

ความผันแปรในส่วนของยีนเอปิคอลเมมเบรนแอนติเจนที่ 1  
จากผู้ป่วยในจังหวัดตากที่ติดเชื้อพลาสมาเดียม ฟัลซิพารัม

ร้อยตำรวจเอก วิธน์ สุวรรณทัต

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา


คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1086-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

VARIATION IN THE CENTRAL PART OF THE APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 GENE  
FROM PLASMODIUM FALCIPARUM-INFECTED PATIENTS IN TAK PROVINCE



Pol.Capt. Vit Suvannadhat

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Parasitology

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-1086-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความผันแปรในส่วนกลางของยีนเอปิคอลเมมเบรนแอนติเจนที่ 1 จากผู้ป่วยในจังหวัดตากที่ติดเชื้อพลาสมาไมเดียม พัลซิปารัม

โดย

ร้อยตำรวจเอก วิธน์ สุวรรณทัต

สาขาวิชา

ปรสิตวิทยาทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประเสริฐ สิทธีเจริญชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินตามพร)

### บทคัดย่อวิทยานิพนธ์

วิธน์ สุวรรณทัต : ความผันแปรในส่วนกลางของยีนเอปิคอลเมมเบรนแอนติเจนที่ 1 จากผู้ป่วยในจังหวัดตากที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพาร์ม. (VARIATION IN THE CENTRAL PART OF THE APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 GENE FROM *PLASMODIUM FALCIPARUM*-INFECTED PATIENTS IN TAK PROVINCE) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์ หน้า. ISBN 937-03-1086-9

เอปิคอลเมมเบรนแอนติเจนที่ 1 (AMA-1) ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* เป็นโปรตีนที่พบมากบริเวณ apical complex ของระยะ merozoite โปรตีนชนิดนี้ถูกเคลื่อนย้ายมายังผิวของ merozoite ตั้งแต่ระยะที่ schizont กำลังมีการเจริญเติบโตจนเป็นระยะ merozoite ข้อมูลเกี่ยวกับ AMA-1 ที่ผ่านมาทั้งที่ได้จากการศึกษาในหลอดทดลอง และในสิ่งมีชีวิต ชี้ให้เห็นว่า AMA-1 เป็นเป้าหมายหนึ่งในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย จากการวิเคราะห์โครงสร้าง พบว่าประกอบด้วยส่วนย่อย 5 ส่วนได้แก่ เปปไทด์สัญญาณ (signal-peptide), โดเมนที่ 1, 2, 3 และ ส่วนท้ายที่อยู่ในไซโตพลาสซึมซึ่งมีส่วนที่แทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Transmembrane cytoplasmic tail) ถึงแม้ว่าจะไม่พบกรดอะมิโนเรียงตัวกันเป็นชุด ๆ ใน AMA-1 แต่ก็ยังพบการแทนที่ในบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์มากในสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่เป็น T-cell epitope ใน โดเมนที่ 1 เพื่อเป็นการศึกษาอย่างละเอียดเกี่ยวกับความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AMA-1 ในส่วน T-cell epitope จากผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในประเทศไทยที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ จึงทำการศึกษาจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจำนวน 100 ราย จากจังหวัดตาก บริเวณของ AMA-1 ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีความยาวทั้งสิ้น 435 คู่เบส จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณดังกล่าวโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ 19 รูปแบบ ในจำนวนนี้มี 16 รูปแบบที่ไม่เคยพบจากการศึกษาใดมาก่อน นอกจากนั้นยังพบตำแหน่งที่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 25 ตำแหน่ง ในจำนวนนี้มี 10 ตำแหน่ง ที่ถูกแทนที่โดยนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้ง 25 ตำแหน่งนี้ ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปทั้งสิ้น ทั้งนี้ codon ที่มีการแทนที่ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 80) เป็นการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติการมีขั้ว และประจุที่แตกต่างไปจากกรดอะมิโนชนิดเดิม ดังนั้นรูปแบบของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณต่าง ๆ ที่เป็น T-cell epitope ที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้จึงมีตั้งแต่ 2 ถึง 9 รูปแบบ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนรูปแบบของบริเวณที่เป็น T-cell epitope ที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับ AMA-1 ในภูมิภาคอื่น ๆ พบว่ามี T-cell epitope 3 บริเวณ ที่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนไม่มาก ในขณะที่ T-cell epitope อีก 2 บริเวณมีจำนวนรูปแบบที่แตกต่างกันเพิ่มขึ้นเป็น 13 ถึง 23 รูปแบบ ด้วยเหตุนี้ความรู้เกี่ยวกับความผันแปรของลำดับกรดอะมิโนของ AMA-1 ที่ปรากฏในประชากรของเชื้อ *P. falciparum* ในธรรมชาติ จึงเป็นพื้นฐานสำคัญในการออกแบบวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่อาศัย AMA-1 เป็นองค์ประกอบ

ภาควิชา..... ปรสตีวิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
 สาขาวิชา.....ปรสตีวิทยาทางการแพทย์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
 ปีการศึกษา.....2544.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## 4375263530: MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEY WORD: *PLASMODIUM FALCIPARUM* / APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1

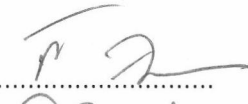

VIT SUVANNADHAT: VARIATION IN THE CENTRAL PART OF THE APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 GENE FROM *PLASMODIUM FALCIPARUM*-INFECTED PATIENTS IN TAK PROVINCE.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES MD, Ph.D. 88 pp.

ISBN 937-03-1086-9

Apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum* is a merozoite protein localized to the apical complex and transported to the merozoite surface during schizont maturation. Several lines of evidences from *in vitro* and *in vivo* studies have suggested that AMA-1 is a promising candidate for a malaria vaccine. Although sequence analysis has revealed that AMA-1 lacks apparent repeats, nucleotide substitutions have been frequently identified among isolates. Importantly, clusters of nucleotide substitutions are found in domain I where a number of T-cell epitopes have been mapped. To gain insights into natural variation in these T-cell-epitope-encoding regions among Thai isolates, 100 *P. falciparum*-infected patients in Tak province were recruited in this study. The AMA-1 gene fragment, spanning 435 base pairs, from each isolate was amplified by the polymerase chain reaction, followed by direct sequencing. Results revealed that 19 distinct alleles were detected in this population, 16 of which were newly identified in this analysis. In total, 25 substituted nucleotides occurred, 10 of which were transitional changes. It is of note that all of these substitutions resulted in amino acid altering. Furthermore, the majority of substituted codon (80%) created radical amino acid replacements in terms of polarity and acid-base property. Consequently, the T-cell epitopes mapped in this region exhibited sequence variation ranging from 2 to 9 sequence types. Comparison with the AMA-1 sequences from diverse geographic origins has shown that a limited sequence variation occurred in 3 epitopes while 2 epitopes displayed extensive sequence polymorphism, containing 13 and 23 sequence types. Therefore, a rational design of an AMA-1-based vaccine should take into account the variation among natural *P. falciparum* populations.

Department.....Parasitology....  
 Field of study.....Medical parasitology  
 Academic year.....2002.....

Student's signature.....  
 Advisor's signature.....  
 Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ผู้เขียนขอกราบพระคุณอย่างยิ่งในความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ เอาใจใส่ สนับสนุน และให้คำแนะนำ ตลอดจนการแก้ไขจุดบกพร่องต่าง ๆ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประเสริฐ สิทธีเจริญชัย และ รองศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินตามพร ที่ให้คำแนะนำ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณมาลี เจริญกร ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องทั่วไประหว่างการทำวิทยานิพนธ์

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยทุนสนับสนุนจากมูลนิธิธิดาธิ ที่ให้การสนับสนุนในการเก็บตัวอย่างเลือด ขอขอบพระคุณ ทบวงมหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก ในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ประจำปีการศึกษา 2544 และขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนโครงการวิจัยหรือค้นคว้าเพื่อทำวิทยานิพนธ์ในระดับบัณฑิตศึกษา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัวทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ และ สนับสนุนมาโดยตลอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ญ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
2. สอบสวนเอกสาร.....	6
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
4. ผลการทดลอง.....	45
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	74
6. สรุปผลการทดลอง.....	80
รายการอ้างอิง.....	82
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	88

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. ข้อมูลทั่วไปของประชากรตัวอย่าง.....	46
2. จำนวนร้อยละของตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยในอำเภอแม่สอด และอำเภอพบพระ.....	49
3. อาการทางคลินิก ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ และค่าทางสถิติ.....	50
4. ตำแหน่งและชนิดของการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน AMA-1.....	58
5. จำนวนตัวอย่างที่พบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์.....	59
6. การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนใน AMA-1 และคุณสมบัติทางกายภาพของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป.....	61
7. การเปรียบเทียบรูปแบบของยีน AMA-1 ระหว่างประชากรตัวอย่างจากอำเภอแม่สอด และอำเภอพบพระ.....	62
8. ความถี่ในการพบ AMA-1 แต่ละรูปแบบ.....	63
9. จำนวนและความสัมพันธ์ระหว่างค่า parasitemia เฉลี่ย และค่า hematocrit เฉลี่ย.....	64
10. การเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบต่าง ๆ ของ AMA-1 ในแต่ละ T-cell epitope.....	72

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1. ภูมิภาคต่าง ๆ ที่มีการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย.....	9
2. วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย.....	14
3. การเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของ merozoite.....	17
4. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของ merozoite.....	27
5. บริเวณต่าง ๆ บนยีน AMA-1 ที่มีระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน ออกไป.....	28
6. โครงสร้างสามมิติ และตำแหน่ง disulfide bond ของ AMA-1 ของ <i>P. falciparum</i> .....	30
7. แสดงตำแหน่งของ primer P1 P2 P3 และ P4 บริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษา.....	40
8. ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ในรอบแรก.....	51
9. แสดงผลการทดสอบผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ในรอบที่สอง .....	52
10. แสดงการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AMA 1 ของเชื้อ <i>P. falciparum</i> .....	55
11. แสดงการเปรียบเทียบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AMA 1 ของเชื้อ <i>P. falciparum</i> ที่ได้จากประชากรตัวอย่างที่ได้จากการศึกษานี้กับการศึกษาอื่น ๆ.....	67
12. แสดงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการถูกแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละ ตำแหน่ง.....	69

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**คำย่อ**

AMA-1	apical membrane antigen 1
bp	basepair
°C	องศาเซลเซียส
DNA	deoxyribonucleic acid
IgG	Immunoglobulin G
Kda	kilodalton
ml	microlitre
mM	milimolar
PCR	polymerase chain reaction
spp.	species
UV	ultraviolet
μl	microlitre



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย