บทที่ 5

ผลการทดลอง

อัลลีลของ Pv200 จากเชื้อมาลาเรียชนิด *P.vivax* ในประเทศไทย

ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P.vivax* ได้จากผู้ป่วยทั้งหมด 15 ราย ซึ่งมีอาการของโรคมาลาเรีย โดยทำการเก็บรวบรวมตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2534 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2537 เป็นเพศชาย 11 คน เพศหญิง 4 คน อายุตั้งแต่ 9 ปี ถึง 32 ปี ส่วนใหญ่เป็นประชากรที่อพยพมาจากถิ่นอื่นเพื่อมาทำงานในพื้นที่จังหวัดตาก 2 ราย และ จังหวัดตราด 12 ราย สำหรับไอโซเลต V100 ได้จากผู้ป่วยที่มาตรวจรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยมีผู้ป่วยสัญชาติไทยทั้งหมด 10 ราย กระเหรี่ยง 2 ราย พม่า 2 ราย และลาว 1 ราย ภายหลังจากการตรวจวินิจฉัยเลือดผู้ป่วยทั้ง 15 ราย พบว่า 13 รายมีการติดเชื้อ *P.vivax* ชนิดเดียว ส่วนอีก 2 ราย มีการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *P.vivax* และ *P.falciparum* ปริมาณการติดเชื้อมาลาเรียโดยประเมินจากจำนวนเม็ดเลือดแดง ที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ (parasitemia) ตรวจพบตั้งแต่น้อยกว่าร้อยละ 0.01 ถึง ร้อยละ 0.50 ระยะการเจริญของ *P.vivax* ที่ตรวจพบนั้นมีหลายระยะ ได้แก่ระยะวงแหวน ระยะโทรโฟซอยต์ ระยะไชซอนต์ และระยะแกมมีโตไซต์ สำหรับ *P.falciparum* ตรวจพบเฉพาะระยะวงแหวนและอาจจะพบมากกว่า 1 ตัวในเม็ดเลือดแดงเดียวกัน รายละเอียด ของตัวอย่างเชื้อแต่ละไอโซเลตแสดงในตารางที่ 1

การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนของยีน Pv200 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ตั้งแต่บริเวณ block 4 ถึง block 6 ซึ่งครอบคลุมบริเวณของยีนที่สร้างกรดอะมิโนซ้ำ ๆ กัน (repeats) บริเวณดังกล่าวจึงเป็นบริเวณที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างไปตามไอโซเลตของเชื้อ ดังนั้นขนาดของผลิตผล PCR จึงอาจแตกต่างกันไปตามตัวอย่างที่ศึกษา อย่างไรก็ตาม

Table 1 Details of *P.vivax* isolates in this study.

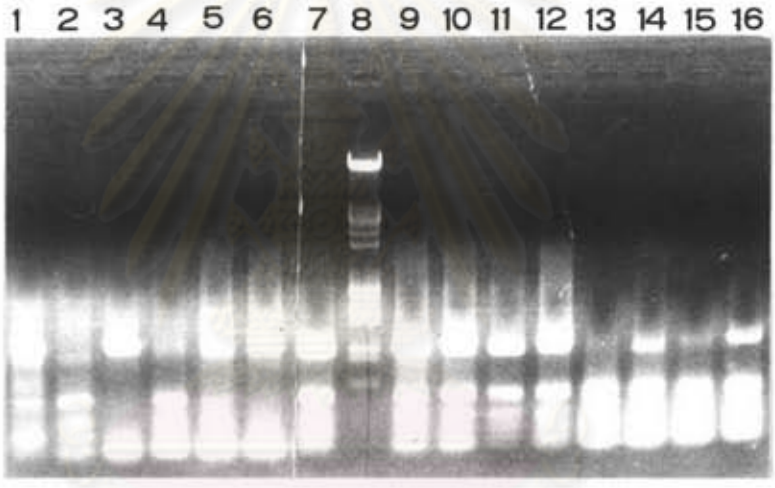
Isolate	Date collected	Age	Sex	Nationality	Type of malaria	% Parasitemia
T117	19 Apr 1991	19	M	Karen	*P.vivax*	<0.01
T128	19 Apr 1991	20	M	Karen	*P.vivax*	<0.01
TD403	4 Oct 1993	28	F	Thai	*P.vivax*	<0.01
V100	15 Oct 1993	-	F	Thai	*P.vivax*	0.50
TD414	8 Nov 1993	9	F	Thai	*P.vivax*	0.26
TD424	8 Nov 1993	12	M	Thai	*P.vivax*	0.18
TD425	8 Nov 1993	32	F	Thai	*P.vivax*	0.26
TD430	8 Nov 1993	25	M	Myanmese	*P.vivax*	0.07
TD438	8 Nov 1993	18	M	Thai	*P.vivax*	0.36
TD439	8 Nov 1993	15	M	Myanmese	*P.vivax* + *P.falciparum*	0.40
TD452	8 Nov 1993	20	M	Thai	*P.vivax* + *P.falciparum*	0.01
TD458	8 Nov 1993	15	M	Laotian	*P.vivax*	0.48
TD183	10 Jan 1994	-	M	Thai	*P.vivax*	<0.01
TD201	10 Jan 1994	-	M	Thai	*P.vivax*	<0.01
TD207	10 Jan 1994	-	M	Thai	*P.vivax*	<0.01

* Dashes = No data available.

จากการวิเคราะห์ขนาดของผลิตผล PCR จาก 15 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 6 จะพบว่าแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏมีหลายแถบในทุกไอโซเลต ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก primers ที่ใช้ แม้จะลอกแบบจากบริเวณ conserved blocks แต่ได้มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่ง เพื่อให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัดได้ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายในของ primer ทั้ง 2 สาย ดังนั้นการจับระหว่าง primer และดีเอ็นเอแม่แบบนั้น จึงไม่สามารถเลือกใช้อุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าว (annealing temperature) ให้สูงขึ้นเพื่อให้การจับดังกล่าวมีความจำเพาะสูงขึ้น นอกจากนี้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้มีการปะปนกันระหว่างดีเอ็นเอของมาลาเรียและดีเอ็นเอของ ผู้ป่วย ดังนั้นโอกาสที่ primers จะจับกับดีเอ็นเออื่น ๆ ที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) จึงอาจเกิดขึ้นได้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจึงมีหลายแถบ เมื่อวัดความยาวของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐาน (λ*Hind* III/*Eco*R I) โดยใช้กราฟกึ่งล็อกการิธึม (semi-logarithm graph) พบว่าแถบดีเอ็นเอด้านบนสุด ซึ่งมีความยาวแตกต่างกันเล็กน้อยตามตัวอย่างที่ศึกษามีความยาวตามที่ต้องการคือประมาณ 900 ถึง 1,000 ในขณะที่แถบดีเอ็นเอ 2,3 และ 4 ที่ปรากฏต่ำลงมามีขนาดสั้นกว่าความยาวที่น่าจะเป็นส่วนของยีน Pv200 ที่ศึกษา และเนื่องจากยีนที่สร้าง MSP1 เป็นยีนที่มีชุดเดียว (single copy gene) (Tanabe et al., 1987) ดังนั้นแถบดีเอ็นเอ ที่เป็นส่วนของยีน Pv200 จึงควรมีแถบเดียวในแต่ละตัวอย่าง ยกเว้นในกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *P.vivax* ที่มีอัลลีลของ Pv200 ซึ่งมีความยาวของส่วนดังกล่าวแตกต่างกัน จึงอาจพบมากกว่า 1 แถบได้ แต่ยังคงมีความยาวแตกต่างกันไม่มากนัก

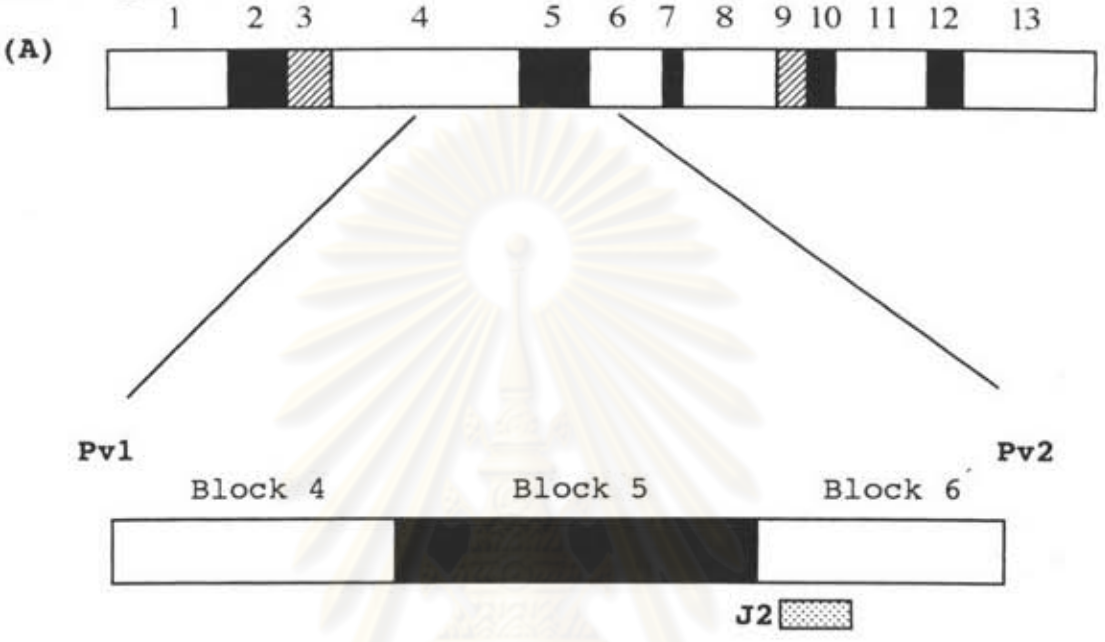
การเลือกแถบดีเอ็นเอเพื่อทำการเชื่อมกับ pUC119 นั้น จึงต้องมีการตรวจสอบยืนยันก่อนโดยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ oligonucleotide probe ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในส่วนของยีนดังกล่าวที่พบได้ในทุกอัลลีลของ Pv200 ตำแหน่งของ probe แสดงในรูปที่ 7A สำหรับผลของ การศึกษา Southern blot hybridization แสดงในรูปที่ 7B ซึ่งแถบสีดำที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์คือแถบบนสุดมีความยาวประมาณ 900 ถึง 1100

Figure 6 Analysis of the polymerase chain reaction (PCR) products of the Pv200 gene from blocks 4 - 6 by 1% agarose gel electrophoresis. Lane 1 = V100; lane 2 = T117; lane 3 = T128; lane 4 = TD183; lane 5 = TD201; lane 6 = TD207; lane 7 = TD403; lane 8 = λ *Hin*d III/*Eco*R I marker; lane 9 = TD414; lane 10 = TD424; lane 11 = TD425; lane 12 = TD430; lane 13 = TD438; lane 14 = TD439; lane 15 = TD452 and lane 16 = TD458.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 7 (A) Scheme for Pv200 gene showing PCR primers (Pv1 and Pv2), the PCR amplified DNA fragment and location of the oligonucleotide probe (J2) for hybridization. (B) Southern hybridization of the PCR products from Figure 6 with J2 probe.



bp โดยความเข้มของแถบจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณดีเอ็นเอ เป็นที่น่าสังเกตว่า แถบดีเอ็นเอในไอโซเลต TD403,TD414,TD424,TD425 และ TD430 มีความเข้มและกว้างมากกว่าตัวอย่างอื่น ๆ ซึ่งอาจเกิดจากมี อัลลีล Pv200 ที่แตกต่างกันในตัวอย่างเดียวกัน หรือปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มีมากกว่าตัวอย่างอื่น ๆ สำหรับไอโซเลต V100, T128, TD201, TD207, TD439 และ TD458 มีแถบเดียว แต่ในไอโซเลต T117, TD183, TD438 และ TD452 ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอจากการทำ Southern blot hybridization เนื่องจากดีเอ็นเอที่ใช้มีปริมาณน้อยเกินไป และโดยทั่วไปประสิทธิภาพการขนถ่ายดีเอ็นเอจากเจล สู่แผ่นไนลอนเมมเบรนมักจะเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล Pv200 จากทั้งหมด 15 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต TD207, TD425, TD430, TD439 และ TD458 ประกอบด้วยอัลลีล Pv200 ที่แตกต่างกัน 2 อัลลีลในไอโซเลตเดียวกัน การเรียกชื่ออัลลีล ดังกล่าวใช้ชื่อไอโซเลตแล้วต่อท้ายด้วยอักษร A หรือ B ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีอัลลีลทั้งหมด 20 อัลลีล โดยทุกอัลลีลมีความแตกต่างกัน อัลลีลที่สั้นที่สุดประกอบด้วย 912 นิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโน 304 ตัว คืออัลลีล 439A ส่วนอัลลีลที่ยาวที่สุดประกอบด้วย 1017 นิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโน 339 ตัว คืออัลลีล 438A และ 128A สำหรับอัลลีล 424A และ 425A ประกอบด้วย 936 นิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโน 312 ตัว อัลลีล 403A, 425B, 430A, 452A และ 458B ประกอบด้วย 945 นิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโน 315 ตัว อัลลีล 207B และ 439B ประกอบด้วย 984 นิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโน 328 ตัว อัลลีล 414A ประกอบด้วย 999 นิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโน 333 ตัว และ อัลลีล V100, 430B, 458A, 207A, 183A, 201A และ 117A ประกอบด้วย 1014 นิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโน 338 ตัว เพื่อการวิเคราะห์ลักษณะของอัลลีลให้ละเอียดขึ้น จึงเปรียบเทียบอัลลีลที่ได้จากการทดลองนี้กับอัลลีลที่มีผู้เคยศึกษามาก่อนได้แก่ อัลลีล Belem จากประเทศโคลัมเบีย (del Portillo et al., 1991) อัลลีล Sal-1 จากประเทศเอลซาลวาดอร์ (Gibson et al., 1992) อัลลีล RO จากประเทศบราซิล (Porto et al., 1992) อัลลีล

Col1 และ Col2 จากประเทศโคลัมเบีย (Mancilla et al., 1994) อัลลีล 16 และ 6B จากประเทศศรีลังกา (Premawansa et al., 1993)เพื่อการเปรียบเทียบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโนในอัลลีลต่าง ๆ ให้เป็นมาตรฐานเดียวกันจึงใช้หมายเลขลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวของอัลลีล Sal-1 เป็นเกณฑ์ เนื่องจากเป็นอัลลีลที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ครบทั้งยีนและมีความยาวมากกว่าอัลลีล Belem โดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ที่ 1813 ซึ่งตรงกับกรดอะมิโนที่ 605 และสิ้นสุดที่นิวคลีโอไทด์ 2826 ซึ่งตรงกับกรดอะมิโนที่ 942 รายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปที่ 8 และลำดับกรดอะมิโนแสดงในรูปที่ 9

ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ block 4

ในส่วนของ block 4 ที่ศึกษาประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 306 ตัว หรือกรดอะมิโน 102 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับ Sal-1 พบว่าตัวอย่างที่ศึกษามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 6 ตำแหน่ง คือลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 1862, 1864, 1900, 1996, 2013 และ 2017 เปลี่ยนจาก C, A, T, A, G และ A เป็น T, G, C, G, T และ G ตามลำดับ (ดูรูปที่ 8) การแทนที่ดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 621, 622, 666, 671 และ 673 เปลี่ยนจาก threonine, isoleucine, isoleucine, lysine และ serine เป็น isoleucine, valine, valine, asparagine และ glycine ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 9 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน พบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์นอกเหนือไปจากที่ทำการศึกษานี้คือ ตำแหน่งที่ 1900 และ 1901 ของสายพันธุ์ Belem เปลี่ยนจาก T และ T เป็น G และ G ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 634 เปลี่ยนจาก leucine เป็น glycine นอกจากนี้ยังพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 2078 ของ Col2 เปลี่ยนจาก A เป็น G ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 693 เปลี่ยนจาก aspartic acid เป็น glycine สำหรับตัวอย่าง 6B พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 2094, 2095, 2098, 2099 และ 2106 เปลี่ยนจาก

C, G, A, G และ G เป็น T, C, G, C และ A ตามลำดับทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 699, 700 และ 703 เปลี่ยนจาก glutamic acid, serine และ alanine เป็น glutamine, alanine และ threonine ตามลำดับ สำหรับ Col1 พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 2103 เปลี่ยนจาก G เป็น C ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 701 เปลี่ยนจาก methionine เป็น isoleucine เมื่อพิจารณาทั้งหมดจะพบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 14 ตำแหน่งจากจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 306 ตัว คิดเป็นร้อยละ 4.57 และการแทนที่ดังกล่าวทำให้ กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง (nonsynonymous substitution) 5 ตำแหน่ง และ การแทนที่ที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง (synonymous substitution) 1 ตำแหน่ง

ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน block 5

บริเวณ block 5 มีการเปลี่ยนแปลงในจำนวนและลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูง ซึ่งถ้าเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานโดยทั่วไปจะพบว่าอัลลีล Sal-1 และอัลลีล Belem มีความแตกต่างกันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่ศึกษานี้จากไอโซเลตในประเทศไทยและจากแหล่งอื่น พบว่ามีทั้งหมด 27 อัลลีล โดยแต่ละอัลลีลมีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสามารถจัดกลุ่มอัลลีลที่คล้ายกันได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม Sal-1 ประกอบด้วย Sal-1, V100, 430B, 458A, 207A, 183A, 201A, 117A, 438A, 128A, RO, Col2 และ 16 กลุ่มที่ 2 มีเพียงตัวอย่างเดียวคือ 414A ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2119 ถึง 2392 เหมือน Sal-1 และลำดับ นิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2393 ถึง 2448 เหมือน Belem (ร้อยละ 83.98 เหมือน Sal-1 และร้อยละ 16.02 เหมือน Belem) กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 424A, 425A, 403A, 425B, 430A, 452A และ 458B มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2119 ถึง 2232 เหมือน Sal-1 และลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2233 ถึง 2403 เหมือน Belem (ร้อยละ

39.92 เหมือน Sal-1 และร้อยละ 60.08 เหมือน Belem) สำหรับกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 207B และ 439B มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2119 ถึง 2232 เหมือน Sal-1 และลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2233 ถึง 2403 เหมือน Belem และลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2404 ถึง 2433 เหมือน Sal-1 (ร้อยละ 45.37 เหมือน Sal-1 และร้อยละ 54.63 เหมือน Belem) และกลุ่มที่ 5 คือกลุ่มของ Belem, 439A, 6B และ Col1

เมื่อพิจารณาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่ม Sal-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างอัลลีลสูง โดยมีการเพิ่ม (insertion) ของนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว คือ CAT, CAA หรือ CCA แทรกระหว่างตำแหน่งที่ 2232 และ 2233 ในอัลลีล 438A, 128A, RO และ Col2 โดย RO และ Col2 มีการขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว ในตำแหน่งที่ 2464 ถึง 2466 ดังนั้นในระดับกรดอะมิโนจะพบ glutamine เรียงกัน 4 ตัว ในตำแหน่งที่ 744 ถึง 747 ในอัลลีล 128A และ RO สำหรับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 745 ของ 438A และ Col2 คือ histidine และ proline ตามลำดับ (ดูรูปที่ 8) นอกจากนี้นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2249 มีการเปลี่ยนแปลงจาก T เป็น C ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก valine เป็น alanine ในตำแหน่งที่ 750 ของ อัลลีล 117A, 128A และ 16 นอกจากนี้ยังพบว่านิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2311 เปลี่ยนจาก A เป็น G ในอัลลีล 128A ตำแหน่งที่ 2393 เปลี่ยนจาก T เป็น C ในอัลลีล 207A, 117A และ Col2 ตำแหน่งที่ 2396 เปลี่ยนจาก G เป็น T ในอัลลีล 128A ตำแหน่งที่ 2414 เปลี่ยนจาก C เป็น A ในอัลลีล 207A และตำแหน่งที่ 2444 เปลี่ยนจาก C เป็น T ในอัลลีล 117A และ 16 ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 771, 798, 799, 805 และ 815 เปลี่ยนจาก threonine, isoleucine, serine, threonine และ alanine เป็น alanine, threonine, isoleucine, asparagine และ valine ตามลำดับ

สำหรับกลุ่มที่ 2 หรืออัลลีล 414A เป็นอัลลีลใหม่ซึ่งยังไม่เคยตรวจพบมาก่อนจากบริเวณอื่น ๆ ของโลก มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 5' ตั้งแต่ตำแหน่งที่

2119 ถึง 2392 เหมือนอัลลีล Sal-1 แต่ในส่วน 3' มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 2393 ถึง 2448 เหมือนอัลลีล Belem ดังแสดงในรูปที่ 8

ในกลุ่มที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 5' ซึ่งเหมือนอัลลีล Sal-1 นั้น ในอัลลีล 424A มีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G ที่ตำแหน่ง 2119 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก asparagine ในตำแหน่งที่ 707 เป็น aspartic acid สำหรับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2120 ในอัลลีล 414A และ 430A เปลี่ยนจาก A เป็น C ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนเป็น threonine ในตำแหน่งที่ 707 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 3' นั้นเหมือนกับอัลลีล Belem ประกอบด้วยชุดของนิวคลีโอไทด์ CAA หรือ CAG ซึ่งสร้าง glutamine เรียงติดต่อกันโดยมีความยาวตั้งแต่ 45 นิวคลีโอไทด์หรือ glutamine 15 ตัวในอัลลีล 424A และ 425A จนถึง 54 นิวคลีโอไทด์หรือ glutamine 18 ตัวในอัลลีล 403A, 425B, 430A, 452A และ 458B สำหรับอัลลีล 452A พบว่ามีการแทนที่ของ C ในตำแหน่งที่ 2237 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก glutamine เป็น proline ในตำแหน่งที่ 746

อัลลีลในกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 207B และ 439B มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับอัลลีลในกลุ่มที่ 3 แต่ในส่วน 3' นั้นกลุ่มนิวคลีโอไทด์ CAA หรือ CAG ซึ่งสร้าง glutamine เรียงติดต่อกันมีความยาว 63 นิวคลีโอไทด์หรือ glutamine 21 ตัวและมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ Sal-1 ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 2404 ถึง 2433 เรียงเพิ่มเติมจากกลุ่มที่ 3 ทำให้ส่วนปลายสุดทางด้าน 3' มีลักษณะคล้ายอัลลีล Sal-1 เป็นช่วงสั้น ๆ อัลลีลเหล่านี้ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนเช่นกัน

กลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มอัลลีล Belem พบว่าอัลลีล 439A มีการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ AGCGTC (ตำแหน่งที่ 2130 ถึง 2135) ทำให้ alanine และ serine ในตำแหน่งที่ 711 และ 712 ขาดหายไป อัลลีล 439A นี้มีองค์ประกอบของ CAA หรือ CAG ซึ่งสร้าง glutamine เรียงติดต่อกันเพียง 24 นิวคลีโอไทด์หรือ glutamine 12 ตัวและนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2128, 2219 และ 2220 เปลี่ยนเป็น A, T และ A ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนเป็น threonine

และ valine ในตำแหน่งที่ 710 และ 740 ตามลำดับ ส่วนอัลลีล 6B ประกอบด้วย glutamine เรียงติดต่อกัน 17 ตัว สำหรับอัลลีล Col1 มีการแทรกของนิวคลีโอไทด์ C, T และ G หลังตำแหน่งที่ 2213 และ 2219 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 739 ถึง 741 เปลี่ยนเป็น leucine, lysine และ valine ตามลำดับ เนื่องจาก glutamine ซึ่งเรียงติดต่อกันมี 23 ตัวเท่ากับ Belem ดังนั้นอัลลีล Col1 จึงประกอบด้วยกรดอะมิโนมากกว่า Belem อยู่ 1 ตัว (รูปที่ 8)

ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ block 6

แม้ว่าใน block 6 จะมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง แต่โดยทั่วไปอัลลีล Sal-1 และอัลลีล Belem จะมีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ 23 ตำแหน่งจากจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 360 ตัว (ดูรูปที่ 8) และพบว่าอัลลีลอื่น ๆ ส่วนใหญ่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งดังกล่าวซึ่งมีลักษณะเหมือน Sal-1 หรือ Belem กระจัดกระจายทั่วไปทั้งนี้การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งมีเพียง 2 ชนิดเท่านั้น (dimorphic nucleotide substitution) ยกเว้นตำแหน่งที่ 2637 ซึ่งมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ได้ทั้ง C, G หรือ T อย่างไรก็ตามในระดับกรดอะมิโนพบว่าตำแหน่งดังกล่าวมีการแทนที่ของกรดอะมิโนเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ในการศึกษานี้พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมจากเดิมนอกเหนือจากตำแหน่งที่มีผู้รายงานมาก่อน คือตำแหน่งที่ 2505, 2508, 2509, 2565, 2568, 2627, 2633, 2676, 2723, 2730 และ 2749 เปลี่ยนจาก C, C, G, A, C, A, T, C, A, G และ C เป็น T, G, C, G, T, C, C, T, G, A และ T ตามลำดับ แต่การแทนที่ดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงเพียง 1 ตัว

Figure 8 Nucleotide sequences of the Pv200 gene among *P.vivax* field isolates in this study [V100, TD430, TD458, TD207, TD183, TD201, T117, TD438, T128, TD414, TD424, TD425, TD403, TD425, TD452 and TD439] comparing with monkey-adapted strains [Sal-1 (Gibson et al., 1992), Belem (del Portillo et al., 1991)], Brazilian isolates [RO (Porto et al., 1992)], Sri Lanka isolates [16, 6B (Premawansa et al., 1993)] and Colombia isolates [Col1, Col2 (Mancilla et al., 1994)]. A and B after the Thai isolates TD430, TD425, TD458, TD207 and TD439 represent clonal mixtures. Nucleotide positions shown above the alignments are after Sal-1 strain. Identical nucleotides are shown by dots. Positions without homologous nucleotide are indicated by dashes. (Due to the difficulty of alignment, TD and T before Thai isolate numbers are omitted.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1813 1932

Block 4

Type I

```
SAL1  GAAATTTATGATCTAGCCCAGGAAATCCGAAAAAACGAAAACAAGCTCACCATTGAAAACAAATTCGACTTCTCCGGGGGTTGTGGAATTACAAGTACAAAAGGTATTGATAATCAAAAAA
V100  ..........................................T.G.....................................................................................
430B  ..........................................T.G.....................................................................................
458A  ..........................................T.G.....................................................................................
207A  ..........................................G......................................................................................
183A  ..........................................G.....................................C................................................
201A  ..........................................T.G.....................................................................................
117A  ..........................................G......................................................................................
438A  ..........................................G......................................................................................
128A  ..........................................G......................................................................................
```

Type II

```
414A  ..........................................................................................................................
```

Type III

```
424A  ..........................................T.G.....................................................................................
425A  ..........................................G......................................................................................
403A  ..........................................G......................................................................................
425B  ..........................................G......................................................................................
430A  ..........................................G......................................................................................
452A  ..........................................G......................................................................................
458B  ..........................................G......................................................................................
```

Type IV

```
207B  ..........................................G......................................................................................
439B  ..........................................G......................................................................................
```

Type V

```
439A  ..........................................G......................................................................................
BELM  ..........................................G.....................................GG...............................................
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
     1933                                                                                                                2050
Type I                                                  Block 4
SAL1 ATTGAGGCTCTAAAGAATGTCCAGAATCTTCTTAAGAATGCCAAGGTGAAGGACGACCTGTACATTCCAAAGGTGTATAAGACAAGCGAGAAAACCTGAGCCCTACTACTTGATGGTCCTC
V100 ..........................................................G.....................G.....................................
430B ..........................................................G.....................G.....................................
458A ..........................................................G.....................G.....................................
207A ..........................................................G.....................G.....................................
183A ..........................................................G.....................G.....................................
201A ..........................................................G.....................G.....................................
117A ..........................................................G.....................G.....................................
438A ..........................................................G.....................G.....................................
128A ..........................................................G.....................G.....................................
RO.. <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<< no data >>>>
```

```
    2053                                                
```

2173 2289

Type I **Block 5**

SAL1 GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAA---CCACAACATCAAGTAGTAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
V100 GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAA---CCACAACATCAAGTAGTAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
430B GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAA---CCACAACATCAAGTAGTAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
458A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAA---CCACAACATCAAGTAGTAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
207A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAA---CCACAACATCAAGTAGTAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
183A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAA---CCACAACATCAAGTAGTAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
201A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAA---CCACAACATCAAGTAGTAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
117A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAA---CCACAACATCAAGTAGCAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
438A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACATCCACAACATCAAGTAGTAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
128A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACATCAAGTAGCAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
RO.. GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACATCAAGTAGTAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
COL2 GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACCACCACAACATCAAGTAGTAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA
16.. GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAA---CCACAACATCAAGTAGCAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA

Type II

414A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACATCCACAACATCAAGTAGCAAATGCAGTAACGGTACAGCCTGGAACAACAGGACATCAA

Type III

424A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA----------
425A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA----------
403A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA---------
425B GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA---------
430A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA---------
452A GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACCACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA---------
458B GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA---------

Type IV

207B GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA
439B GGAGCAAGTGAAACAGGGACAACTGGCAATACAGTCAATGCGCAAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA

Type V

439A AGCGAACGAGCGACAGAGGTCACAACCAATGCGGTAACATCTGAAGTACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA----------
6B.. AGCGAACGAGCGACAGAGGTCACAACCAATGCGGTAACATCTGAAGATCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAGCAACAACAACAA----------
COL1 AGCGAACGAGCGACAGAGGTCACAACCAATGCGGTAACATCCTTGAAGGTACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA
BELM AGCGAAGCAGCGACAGAGGTCACAACCAATGCGGTAACATCTGAAGATCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAGCAACAACAGCAACAACAACAA---

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2290 2409

Type I **Block 5**

```
SAL1  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGATTAGCCAAGCCCCAGCA
V100  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGATTAGCCAAGCCCCAGCA
430B  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGATTAGCCAAGCCCCAGCA
458A  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGATTAGCCAAGCCCCAGCA
207A  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGACTAGCCAAGCCCCAGCA
183A  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGATTAGCCAAGCCCCAGCA
201A  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGATTAGCCAAGCCCCAGCA
117A  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGACTAGCCAAGCCCCAGCA
438A  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGATTAGCCAAGCCCCAGCA
128A  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAGCACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGATTATCCAAGCCCCAGCA
RO..  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGATTAGCCAAGCCCCAGCA
COL2  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGACTAGCCAAGCCCCAGCA
16..  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGATTAGCCAAGCCCCAGCA
```

Type II

```
414A  GCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAAATTCAGTACAAGCAGCACAAGTTCAACAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAAACGACTAGTCAATCCGCAGCA
```

Type III

```
424A  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGACGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
425A  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGACGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
403A  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGGCGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
425B  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGGCGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
430A  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGGCGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
452A  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGGCGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
458B  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGGCGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
```

Type IV

```
207B  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGGGGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCCGCAGCC
439B  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGGCGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCCGCAGCC
```

Type V

```
439A  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGGCGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
6B..  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGGCGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
COL1  TCACAAGTAGTACCAGACCCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATGCGCAGCACCAGGAGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
BELM  TCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGACTAGTCAATCCGCAGCACCAGGCGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC------
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
    2410                                                        2466
Type I                              Block 5
SAL1  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACACCTGCTGCC
V100  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACACCTGCTGCC
430B  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACACCTGCTGCC
458A  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACACCTGCTGCC
207A  CCAAATCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACACCTGCTGCC
183A  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACACCTGCTGCC
201A  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACACCTGCTGCC
117A  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGTCCCACCATCGACACCTGCTGCC
438A  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACACCTGCTGCC
128A  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACACCTGCTGCC
RO..  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACACTGTGC---
COL2  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCATCGACATCGTGC---
16..  CCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGTCCCACCATCGACACGTGCCG--

Type II
414A  CCAGGCGTATCAGCCACACCAGCACCAACACCTGCTGCC----------

Type III
424A  ----------
425A  ----------
403A  ----------
425B  ----------
430A  ----------
452A  ----------
458B  ----------

Type IV
207B  GCCCCAGCACCAACACCTGCTGCC----------
439B  GCCCCAGCACCAACACCTGCTGCC----------

Type V
439A  ----------
6B..  ----------
COL1  ----------
BELM  ----------
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
    2467                                                
```

```
    2587                                                                                                                2706
Type I                                                  Block 6
SAL1  GAGCTACTCGATCAGTACAAACTTAACGCTGATGAGCAAAACAAAATTAACGAAACTAAATGCGATGAATTGGACCTCCTATTCAATGTCCAGAACAACTTGCCAGCCATGTACTCCATA
V100  ..................................................G....A.....................................................................
430B  ..........................................................................................................................
458A  ..........................................................................................................................
207A  .....................................A....................................................................................
183A  ..........................................................................................................................
201A  ..........................................................................................................................
117A  ..........................................................................................................................
438A  ..................................................C...G....A.....................................................................
128A  ..........................................................................................................................
16..  ..........................................................................................<<<<<<<<<<<<< no data >>>>>>>>>>>>>>

Type II
414A  ..........................................................................................................................

Type III
424A  A.A......A.AG.....G.................A...C.....................................................................
425A  A.A......A.AG.....G.................A...C.....................................................................
403A  A.A......A.AG.....G.................A...C.........TC...AC.....................................T.....................
425B  A.A......A.AG.....G.................A...C.........TC...AC.....................................T.....................
430A  A.A......A.AG.....G.................A...C.........TC...AC.....................................T.....................
452A  ..................................................G....A.....................................................................
458B  A.A......A.AG.....G.................A...C.........TC...AC.....................................T.....................

Type IV
207B  A.A......A.AG.....G.................A...C.........TC...AC.....................................................
439B  A.A......A.AG.....G.................A...C.........TC...AC.....................................................

Type V
439A  ..................................................G....A.....................................................................
6B..  A.A......A.AG.....G.................A.............TC...AC.....................................<<<<<<<<<<<<< no data >>>>>>>>>>>>>>
BELM  A.A......A.AG.....G.................A.............TC...AC.....................................................
```

```
    2707                                                
```

