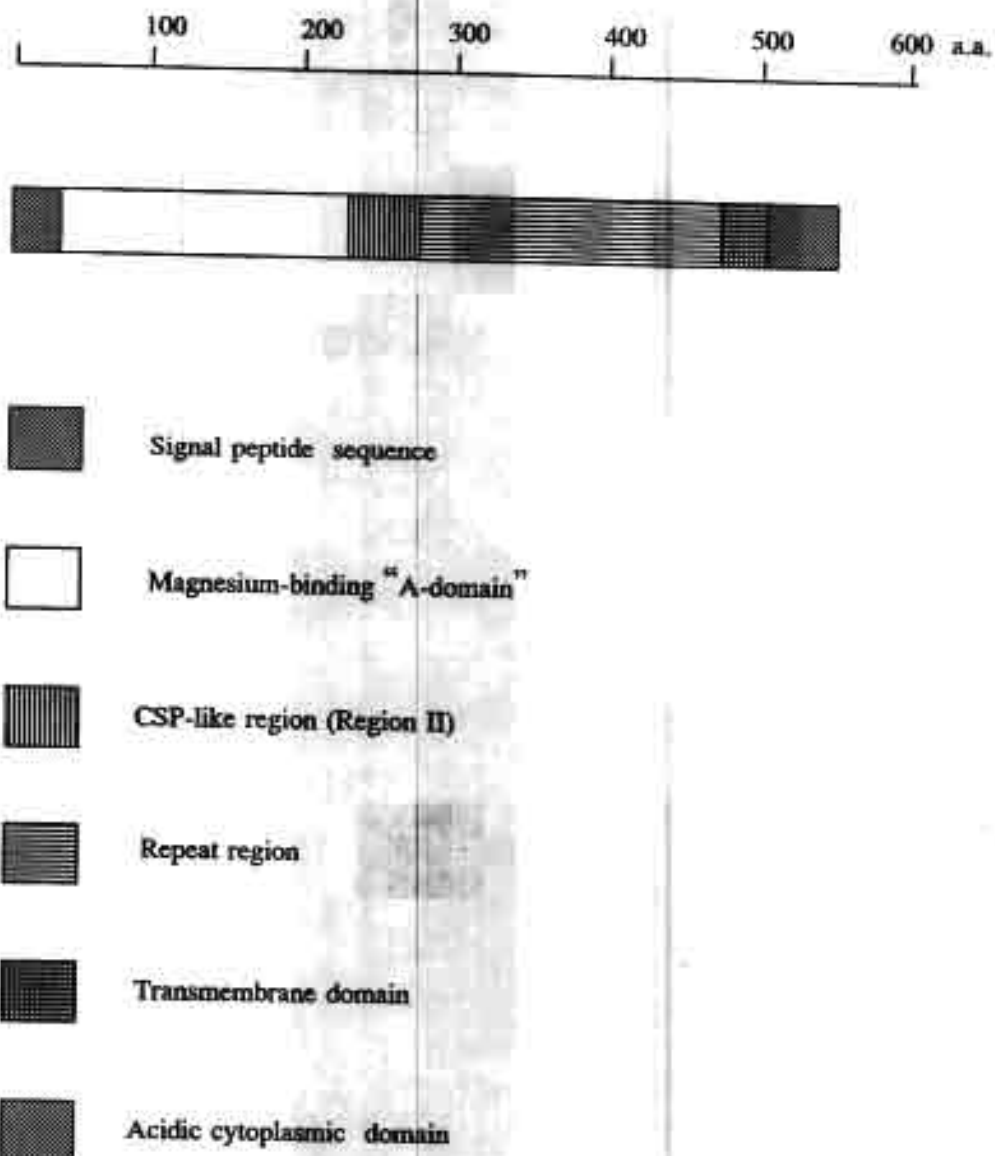
รูปที่ 3

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 ตลอดจนการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนในอนาคตจึงจำเป็นต้องทราบคุณสมบัติของเชื้อในเขตปรากฏโรค ตลอดจนการเข้าใจกลไกทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม

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



1. ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย ชนิด *P. falciparum*

1.1 ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่ได้จาก อามอแมตอด 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 อามอแมตอด 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 จะได้ตะกอนของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ทั้งหมด

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 นำตะกอนส่วนล่างที่ได้มาเติมน้ำสารละลาย 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 โดยปฏิกิริยาจุดโซ่พอลิเมอร์เรส (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' TTATTC TAGAATTATATTTAATTCCACTCGTTTTTC -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 เพื่อทำให้เกิด *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 ใต้อำนาจหลอด 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 ข้ามคืน

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 เขย่าข้ามคืนด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที วันรุ่งขึ้น *E. coli* จะเจริญเต็มที่จนอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น ใช้พาสเจอร์บีปคนด้วยหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มีฝาปิดนำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที *E. coli* จะตกตะกอนแน่นบริเวณก้นหลอด เทสารละลายข้างบนทิ้ง เติมน้ำกลั่น 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 นำไปปั่นอีกครั้งที่สถานะเดิมและเทสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่น GTE 50 μ l เขย่าอย่างแรงเพื่อให้ *E. coli* กระจายในสารละลาย เติมน้ำกลั่น GTE ที่มี lysozyme 200 μ g/ml ในปริมาณ 50 μ l ตีคั่นหลอดเบา ๆ ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมน้ำกลั่น GTE 0.2

N NaOH/SDS ร้อยละ 1 จำนวน 200 μ l คีตกั้นหลอดมา ๆ ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วเติม 3M sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 150 μ l ทิ้งให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง 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' -GAACAATGTGAAGAAGAAGAAAC -3' (nucleotides 1146-1168), T5: 5' -CTTTGTTTCCTTTCATTATC -3' (nucleotides 1581-1600) และ T6: 5' -CCTCCAGCTATTCACCTGC -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 ออกจากกระดาษ 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 หนุมนให้ความดันเท่ากับ 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) โดยผ่านแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 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

