

ภาวะหลายรูปแบบของยีนที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์
(Pv200) ของ *Plasmodium vivax* ที่ได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย



นาย จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ. ศ. 2538

ISBN 974-631-751-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

116458614

POLYMORPHISM IN THE MEROZOITE SURFACE PROTEIN (Pv200) OF

Plasmodium vivax FROM THAI ISOLATES



Mr. CHATURONG PUTAPORNTIP

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Biology
Graduate School
Chulalongkorn University

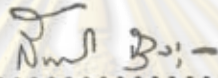
1995

ISBN 974-631-751-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ภาวะหลายรูปแบบของยีนที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์
(Pv200) ของ *Plasmodium vivax* ที่ได้จากผู้ป่วยใน
ประเทศไทย
โดย นาย จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์
ภาควิชา ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์




บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

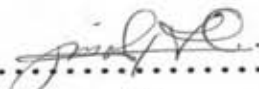

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ จงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์)


.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. พงชัย หาญยุทธนากร)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ : ภาวะหลายรูปแบบของยีนที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอร์โร-
ซอยต์ (Pv200) ของ *Plasmodium vivax* ที่ได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย
(POLYMORPHISM IN THE MEROZOITE SURFACE PROTEIN (Pv200) OF
Plasmodium vivax FROM THAI ISOLATES.) อ. ที่ปรึกษา : รศ. สดศรี
ไทยทอง, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์, 179 หน้า.
ISBN 974-631-751-2

ระยะเมอร์โรซอยต์ของ พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ มีโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลสูงบนผิว เรียกว่า Pv200 ซึ่งมีความหลากหลายของแอนติเจนแตกต่างกันไปตามไอโซเลต ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน Pv200 ในกลุ่มประชากรมาลาเรียที่พบตามธรรมชาติมีอยู่อย่างจำกัดมาก ดังนั้นการศึกษานี้ได้วิเคราะห์ขอบเขตของความหลากหลายใน block 5 และบริเวณใกล้เคียง โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวแล้วทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามี 20 อัลลีลที่แตกต่างกันในจำนวน 15 ไอโซเลตที่ได้จากอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างปี พ.ศ. 2534 ถึง 2537 และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลที่มีรายงานมาก่อน พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 5 กลุ่มในบริเวณ block 5 โดยมี 2 กลุ่มที่ถูกค้นพบใหม่ ความหลากหลายที่พบสามารถอธิบายได้จากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมภายในยีนระหว่างอัลลีลที่ต่างกัน การเกิด point mutation การขาดหาย และการทวิจำนวนของ นิวคลีโอไทด์ ทำให้คุณสมบัติของกรดอะมิโนในน้ำ (hydropathy profile) ของบริเวณ ดังกล่าวในแต่ละกลุ่มต่างกัน สำหรับการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ block 4 และ 6 เกือบทั้งหมดจะมีเพียง 2 แบบ เมื่อวิเคราะห์การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าว พบการแทนที่ชนิด transition เกิดขึ้นบ่อยกว่าการแทนที่ชนิด transversion และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ไม่ทำให้คุณสมบัติทางด้านเคมีฟิสิกส์ของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก ซึ่งน่าจะมีผลมาจากการถูกจำกัดโดยหน้าที่ของบริเวณดังกล่าว ดังนั้นกลุ่มประชากรของพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ ในเขตปรากฏโรคของประเทศไทยจึงมีความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Pv200 มาก

ภาควิชา ชีววิทยา
สาขาวิชา สรีรวิทยานว
ปีการศึกษา 2537

ลายมือชื่อนิสิต จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สดศรี ไทยทอง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สมชาย จงวุฒิเวศย์



C525262 MAJOR ZOOLOGY
KEY WORD: *Plasmodium vivax* / MEROZOITE SURFACE PROTEIN /
POLYMORPHISM / FIELD ISOLATES

CHATURONG PUTAPORNTIP : POLYMORPHISM IN THE MEROZOITE
SURFACE PROTEIN (Pv200) OF *Plasmodium vivax* FROM THAI
ISOLATES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SODSRI THAITHONG,
M.Sc., THESIS CO-ADVISOR : ASS. PROF. SOMCHAI
JONGWUTIWES, M.D., Ph.D. 179 pp. ISBN 974-631-751-2

The merozoite of *Plasmodium vivax* possesses a high molecular weight surface protein called Pv200, which exhibits antigenic diversity among isolates. To date, sequences available to document variations in the Pv200 gene among natural parasite isolates are very limited. Thus, in this study, the extent of the variation in block 5 and the flanking regions was analyzed using the polymerase chain reaction to amplify the DNA fragment encompassing these regions, followed by sequencing. Twenty different alleles were obtained from 15 isolates from the Borai district in Trad province, the Mae Sod district in Tak province and Chulalongkorn hospital during 1991 and 1994, and their sequences were compared with those previously reported. The results revealed 5 sequence types of block 5, two of which were newly identified in this study. Such variations could be explained by intragenic recombination between different alleles, point mutation, deletion and duplication, resulting in a different hydropathy profile of the region for each type. On the other hand, almost all nucleotide substitutions in the flanking regions, block 4 and 6, were dimorphic. Analysis of nucleotide substitutions in these blocks has shown that transition occurs more frequently than transversion and most of the nonsynonymous substitutions do not drastically alter the physicochemical properties of the amino acid changes, suggesting the existence of functional constraints in these regions. Therefore, extensive sequence variation in the Pv200 gene exists among the *P.vivax* population in the endemic areas of Thailand.

ภาควิชา ชีววิทยา

สาขาวิชา สัตววิทยา

ปีการศึกษา 2537

ลายมือชื่อนิสิต *Chaturong Putaporn*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *Sodsri Thaitong*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม *Somchai Jongwutiwes*



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดี ขำพเจ้าขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อแนะนำ ในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ในการทำวิจัย ให้กำลังใจเมื่อมีอุปสรรค มิตรภาพที่ดี ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดีตลอด ขำพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ ดร. พงษ์ หาดญูทอนากร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาร่วมแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลงได้ด้วยดี และ Professor Kazuyuki Tanabe ที่ได้ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลบางส่วน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิจัยตลอดจนความช่วยเหลือและมิตรภาพอันดีมาตลอด

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนใหญ่จากเงินทุนวิจัยที่ทางองค์การอนามัยโลกมอบให้แก่ รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง ในโครงการ ID 880 279 Epidemiology and Immune Response to Potential Candidate Vaccine Antigen for *P.falciparum* Blood Stage Vaccine ทุนวิจัยมูลนิธิกระจกฟ้า 2537 มอบให้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ และบางส่วนจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ศูนย์วิจัยมาลาเรียร่วมองค์การอนามัยโลกเพื่อการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างเชื้อส่วนใหญ่ในการศึกษานี้

สุดท้ายนี้ขำพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา และพี่ ๆ เป็นอย่างสูง ที่ได้กรุณาให้กำลังใจการสนับสนุน การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
คำอธิบายคำย่อ	ซ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. สอบสวนเอกสาร	6
3. วัสดุและอุปกรณ์	37
4. วิธีดำเนินการวิจัย	43
5. ผลการทดลอง	65
6. วิจารณ์ผลการทดลอง	114
7. สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	132
รายการอ้างอิง	135
ภาคผนวก	163
ประวัติผู้เขียน	179

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1. Details of *P.vivax* isolates in this study..... 66
2. Nucleotide and amino acid substitutions in the conserved blocks 4 and 6 in the Pv200 gene from Thai isolates..... 93-94-95
3. Types of nucleotide substitutions in relation to codon positions in the *P.vivax* Pv200 gene from Thai isolates..... 96
4. Analysis of the nucleotide changes in the conserved blocks 4 and 6 of the Pv200 gene..... 98
5. Chemical characteristics of amino acid substitutions in blocks 4 and 6 of Pv200 among Thai isolates..100-101