Figure 9 Deduced amino acid sequences of the Pv200 of *P.vivax* among Thai field isolates [V100, TD430, TD458, TD207, TD183, TD201, T117, TD438, T128, TD414, TD424, TD425, TD403, TD425, TD452 and TD439] comparing with monkey-adapted strains [Sal-1 (Gibson et al., 1992), Belem (del Portillo et al., 1991)], Brazilian isolates [RO (Porto et al., 1992)], Sri Lanka isolates [6A, 6B, 16, 21, 40, 109 (Premawansa et al., 1993)] and Colombia isolates [Col1, Col2 (Mancilla et al., 1994)]. A and B after the Thai isolates TD430, TD425, TD458, TD207 and TD439 represent clonal mixtures. Amino acid positions shown above the alignments are after Sal-1 strain. Identical amino acids are shown by dots. Positions where no homologous amino acid are indicated by dashes. (Due to the difficulty of alignment, TD and T before Thai isolate numbers are omitted.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
      605                                                                  684
Type  I                                  Block 4
SAL1  EIYDLAQEIRKNENKLTIENKFDFSGVVELQVQKVLIIKKIEALKNVQNLLKNAKVKDDLYIPKVYKTSEKPEPYYLMVL
V100  ................IV.....................................V......G.....
430B  ................IV.....................................V......G.....
458A  ................IV.....................................V......G.....
207A  ................V......................................V......G.....
183A  ................V......................................G.....
201A  ................IV.....................................V......G.....
117A  ................V......................................V......G.....
438A  ................V......................................V......G.....
128A  ................V......................................V......G.....
RO..                          < no data >                              .....
COL2                          < no data >                              .....

Type  II
414A  ...........................................................................

Type  III
424A  ................IV.....................................V......G.....
425A  ................V......................................V......G.....
403A  ................V.....................................................G.....
425B  ................V.....................................................G.....
430A  ................V.....................................................G.....
452A  ................V......................................V....N.G.....
458B  ................V.....................................................G.....

Type  IV
207B  ................V...........................................................
439B  ................V......................................V......G.....

Type  V
439A  ................V......................................V......G.....
COL1                          < no data >                              .....
BELM  ................V..........G.............................V....N.G.....
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
      685                                                                                                                  764
Type  I          Block 4 <   > Block 5
SAL1  KREIDKLKDFIPKIESMIATEK/NKPTVAAADIVAKGQSLRGASETGTTGNTVNAQTAVVQ-PQHQVVNAVTVQPGTTGHQA
V100  ....................../.....................................-.....................
430B  ....................../.....................................-.....................
458A  ....................../.....................................-.....................
207A  ....................../.....................................-.....................
183A  ....................../.....................................-.....................
201A  ....................../.....................................-.....................
117A  ....................../.....................................-.....A...............
438A  ....................../.....................................H.....................
128A  ....................../.....................................QQ....A...............
RO..  ....................../.....................................QQ.....................
COL2  ........G............./.....................................P.....................
109.  < no data  >.......I.E/EQADRGS.....................................Q.....A...............
16..  < no data  >.........../.....................................-.....A...............
Type  II
414A  ....................../T....................................H.....A...............
Type  III
424A  ....................../D....................................QQQQQQQQQQQQQQQ------S
425A  ....................../.....................................QQQQQQQQQQQQQQQ------S
403A  ....................../.....................................QQQQQQQQQQQQQQQQQQQ---S
425B  ....................../.....................................QQQQQQQQQQQQQQQQQQQ---S
430A  ....................../T....................................QQQQQQQQQQQQQQQQQQQ---S
452A  ....................../.....................................QQPQQQQQQQQQQQQQQQ---S
458B  ....................../.....................................QQQQQQQQQQQQQQQQQQQ---S
6A..  < no data  >.........../.....................................QQQQQQQQQQQQQQQQQQQ---S
21..  < no data  >.........../.....................................QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ--S
40..  < no data  >.........../...................S.....................QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ-S
Type  IV
207B  ....................../.....................................QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQS
439B  ....................../.....................................QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQS
Type  V
439A  ....................../AKPT--APVTSGQLLRGSSERATEVTTNAVTSEVQQQQQQQQQQQQ------------S
6B..  < no data  >..QA..T.../A..AASAPVTSGQLLRGSSEAATEVTTNAVTSEDQQQQQQQQQQQQQQQQQ-------S
COL1  ................I...../AKPAASDPATSGQLLRGSSERATEVTTNAVTSLKVQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQS
BELM  ....................../AKPAASAPVTSGQLLRGSSEAATEVTTNAVTSEDQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ-S
```

```
      765                                                                                                  822
Type I                                                Block 5
SAL1  QGGEAETQTNSVQAAQVQQTPAGAGGQVASTQTISQAPAPTQAS-PEPAPAAPPSTPAA----------------------------
V100  ..........................................-.............----------------------------
430B  ..........................................-.............----------------------------
458A  ..........................................-.............----------------------------
207A  ..............................T......N...-.............----------------------------
183A  ..........................................-.............----------------------------
201A  ..........................................-.............----------------------------
117A  ..............................T..........-......V.......----------------------------
438A  ..........................................-.............----------------------------
128A  ......A.....................I..........-.............----------------------------
RO..  ..........................................-...........LC----------------------------
COL2  ..............................T..........-...........SC----------------------------
109.  ..........................................-.............----------------------------
16..  ..........................................H......C.....R.----------------------------
Type  II
414A  ..............................T---------------------------SQSAAPGVSATPAPTPAA----------
Type  III
424A  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPDVSATPAPTPAA----------
425A  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPDVSATPAPTPAA----------
403A  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAA----------
425B  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAA----------
430A  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAA----------
452A  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAA----------
458B  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAA----------
6A..  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPRA----------
21..  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAA----------
40..  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAA----------
Type  IV
207B  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAAAAAPAPTPAA
439B  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAAAAAPAPTPAA
Type  V
439A  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAA----------
6B..  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAA----------
COL1  ----------------------------------------QVVPDPAGDAQQVISTQPTSQCAAPGVSATPAPTPAA----------
BELM  ----------------------------------------QVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTPAA----------
```

```
      823                                                                                                  902
Type I                                                Block 6
SAL1  AVAPAP-TMSKLEYLEKLLDFLKSAYACHKHIFVTNSTMKKELLDQYKLNADEQNKINETKCDELDLLFNVQNNLPAMYSI
V100  ......-.....................................................K.N.....................
430B  ......-.....................................................K.N.....................
458A  ......-.....................................................................
207A  ......-.....................................................K.....................
183A  ......-.....................................................................
201A  ......-.....................................................................
117A  ......-A....................................................................
438A  ......-.....................................................TK.N.....................
128A  ......-.....................................................................
RO..  ......-........Q.............< no data >
COL2  ......-.....................< no data >
109.  ..P...-A.............................KD.K..KE.E.....KT...QN...........< no data >
16..  ..P...-.....................................................< no data >
Type  II
414A  ......-.....................................................................
Type  III
424A  .A....-A.............................D.K..KE.E.....KT.....................
425A  .A....-A.............................D.K..KE.E.....KT.....................
403A  .A....-A.............................D.K..KE.E.....KT...QN................
425B  .A....-A.............................D.K..KE.E.....KT...QN................
430A  .A....-A.............................D.K..KE.E.....KT...QN................
452A  .A....-A.....................................................K.N............
458B  .A....-A.............................D.K..KE.E.....KT...QN................
6A..  .A....-A...........I.-.IR.....................................K.N...........< no data >
21..  .A....PA.............................D.K..KE.E.....KT...QN...........< no data >
40..  .A-...-A.....................................................K.N...........< no data >
Type  IV
207B  .A....-A.............................D.K..KE.E.....KT...QN................
439B  .A....-A.............................D.K..KE.E.....KT...QN................
Type  V
439A  .A....-A.....................................................K.N............
6B..  .A....-A.............................D.K..KE.E.....KT...QN...........< no data >
COL1  .A....-A.....................< no data >
BELM  .A....-A.............................D.K..KE.E.....KN...QN................
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
     903                                        942
Type I                 Block 6
SAL1  YDSMSNELQNLYIELYQKEMVYNIYKNKDTDKKIKAFLET
V100  .....S.....................................
430B  .....................................
458A  .....................................
207A  .....................................
183A  .....................................
201A  .....................................
117A  .....................................
438A  .....S.....................................
128A  .....................................

Type II
414A  .....................................

Type III
424A  .....................................
425A  .....S.....................................
403A  .....................................
425B  .....................................
430A  .....................................
452A  .....................................
458B  .....................................

Type IV
207B  .....S.....................................
439B  .....S.....................................