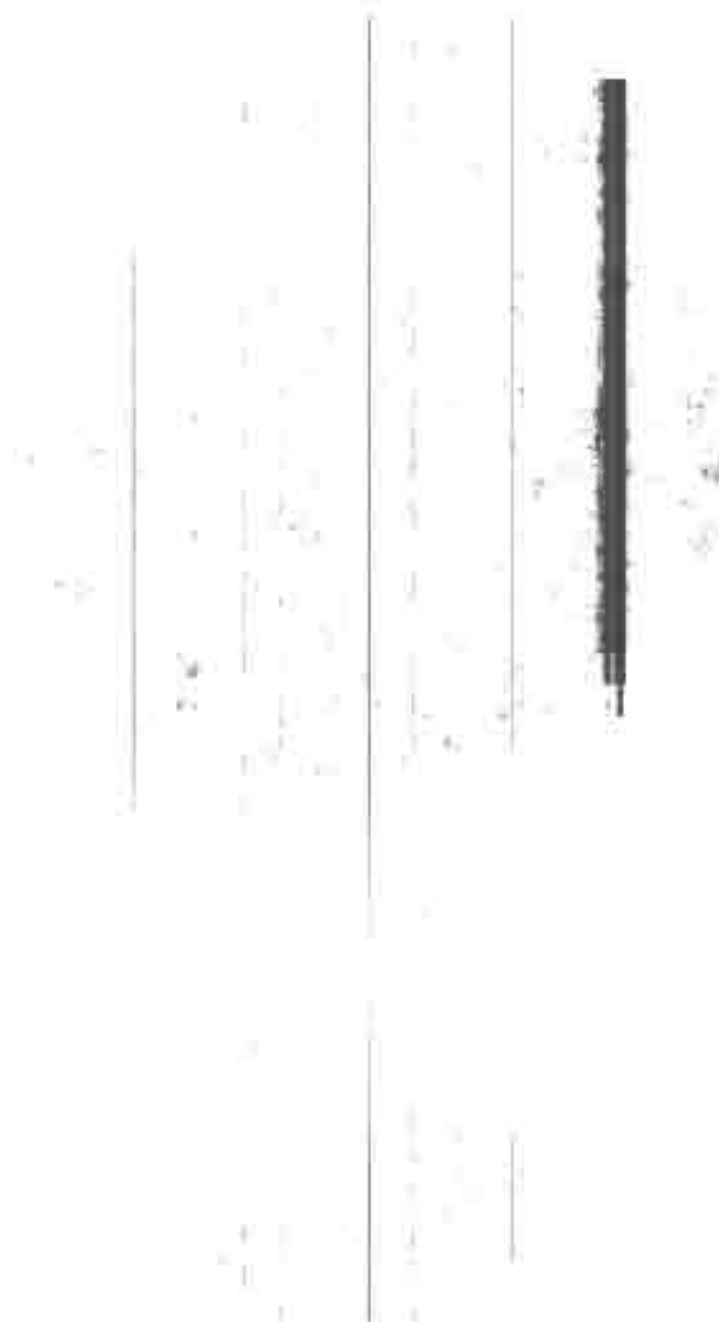
12.3 การทำ hybridization

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
815	ad	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD ^{12B}	VRO33	K1	MAD	MAD	MAD	MAD
835A	-46%	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD	MAD ^{10C}	VI	K1	MAD	MAD	MAD	MAD
835C	-34%	MAD	MAD	MAD	MAD	K1							
T9-101	ad	MAD	MAD	K1	MAD	MAD			MAD	K1			
822A	-30%	MAD	MAD	K1	MAD	MAD	MAD 8A	III	MAD	K1	MAD	MAD	MAD
834A	<5%		MAD	K1	MAD		MAD ^{11A}	VRO33	MAD		MAD	MAD	MAD
835B	-20%	MAD	MAD	K1	MAD	MAD	MAD ^{12B}		MAD	K1	MAD	MAD	MAD
807	ad	MAD	MAD	K1	MAD	K1	MAD ^{12B}	VRO33	MAD	K1	MAD	MAD	MAD
836	ad	MAD	MAD	K1	MAD	K1	MAD ^{12B}	VRO33	MAD	K1	MAD	MAD	MAD
842	ad	MAD	MAD	K1	MAD	MAD	MAD ^{10C}	VI	MAD	K1	MAD	MAD	MAD
843	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	
814B	-3%	R033	MAD	MAD	MAD	MAD	R033	VI					
838	ad	R033	MAD	MAD	MAD	MAD	R033	VI	K1	MAD	MAD	MAD	MAD
841C	-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							
814A	-97%	[3D7] CAMP	T9-102	MAD	MAD	MAD	CAMP ¹⁹	IV	CAMP	MAD	MAD	MAD	MAD
841A&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
806B	-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
834B	-95%	[3D7] CAMP	K1	K1	K1	K1	CAMP ⁷	II	K1A	K1	K1	K1	K1
844	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 8B	II	K1B	K1	K1	K1	K1
806A	-98%	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
808	ad	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
822B	-70%	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
827	ad	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
837	ad	MAD	K1	K1	K1	K1	MAD ^{12A}	II	K1B	K1	K1	K1	K1
838	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	783	894	903	919	949	969	977	1006	1013	1033	1101	1105		
MAD-I	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-II	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-III	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-IV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-V	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-VI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-VII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-VIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-IX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-X	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XIV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XVI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XVII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XVIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XIX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXIV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXVI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXVII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXVIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXIX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXIV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXVI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXVII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXVIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXIX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXIV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXVI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXVII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXVIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXIX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXIV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXV	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXVI	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXVII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXVIII	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXXIX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C	C	A	T	G	xxx	A	A
MAD-XXX	T	xxx	A	T	T	T	T	T	A	C	T	C	G	C	A	A	G	G	xxx	A	C	C	C	A	G	A	xxx	C	C	C							

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 = 841D
 MAD-VIII = 814A, 841A/B, 946
 MAD-IX = 8071
 MAD-X = CAMP, PALO ALTO/FUP

KI-I = KI, 834B, 844
 KI-II = WELLCOME, 805, 806, 821B, 827, 837
 KI-III = 828

--- = 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 GAAGATATAGATAAAATTAAACAGATGCCGAAACCCCACTACTGGAAGTAAACCAATCTCTCCCTGAGAATAAGAAAAAGAAGTCGAAGGA
 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'-TCCTCGATTTTTTTGTCTTATCAAG-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

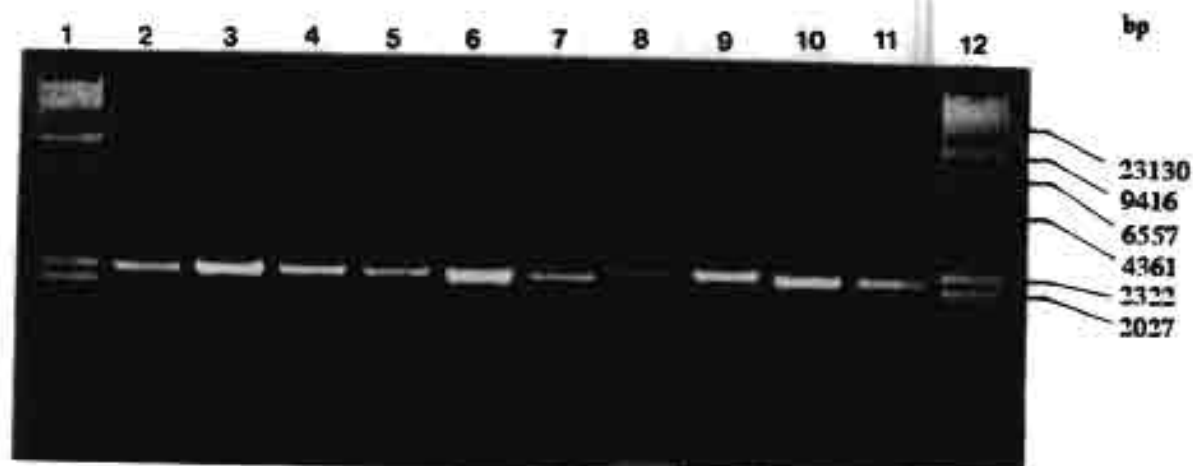
แถวที่ 1	<i>Lambda/HindIII</i>
แถวที่ 2	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 806
แถวที่ 3	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 807
แถวที่ 4	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 815
แถวที่ 5	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 822
แถวที่ 6	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 827
แถวที่ 7	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 834
แถวที่ 8	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 836
แถวที่ 9	ผลิตภัณฑ์ PCR ของ 837
แถวที่ 10	ผลิตภัณฑ์ PCR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

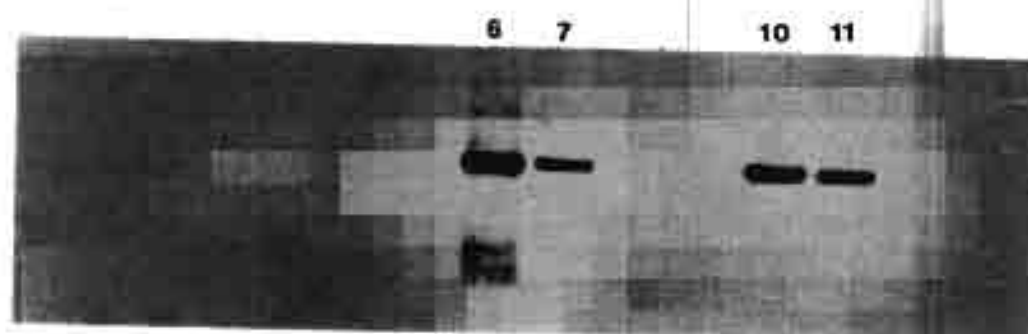
7C แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่าง 7B บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe M534

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

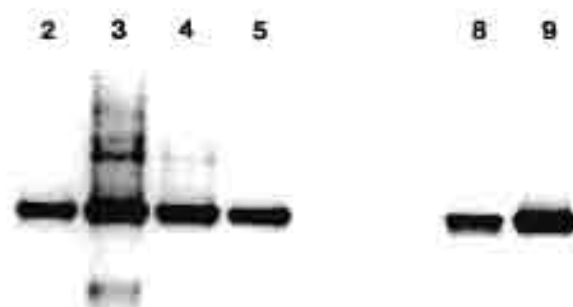
7A



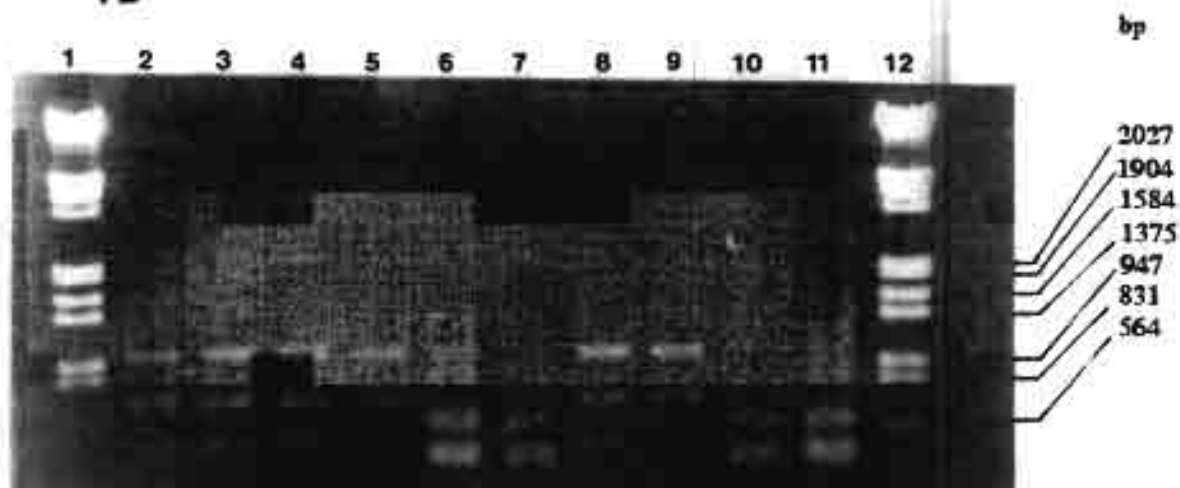
7B



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 ซึ่งเปรียบเทียบอัลลีลที่พบในปี 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

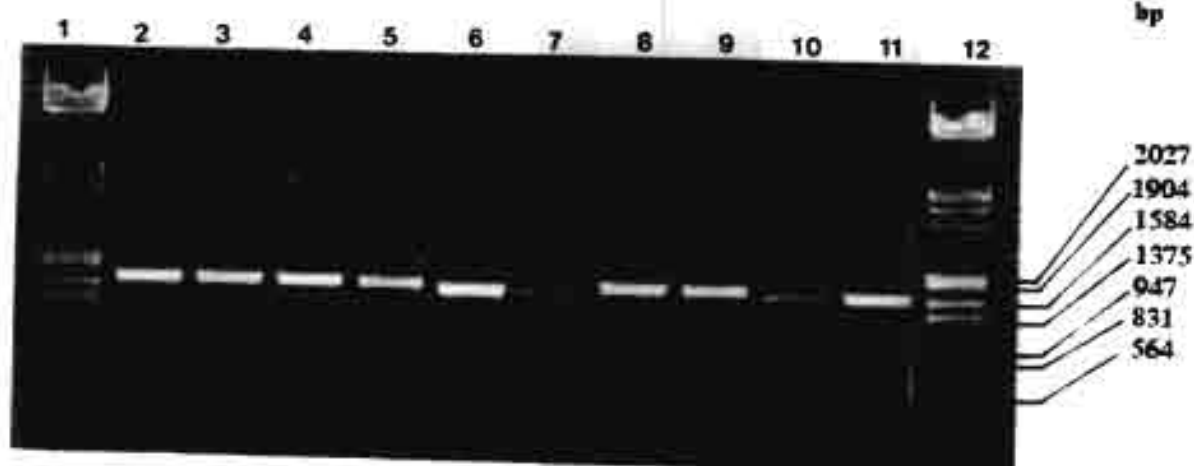
แถวที่ 1	Lambda/ <i>Hin</i> dIII/ <i>Eco</i> RI
แถวที่ 2	ผลผลิต PCR ของ 806
แถวที่ 3	ผลผลิต PCR ของ 807
แถวที่ 4	ผลผลิต PCR ของ 815
แถวที่ 5	ผลผลิต PCR ของ 822
แถวที่ 6	ผลผลิต PCR ของ 827
แถวที่ 7	ผลผลิต PCR ของ 834
แถวที่ 8	ผลผลิต PCR ของ 836
แถวที่ 9	ผลผลิต PCR ของ 837
แถวที่ 10	ผลผลิต PCR ของ 838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

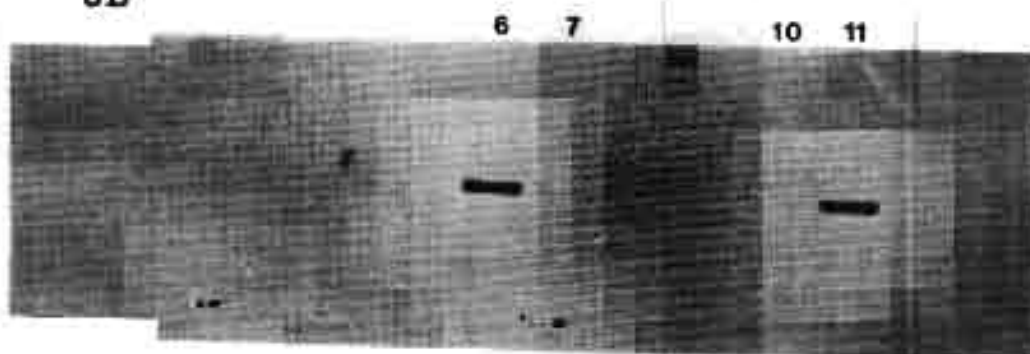
8C แสดงแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างในรูป 8A บนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ จากการทำ Southern blot hybridization ด้วย probe M16

