

ความหลากหลายของยีนที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอริโรซอยด์ชนิดที่ 1
ในบริเวณที่กรดอะมิโนสามตัวเรียงซ้ำกันของพลาสมิเดียม พัลชิปาร์ม จากจังหวัดตาก

นายอุดมศักดิ์ ตั้งชัยสุริยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1084-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POLYMORPHISM IN THE TRIPEPTIDE REPEAT-ENCODING REGION OF THE
MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1 (MSP1) GENE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM*
IN TAK PROVINCE

MR. UDOMSAK TANGCHASURIYA

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 974-03-1084-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความหลากหลายของยีนที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอริโรซอยด์ชนิดที่ 1
ในบริเวณที่กรดอะมิโนสามตัวเรียงซ้ำกันของพลาสโมเดียม พัลซิพารัม
จากจังหวัดตาก

โดย

นายอุดมศักดิ์ ตั้งชัยสุริยา

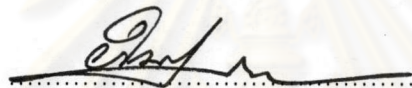
สาขาวิชา

ปรสิตวิทยาทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์

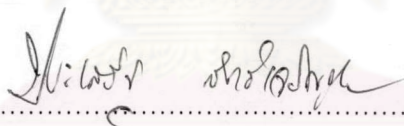
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

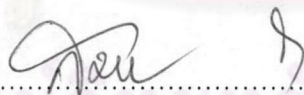
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



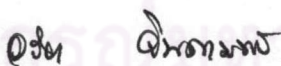
..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประเสริฐ สิวทิวรักษ์)



..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินตามพร)

อุดมศักดิ์ ตั้งชัยสุริยา : ความหลากหลายของยีนที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอริโซซอิต์ชนิดที่ 1

ในบริเวณที่กรดอะมิโนสามตัวเรียงซ้ำกันของ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม จากจังหวัดตาก

(POLYMORPHISM IN THE TRIPEPTIDE REPEAT-ENCODING REGION OF THE MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1 (MSP1) GENE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN TAK PROVINCE).

อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมชาย จงวุฒิวัดยศ, 139 หน้า.

ISBN 974-03-1084-2.

โปรตีนบนผิวเมอริโซซอิต์ชนิดที่ 1 (merozoite surface protein 1, MSP1) ของเชื้อมาลาเรียชนิด พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนสำหรับป้องกันโรค มาลาเรีย จากการศึกษาพบว่าโปรตีนจาก block 2 ของยีน PfMSP1 เป็นเป้าหมายหนึ่งของการกระตุ้นให้เกิด ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย แม้ว่าความหลากหลายของยีน PfMSP1 มีพื้นฐานเพียง 2 รูปแบบ แต่ block 2 มีลักษณะที่ต่างไป เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน แบ่งได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม MAD20 กลุ่ม K1 และ กลุ่ม RO33 โดยกลุ่ม MAD20 และกลุ่ม K1 ประกอบด้วยกรดอะมิโนสามตัวเรียงซ้ำกันเป็นชุด (tripeptide repeat) โดยมีลำดับกรดอะมิโนและจำนวน tripeptide repeat แตกต่างกันตามตัวอย่างของเชื้อ ในขณะที่ไม่ พบความหลากหลายดังกล่าวในกลุ่ม RO33 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่มี tripeptide repeat การที่จะทราบขอบเขต ความหลากหลายของ block 2 จำเป็นต้องศึกษาจากตัวอย่างเชื้อจากผู้ป่วยจำนวนมาก การศึกษานี้ใช้ ตัวอย่างทั้งหมดจากผู้ป่วย 177 ราย โดยเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2538 และ พ.ศ. 2540-2542 จากจังหวัดตาก ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ครอบคลุม block 1 ถึง block 5 ของ PfMSP1 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ากลุ่ม MAD20 มีปริมาณมากที่สุด (ร้อยละ 58) รองลงไปคือ กลุ่ม RO33 และกลุ่ม K1 โดยพบร้อยละ 25 และ 17 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้กับ ข้อมูลที่มีการศึกษามาก่อน พบว่า block 2 ประกอบด้วย 67 อัลลิล โดยประเทศไทยพบ 24 อัลลิล สำหรับ อัลลิลใหม่ที่มีการศึกษานี้เป็นกลุ่ม MAD20 8 อัลลิล และกลุ่ม K1 3 อัลลิล ซึ่งมีจำนวน tripeptide repeat แตกต่างกันระหว่าง 5-16 ชุด ในกลุ่ม MAD20 และ 5-14 ชุด ในกลุ่ม K1 ทั้งนี้อัลลิลในกลุ่ม MAD20 ที่พบมากที่สุดประกอบด้วย tripeptide repeat 12 ชุด (38 ตัวอย่าง) ในขณะที่กลุ่ม K1 พบ tripeptide repeat 10 ชุด (18 ตัวอย่าง) เป็นที่น่าสังเกตว่า tripeptide repeat ที่มีจำนวนชุดเท่ากันอาจมีความแตกต่างกันใน ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในทางตรงกันข้ามลำดับ นิวคลีโอไทด์ในกลุ่ม RO33 มีความคงที่ อย่างไรก็ตามอัลลิลใน กลุ่ม MAD20 และกลุ่ม K1 มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหรือลดลงในแต่ละปี ดังนั้นประชากรของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ในประเทศไทยมีความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์และจำนวนของ tripeptide repeat แม้ว่ากรกระจายของกลุ่ม MAD20 กลุ่ม K1 และกลุ่ม RO33 ใน block 2 จะไม่พบความผันแปร ตามเวลา แต่จะพบความผันแปรในระดับอัลลิลในกลุ่ม MAD20 และกลุ่ม K1 ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ผลการศึกษานี้จะเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการออกแบบวัคซีนป้องกันมาลาเรียต่อไป