Type V
439A  .....S.....................................
BELM  .....................................
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 2 แสดงตำแหน่งที่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ block 4 และ 6 โดยเปรียบเทียบกับตำแหน่งกรดอะมิโนที่สัมพันธ์กันตามอัลลีล Sal-1 พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 40 ตำแหน่งจาก 33 codons การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ อาจเปลี่ยนจากชนิดพิวรีน (purine) คือ A และ G เป็นพิวรีน หรือชนิดไพริมิดีน (pyrimidine) คือ C และ T เป็นไพริมิดีน เรียกว่า transition สำหรับการแทนที่โดยเปลี่ยนจากนิวคลีโอไทด์ชนิดพิวรีนเป็นไพริมิดีนหรือในทางตรงข้ามเรียกว่า transversion จากการวิเคราะห์การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวพบ transition 30 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 75 และtransversion 10 ตำแหน่งคิดเป็นร้อยละ 25 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไป (nonsynonymous substitution) มีทั้งหมด 19 ตำแหน่งคิดเป็นร้อยละ 57.57 และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่กรดอะมิโนไม่เปลี่ยนแปลง (synonymous substitution) มีทั้งหมด 14 ตำแหน่งคิดเป็นร้อยละ 42.43 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ชนิด transition ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 มากกว่าตำแหน่งที่ 2 ของ codon เมื่อเปรียบเทียบกับชนิด transversion ในตำแหน่งเดียวกันพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) ดังแสดงในตารางที่ 3 ทั้งนี้การเกิด transversion ณ ตำแหน่งใดก็ตามของ codon จะพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนร่วมด้วยเสมอ สำหรับ transition นั้นเมื่อเกิดขึ้นในตำแหน่งที่ 2 ของ codon จะมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเสมอแต่การเกิด transition ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงเสมอไป (กรดอะมิโนเปลี่ยน 8 ตัว และกรดอะมิโนไม่เปลี่ยน 18 ตัว)

เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงระหว่างนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ พบว่าการเปลี่ยนแปลงระหว่าง G และ A พบมากที่สุดในตำแหน่งที่ 1 ของ codon ซึ่งทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงเสมอ สำหรับการเปลี่ยนแปลงระหว่าง C และ T

Table 2 Nucleotide and amino acid substitutions in the conserved blocks 4 and 6 in the Pv200 gene of *P. vivax* from Thai isolates

Amino acid residue No.*	Amino acid	Codon	Type of change
621	Thr Ile	ACC -T-	Transition
622	Ile Val	ATT G--	Transition
634	Leu Leu	TTA C--	Transition
666	Ile Val	ATT G--	Transition
671	Lys Asn	AAG --T	Transversion
673	Ser Gly	AGC G--	Transition
824	Val Ala	GTT -CC	Transition
825	Ala Ala	GCT --C	Transition
829	Thr Ala	ACC G--	Transition
835	Tyr Tyr	TAC --T	Transition
853	Ile Ile	ATT --C	Transition
854	Phe Phe	TTT --C	Transition
855	Val Val	GTA --G	Transition
856	Thr Thr	ACC --T	Transition
861	Lys Asp	AAA G-C	Transition Transversion

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Amino acid residue No.	Amino acid	Codon	Type of change
863	Glu	GAG	
	Lys	A-A	Transition Transition
866	Asp	GAT	
	Lys	A-A	Transition Transversion
867	Gln	CAG	
	Glu	G--	Transversion
869	Lys	AAA	
	Glu	G--	Transition
875	Gln	CAA	
	Lys	A--	Transversion
876	Asn	AAC	
	Thr	-C-	Transversion
878	Ile	ATT	
	Thr	-C-	Transition
879	Asn	AAC	
	Lys	--G	Transversion
	Asn	--T	Transition
880	Glu	GAA	
	Gln	C--	Transversion
881	Thr	ACT	
	Asn	-A-	Transversion
	Asn	-AC	Transversion Transition
882	Val	GTC	
	Val	--T	Transition
905	Ser	TCT	
	Ser	--C	Transition
908	Asn	AAC	
	Ser	-G-	Transition
909	Glu	GAA	
	Glu	--G	Transition
910	Leu	CTG	
	Leu	--A	Transition

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Amino acid residue No.	Amino acid	Codon	Type of change
911	Asn	AAC	
	Asn	--T	Transition
917	Leu	CTG	
	Leu	T--	Transition
927	Tyr	TAC	
	Tyr	--T	Transition

* Positions are after Sal-I sequence (Gibson et al, 1992).

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 3 Types of nucleotide substitutions in relation to codon positions in the *P. vivax* Pv200 gene from Thai isolates

Type of substitution*	Codon position			Total
	1	2	3	
Transition	10	4	16	30
Transversion	3	3	4	10
Total	13	7	20	40

* Nucleotide substitutions in the first and the third codon positions for transition are significantly greater than for transversion. ($\chi^2 = 0.4722$, $p < 0.5$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พบมากที่สุดในตำแหน่งที่ 3 ของ codon ซึ่งไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงเลย (100% synonymous substitution) ดังแสดงในตารางที่ 4

สำหรับการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน block 5 ไม่สามารถเปรียบเทียบตามตำแหน่งที่ตรงกันได้ (equivalent position) เนื่องจากมีจำนวนแตกต่างกันตามอัลลีล อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ C+A และ G+T ในแต่ละอัลลีลมีค่าเฉลี่ยร้อยละของ C+A มากกว่าร้อยละของ G+T ในทุกอัลลีลและค่าเฉลี่ยร้อยละ C+A ในแต่ละกลุ่มอัลลีลมีค่าใกล้เคียงกันคือ ร้อยละ 65.99, 61.09, 68.34, 71.02 และ 67.33 ในกลุ่มอัลลีลที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ แสดงว่าแม้กลุ่มอัลลีลจะมีความแตกต่างกันในลำดับนิวคลีโอไทด์แต่มีองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์คล้ายกัน นอกจากนี้แม้ว่าอัลลีล Sal-1 ไม่มี CAA และ CAG ที่สร้าง glutamine เรียงติดต่อกันเป็นชุด แต่พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ CA, CAA, CAAA, CAG และ CAAG แทรกกระจายอยู่ในอัลลีล SA1-1

การวิเคราะห์การแทนที่ของกรดอะมิโน

การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ block 4 และ 6 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 19 ตัวไม่เปลี่ยนแปลง 14 ตัว สำหรับคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งจำแนกกรดอะมิโนเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มไม่มีขั้วไม่มีประจุ (nonpolar) กลุ่มมีขั้วไม่มีประจุ (polar) กลุ่มที่เป็นเบสมีประจุ (charged, basidic) และกลุ่มที่เป็นกรดมีประจุ (charged, acidic) พบว่ากรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงแต่ยังคงคุณสมบัติในกลุ่มเดิมมี 6 ตัวและกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงและเปลี่ยนคุณสมบัติมี 13 ตัว อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนชนิดมีขั้ว (มีขั้วไม่มีประจุและมีขั้วมีประจุ) กับชนิดไม่มีขั้วจะพบว่ามีกรดอะมิโนเพียง 3 ตำแหน่งเท่านั้นคือ ตำแหน่งที่ 621 เปลี่ยนจาก threonine (มีขั้ว) เป็น isoleucine (ไม่มีขั้ว) ตำแหน่งที่ 829 เปลี่ยนจาก threonine (มีขั้ว) เป็น alanine (ไม่มีขั้ว)

Table 4 Analysis of the nucleotide changes in the conserved blocks 4 and 6 of the Pv200 gene

Nucleotide change in coding strand	Codon position			Total
	1	2	3	
G/A, A/G	8	1	4	13
G/C, C/G	2	0	1	3
G/T, T/G	0	0	1	1
A/C, C/A	1	3	1	5
A/T, T/A	0	0	1	1
C/T, T/C	1	4	12	17
Total	12	8	20	40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และตำแหน่งที่ 878 เปลี่ยนจาก isoleucine เป็น threonine ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวส่วนใหญ่ (ร้อยละ 84) จะทำให้กรดอะมิโนคงความมีขั้วหรือไม่มีขั้วไว้เหมือนเดิม

เนื่องจากโครงสร้างสามมิติของโปรตีน (three-dimensional conformation) ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติพื้นฐานของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ปัจจัยที่สำคัญคือคุณสมบัติของการมีขั้ว (polarity, P) และปริมาตร (volume, V) ของกรดอะมิโน ทำให้สามารถหาค่าความห่างระหว่างกรดอะมิโนแต่ละคู่ (amino acid pair distance, D_{ij}) โดยความสัมพันธ์ดังนี้

$$D_{ij} = \sqrt{(\delta P_{ij}/\rho P)^2 + (\delta V_{ij}/\rho V)^2}$$

เมื่อ D_{ij} คือความห่างระหว่างกรดอะมิโน a_i และ a_j ในคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ ในเชิง polarity และปริมาตร

δP_{ij} คือความแตกต่างของ polarity ระหว่างกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลง

δV_{ij} คือความแตกต่างของปริมาตรระหว่างกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลง

ρP คือค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของ δP_{ij}

ρV คือค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของ δV_{ij}

โดยวิธีนี้จะพบว่าค่า D_{ij} ที่น้อยที่สุดคือระหว่าง alanine และ proline (D_{ij} = 0.06) ส่วนค่า D_{ij} ที่มากที่สุดคือระหว่าง glycine และ tryptophan (D_{ij} = 5.13) (Miyata et al., 1979)

ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนแต่ละคู่ในส่วนของ block 4 และ block 6 ทำให้ค่า D_{ij} แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 5 จะพบว่าค่า D_{ij} ส่วนใหญ่มีค่าค่อนข้างต่ำ แสดงว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวมักจะคงคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปไม่ให้มีความแตกต่างจากเดิมมากนัก

Table 5 Chemical characteristics of amino acid substitutions in blocks 4 and 6 of Pv200 among Thai isolates

Residue No	Amino acid	Classification				Amino acid pair distance*
		Nonpolar	Polar	Charged polar		
				Basidic	Acidic	
621	Tyr		+			0.86
	Ile	+				
622	Ile	+				0.85
	Val	+				
666	Ile	+				0.85
	Val	+				
671	Lys			+		1.84
	Asn		+			
673	Ser		+			0.85
	Gly	+				
824	Val	+				1.85
	Ala	+				
829	Thr		+			0.90
	Ala	+				
861	Lys			+		2.05
	Asp				+	
863	Glu				+	1.14
	Lys			+		
866	Asp				+	2.05
	Lys			+		
867	Gln		+			0.84
	Glu				+	
869	Lys			+		1.14
	Glu				+	
875	Gln		+			1.14
	Lys			+		
876	Asn		+			1.40
	Thr		+			
878	Ile	+				2.14
	Thr		+			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Residue No	Amino acid	Classification				Amino acid pair distance*
		Nonpolar	Polar	Charged polar		
				Basidic	Acidic	
879	Asn		+			1.84
	Lys			+		
880	Glu				+	0.84
	Gln		+			
881	Thr		+			1.40
	Asn		+			
908	Asn		+			1.31
	Ser		+			

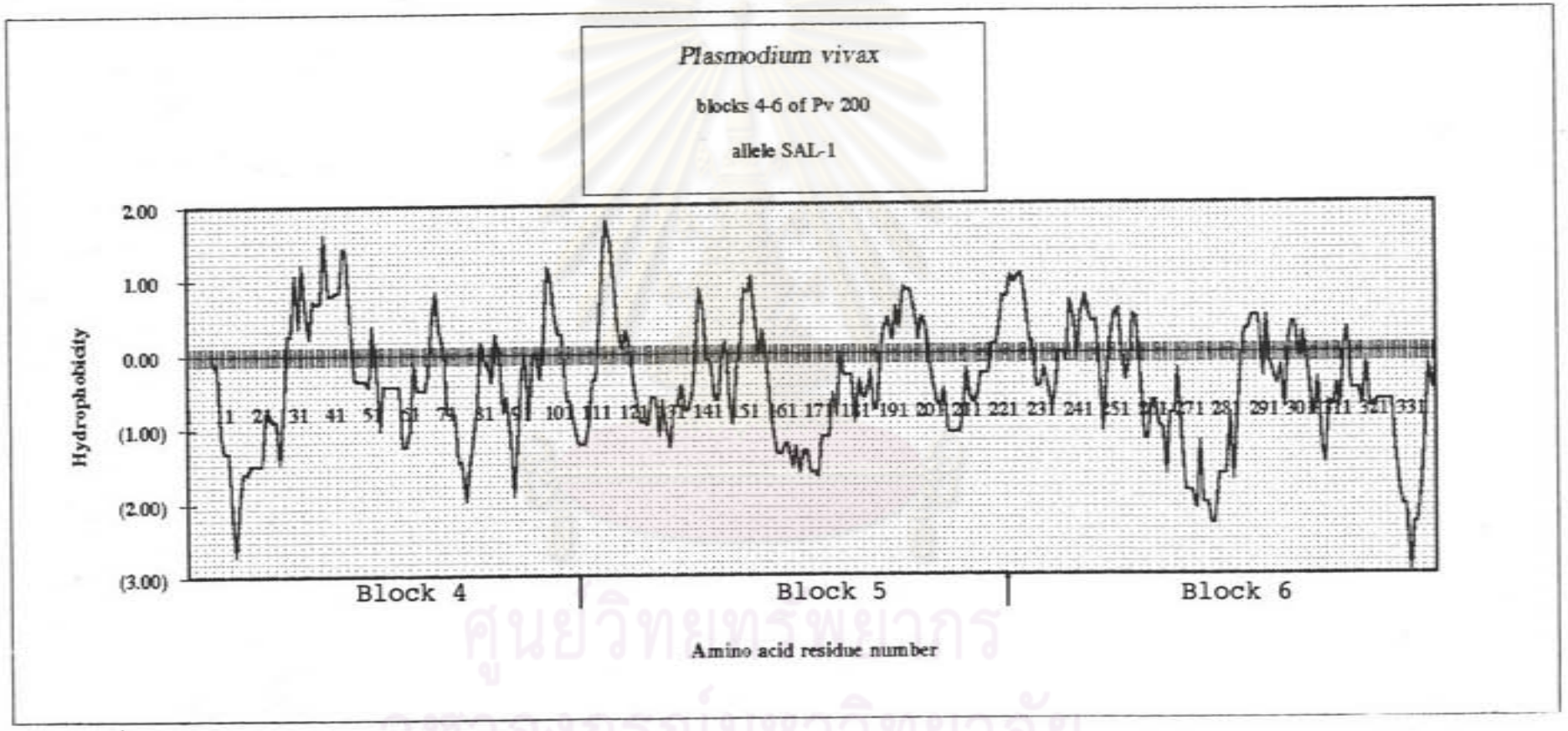
* Value of amino acid pair distance is after Miyata et al., 1979. Mean amino acid pair distance = 1.33 + 0.48

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยมีค่าเฉลี่ยของ $D_{ij} = 1.33 \pm 0.48$ (ค่าเฉลี่ยของ D_{ij} ของกรดอะมิโนทุกคู่ = 3.02)

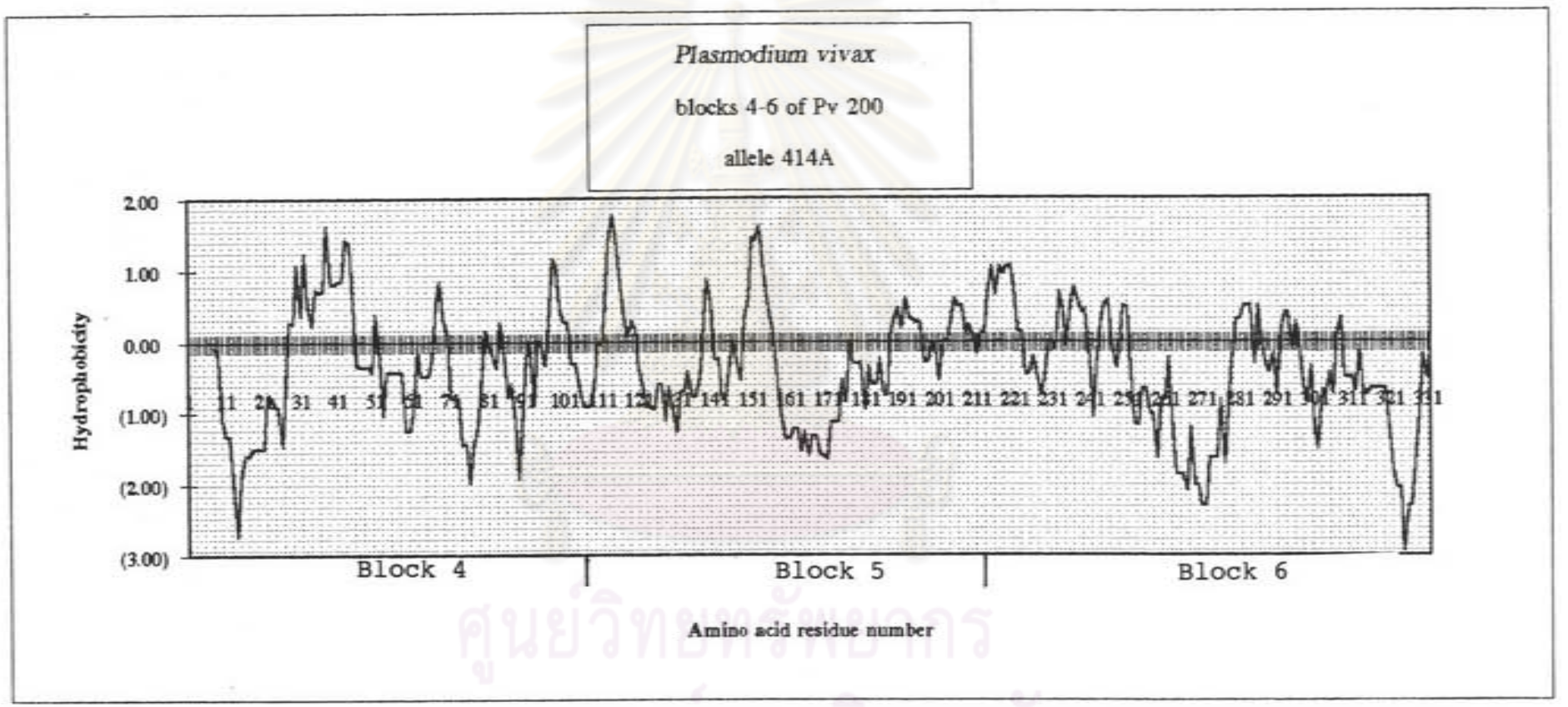
เนื่องจาก Pv200 เป็นโปรตีนบนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ ดังนั้นในองค์ประกอบของโมเลกุลน่าจะมีทั้งส่วนที่อยู่ในเซลล์เมมเบรน (transmembrane domain) และส่วนที่เป็นอิสระนอกเซลล์เมมเบรน แม้ว่าโครงสร้างสามมิติของ Pv200 ยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อนแต่เนื่องจากลักษณะโดยทั่วไปของ transmembrane domain ประกอบด้วยกลุ่มของกรดอะมิโนชนิด hydrophobic เรียงติดต่อกันเป็นบริเวณกว้าง ซึ่งสามารถวิเคราะห์โดยใช้ค่า Kyte-Doolittle hydropathy index (Kyte & Doolittle, 1982) โดยหาค่าเฉลี่ยของกลุ่มกรดอะมิโนที่เรียงติดต่อกันตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 9 คิดเป็นค่าเฉลี่ยของ 1 ช่วง (window) ช่วงถัดไปหาค่าเฉลี่ยตั้งแต่ตำแหน่งที่ 2 ถึง 10 คิดเป็นค่าเฉลี่ยของช่วงที่ 2 ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ ในช่วงถัดไปจนครบทุกตำแหน่งของกรดอะมิโน นำค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างช่วงจุดกึ่งกลางของช่วง (midpoint of window) เป็นแกนนอน และค่าเฉลี่ยของ hydropathy index เป็นแกนตั้ง ค่าเฉลี่ยที่เป็นบวกหมายถึงบริเวณที่มีกลุ่มของกรดอะมิโนชนิด hydrophobic มาก ค่าเฉลี่ยที่เป็นลบหมายถึงบริเวณที่มีกลุ่มของกรดอะมิโนชนิด hydrophilic มาก ดังนั้นบริเวณที่น่าจะเป็น transmembrane domain คือบริเวณที่มี hydropathy index เป็นบวกติดต่อกันเป็นบริเวณกว้าง ในการศึกษานี้ได้เลือกอัลลีลในแต่ละกลุ่มเพื่อวิเคราะห์โดยวิธีดังกล่าว ได้แก่กลุ่มที่ 1 หรืออัลลีล Sal-1 กลุ่มที่ 2 หรืออัลลีล 414A กลุ่มที่ 3 หรืออัลลีล 439B และกลุ่มที่ 4 หรืออัลลีล 439A ดังแสดงในรูปที่ 10, 11, 12 และ 13 ตามลำดับ สำหรับกลุ่มที่ 5 ไม่ได้นำมาวิเคราะห์ เนื่องจากมีความแตกต่างจากอัลลีลที่ 3 น้อยมาก จากกราฟในรูปที่ 10 ถึง 13 แสดง hydropathy profile ของแต่ละอัลลีลจะเห็นว่าในส่วนของ block 4 และ block 6 มีลักษณะของกราฟคล้ายกันหมดทุกอัลลีลแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบางตำแหน่งของแต่ละอัลลีลก็ตาม แต่สำหรับ block 5 จะมีความแตกต่างกันมาก กล่าวคือ อัลลีล 439B ซึ่งประกอบด้วย glutamine เรียงติดต่อกัน 22 ตัว ทำให้ hydropathy profile เป็นลบมากและติดต่อกัน

Figure 10 Hydropathy profile of Pv200 from blocks 4 - 6 of Sal-1 allele. Hydropathy was computed as the method described by Kyte and Doolittle (1982). Hydrophobic and hydrophilic areas are shown above and below the horizontal line, respectively.



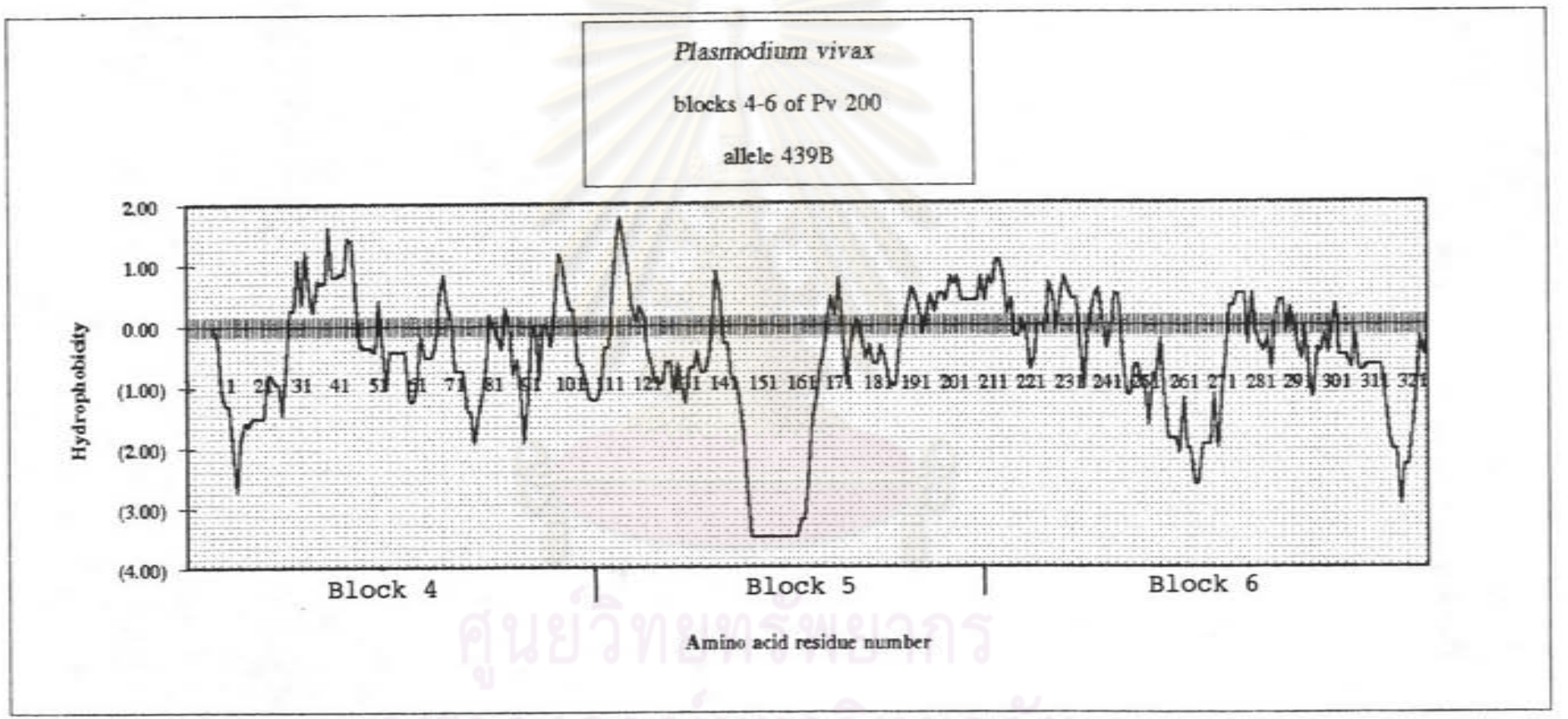
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 11 Hydropathy profile of Pv200 from blocks 4 - 6 of 414A allele. Hydropathy was computed as the method described by Kyte and Doolittle (1982). Hydrophobic and hydrophilic areas are shown above and below the horizontal line, respectively.



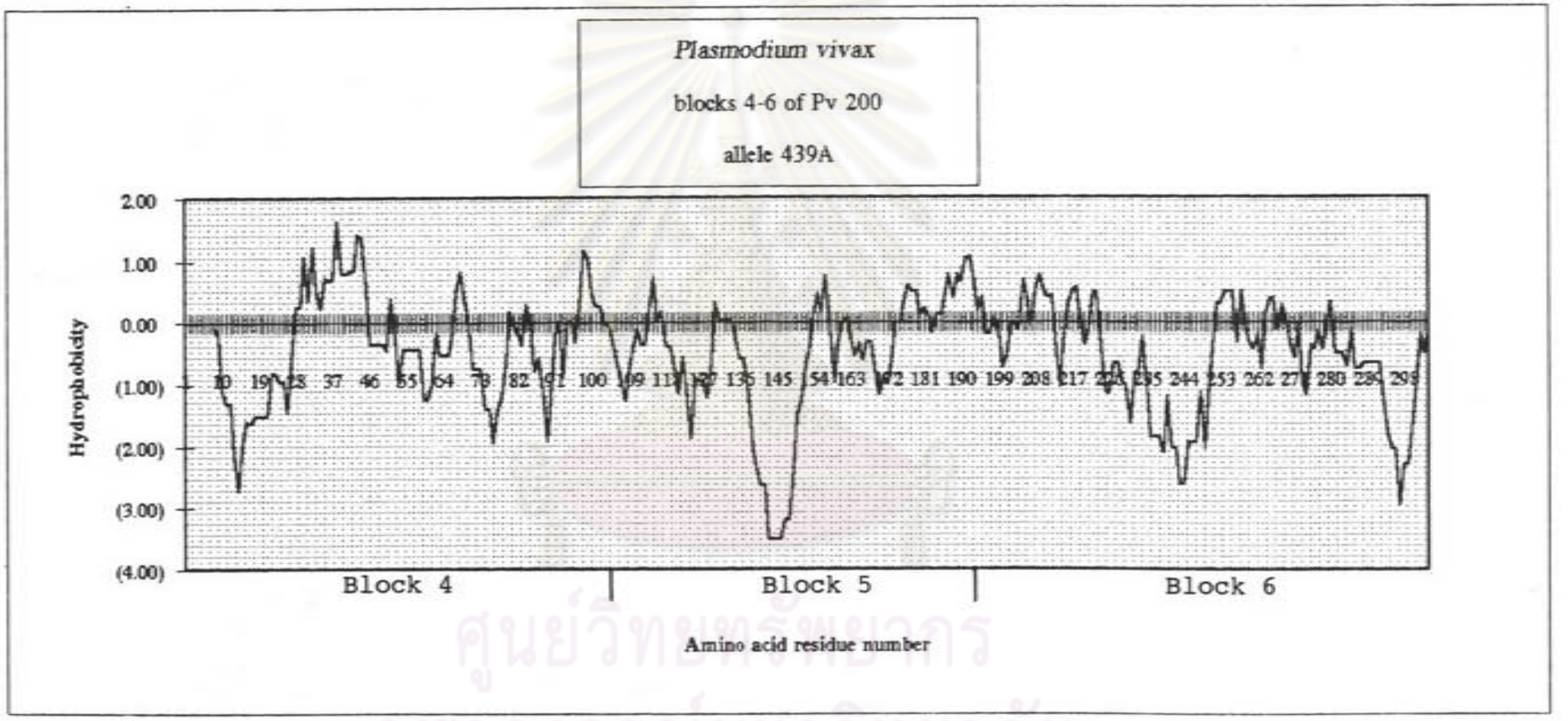
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 12 Hydropathy profile of Pv200 from blocks 4 - 6 of 439B allele. Hydropathy was computed as the method described by Kyte and Doolittle (1982). Hydrophobic and hydrophilic areas are shown above and below the horizontal line, respectively.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 13 Hydropathy profile of Pv200 from blocks 4 - 6 of 439A allele. Hydropathy was computed as the method described by Kyte and Doolittle (1982). Hydrophobic and hydrophilic areas are shown above and below the horizontal line, respectively.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นบริเวณกว้าง ดังนั้นบริเวณดังกล่าวจึงน่าจะเป็นส่วนของโปรตีนที่อยู่นอกเซลล์เมมเบรน ในทำนองเดียวกันอัลลีล 439A ซึ่งประกอบด้วย glutamine เรียงติดต่อกัน 12 ตัว ทำให้ hydropathy profile เป็นลบมากเช่นกันแต่มีขอบเขตแคบกว่าอัลลีล 439B ดังนั้นส่วนของโปรตีนที่อยู่นอกเซลล์เม็มเบรนนี้อาจมีรูปร่างสามมิติแตกต่างกัน สำหรับ block 5 ของอัลลีล Sal-1 และ 414A จะมี hydropathy profile คล้ายกันแม้ว่าอัลลีลทั้งสองจะไม่มี glutamine เรียงติดต่อกัน แต่บริเวณดังกล่าวกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็น hydrophilic amino acid ทำให้ส่วนนี้มีลักษณะของโปรตีนที่อยู่นอกเซลล์เมมเบรนเช่นกันแต่ค่า hydrophobicity จะเป็นลบน้อยกว่าอัลลีล 439A และ 439B นอกจากนี้ในส่วนท้ายของ block 5 ของอัลลีล Sal-1 จะมีกลุ่มของกรดอะมิโนเป็น hydrophilic amino acid ซึ่งอาจเป็นส่วนของโปรตีนที่อยู่นอกเซลล์เมมเบรนเช่นกัน แต่ลักษณะดังกล่าวไม่พบในอัลลีล 414A

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในบริเวณ T cell epitope motif

จากการวิเคราะห์ T cell epitope ของโปรตีนชนิดต่าง ๆ พบว่ามีบางบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบพื้นฐาน (primary sequence) ทั้งนี้เนื่องจาก T cell epitope มักจะมีโครงสร้างเป็น amphipathic helix โดยมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบที่มี polarity ตามตำแหน่งต่าง ๆ ในบริเวณดังกล่าวค่อนข้างคงที่ ข้อมูลดังกล่าวจึงมีผู้ใช้พยากรณ์บริเวณ T cell epitope ได้จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความยาวของลำดับกรดอะมิโน (block length) ที่ทำให้เกิดโครงสร้างเป็น helix ค่า hydrophobicity ของกรดอะมิโนแต่ละตัว และช่วงความยาวของกรดอะมิโนที่ทำให้ amphipathic helix คงที่ (stable amphipathic segment) (Margalit et al., 1987) ซึ่งการคำนวณและทำนายโดยวิธีนี้มีความไวสูงถึงร้อยละ 75 และมีนัยสำคัญทางสถิติสูง

($p < 0.001$) อย่างไรก็ตามมีผู้ตั้งข้อสังเกตจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนใน T cell epitope จากโปรตีนของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดพบว่า T cell epitope ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เรียงกันเป็นเส้น (linear sequence) ของโปรตีนซึ่งมีความแตกต่างจาก B cell epitope ที่มักจะสัมพันธ์กับโครงสร้างสามมิติของโปรตีน และความยาวของลำดับกรดอะมิโนที่สั้นที่สุดที่สามารถกระตุ้น T cell ทั้งชนิด helper T cell และ cytotoxic T cell มีจำนวน 8 ถึง 12 ตัว นอกจากนี้ T cell epitope จะถูกจดจำ (recognize) ขึ้นอยู่กับ major histocompatibility complex (MHC) ดังนั้นจึงมีบริเวณของโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นกลุ่มก้อน (globular protein) ที่แตกต่างกัน ทำให้ MHC ซึ่งมีความหลากหลายอยู่ในตัวจดจำแตกต่างกัน จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของกลุ่ม T cell epitope นั้น Rothbard และ Taylor เสนอว่า T cell epitope motif มีลักษณะพื้นฐานแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรกมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนเรียงกัน 4 ตัว คือกรดอะมิโนที่มีประจุหรือ glycine ติดตามด้วยกรดอะมิโนชนิด hydrophobic 2 ตัว และกรดอะมิโนที่มีขั้ว หรือ glycine กลุ่มที่สองมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนเรียงกัน 5 ตัว คือกรดอะมิโนที่มีขั้วหรือ glycine ติดตามด้วยกรดอะมิโนชนิด hydrophobic 3 ตัว โดยกรดอะมิโนชนิด hydrophobic ตัวสุดท้ายอาจเป็น proline และกรดอะมิโนที่มีขั้วหรือ glycine สำหรับกลุ่มสุดท้ายไม่พบลักษณะที่เป็นรูปแบบการเรียงลำดับกรดอะมิโนชัดเจน วิธีดังกล่าวสามารถใช้พยากรณ์ T cell epitope ได้ถูกต้องทัดเทียมกับวิธีแรก ดังนั้นในการวิเคราะห์นี้จึงเลือกใช้วิธีหลัง (Rothbard & Taylor, 1988) เพื่อตรวจหาบริเวณที่น่าจะเป็น T cell epitope motif ใน Pv200 ส่วนที่ทำการศึกษาในอัลลีลต่าง ๆ ซึ่งแสดงลำดับองค์ประกอบเฉพาะส่วนที่เป็นรูปแบบตามวิธีของ Rothbard และ Taylor ดังแสดงในรูปที่ 14 ซึ่งจะพบว่ามี T cell epitope motif อยู่หลายตำแหน่ง ในบริเวณ block 4 และ block 6 ซึ่งบางบริเวณเป็นตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในอัลลีลที่แตกต่างกัน แต่ส่วนใหญ่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ทำให้คุณลักษณะของ T cell epitope motif เปลี่ยนแปลง

Figure 14 T cell epitope motifs in blocks 4, 5 & 6 of Pv200 among different alleles.*

SAL1

Block 4

(1) ...DLAQ.....GVVE...KKIEALK...KVKD...KVYK...DKLKD...

(2) .....KLTIE.....KVYKT..DKLKDFIPK...

Block 5

(1) .....RGASETGTTG...GTTG...GAGG...

(2) ...DIVAK....ETGTTGN..GTTGH..GAGGQ...

Block 6

(1) ...KLLDFLK.....ELLD.....ELYQ...EMVY....KKIK...

(2) ..EKLLDFLKS.....HIFVT.....ETKCD...DLLFN.....EMVYN..DKKIKAFE...

414A

Block 4

(1) ...DLAQ.....GVVE...KKIEALK...KVKD...KVYK...DKLKD...

(2) .....KLTIE.....KVYKT..DKLKDFIPK...ETKPT...

Block 5

(1) .....RGASETGTTG...GTTG...GAGG...

(2) ...DIVAK.....ETGTTGN..GTTGH..GAGGQ...

Block 6

(1) ...KLLDFLK.....ELLD.....ELYQ..EMVY...KKIK...

(2) ..EKLLDFLKS...HIFVT.....ETKCD...DLLFN.....EMVYN.DKKIKAFLE...

Figure 14 (continued)

439A

Block 4

(1) ...DLAQ.......GVVE...KKIEALK...KVKD...KVYK...DKLKD....

(2) ........KLTIE.........................KVYKT..DKLKDFIPK...

Block 5

(1) ...EKAK...EVTT...

(2) ....EVTTN...

Block 6

(1) ....KLLDFLK..........ELLD...KTKE.......ELYQ...EMVY...KKTK...

(2) ...EKKLDFLKS...HIFVT.............DLLFN........EMVYN.DKKTKAFLE...

425A & 439B

Block 4

(1) ...DLAQ.......GVVE...KKIEALK...KVKD...KVYK...DKLKD...

(2) ........KLTIE.........................KVYKT..DKLKDFIPK...

Block 5

(1) ....RGASETGTTG...

(2) ...DIVAK.....ETGTTGN...

Block 6

(1) ....KLLDFLK..........KLLK...EKTKIK.......ELYQ..EMVY...KKIK...

(2) ...EKLLDFLKS...HIFVT.............DLLFN.......EMVYN.DKKIKAFLE...

---

* T cell epitope motifs are predicted after Rothbard & Taylor (1988).

(1) consists of glycine or charged amino acid + hydrophobic amino acid + hydrophobic amino acid + polar amino acid or glycine.

(2) consists of glycine or charged amino acid + hydrophobic amino acid + hydrophobic amino acid + hydrophobic amino acid or proline + polar amino acid or glycine.

อนึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าในบริเวณ block 5 ของทุกอัลลีลมี T cell epitope motif น้อยกว่า block 4 และ 6 และไม่พบ T cell epitope motif ในส่วนที่เป็น glutamine repeats เลย

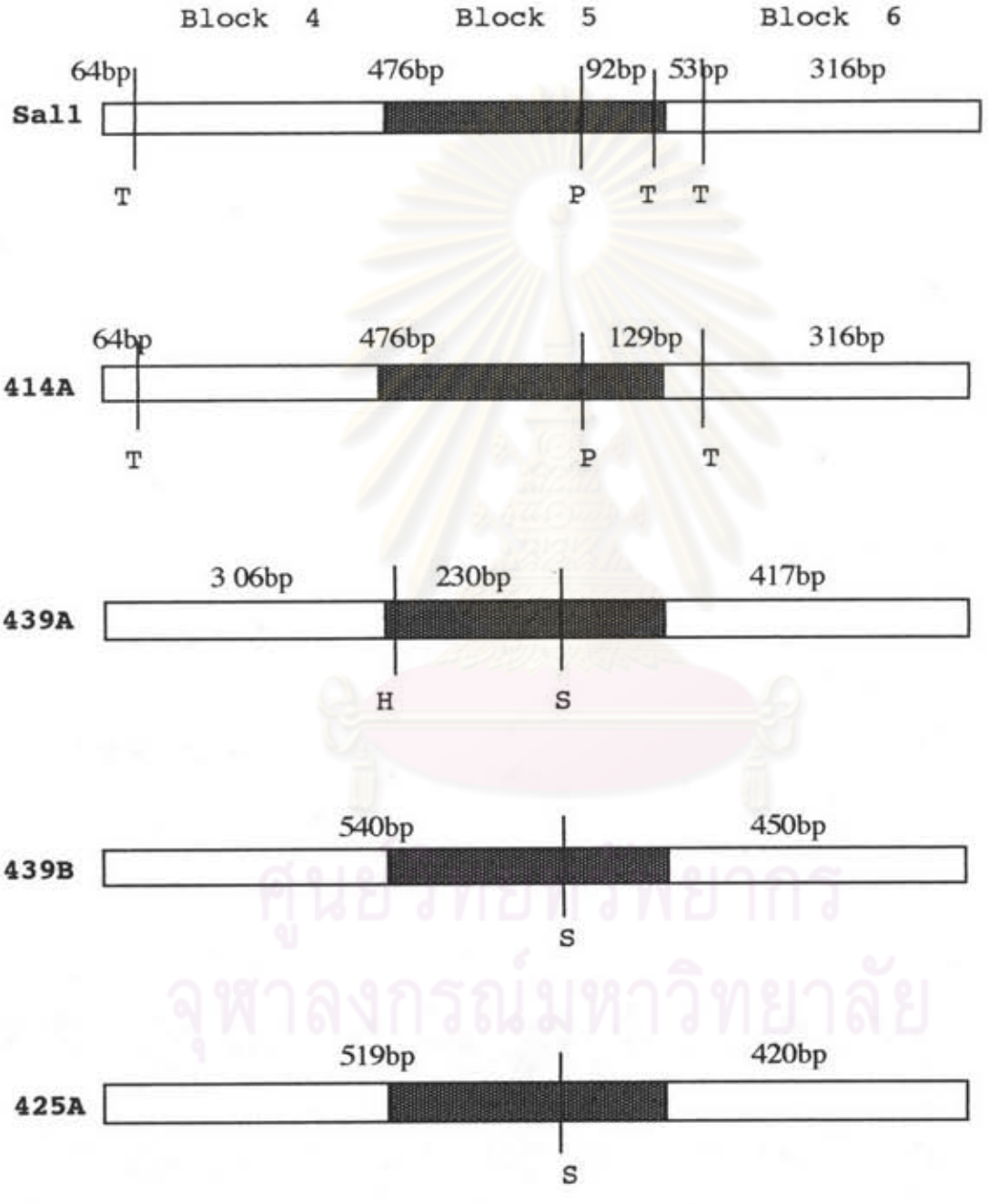
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ถูกตัดได้โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายใน

เนื่องจากในแต่ละอัลลีลมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันทำให้ตำแหน่งที่ถูกตัดได้โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายในแตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ block 5 พบว่ากลุ่มอัลลีลที่ 1 หรือ Sal-1 มีตำแหน่งที่ถูกตัดได้โดย *Alu* I (-AGCT-) (นิวคลีโอไทด์ที่ 2220 ถึง 2223) *Pst* I (-CTGCAG-) (นิวคลีโอไทด์ ที่ 2352 ถึง 2357) และ *Taq* I (-TCGA-) (นิวคลีโอไทด์ที่ 2452 ถึง 2455) กลุ่มอัลลีลที่ 2 หรือ 414A พบตำแหน่งที่ถูกตัดได้โดยเอนไซม์เหมือน Sal-1 ยกเว้นตำแหน่ง *Taq* I กลุ่มอัลลีลที่ 3 หรือ 424A และกลุ่มอัลลีลที่ 4 หรือ 207B มีตำแหน่งที่ถูกตัดได้โดย *Spe* I (-ACTAGT-) (นิวคลีโอไทด์ที่ 2344 ถึง 2349) กลุ่มอัลลีลที่ 5 หรือ Belem มีตำแหน่งที่ถูกตัดได้โดย *Hae* III (-GGCC-) (นิวคลีโอไทด์ที่ 2118 ถึง 2121) *Hpa* II (-CCGG-) (นิวคลีโอไทด์ที่ 2125 ถึง 2128) และ *Sau*3A I (-GATC-) (นิวคลีโอไทด์ที่ 2168 ถึง 2171 และ 2218 ถึง 2221) ในส่วนของ block 4 ไม่พบตำแหน่งที่ถูกตัดได้โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายในที่ตรงกับตำแหน่งที่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ สำหรับส่วนของ block 6 มีตำแหน่งที่มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัดได้โดย *Taq* I (นิวคลีโอไทด์ที่ 2507 ถึง 2510) พบในทุกอัลลีลยกเว้น RO, 16 และ 6B *Alu* I (นิวคลีโอไทด์ที่ 2588 ถึง 2591) พบในอัลลีล 430B, 458A, 207A, 183A, 201A, 117A, 128A, 414A และ 452A *Vsp* I (-ATTAAT-) (นิวคลีโอไทด์ที่ 2633 ถึง 2637) พบในทุกอัลลีลยกเว้น 438A และ *Alu* I (นิวคลีโอไทด์ที่ 2749 ถึง 2752) พบในกลุ่มอัลลีล 430B, 458A, 207A, 183A, 201A, 117A, 128A, 414A, 425A, 452A

และ Belem สำหรับเอนไซม์ที่ตัดส่วนของ block 4 และ 6 ในบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทุกอัลลีลได้แก่ *Taq* I (นิวคลีโอไทด์ที่ 1878 ถึง 1881) *Hpa* II (นิวคลีโอไทด์ที่ 1887 ถึง 1890) *Mse* I (-TTAA-) (นิวคลีโอไทด์ที่ 1965 ถึง 1968 และ 2808 ถึง 2811) *Alu* I (นิวคลีโอไทด์ที่ 1857 ถึง 1860 และ 2514 ถึง 2517) และ *Dra* I (-TTTAAA-) (นิวคลีโอไทด์ที่ 2527 ถึง 2532) รูปที่ 15 แสดงแผนที่ตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ (restriction map) ที่สำคัญในแต่ละกลุ่มอัลลีล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 15 Restriction maps of the PCR product of different Pv200 allele type 1(sal1), 2(414A), 3(439A), 4(439B) and 5(425A). Sizes are calculated in base pair (bp). H, *Hae* III ; P, *Pst* I ; S, *Spe* I and T ,*Tag* I .



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย