ความหลากหลายของแอนติเจนยีนสองชนิด (เอ็มเอสพี 1 และ เอ็มเอสพี 2) ของ Plasmodium falciparum ในประเทศไทย ตรวจหาโดยพีซีอาร์และดีเอ็นเอติดตาม

นางสาว กาญจนา รังษีหิรัญรัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-450-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16751054
I16751054

DIVERSITY OF TWO ANTIGEN GENES (MSP-1 AND MSP-2) OF *Plasmodium falciparum* IN THAILAND DETECTED BY PCR AND DNA PROBES

Miss Kanchana Rungsihirunrat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Biology
Graduate School
Chulalongkorn University
1995

ISBN 974-631-450-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายของแอนติเจนยีนสองชนิด(เอ็มเอสพี 1 และ เอ็มเอสพี 2)ของ Plasmodium falciparum ในประเทศไทยตรวจหาโดยพีซีอาร์และดีเอ็นเอติดตาม

โดย นางสาว กาญจนา รังษีหิรัญรัตน์

ภาควิชา ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. พงชัย หาญยุทธนากร)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กาญจนา รังษีหิรัญรัตน์ : ความหลากหลายของแอนติเจนยีนสองชนิด (เอ็มเอสพี 1 และเอ็มเอสพี 2) ของ Plasmodium falciparum ในประเทศไทยตรวจหาโดยพีซีอาร์และดีเอ็นเอติดตาม (DIVERSITY OF TWO ANTIGEN GENES (MSP-1 AND MSP-2) OF Plasmodium falciparum IN THAILAND DETECTED BY PCR AND DNA PROBES) อ.ที่ปรึกษา : รศ. สดศรี ไทยทอง, 113 หน้า. ISBN 974-631-450-5

เมอร์โรซอยท์เซอร์เฟสโปรตีน - 1 (MSP-1) และเมอร์โรซอยท์เซอร์เฟสโปรตีน - 2 (MSP-2) ของเชื้อ Plasmodium falciparum เป็นโปรตีนที่กำลังศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะนำมาผลิตเป็นวัคซีนป้องกันมาลาเรีย เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวสามารถทำให้เกิดภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองได้ อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอนติเจนยีนทั้งสองชนิดนี้พบว่า ประกอบด้วยส่วนของ tandem repeats ซึ่งมีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดที่แตกต่างกัน ในการศึกษาความหลากหลายของแอนติเจนยีนทั้งสองชนิดนี้จากผู้ป่วยในพื้นที่ที่มีมาลาเรียชุกชุมในประเทศไทย โดยนำตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาสกัดดีเอ็นเอและใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณบล็อค 2 ของยีน MSP-1 และส่วนกลางของยีน MSP-2 จากจำนวน 97 ไอโซเลตและ 3 สายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่า มีความแตกต่างของขนาดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในยีน MSP-2 ชิ้นดีเอ็นเอของยีน MSP-1 มีขนาดระหว่าง 400-580 คู่เบส ส่วนชิ้นดีเอ็นเอของยีน MSP-2 มีขนาดระหว่าง 400-740 คู่เบส ซึ่งมีความแตกต่างของขนาดมากกว่าที่พบในยีน MSP-1 นอกจากนี้ยังสามารถพบจำนวนแถบมากกว่า 1 แถบด้วย ซึ่งเป็นผลมาจากการติดเชื้อแบบผสม จากการศึกษาด้วยวิธีไฮบริไดเซชันโดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีนทั้ง 2 นี้ ความถี่ที่พบอัลลีลแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ใน MSP-1 พบว่า 84 ไอโซเลตเป็นชนิด MAD20 จำนวน 49 ไอโซเลตเป็นชนิด K1 และ 42 ไอโซเลตเป็นชนิด RO33 ส่วนใน MSP-2 นั้นพบว่า 44 ไอโซเลตเป็นชนิด IC1 จำนวน 22 ไอโซเลตเป็นชนิด FC27 และจำนวน 23 ไอโซเลตไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้ง 2 ชนิด และจำนวน 11 ไอโซเลตที่ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามนั้นอาจเกิดจากอัลลีลอื่น

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต กาญจนา รังษีหิรัญรัตน์

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สดศรี ไทยทอง

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ที่ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

C427040 : MAJOR ZOOLOGY
KEY WORD: Plasmodium falciparum / POLYMERASE CHAIN REACTION / MSP-1 / MSP-2 / DNA PROBE

KANCHANA RUNGSIHIRUNRAT : DIVERSITY OF TWO ANTIGEN GENES (MSP-1 AND MSP-2) OF Plasmodium falciparum IN THAILAND DETECTED BY PCR AND DNA PROBES. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SODSRI THAITHONG, 113 pp.
ISBN 974-631-450-5

The major merozoite surface protein 1 (MSP-1) and merozoite surface protein 2 (MSP-2) of Plasmodium falciparum are considered to be potential candidate vaccines for malaria. Immunization studies using the merozoite surface proteins have shown that they can afford protection to animals against P. falciparum. However, sequence data of the merozoite antigen genes have revealed that both genes have a region of tandem repeats which varies both in sequence type and size. The diversity of two major merozoite surface antigens (MSP-1 and MSP-2) has been analysed in clinical isolates from different endemic area of Thailand. Genomic parasite DNA was extracted directly from patients' blood and used in Polymerase Chain Reaction (PCR) to amplify block 2 of MSP-1 and the central region from MSP-2. Ninety-seven isolates and three clones were analysed and a marked degree of size polymorphism was detected, especially for MSP-2. MSP-1 amplified DNA fragments varied in size, between 400-580 bp and MSP-2 amplified DNA fragments produced a range in size between 400 and 740 bp, a greater difference in size than observed with MSP-1. A high proportion of isolates with multiple bands was also observed, most probably resulting from mixed infection. Hybridization studies with allele-specific oligonucleotides were used to type both genes. However, the frequency of the occurrence of alleles among the isolates are uneven. For MSP-1 eighty-four isolates were of the MAD20 type , forty-nine were K1 and forty-two were typed as RO33. When the MSP-2 allele was analysed, forty-four isolates were the IC1 type and twenty-two were the FC27 type. Twenty-three samples hybridized with both probes and eleven isolates of the MSP-2 allele remained unassigned by the specific probes, possibly due to presence of other alleles.

ภาควิชา สัตววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต กาญจนา รุ่งสิหิรันรัตน์
สาขาวิชา สัตววิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [illegible]
ปีการศึกษา 2537	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของรองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือสนับสนุน ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการวิจัยครั้งนี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ ดร. พงชัย หาญยุทธนากร แห่งสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล และ Prof. Geoffrey Beale แห่ง University of Edinburgh, Scotland, United Kingdom ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบรูณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Dr. Lisa Ranford - Cartwright แห่ง Institute of Cell, Animal and Population Biology, University of Edinburgh, Scotland, United Kingdom ที่ได้กรุณาช่วยแนะนำเทคนิค

ขอขอบคุณคุณนภาพร ศิริพูล และคุณอารีย์ เสือก้อน ศูนย์วิจัยมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยแนะนำเทคนิคและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆและน้องๆ ที่คอยเป็นกำลังใจให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนใหญ่จากเงินทุนที่ทางองค์การอนามัยโลกมอบให้แก่ รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง ในโครงการ ID 880 279 Epidemiology and immune response to potential candidate vaccine antigen for a Plasmodium falciparum blood stage vaccine และบางส่วนจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบคุณองค์การอนามัยโลกและบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไว้ ณ ที่นี้ด้วย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. บทสอบสวนเอกสาร	4
3. วิธีการทดลอง	33
4. ผลการทดลอง	47
5. วิจารณ์ผลการทดลอง	92
6. สรุปผลและข้อเสนอแนะ	99
รายการอ้างอิง	101
ภาคผนวก	110
ประวัติผู้เขียน	113

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงความถี่ของการพบอัลลีล MSP-1 ของเชื้อ P. falciparum ในพื้นที่ต่างๆกัน 25
2. PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง 39
3. ดีเอ็นเอติดตามที่ใช้ในการทดลอง 44
4. ผลการไฮบริไดเซชันและขนาดผลิตผล PCR ของยีน MSP-1 และ MSP-2 ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 17 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์ 49
5. ผลการไฮบริไดเซชันและขนาดผลิตผล PCR ของยีน MSP-1 และ MSP-2 ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 20 ไอโซเลต 57
6. ผลการไฮบริไดเซชันและขนาดผลิตผล PCR ของยีน MSP-1 และ MSP-2 ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด จำนวน 40 ไอโซเลต 65
7. ผลการไฮบริไดเซชันและขนาดผลิตผล PCR ของยีน MSP-1 และ MSP-2 ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี จำนวน 20 ไอโซเลต 76
8. สรุปผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 จากผู้ป่วยใน 4 พื้นที่ จำนวน 97 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์ ตามรูปแบบของการไฮบริไดซ์ 85
9. สรุปผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 จากผู้ป่วยใน 4 พื้นที่ จำนวน 97 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์ ตามรูปแบบของการไฮบริไดซ์ 86

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

1. แผนที่แสดงการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย 6
2. วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย 7
3. แสดงจำนวนโครโมโซมที่พบในวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย 11
4. แสดงโครโมโซมจำนวน 14 โครโมโซมของ 3 สายพันธุ์ของเชื้อ
P. falciparum (D10, E12, และ 3D7) 13
5. แสดงโครงสร้างของยีน S-antigen ของเชื้อมาลาเรีย จาก 5 ไอโซเลต 17
6. แสดงโครงสร้างของยีน circumsporozoite protein ของเชื้อ
พลาสโมเดียมชนิดต่างๆ 20
7. แสดงโครงสร้างของยีน ring infected erythrocyte surface
antigen ของเชื้อ P. falciparum 21
8. แสดงโครงสร้างของยีน merozoite surface protein-1 ของเชื้อ
P. falciparum จำนวน 24 ไอโซเลตจากประเทศต่างๆ 24
9. แสดงโครงสร้างของยีน merozoite surface protein-2 ของเชื้อ
P. falciparum จากไอโซเลตต่างๆ 27
10. หลักการของ polymerase chain reaction (PCR) 29
11. แสดงกราฟมาตราฐานซึ่งเขียนขึ้นจากค่าระยะทางการเคลื่อนที่กับค่า log ของ
ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอมาตราฐาน (DNA molecular weight marker VI) 48

รูปที่ หน้า

12. แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum
กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 ในพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด K1
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20
D: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 50
13. แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum
กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27..... 52
14. กราฟแสดงความถี่ของขนาดอัลลีล MSP-1 และ MSP-2 ในพื้นที่อำเภอแม่สอด
จังหวัดตาก
A: MSP-1
B: MSP-2 54
15. แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum
กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 ในพื้นที่อำเภอทองผาภูมิ
จังหวัดกาญจนบุรี
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด K1
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20
D: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 58

รูปที่ หน้า

16. แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum
กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่อำเภอทองผาภูมิ
จังหวัดกาญจนบุรี
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 60
17. กราฟแสดงความถี่ของขนาดอัลลีล MSP-1 และ MSP-2 ในพื้นที่อำเภอทองผาภูมิ
จังหวัดกาญจนบุรี
A: MSP-1
B: MSP-2..... 62
18. แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum
กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 ในพื้นที่อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด K1
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20
D: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 67
19. แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum
กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 69
20. กราฟแสดงความถี่ของขนาดอัลลีล MSP-1และ MSP-2 ในพื้นที่อำเภอบ่อไร่
จังหวัดตราด
A: MSP-1
B: MSP-2 71

รูปที่ หน้า

21. แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 ในพื้นที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด K1
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20
D: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 77
22. แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 79
23. กราฟแสดงความถี่ของขนาดอัลลีล MSP-1และ MSP-2 ในพื้นที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี
A: MSP-1
B: MSP-2 81
24. กราฟแสดงความถี่ของขนาดอัลลีล MSP-1และ MSP-2 ในพื้นที่ 4 จังหวัด จำนวน 97 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์
A: MSP-1
B: MSP-2 87
25. กราฟแสดงความถี่ของรูปแบบอัลลีล MSP-1และ MSP-2 ในพื้นที่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ตราด และชลบุรี
A: MSP-1
B: MSP-2 88

รูปที่ หน้า

26. กราฟแสดงการกระจายของ MSP-1และ MSP-2 ในพื้นที่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ตราด และชลบุรี
A: MSP-1
B: MSP-2 89