ภาควิชา
.....

สาขาวิชา
.....

ปีการศึกษา2544.....

ลายมือชื่อนิสิต อุดมศักดิ์ ตั้งชัยสุริยา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
.....

4375281830 : MEDICAL PARASITOLOGY.

KEY WORD

PLASMODIUM FALCIPARUM / MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1
/ TRIPEPTIDE REPEATS / DNA SEQUENCE

UDOMSAK TANGCHAISURIYA : POLYMORPHISM IN THE TRIPEPTIDE
REPEAT-ENCODING REGION OF THE MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1
(MSP1) GENE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN TAK PROVINCE. THESIS
ADVISOR : ASSOC PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D, Ph.D. 139 pp. ISBN
974-03-1084-2.

The merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* (PfMSP1) is a strong malaria vaccine candidate. Recent studies have shown that block 2 of PfMSP1 is a target for protective immunity. Although structural diversity in PfMSP1 is basically dimorphic, block 2 is unique because 3 basic sequence types have been found, i.e. K1 type, MAD20 type and RO33 type. Both the K1 and MAD20 types possess tripeptide repeats with sequence and size polymorphism among isolates whereas a limited sequence variation has been detected in the RO33 type which lacks apparent repeats. To investigate into the extent of variations in block 2 of PfMSP1, a number of field isolates are required to address this issue. A total of 151 clinical isolates of *P. falciparum* collected during 1995 and 1997-1999 from Tak Province, northern Thailand were recruited in this analysis. The genomic *P. falciparum* DNA of all isolates in this study were amplified by the polymerase chain reaction (PCR), encompassing blocks 1 and 5 of PfMSP1, followed by sequencing. Results revealed that the MAD20 types were predominantly identified (58%) followed by the RO33 types (25%) and the K1 types (17%). In total 67 alleles of block 2 were observed among isolates in this study and those previously reported. Of these, 24 alleles were identified among Thai isolates. Eight alleles of the MAD20 type and 3 alleles of the K1 types were newly identified. Size variations in the tripeptide repeat units ranging from 5 to 16, and from 5 to 14 units were observed in the MAD20 types and the K1 types, respectively. The most frequently identified MAD20 type of block 2 contained 12 repeat units (38 isolates) whereas the predominant K1 type possessed 10 units (18 isolates). It is of note that sequence variation occurred in the tripeptide repeats among isolates with the same number of repeat units. On the other hand, the RO33 type is highly conserved. However, a notable fluctuation of certain alleles within the MAD20 and the K1 types was found. Therefore, extensive sequence and size polymorphism of PfMSP1 block 2 occurred in natural *P. falciparum* population in Thailand. The distribution of major types (MAD20, K1 and RO33) of block 2 displayed no apparent temporal variation while the fluctuation in certain alleles within the MAD20 and K1 types was detected. This finding provides implication for vaccine design based on block 2 of PfMSP1.

Department Parasitology.....

Student's signature

อุดมศักดิ์ ตั้งชัยสุริยา

Field of study Medical Parasitology.....