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

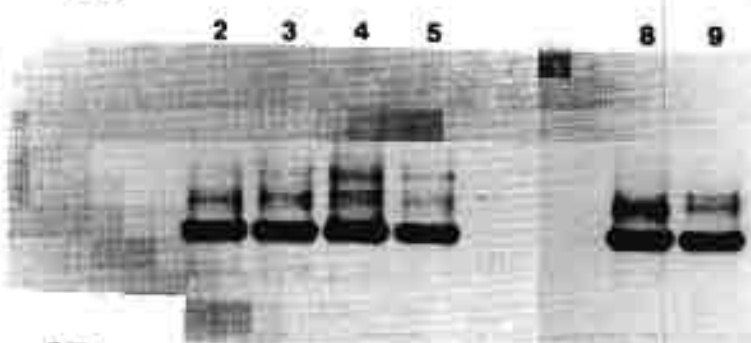
8A



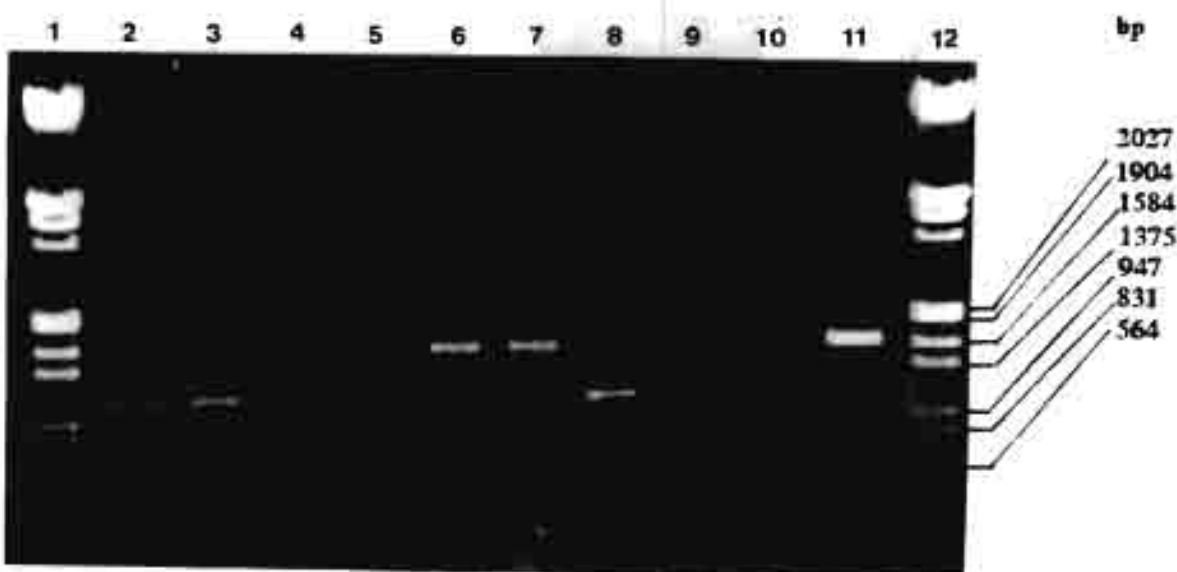
8B



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

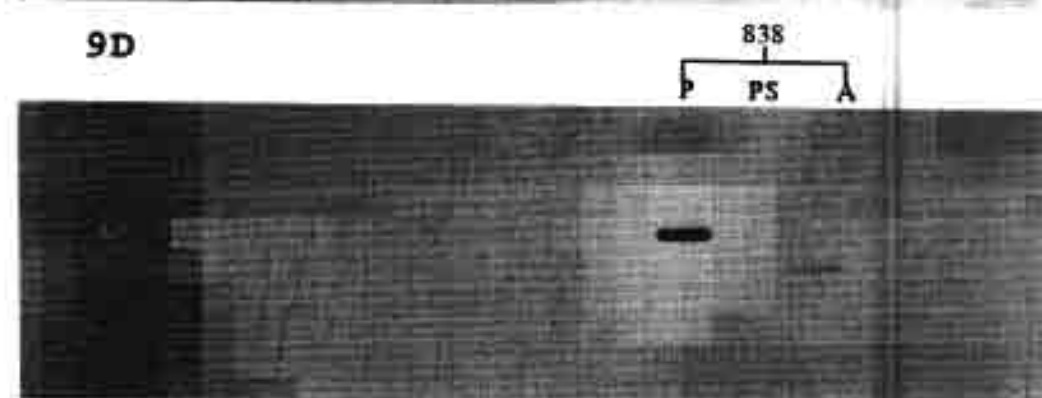
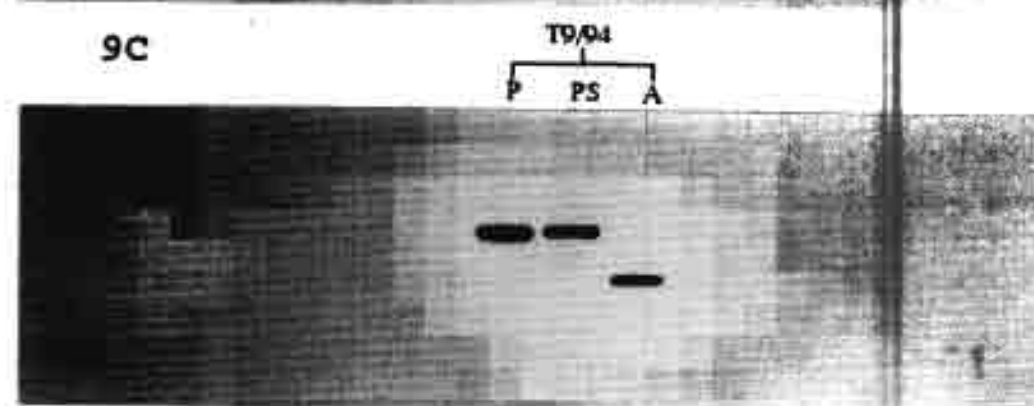
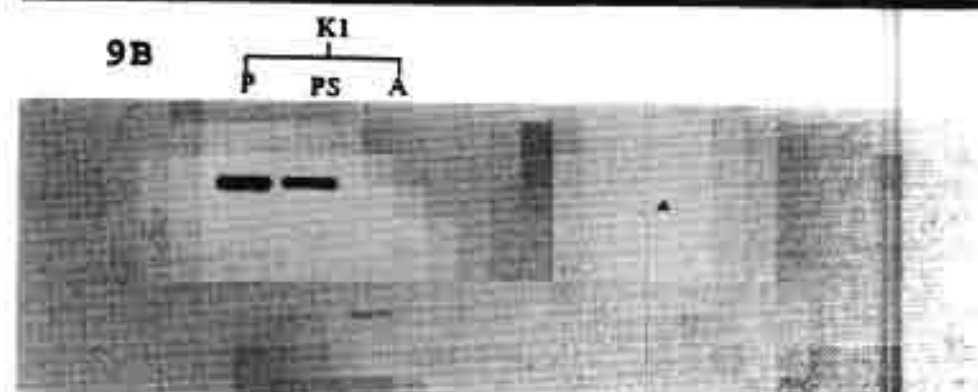
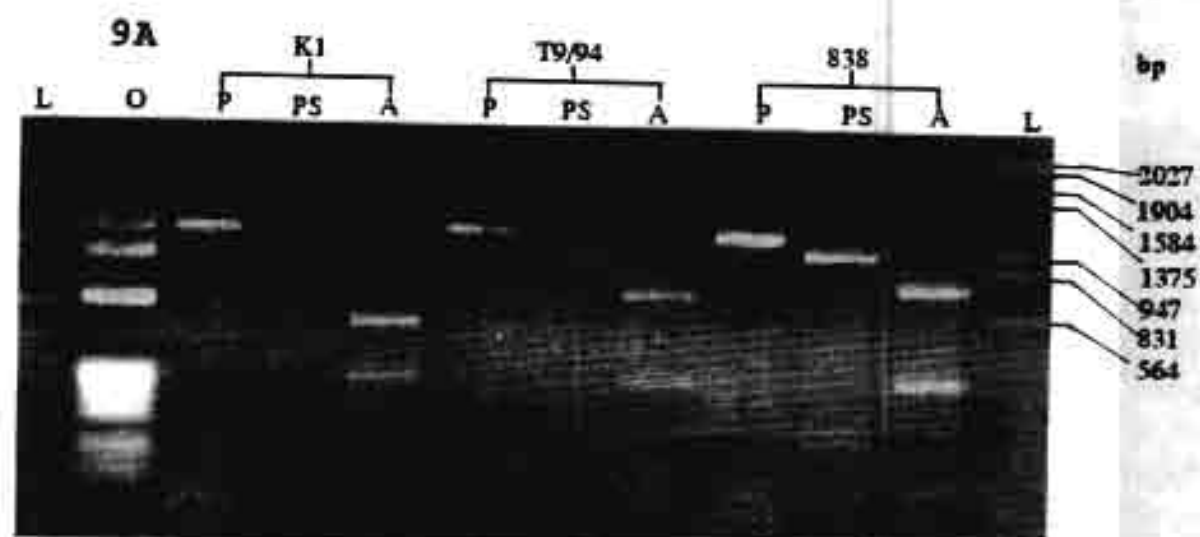
- 9A แสดงแถบดีเอ็นเอแบบ 1.7 % อะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์จาก PCR และแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Alu*I เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda/*Hin* dIII/*Eco* RI และ Φ X174/*Hae* III เรียงลำดับดังนี้

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