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

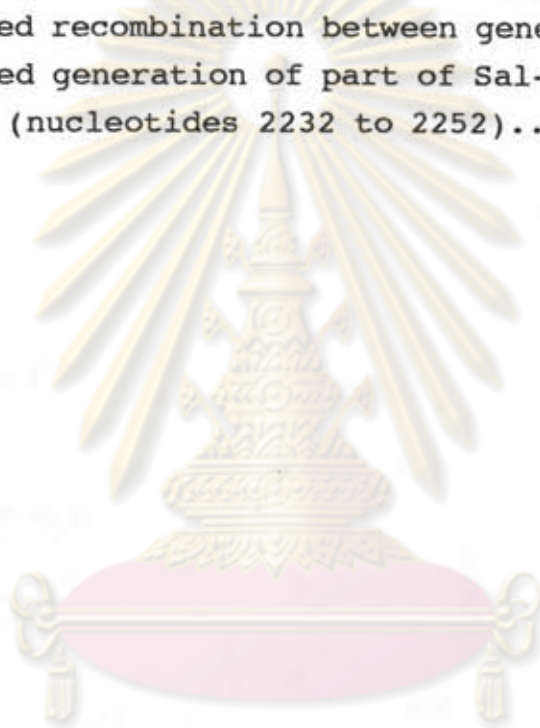
รูปที่	หน้า
1. Diagram illustrating the life cycle of human malaria.....	17
2. Schematic representations of Pv200 of <i>P.vivax</i> and MSP1 of <i>P.falciparum</i>	33
3. Diagram showing ligation of Pv200 PCR fragment with pUC119.....	54
4. Photograph showing blue and white colonies of <i>E.coli</i> on LB agar plate containing ampicillin, IPTG and X-gal.....	57
5. Autoradiograph of DNA sequencing by the dideoxy chain-termination technique (Sanger et al., 1977). Sequences are sequentially read from bottom to top according to the bands in each lane.....	63
6. Analysis of the polymerase chain reaction (PCR) products of the Pv200 gene from blocks 4-6 by 1% agarose gel electrophoresis.....	68
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...	69
8. Nucleotide sequences of the Pv200 gene among <i>P.vivax</i> field isolates in this study.....	76-85
9. Deduced amino acid sequences of the Pv200 of <i>P.vivax</i> among Thai field isolates.....	86-91
10. Hydropathy profile of Pv200 from blocks 4-6 of Sal-1 allele.....	103
11. Hydropathy profile of Pv200 from blocks 4-6 of 414A allele.....	104
12. Hydropathy profile of Pv200 from blocks 4-6 of 439B allele.....	105
13. Hydropathy profile of Pv200 from blocks 4-6 of 439A allele.....	106

14. T cell epitope motifs in blocks 4, 5 and 6 of
Pv200 among different alleles..... 109-110

15. Restriction maps of the PCR products of different
Pv200 alleles type 1(sal1), 2(414A), 3(439A),
4(439B), and 5(452A). Sizes are calculated
in base pair(bp). H, *Hae* III; P, *Pst* I; S, *Spe* I
and T, *Taq* I..... 113

16. Postulated recombination between genes for Pv200. 118

17. Postulated generation of part of Sal-1 block 6
sequence (nucleotides 2232 to 2252)..... 121



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

bp	Base pair
C	Degree celsius
Ci	Curie
cm	Centimetre
cm ³	Cubic millimetre
g	Gram
Kb	Kilobase
KD	Kilodalton
l	Litre
mA	Milliampere
Mb	Megabase
μg	Microgram
μl	Microlitre
mg	Milligram
ml	Millilitre
mm	Millimetre
mmole	Millimole
mM	Millimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optical density
V	Volte

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย