บทที่ 6

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ P. falciparum

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของดีเอนเอที่สกัดได้ขึ้นอยู่กับจำนวนและระยะของเชื้อมาลาเรีย เช่น ถ้านำเชื้อเปอร์เซนต์สูงและส่วนใหญ่อยู่ในระยะไซซอนท์มาสกัด จะได้ปริมาณสุทธิของดีเอนเอสูง การเลี้ยงเชื้อ P. falciparum ในจานเพาะนั้น พบว่าเชื้อมักจะไม่อยู่ในระยะเดียวกันทั้งหมด แต่จะมีหลายระยะปนกันอยู่ (asynchronous culture) ส่วนที่ต้องการคือเชื้อที่อยู่ในระยะไซซอนท์ ดังนั้นเพื่อที่จะให้ปริมาณสุทธิของดีเอนเอที่สกัดได้สูง จึงจำเป็นต้องทำให้เชื้ออยู่นระยะเดียวกัน (synchronous culture) โดยใช้สารละลาย sorbitol 5 เปอร์เซนต์ และดีเอนเอที่สกัดได้แต่ละครั้งจะต้องไม่มีดีเอนเอของคน ซึ่งเป็นโฮสต์ปะปนอยู่ ปัญหานี้ป้องกันได้โดย ก่อนที่จะนำเลือดของโฮสต์มาทำการเลี้ย[illegible] P. falciparum [illegible] เลือดขาวหลงเหลืออยู่ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยทำฟิล์มเลือดชนิดบาง และชนิดหนา ย้อมสีส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์ ซึ่งโดยปกติแล้วการเลี้ยงเชื้อ P. falciparum ในจานเพาะจะต้องมีการตรวจสอบระยะ (stage) และรูปร่างลักษณะ (morphology) ของเชื้อทุก ๆ 24 ชั่วโมง ซึ่งก็เป็นการตรวจสอบเม็ดเลือดขาวไปด้วย ดังนั้นจึงแน่ใจว่าดีเอนเอที่สกัดได้นั้นเป็นดีเอนเอของ P. falciparum เพียงอย่างเดียว ซึ่งถ้าผลการสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดแดงที่อัดแน่นจากการเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วยเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อประมาณ 10 ถึง 15 เปอร์เซนต์ เป็นเชื้อในระยะไซซอนท์ 80 ถึง 100 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2 ml. ซึ่งได้ดีเอนเอปริมาณสุทธิ 200 ถึง 300 µg. คิดเฉลี่ยเป็นปริมาณ 0.1-0.2 pg. ต่อ 1 นิวเคลียส โดยประมาณว่าแต่ละไซซอนท์จะมี 10 nuclei ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Goman และคณะ (Goman et al., 1982) และยังเท่ากับของ P. berghei เช่นกัน (Dore et al., 1980) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ E. coli แล้วจะพบว่าภายในนิวเคลียสของ P. falciparum จะมีดีเอนเอมากกว่า E. coli ถึง 6 เท่า (Bachmann และ Low, 1980) จากการศึกษาของ Hough-Evans และคณะ พบว่าถ้านำเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในระยะไซซอนท์มาสกัดเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในระยะวงแหวน จะต้องใช้ปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อระยะวงแหวนมากกว่าถึง 10 เท่า จึงจะได้ปริมาณดีเอนเอเท่ากัน Hough-Evans และคณะยังได้ศึกษาพบว่าปริมาณเบสตลอดทั้ง genome ของเชื้อ P. falciparum มีทั้งสิ้น 3.8×10^8 คู่เบส (base pair, bp) และมีส่วนที่ซ้ำกัน (repetitive DNA) อยู่ 10 เปอร์เซนต์ การซ้ำกันของดีเอนเอเป็นคุณสมบัติ

อย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิตพวก Eukaryote ดังตัวอย่างในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงขนาดของดีเอนเอในนิวเคลียสของ Eukaryote ชั้นต่ำบางชนิด และแสดงเปอร์เซนต์การซ้ำของดีเอนเอ (Hough-Evans et al., 1982)

สิ่งมีชีวิต	ขนาดของจีโนม (bp)	เปอร์เซนต์การซ้ำของดีเอนเอ
Protozoa		
Plasmodium falciparum	3.8×10^8	10%
Plasmodium berghei	2×10^7	18%
Tetrahymena pyriformis	1.4×10^8	10-20%
Stylonichia mytilus	6.6×10^9	60%
Oxytricha sp.	$6-8 \times 10^8$	26%
Stentor coeruleus	9.2×10^7	10-15%
Fungi		
Achlea bisexualis	4.2×10^7	16%
Aspergillus nidulans	2.6×10^7	2-3%
Neurospora crassa	2.4×10^7	8%
Phycomyces blakesleeanus	$2.8-6.6 \times 10^7$	35%
Slime mold		
Dictyostelium discoideum	4.5×10^7	30%
Yeast		
Saccharomyces carlsbergensis	1.4×10^7	11%

สำหรับดีเอนเอที่สกัดได้จากการทดลองนี้มีขนาดตั้งแต่ 50 ถึง 150 kb. ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Bone และคณะ เมื่อปี 1983 และ Goman และคณะ เมื่อปี 1982 เมื่อนำสารละลายดีเอนเอมาวัดค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ช่วงความยาวคลื่น 190 ถึง 400 นาโนเมตร จะพบว่ารูปแบบของการดูดกลืนแสงคล้ายคลึงกับดีเอนเอมาตรฐาน คือ salmon sperm DNA ดังแสดงในรูปที่ 10 สำหรับค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายดีเอนเอจะอยู่ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) และอัตรส่วนของ $OD_{260}:OD_{280}$ จะอยู่ระหว่าง 1.8 ถึง 2.2

ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีเอนเอที่สกัดได้ไม่มีการปนเปื้อนของ phenol และโปรตีน จึงมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเพื่อนำไปศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป

2. เปรียบเทียบรูปแบบของดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum ไอโซเลต และสายพันธุ์บริสุทธิ์ต่าง ๆ เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

ดีเอนเอจากเชื้อ P. falciparum แต่ละไอโซเลตและสายพันธุ์บริสุทธิ์ ถูกย่อยตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ Alu. I, Eco. RI และ Hind III ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเอ็นไซม์ แยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ดีเอนเอที่ย่อยด้วย Hind III มีขนาด 23.5, 9.7, 6.6, 4.3, 2.3, 2.1 และ 0.59 kb. ตามลำดับ เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาด (size marker)

การวิเคราะห์ดีเอนเอของ 3 ไอโซเลตและ 19 สายพันธุ์บริสุทธิ์ก่อนที่จะทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าจะมีขนาดประมาณ 50 ถึง 150 kb. จะปรากฏเป็นแถบเดียวอยู่เหนือขนาด 23.5 kb. ของดีเอนเอ แต่เมื่อถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแล้ว รูปแบบจะเปลี่ยนเป็นแถบยาวลงมาตลอดแผ่นเจล และมีแถบย่อยเล็ก ๆ ที่เรียงตามลำดับขนาด โดย Eco. RI และ Hind III จะย่อยดีเอนเอให้เหลือขนาดตั้งแต่ 23.5 จนถึงขนาดเล็กกว่า 0.59 kb. Eco. RI จะตัดดีเอนเอที่ตำแหน่ง -GAATTC- ส่วน Hind III จะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง -AAGCTT- ทั้ง Eco. RI และ Hind III จึงเป็นเอ็นไซม์ชนิด six cutter ส่วน Alu. I เป็นเอ็นไซม์ชนิด four cutter โดยจะตัดดีเอนเอที่ตำแหน่ง -AGCT- ซึ่งจะสามารถตัดดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กกว่า Eco. RI และ Hind III จากการวิเคราะห์จึงเห็นว่าดีเอนเอที่ถูกตัดด้วย Alu. I จะมีขนาดที่ปรากฏเริ่มจากขนาดที่เล็กกว่า 23.5 kb. ไปจนถึงขนาดที่เล็กกว่า 0.59 kb.

เหตุที่เลือก Alu. I, Eco. RI และ Hind III มาใช้ในการทดลองในครั้งนี้ก็เนื่องจากตำแหน่งที่เอ็นไซม์ทั้ง 3 ชนิดเลือกตัดนั้นจะมีเบส A และ T อยู่มาก ซึ่งจากการศึกษาลำดับของเบสใน genome ของเชื้อ P. falciparum พบว่ามีค่า AT content อยู่ถึง 81 เปอร์เซนต์ (Pollack et al., 1982; Goman et al., 1982) จากผลการทดลองจะเห็นว่าเอ็นไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถย่อยดีเอนเอได้อย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 11-17) จากการศึกษาของ Tungprasubkul และคณะ ในปี 1983 พบว่า Bam HI ซึ่งมีตำแหน่งการตัดอยู่ที่ -GGATCC- ซึ่งมีค่า GC content อยู่ถึง 66.6 เปอร์เซนต์ จะไม่สามารถย่อยดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum ได้อย่างสมบูรณ์ และยังไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง P. berghei, P. chabaudi, P. yoelii และ P. falciparum ได้อีกด้วย ในขณะที่ Hind III สามารถบอกความแตกต่างได้ (Tungpradubkul et al., 1983) ซึ่ง

ตรงกับการศึกษาของ Pollack และคณะ พบว่า Msp I และ Hpa II ซึ่งมีตำแหน่งการตัดอยู่ที่ CCGG ทั้ง 2 ชนิด ทำให้ความสามารถในการย่อยของเอ็นไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ถูกจำกัดเนื่องจากใน genome ของเชื้อ P. falciparum มีจำนวนเบส G และ C อยู่เพียง 19 เปอร์เซนต์ (Pollack et al., 1982)

จากการเปรียบเทียบรูปแบบของดีเอนเอของเชื้อแต่ละไอโซเลตและสายพันธุ์บริสุทธิ์ หลังจากที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิดแล้วพบว่า ความแตกต่างของรูปแบบดีเอนเอที่เกิดขึ้นนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของเอ็นไซม์ที่ใช้ กล่าวคือ รูปแบบดีเอนเอที่ย่อยด้วย Alu. I ก็จะแตกต่างจากรูปแบบของดีเอนเอที่ย่อยด้วย Eco. RI และ Hind III โดยไม่ขึ้นกับไอโซเลต หรือสายพันธุ์บริสุทธิ์แต่อย่างใด (รูปที่ 11) Tungpradubkul และคณะ ได้รายงานว่าวิธีการวิเคราะห์ดีเอนเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะนี้สามารถจำแนกเชื้อมาลาเรียได้ในระดับชนิด (species) เท่านั้น แต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างได้ในระดับสายพันธุ์บริสุทธิ์และระดับไอโซเลต โดยพบความแตกต่างระหว่างรูปแบบของดีเอนเอของ P. chabaudi, P. yoelii, P. berghei และ P. falciparum เมื่อย่อยด้วย Hind III และไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์บริสุทธิ์ของ P. yoelii YM และ P. yoelii 33X นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างระหว่างเชื้อ P. chabaudi 3 สายพันธุ์ ซึ่งมีคุณสมบัติไวต่อยา pyrimethamine ต้านทานต่อยา pyrimethamine และทั้งที่ต้านทานต่อยา pyrimethamine, chloroquine ด้วย (Tungpradubkul et al., 1983)

สำหรับการศึกษาในเชื้อ P. falciparum ได้มีรายงานว่า ไม่พบความแตกต่างระหว่างไอโซเลต K_1 จากประเทศไทย ซึ่งดื้อต่อยา pyrimethamine กับไอโซเลต G_{112} จากประเทศแกมเบีย ซึ่งดื้อต่อยา pyrimethamine วิเคราะห์โดยเอ็นไซม์ Hind III (Tirawanchai, 1983; Intapruk, 1984) จากการศึกษาของ Goman และคณะ ในปี 1982 พบว่า ไอโซเลต T_9 และไอโซเลต K_1 จากประเทศไทยทั้ง 2 ไอโซเลต นี้ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อใช้ Hind III วิเคราะห์ (Goman et al., 1982) แต่อย่างไรก็ตาม ในปี 1985 Fucharoen ได้ศึกษารูปแบบของดีเอนเอ โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ Alu. I, Eco RI, Hind III และ Bam HI และพบว่าเอ็นไซม์ Alu. I สามารถบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์บริสุทธิ์ T_9C_{24} และ T_9C_{28} ของเชื้อ P. falciparum ได้ โดยพบความแตกต่างที่บริเวณขนาด 6.6 kb. และไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ T_9C_{26} และ T_9C_{28} ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีความแตกต่างกันทางด้านฟีโนไทพ์ที่การตอบสนองต่อยา pyrimethamine เช่นเดียวกันกับไม่พบความแตกต่างในไอโซเลต T_9 และ T_{28} โดยทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มีความแตกต่างกันที่การตอบสนองต่อยา pyrimethamine เช่นกัน

จากผลที่กล่าวมาแล้วข้างต้นพอสรุปได้ว่าการวิเคราะห์ดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิสยังไม่สามารถให้รายละเอียดเพียงพอในการจำแนกความแตกต่างของรูปแบบดีเอนเอของเชื้อในระดับไอโซเลต และสายพันธุ์บริสุทธิ์ จึงจำเป็นต้องทำการทดลองต่อโดยการถ่ายดีเอนเอจากแผ่นอากาโรสเจลขึ้นสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยดีเอนเอตรวจสอบต่อไป

3. ไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอนเอตรวจสอบ $pBKR_{1-14}$ กับ ดีเอนเอของ P. falciparum

จากผลไฮบริไดเซชันในสายพันธุ์บริสุทธิ์ TM_4C_1 และ TM_4C_3 พบว่าถ้าใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Alu. I จะให้ผลเหมือนกัน แต่เมื่อใช้ Eco. RI จะพบความแตกต่างที่บริเวณ 23.5, 9.7, 8.1, 6.6, 3.9 และ 1.5 kb. (ตารางที่ 6) และเมื่อใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Hind III จะให้ผลแตกต่างระหว่าง TM_4C_1 และ TM_4C_3 บริเวณ 8.1, 3.9, 3.1, 2.7 และ 1.9 kb. ซึ่งพบแต่เฉพาะ TM_4C_1 และที่บริเวณ 9.7, 6.6, 5.4, 4.7, 3.3 และ 2.3 kb. (ตารางที่ 7) จะพบแต่เฉพาะ TM_4C_3 จะเห็นได้ว่าเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Eco. RI และ Hind III จะให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์บริสุทธิ์ TM_4C_1 และ TM_4C_3 ได้ดีกว่า Alu. I ทั้งนี้เพราะเมื่อใช้ Eco. RI และ Hind III จะพบความแตกต่างระหว่าง TM_4C_1 และ TM_4C_3 ซึ่งมีรูปแบบของโปรตีนเหมือนกันและมาจากไอโซเลต TM_4 ซึ่งเป็นไอโซเลตต้นแบบ (parent isolate) เดียวกันได้ [illegible] ดังนั้นการใช้ดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ จะมีความไวในการจำแนกความแตกต่างได้ดีกว่าการทำ 2 D PAGE

สำหรับผลการศึกษาในกลุ่มไอโซเลต CH_{150} และสายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่าเมื่อใช้ Alu. I เป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ จะสามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 2 แบบ คือ $CH_{150}C_3$ และ $CH_{150}C_8$ จะอยู่ในแบบเดียวกันคือ พบ 4 แถบที่ 3.7, 3.1, 2.2 และ 1.8 kb. เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบของโปรตีนจะพบว่ามีความแตกต่างกันที่จุด C โดย $CH_{150}C_3$ จะมี C_2 แต่ $CH_{150}C_8$ จะมี C_5 และในทำนองเดียวกันกับแบบที่พบ 3 แถบ ซึ่งได้แก่ $CH_{150}C_1$, $CH_{150}C_4$, $CH_{150}C_5$, $CH_{150}C_6$ และ $CH_{150}C_7$ ซึ่งจากผลโปรตีนจะมีความแตกต่างกันในจุด C, D, G และ K สำหรับ $CH_{150}C_1$ และ $CH_{150}C_8$ จะมีจุด C, D, F, G และ N ที่เหมือนกัน ส่วนจุด K และ L ยังไม่ได้ศึกษา จากผลการศึกษาเชื้อกลุ่มนี้อาจจะกล่าวได้ว่าดีเอนเอของเชื้อในบริเวณที่เกิดไฮบริไดเซชันกับดีเอนเอตรวจสอบ $pBRK_{1-14}$ อาจไม่ได้เป็นส่วนลำดับเบสที่นำระหัสสำหรับโปรตีนจุด C, D, F, G, K, L และ N และเมื่อใช้ Eco. RI และ Hind III เป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ จะทำให้แบ่งเชื้อกลุ่มนี้ได้ละเอียดมากขึ้น คือพบ 4

และ 6 แบบ ตามลำดับ และจำนวนแถบที่พบก็จะมีจำนวนมากกว่าที่ใช้ Alu. I เป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า Alu. I เป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับเบสในการตัดเพียง 4 เบส คือ -AGCT- แต่ Eco. RI และ Hind III จึงมีลำดับเบสในการตัดถึง 6 เบส คือ -GAATTC- และ -AAGCTT- ตามลำดับ (Maniatis, 1982) ดังนั้นโอกาสที่ Alu. I จะตัดเส้นดีเอนเอของเชื้อ P. falciparum จึงมากกว่า Eco. RI และ Hind III เส้นดีเอนเอที่ได้จึงมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า และโอกาสที่ท่อนดีเอนเอเล็ก ๆ เหล่านี้จะมีลำดับเบสที่เข้าคู่กับ $pBRK_{1-14}$ จึงน้อย ทำให้จำนวนแถบที่พบน้อยกว่า Eco. RI และ Hind III

เมื่อนำผลไฮบริไดเซชันของเชื้อกลุ่ม CH_{iso} และสายพันธุ์บริสุทธิ์มาเปรียบเทียบกับ CH_{isoR} และสายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่า เมื่อใช้ Alu. I เป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ CH_{isoR} จะพบแถบเพียง 3 แถบที่บริเวณ 3.1, 2.2 และ 1.8 kb. แต่ในสายพันธุ์บริสุทธิ์จะพบ 4 แถบ ที่ขนาด 3.3, 2.8, 2.2 และ 1.8 kb. (ตารางที่ 5) จะเห็นว่า CH_{isoR} ซึ่งเป็นไอโซเลตต้นแบบ และเป็นกลุ่มประชากรรวม (mix population) กลับพบแถบน้อยกว่า อาจเป็นไปได้ว่าในขณะที่ทำการเพาะเลี้ยงประชากรบางกลุ่มอาจเจริญได้ไม่ดีหรือเจริญได้น้อยมากจนไม่สามารถให้ผลบวกในการไฮบริไดเซชันได้ และผลการไฮบริไดเซชันของ CH_{iso} ยังเหมือนกับกลุ่ม CH_{iso} ซึ่งพบ 3 แถบและมีขนาดเท่ากัน คือ $CH_{iso}C_4$, $CH_{iso}C_6$ และ $CH_{iso}C_7$ จึงอาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มประชากรของเชื้อในไอโซเลต CH_{isoR} ซึ่งดื้อต่อยาเมโฟลควิน มาจากประชากรกลุ่มที่ดื้อยาอยู่แล้วในไอโซเลต CH_{iso} แต่ว่ามีอยู่เป็นจำนวนน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pinswadi และคณะ ซึ่งยืนยันว่าการดื้อต่อยาเมโฟลควินของเชื้อ CH_{isoR} นั้นเกิดจากการคัดเลือก (selection) ของเชื้อที่ดื้อยาอยู่แล้วในไอโซเลต CH_{iso} แต่มีอยู่จำนวนน้อย โดยศึกษาจากการทำ 2 D PAGE (Pinswadi et al., 1987) และจากผลของ Hind III พบว่า $CH_{isoR}C_5$ มีผลการไฮบริไดเซชันเหมือนกับ $CH_{iso}C_6$ จึงเป็นการยืนยันว่า เชื้อ P. falciparum ทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มีความสัมพันธ์กัน หรือมีประชากรบางกลุ่มที่เหมือนกัน จากผลการทดลองยังพบว่า Eco. RI และ Hind III จะให้ผลการไฮบริไดเซชันที่แตกต่างกันทุกสายพันธุ์บริสุทธิ์ของทั้ง 2 ไอโซเลต ดังนั้น Eco. RI และ Hind III จึงเหมาะที่จะใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อในกลุ่ม CH_{iso} และ CH_{isoR} มากกว่า Alu. I

สำหรับการศึกษาเชื้อ P. falciparum กลุ่ม TM_{90} และสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เลือกมาศึกษา คือ $TM_{90}CB_1$, $TM_{90}CB_2$, $TM_{90}CB_8$ และ $TM_{90}CB_{10}$ ซึ่งเชื้อกลุ่มที่เลือกมานี้มีรูปแบบโปรตีนแตกต่างกันที่จุด D, L และ K

จากผลไฮบริไดเซชันพบว่า เมื่อใช้ Alu. I เป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ จะไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์บริสุทธิ์ แต่เมื่อใช้ Hind III และ Eco. RI จะแบ่งเชื้อกลุ่มนี้ออกได้เป็น 3 และ 4 แบบ ตามลำดับ Eco. RI จะให้ผลที่แตกต่างกันทุกสายพันธุ์บริสุทธิ์ จึงเป็นเอ็นไซม์ที่เหมาะที่สุดสำหรับใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อในกลุ่มนี้ สำหรับ Hind III จะให้ผลที่เหมือนกัน 2 สายพันธุ์บริสุทธิ์ คือ $TM_{90}CB_8$ และ $TM_{90}CB_{10}$ ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลของโปรตีน ทั้งนี้เป็นเพราะ 2 สายพันธุ์นี้มีโปรตีนที่แตกต่างกันที่จุด K

กลุ่มสุดท้ายที่นำมาศึกษา คือ สายพันธุ์บริสุทธิ์ $TM_{142R}C_1$, $TM_{142R}C_5$ และ $TM_{142R}C_7$ ซึ่งมีรูปแบบโปรตีนที่แตกต่างกันทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อใช้ Alu. I เป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะจะให้ผลที่เหมือนกัน 2 สายพันธุ์ คือ $TM_{142R}C_8$ และ $TM_{142R}C_7$ คือพบ 4 แถบที่ขนาด 3.7, 3.1, 2.2 และ 1.8 kb. (ตารางที่ 5) ซึ่งจะเหมือนกับในกลุ่มไอโซเลต CH_{150} และ $CH_{150}C_3$ และ $CH_{150}C_8$ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ 2 กลุ่มนี้มีประชากรบางกลุ่มที่มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน แต่เมื่อใช้ Hind III และ Eco. RI จะให้ผลที่แตกต่างกันออกไป และให้ผลแตกต่างกันในทุกสายพันธุ์บริสุทธิ์ Hind III และ Eco. RI จึงใช้จำแนกชนิดเชื้อกลุ่มนี้ได้ดีกว่า Alu. I

เมื่อนำผลการไฮบริไดเซชันทั้งหมดของ 3 เอ็นไซม์ตัดจำเพาะมารวมกัน (ตารางที่ 8) พบว่าสามารถที่จะจำแนกชนิดเชื้อ P. falciparum ที่นำมาศึกษาทั้งหมด 3 ไอโซเลต และ 19 สายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ละเอียดยิ่งขึ้น มีเพียง 2 สายพันธุ์บริสุทธิ์ คือ $TM_{90}CB_8$ และ $TM_{90}CB_{10}$ เท่านั้นที่ให้ผลเหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อ 2 สายพันธุ์นี้มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่าสายพันธุ์บริสุทธิ์อื่น และเมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติทางฟีโนไทป์อื่น ๆ เช่น การตอบสนองต่อยาเมโฟลควิน ก็พบว่ามีค่า MIC ที่ $5x10^{-7}$ M เท่ากัน มีไอโซเอ็นไซม์ GPI-III เหมือนกัน (Thaithong, personal communication) และผลของโปรตีนก็ต่างกันเพียงจุดเดียวคือ ที่จุด K แต่สำหรับเชื้อในกลุ่มอื่น จะให้ความแตกต่างกันออกไป ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อได้เป็นอย่างดี

จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นว่าเชื้อ P. falciparum ที่มีอยู่ในธรรมชาตินั้นมีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน จากผลไฮบริไดเซชันในครั้งนี้พบว่าการเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมมาใช้ในการทดลองเป็นสิ่งจำเป็น เพราะความแตกต่างของจำนวนและขนาดของแถบขึ้นอยู่กับชนิดของเอ็นไซม์ที่ใช้ย่อยเส้นดีเอนเอของเชื้อแต่ละตัวอย่าง เช่นเมื่อใช้ Alu. I เป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะจะได้จำนวนแถบสูงสุดเพียง 5 แถบ ซึ่งพบในไอโซเลต CH_{150} และจำนวนแถบโดยเฉลี่ยเมื่อใช้ Alu. I เป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ คือ 3 ถึง 4 แถบ ถึงแม้ว่า Alu. I จะไม่ให้รายละเอียดมากนักสำหรับการจำแนกชนิด แต่ Alu. I ก็สามารถใช้ในการแบ่งกลุ่มของเชื้อ P. falciparum ได้ นอกจากนี้ยังอาจมีประโยชน์ในการตรวจ

เช็คความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ โดยอาจใช้พิจารณาร่วมกับคุณลักษณะอื่น ๆ เช่น ไอโซเอ็นไซม์ รูปแบบโปรตีน ฯลฯ สำหรับ Hind III จะให้จำนวนแถบสูงสุด 14 แถบ ซึ่งพบในสายพันธุ์บริสุทธิ์ $TM_{90}CB_2$ และจำนวนแถบที่พบโดยเฉลี่ยประมาณ 7 ถึง 11 แถบ นอกจากนี้ยังสามารถบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์บริสุทธิ์ กลุ่ม TM_4, CH_{150R} และ TM_{142R} ได้ทุกสายพันธุ์บริสุทธิ์ แต่ในกลุ่ม CH_{150} Hind III จะให้ผลเหมือนกันระหว่าง $CH_{150}C_1$ และ $CH_{150}C_3$ ในกลุ่ม TM_{90} จะให้ผลเหมือนกันระหว่าง $TM_{90}CB_8$ และ $TM_{90}CB_{10}$ และยังให้ผลเหมือนกันระหว่าง $CH_{150}C_5$ กับ $CH_{150}RC_5$ อีกด้วย Hind III จึงเหมาะที่ใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่ม TM_4, CH_{150R} และ TM_{142R}

สำหรับ Eco. RI จะให้จำนวนแถบสูงสุด 15 แถบ ซึ่งพบใน $TM_{142R}CB_1$ Eco. RI ยังให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์บริสุทธิ์ กลุ่ม TM_4, CH_{150R}, TM_{90} และ TM_{142R} แต่สำหรับกลุ่ม CH_{150} Eco. RI จะให้ผลที่เหมือนกัน 2 คู่ คือ $CH_{150}C_1$ กับ $CH_{150}C_3$ และ $CH_{150}C_4$ กับ $CH_{150}C_8$ (ตารางที่ 6)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลทั้ง 3 เอ็นไซม์แล้วจะพบว่า Eco. RI จะเป็นเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะที่สุดสำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อ P. falciparum เพราะสามารถให้ความแตกต่างของแถบทั้งจำนวนและขนาดมากกว่า Alu. I และ Hind III นอกจากนี้ Eco. RI ยังให้แถบที่เป็นลักษณะเฉพาะ ที่ขนาด 16.6, 5.4 และ 4.8 kb. ซึ่งเป็นแถบที่พบเฉพาะในกลุ่ม TM_4, CH_{150} และ CH_{150R} เท่านั้น และที่แถบขนาด 18.9, 15.9, 9.7, 8.4, 7.8, 5.9, 4.6, 2.9 และ 0.7 kb. (ตารางที่ 6) จะเป็นแถบที่พบเฉพาะในกลุ่มของ TM_{90} และ TM_{142R} จากการสังเกตจากแถบเหล่านี้จึงทำให้พอจะคาดได้ว่าประชากรของเชื้อแต่ละกลุ่มมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันหรือไม่เพียงใด และอาจบอกถึงการกระจายของเชื้อ P. falciparum ในแต่ละพื้นที่ (geographic distribution) ได้ด้วย เช่น ถ้าตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นเก็บมาจากแหล่งเดียวกัน ก็อาจจะพบว่าเชื้อเหล่านั้นที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงควรจะได้มีการศึกษาต่อไปในแง่ของระบาดวิทยา (epidimiology) เพราะจะทำให้สามารถจัดกลุ่มของเชื้อได้อย่างคร่าว ๆ ได้

ผลจากไฮบริไดเซชันรวมของทั้ง 3 เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (ตารางที่ 8) ยังบอกได้ว่าแถบ 23.5, 9.7, 4.3, 3.4, 3.3, 3.1, 2.2, 2.1, 1.8 และ 1.5 kb. เป็นแถบปกติ (common band) ซึ่งหมายถึงแถบที่พบมากในเกือบทุกตัวอย่าง ซึ่งแถบเหล่านี้อาจจะเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ P. falciparum ซึ่งอาจจะแตกต่างจากเชื้อพลาสโมเดียมชนิดอื่น ๆ ซึ่งก็ควรจะได้มีการศึกษาเปรียบเทียบกันต่อไป

อย่างไรก็ตามมีผู้ศึกษาพบว่าการจำแนกชนิดของเชื้อ P. falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์โดยวิธีไฮบริไดเซชันกับดีเอนเอตรวจสอบนี้ รูปแบบที่ได้อาจจะมีการเปลี่ยนแปลง (unstable) เมื่อเชื้อที่นำมาศึกษานั้นถูกเลี้ยงไว้ในจานเพาะอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 6 เดือน (Bhasin et al., 1985) แต่ในการทดลองนี้ไม่พบความเปลี่ยนแปลงของแถบดีเอนเอจากเซาเทินไฮบริไดเซชัน เนื่องจากดีเอนเอที่สกัดได้นี้มาจากเชื้อที่เลี้ยงในเวลาเดียวกันทั้งหมด ถึงแม้จะทำซ้ำถึง 3 ครั้ง ก็ยังได้ผลเหมือนเดิม นอกจากนี้รายงานของ Thaitong และคณะ 1988 ซึ่งทำการศึกษาคุณสมบัติการตอบสนองต่อยาในเชื้อ P. falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์ ซึ่งถูกเพาะเลี้ยงต่อเนื่องนาน 2 ปี ในจานเพาะภายในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยมาลาเรีย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย [illegible] ตอบสนอง อีกทั้งการศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธี 2D PAGE ของศูนย์วิจัยมาลาเรีย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งใช้สายพันธุ์บริสุทธิ์ T_9C_{94} เป็นแบบมาตรฐานมาตลอดระยะ 4-5 ปี ก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบของโปรตีน จึงอาจจะสรุปว่ารูปแบบดีเอนเอในสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ศึกษาโดยวิธีเซาเทินไฮบริไดเซชันดังการทดลองนี้น่าจะคงที่ แต่อย่างไรก็ตามควรจะได้มีการศึกษาซ้ำโดยทำในเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์เหล่านี้เมื่อถูกเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน ทดสอบความถาวรของรูปแบบดีเอนเอ

การจำแนกชนิดของเชื้อ P. falciparum โดยอาศัยดีเอนเอตรวจสอบยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความบริสุทธิ์ของโคลนได้ดีอีกด้วย โดยการพิจารณาร่วมกับคุณสมบัติทางชีววิทยาอื่น ๆ เช่น การตอบสนองต่อยา ไอโซเอ็นไซม์ รูปแบบโปรตีน และคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา

ปัจจุบันได้มีเทคนิคใหม่เรียกว่า Pulse field gradient gel electrophoresis (PFGE) ซึ่งสามารถที่จะแยกโครโมโซมของเชื้อ P. falciparum ออกจากกันได้ตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นโครโมโซม (Kemp et al., 1983) จึงควรจะได้มีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผลการไฮบริไดเซชันจากการทดลองนี้ ซึ่งเป็นการแยกชิ้นดีเอนเอโดยการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแล้วทำ agarose gel electrophoresis กับการแยกชิ้นโครโมโซมด้วย Pulse field gradient gel electrophoresis โดยการไฮบริไดเซชันกับดีเอนเอตรวจสอบชนิดเดียวกัน คือ $pBRK_{1-14}$ ว่าจะมีความสอดคล้องหรือแตกต่างกันอย่างไร เพื่อจะเป็นประโยชน์ในการจำแนกเชื้อได้ในระดับต่อไป