Advisor's signature



Academic year 2001.....

co-Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ
รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อแนะนำในการแก้ไขปัญหา
ต่าง ๆ ในการศึกษาวิจัยและดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย
ภาควิชาปรสิตวิทยา รองศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินตามพร ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจน
แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ณัฐรอส จันทระชุม ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ คุณมาลี เจริญกร คุณทวีศักดิ์ แซ่เตีย ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้และมิตรภาพอันดีเสมอมา

งานวิจัยนี้ได้ทุนสนับสนุนจากมูลนิธิธิดาธิที่มอบให้ รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์
สมชาย จงวุฒิเวศย์ ทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท - เอก ในสถาบันอุดม
ศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2544 และทุนอุดหนุนโครงการวิจัยหรือค้นคว้าเพื่อ
ทำวิทยานิพนธ์ในระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา ครูอาจารย์และพี่น้องทุกคนที่ให้
กำลังใจ คำปรึกษาและให้การสนับสนุนในการศึกษามาโดยตลอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ญ
คำย่อ	ฎ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
3. วิธีดำเนินการวิจัย	33
4. ผลการทดลอง	48
5. วิจัยผลผลการทดลอง	99
6. สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	111
รายการอ้างอิง	113
ภาคผนวก	135
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	139

ศูนย์วิทยุทันตวิทยาการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. การกระจายของอัลลีลใน block 2 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	28
2. ตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย แหล่งที่มาและปีที่ทำการเก็บตัวอย่าง.....	49
3. สรุปข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง.....	50
4. การกระจายของอัลลีลใน block 2 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i> ในประเทศไทย.....	59
5. ตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียจากรายงานการทดลองที่เคยมีการศึกษามาก่อน...	71
6. การกระจายความถี่ของอัลลีล MAD20 ในบริเวณ tripeptide repeats ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	75
7. การกระจายความถี่ของอัลลีล K1 ในบริเวณ tripeptide repeats ของยีน MSP1 ของ เชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	76
8. การกระจายความถี่ของอัลลีล RO33 ในบริเวณ tripeptide repeats ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	77
9. รูปแบบความหลากหลายของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่มีการแทนที่ใน block 1 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	83
10. ความหลากหลายของกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลงใน block 1-3 ของอัลลีล MAD20 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	88
11. ความหลากหลายของกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลงใน block 1-3 ของอัลลีล K1 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	89
12. ความหลากหลายของกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลงใน block 1-3 ของอัลลีล RO33 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	90
13. องค์ประกอบของโคดอนที่ใช้ใน tripeptide repeats ของอัลลีล MAD20 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	94
14. องค์ประกอบของโคดอนที่ใช้ใน tripeptide repeats ของอัลลีล K1 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	95
15. องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ใช้ใน tripeptide repeats แต่ละชุดของ อัลลีล MAD20 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	97

สารบัญตาราง

ตาราง

หน้า

16. องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ใช้ใน tripeptide repeats แต่ละชุดของ อัลลีล K1 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	98
17. แสดงการเปรียบเทียบการกระจายของกลุ่มอัลลีล ใน block 2 ในช่วงระยะเวลา เวลา 10 ปี ทดสอบทางสถิติด้วยวิธี chi-square	103
18. แสดงการเปรียบเทียบการกระจายของอัลลีลในประเทศไทย เวียดนาม บราซิล และแทนซาเนีย ทดสอบทางสถิติด้วยวิธี chi-square	106



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1. วงชีวิตของมาลาเรีย.....	10
2. แผนที่เขตพลาสมาโรคมาลาเรียทั่วโลก.....	12
3. โปรตีนของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i> ที่พบในระยะเวลาเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยเพศ ในเม็ดเลือดแดง	22
4. โครงสร้างยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	26
5. แสดงแถบดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสรอบแรก	53
6. แสดงแถบดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสรอบสอง.....	54
7. Electropherogram ของอัลลีล MAD20	55
8. Electropherogram ของอัลลีล K1	56
9. Electropherogram ของอัลลีล RO33	57
10. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนบริเวณ tripeptide repeats ของอัลลีล MAD20 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	63
11. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนบริเวณ tripeptide repeats ของอัลลีล K1 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	67
12. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนบริเวณ tripeptide repeats ของอัลลีล RO33 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	70
13. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ block 1 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	79
14. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ block 3 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	84
15. องค์ประกอบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของชุด tripeptide repeats ของอัลลีล MAD20 ของยีน MSP1 ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i>	96

คำย่อ

A	Adenine
bp	Base pair
C	Cytosine
cm	Centimetre
°C	Degree celsius
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr	Ethidium bromide
G	Guanine
g	Gram
Ig	Immunoglobulin
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
ml	Millilitre
mm	Millimetre
mM	Millimolar
nm	Nanometre
OD	Optimal density
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
S	Svedberg unit
T	Thymine
U	Uracil
μl	Microlitre