



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

การศึกษาลำดับนิเวศสิทธิ์ไอทีของ
ฮินไดไฮโดรโฟลเลตริตักเทสของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์
จากผู้ป่วยไทย

สถาบันวิจัยบริการ
โดย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กาญจนา รั้งปัทมรัตน์ และคณะ

จพ.
วพ. 15
01.09.34

เมษายน ๒๕๕๔



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโคไฮโรไฟเลตริกเทส
ของเชื้อพลาสมาเดียมไวแวกซ์จากผู้ป่วยไทย

โดย

นางสาวกาญจนา รังษีหิรัญรัตน์ และคณะ

สถาบันวิจัยบริการ
เดือนเมษายน ปี พ.ศ. 2544

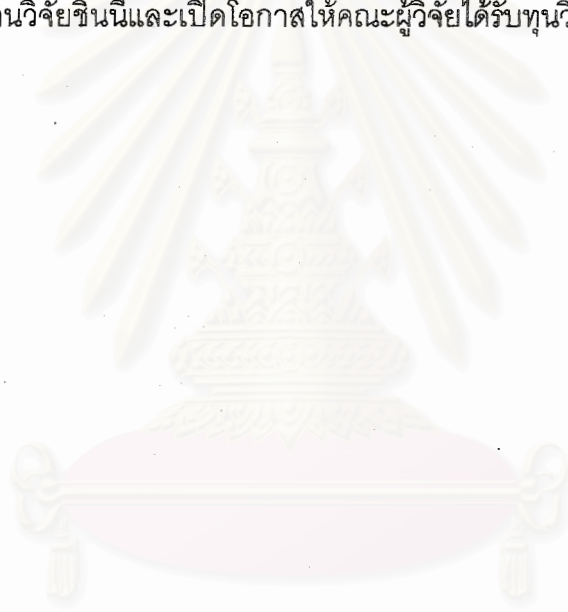
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือสนับสนุนจาก ศาสตราจารย์
กิตติคุณ สดศรี ไทยทอง ที่กรุณาให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาที่ดี ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่อง
ต่างๆในการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณพรทิพย์ นพรัตน์ และ คุณเสาวนิต วิชัยชัทตะ เจ้าหน้าที่กอง
มาลาเรีย กระทรวงสาธารณสุข รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำมาลาเรียคลินิก ที่ให้ความช่วยเหลือและ
อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย

สุดท้ายนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โดยคณะกรรมการบริหารทุนวิจัยและคณะกรรมการติดตามและประเมินผลโครงการวิจัย
ที่เห็นความสำคัญของงานวิจัยชิ้นนี้และเปิดโอกาสให้คณะผู้วิจัยได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช
ครั้งนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จที่
 กพ 15
เลขทะเบียน 010934
วัน.เดือน.ปี 27 กพ.45

ชื่อโครงการวิจัย

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส
ของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์จากผู้ป่วยไทย

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวกาญจนา รัชชี่หิรัญรัตน์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ

เดือนเมษายน ปี พ.ศ. 2544



บทคัดย่อ

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมไวแวกซ์ โดยเพิ่มปริมาณ ส่วนของยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจาก genomic DNA ของเชื้อ มาลาเรีย จำนวน 20 ไอโซเลต ที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไอโซเลตต่างๆ พบ point mutation เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 57 : Phe >> Iso, Leu 58 : Ser >> Arg 61 : Thr >> Met และ 117 : Ser >> Thr, Asn รวมทั้ง ส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆกัน (short tandem repeat) ซึ่งทำให้เกิดความแตกต่างของขนาด (polymorphism) ในยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากที่มีรายงานมาก่อนกับการศึกษาครั้งนี้ พบว่า point mutation ที่ตำแหน่ง 57: Iso , 61 : Met และ 117 : Thr ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตาม ควรจะมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง point mutation และการดื้อต่อยาไพริเมธามีนทั้ง *in vivo* และ *in vitro* ของเชื้อมาลาเรียชนิด พลาสโมเดียมไวแวกซ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title Sequence variations in the DHFR gene of *Plasmodium vivax*
from Thai field isolates

Name of the Investigators Miss Kanchana Rungsibirunrat

Year April 2001

Abstract

To determine sequence variations in the human malaria parasite, *Plasmodium vivax*, the gene encoding dihydrofolate reductase was isolated by the polymerase chain reaction from genomic DNA of 20 clinical isolates originating from various geographic areas in Thailand. Analysis of the nucleotide sequence between different parasite isolates showed several point mutation in codon 57 : Phe >> Iso, Leu 58: Ser >> Arg 61: Thr >> Met and 117 : Ser >> Thr , Asn , including short tandem repeats which generate length polymorphism in the DHFR gene. Sequences were compared with previously reported, the results revealed an amino acid substitutions observed here in codon 57 ; Iso , 61 : Met , and 117 : Thr are not reported before. How ever, further study are needed to determine the relation between point mutation and *in vivo* and *in vitro* pyrimethamine resistance in *P. vivax*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ii
บทคัดย่อภาษาไทย.....	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iv
สารบัญ.....	v
รายการตารางประกอบ.....	vi
รายการภาพประกอบ.....	vii
รายการสัญลักษณ์.....	viii
บทนำ.....	1
วิธีการวิจัย.....	4
ผลการวิจัย.....	11
อภิปรายผล.....	17
สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....	21
รายการอ้างอิง.....	22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1. แสดงลำดับเบสของ PCR primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอร์เรส.....	6
2. แสดงลำดับเบสของ sequencing primer ที่ใช้ในการหาลำดับเบส.....	8
3. ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. vivax</i> และ <i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> ที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ..	12
4. แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลงภายในยีน DHFR	16
5. แสดงส่วนของ short repetitive sequence ในยีน DHFR ของเชื้อ <i>P. vivax</i> บริเวณลำดับกรดอะมิโนที่ 88-106.....	20



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. แผนภูมิแสดงวิธีการวิจัยโดยสังเขป.....	4
2. แผนภูมิยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสของเชื้อพลาสมิเดียมไมโครเวกซ์ แสดงตำแหน่งของ PCR primer (PVF1 และ PVR3) และ sequencing primer (PVF2, PVF461, PVR2 และ PVR200).....	10
3. แสดงผลผลิตผล PCR ที่ได้ เมื่อนำมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis	14
4. แสดงลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำกัน GGDN บริเวณตำแหน่งที่ 88-106 ของยีน DHFR.....	15



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์

DHFR-TS	dihydrofolate reductase-thymidylate synthase
bp	base pair
ml	millilitre
mM	millimolar
mg	milligram
M	molar
μ M	micromolar
μ l	microlitre
PBS	phosphate buffer saline
EDTA	disodium ethylenediamine tetraacetic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ci	curie
mmol	millimole
pmol	picomole
$^{\circ}$ C	degree Celsius

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทนำ

ในปัจจุบันนี้โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศ ทั้งนี้เพราะการควบคุมการระบาดของมาลาเรียต้องเผชิญกับปัญหาหลายด้าน ทำให้การควบคุมโรคไม่ได้ผลเท่าที่ควร มาตราการสำคัญที่ใช้ในการควบคุมมาลาเรียกระทำได้ 2 ทาง คือการควบคุมยุงพาหะโดยการให้สารเคมีและการควบคุมที่ตัวเชื้อมาลาเรียโดยการให้ยาฆ่าเชื้อมาลาเรีย อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีฆ่าแมลงสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ขณะเดียวกันก็ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ส่วนการให้ยาฆ่าเชื้อมาลาเรีย จึงให้ผลดีกว่ากลับพบว่ามีอัตราการดื้อยาของเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญในขณะนี้ จึงต้องมีมาตรการพัฒนายาใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพขึ้น ซึ่งใช้เงินทุนจำนวนมาก

Plasmodium vivax ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียอีกหนึ่งชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในคน และประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อ *P. vivax* มากเป็นอันดับ 2 รองจาก *P. falciparum* โดยพบว่ามีอัตราการแพร่ระบาดสูงถึงร้อยละ 54.48 (กองมาลาเรีย 2539) และพบมากบริเวณภาคใต้และบริเวณชายแดนติดต่อระหว่างไทย-พม่า และ ไทย-กัมพูชา จึงนับว่า *P. vivax* เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งของประเทศด้วย ถึงแม้ว่าเชื้อ *P. vivax* จะไม่ก่อให้เกิดอาการรุนแรงเหมือน *P. falciparum* แต่เชื้อมีระยะ hypnozoite ทำให้เกิดอาการไข้กลับ (relapse) ซึ่งระยะ hypnozoite นี้ สามารถพักตัวอยู่ในเซลล์ตับได้เป็นระยะเวลานาน เมื่อเมอริโรซอยท์แตกออกจากเซลล์ตับจะเข้าสู่กระแสเลือด จำนวนเมอริโรซอยท์ที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเชื้อมาลาเรีย สำหรับ *P. vivax* นั้น มีจำนวนเมอริโรซอยท์ 12-24 เมอริโรซอยท์และเมอริโรซอยท์ของ *P. vivax* สามารถลุกลามเข้าได้เฉพาะเม็ดเลือดแดงที่มีอายุน้อย (reticulocyte) ซึ่งมีเพียง 1% ในเม็ดเลือดแดงของคน จึงเป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญของเชื้อและเป็นข้อจำกัดที่ทำให้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. vivax* ได้ในหลอดทดลอง (Galinski and Barnwell, 1996) ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงของ *P. vivax* ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ระหว่างที่มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนนั้น เชื้อมาลาเรียมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้หลายแบบ ซึ่งแต่ละระยะจะมีแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันไป เพื่อหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายคน ทำให้การรักษามีความยากลำบาก โดยเฉพาะเมื่อผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *P. vivax* ปนอยู่กับ *P. falciparum* อุปสรรคสำคัญในการรักษาป้องกันและควบคุมโรคมาลาเรีย คือ การดื้อต่อยาหลายชนิดของเชื้อมาลาเรีย ถึงแม้ว่าการรักษามาลาเรียที่เกิดจาก *P. vivax* ยังไม่ประสบปัญหาเหมือน *P. falciparum* แต่มีรายงานผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. vivax* ดื้อต่อยา

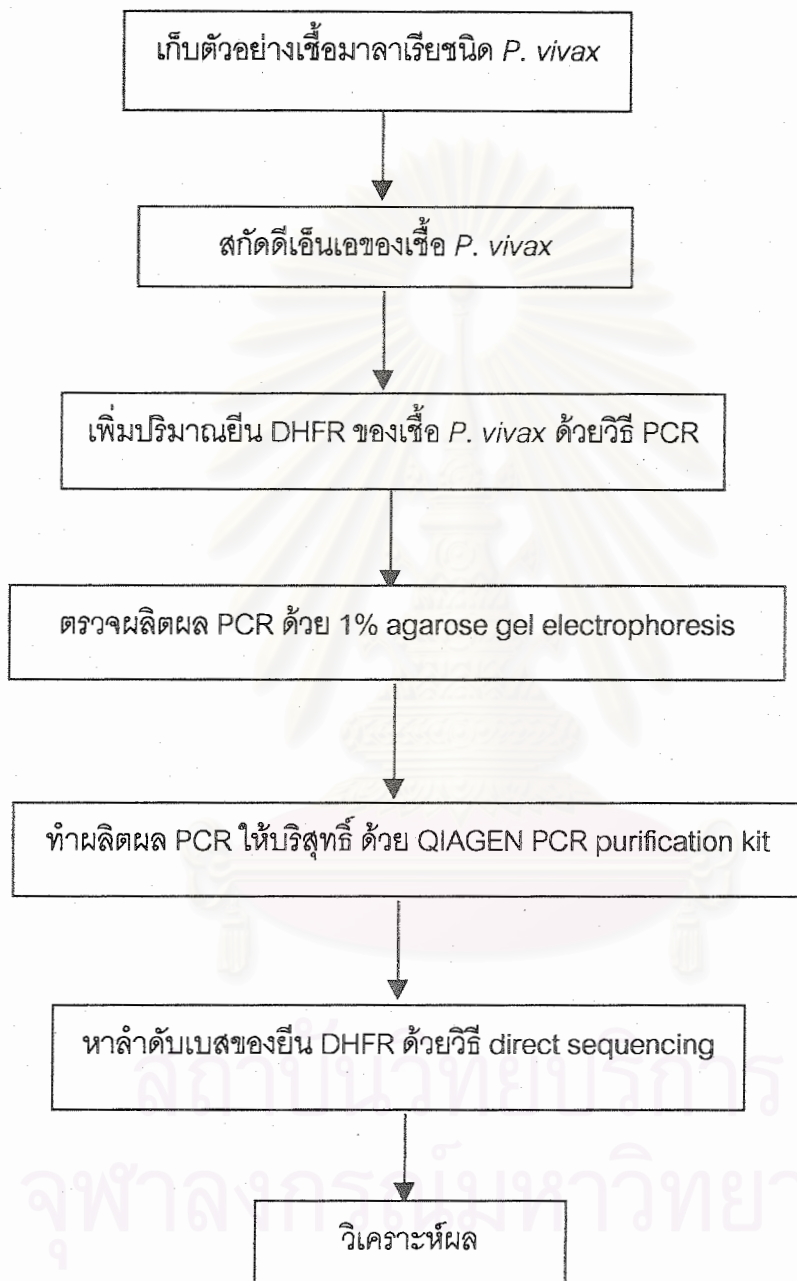
คลอโรควินในหลายประเทศ (Rieckmann *et al.*, 1989, Schunrkamp *et al.*, 1992) ซึ่งก่อให้เกิดอุปสรรคในการรักษาควบคุมโรคในขนาดที่ได้

การรักษาโรคมาลาเรียมีการใช้ยาหลายชนิด แต่มีเพียงยากลุ่มเดียวที่ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ คือ proguanil cycloguanil และ pyrimethamine ซึ่งเป็นยาจำพวก antifolate ซึ่งได้เคยนำออกมาใช้รักษา *P. falciparum* อย่างแพร่หลายในช่วงปี 1952 (Hyde, 1989) แต่ในปัจจุบันนี้ไม่สามารถใช้ยาดังกล่าวได้ เนื่องจากเชื้อมาลาเรียเกิดการดื้อต่อยาดังกล่าว และมีการศึกษามากมายที่แสดงให้เห็นถึงการที่เชื้อ *P. falciparum* ดื้อต่อยาไพริเมธามีน (Cowman *et al.*, 1988, Foote *et al.*, 1990, Peterson *et al.*, 1988) ดังนั้น ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax* ปนอยู่กับ *P. falciparum* อาจจะเป็นปัจจัยที่ทำให้ *P. vivax* เกิดการดื้อยาเพิ่มขึ้น (Wernsdorfer *et al.*, 1991) กลไกที่ก่อให้เกิดการดื้อยา pyrimethamine ใน *P. vivax* ยังไม่ได้มีผู้ศึกษากันมากนัก แต่ใน *P. falciparum* พบว่า กลไกการออกฤทธิ์ยาในระดับโมเลกุลของยาในกลุ่ม antifolate เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทสและไธมิไดเลทซินเทส (dihydrofolate reductase-thymidylate synthase : DHFR-TS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ thymidine อันเป็นองค์ประกอบสำคัญของสารพันธุกรรม การดื้อต่อยา pyrimethamine ของเชื้อมาลาเรียเกิดขึ้นได้จาก 2 สาเหตุสำคัญคือ การเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน DHFR และเกิดการเพิ่มขยายของยีน DHFR (DHFR gene amplification) (Inselburg *et al.*, 1987, Tanaka *et al.*, 1990) การเกิด mutation ที่ยีน DHFR (Cowman *et al.*, 1988, Bzik *et al.*, 1987, Peterson *et al.*, 1988, Peterson *et al.*, 1990, Plowe *et al.*, 1995, Zolg *et al.*, 1989, Basco *et al.*, 1995) ทำให้การจับกันระหว่างเอนไซม์ DHFR-TS ซึ่งเป็นเป้าหมายสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของยาจับกับยาได้น้อยลง จากการศึกษากลไกการดื้อต่อยา pyrimethamine ใน *P. falciparum* พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 16 51 59 108 และ 164 ในยีน DHFR ซึ่งเป็นตำแหน่ง ที่อยู่ในบริเวณ active site ของเอนไซม์ DHFR-TS ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ส่งผลให้การจับกันระหว่างเอนไซม์กับยาลดลง ทำให้เชื้อมีความสามารถต้านทานต่อยาเพิ่มมากขึ้น และจากการศึกษาเอนไซม์ DHFR ใน *P. chabaudi* กับ *P. yoelii* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียในหนูที่ดื้อต่อยา pyrimethamine พบว่า เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่ง 106 ซึ่งเทียบเท่ากับตำแหน่ง 108 ใน *P. falciparum* (Cheng and Saul 1994) สำหรับ *P. vivax* นั้นคาดว่า การดื้อต่อยาไพริเมธามีนน่าจะมีกลไกเหมือนกันกับ *P. falciparum* และมาลาเรียในหนู Pecoulas และคณะ (Pecoulas *et al.*, 1998) ได้ทำการศึกษายีน DHFR ของเชื้อ *P. vivax* ยีนดังกล่าวประกอบด้วย 1872 นิวคลีโอ

ไทด์ ถอดรหัสได้เป็นเปปไทด์ที่มีความยาว 623 กรดอะมิโน ปลายด้านที่เป็นอะมิโนเป็นส่วนของ DHFR เป็นส่วนที่มีความหลากหลาย (variation) มีความยาว 237 อะมิโน และปลายด้านคาร์บอกซีเป็นส่วนของ TS ที่มีความยาว 286 อะมิโน เป็นส่วนที่ค่อนข้างจะคงที่ (conserve) ระหว่างส่วนของ DHFR และ TS มีส่วนของ junction ชั้นกลางมีความยาว 100 อะมิโน จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR -TS ของเชื้อ *P. vivax* จากผู้ป่วย พบว่า มี mutation เกิดขึ้นในตำแหน่งที่ 58 และ 117 ของยีนส่วน DHFR (เทียบเท่าตำแหน่ง 59 และ 108 ใน *P. falciparum*) และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *P.vivax* กับ *P. falciparum* และมาลาเรียในหนู พบว่า *P. vivax* มีส่วนของลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำกันเป็นชุด GGDN (short tandem repeat) ทำให้เกิด polymorphism ในยีนดังกล่าว เช่นเดียวกับที่พบการเรียงลำดับกรดอะมิโนเป็น ELNNG ใน *P. yoelii* และ ELNT ใน *P. berghei* (Cheng and Saul.,1994 , Dijk et al., 1994) แต่ไม่พบลักษณะเช่นนี้ใน *P. falciparum* และ *P. chabaudi* (Hyde, 1990 , Basco, et al., 1995) ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน DHFR ในกลุ่มประชากรมาลาเรียที่พบตามธรรมชาติมีอยู่จำกัดมาก สำหรับการศึกษายีน DHFR ของเชื้อ *P. vivax* จากผู้ป่วยในประเทศไทยนั้น ยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน นอกจากนี้ยังไม่มีวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P.vivax* ได้อย่างต่อเนื่องในหลอดทดลอง ซึ่งมีข้อจำกัดในเรื่อง reticulocyte จึงทำให้ข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR ของ *P. vivax* ที่ได้มีน้อย ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR ในเชื้อ *P. vivax* ในโครงการวิจัยครั้งนี้ ก็จะทำให้เกิดความเข้าใจพื้นฐานทางด้านพันธุกรรม รวมทั้งกลไกการดื้อต่อยา pyrimethamine ของเชื้อ *P.vivax* และมีประโยชน์ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อ *P.vivax* ในอนาคตด้วย



วิธีการวิจัย



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงวิธีวิจัยโดยสังเขป

การเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย

เก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* จากพื้นที่ที่มีการระบาดจากผู้ป่วยที่ มาทำการรักษาที่มาลาเรียคลินิกในพื้นที่ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก อำเภอกระบุรี จังหวัดระนอง อำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี อำเภอบุญชริก จังหวัดอุบลราชธานี และโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน รวมทั้งหมด 25 ตัวอย่าง โดยเจาะเลือดจากปลายนิ้วผู้ป่วย ประมาณ 100 ไมโครลิตร เก็บในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่มี transport media (RPMI 1640 ,5% NaHCO₃ , 2 g Glucose และ 10 unit/ml heparin ป้องกันการแข็งตัวของเลือด) ตรวจวินิจฉัยตัวอย่างเลือดด้วยการทำแผ่นฟิล์มเลือดหนา (thick smear) และแผ่นฟิล์มเลือดบาง (thin smear) ย้อมด้วยสี ยิมซา (giemsa) รวมทั้งเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานทางคลินิก

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *P. vivax*

1. นำตัวอย่างเลือดมาเติมสารละลาย PBS ที่มี saponin อยู่ร้อยละ 0.05 ประมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 นาที จนสังเกตเห็นการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยสีของสารละลายจะเป็นสีแดงใส นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเชื้อมาลาเรีย ดูดสารละลายส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
2. ล้างตะกอนด้วย PBS ที่เย็น 2-3 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายส่วนบนใส
3. เติม lysis buffer (40 mM Tris pH 8.0 , 80 mM EDTA pH 8.0, 2% SDS , 2 mg/ml Protienase K) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในตะกอนของเชื้อมาลาเรีย ผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ ซ้ำมคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
4. สกัดดีเอ็นเอออกจากโปรตีนด้วย Phenol / Chloroform โดยเติม Tris-equilibrate phenol pH 8.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนออกไปใส่หลอดทดลองใหม่
5. เติม phenol / chloroform / isoamyl ในสัดส่วน 25:24:1 ลงในหลอดที่มีสารละลาย ส่วนบน ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนออกไปใส่หลอดทดลองใหม่
6. เติมสารละลาย 3 M sodium acetate pH 5.0 ลงในสารละลายในปริมาตร 1 ใน 10 เท่า และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า เขียงหลอดไปมาเพื่อผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

7. นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้งไป จะได้ตะกอนสีขาวอยู่บริเวณก้นหลอด ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanal ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายออกให้หมดโดยไม่กระทบกระเทือนตะกอนดีเอ็นเอ ทิ้งให้แห้ง

8. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE (10 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน DHFR ของเชื้อ *P. vivax* ต่อไป

การเพิ่มปริมาณยีน DHFR ของเชื้อ *P. vivax* ด้วย PCR

การออกแบบ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน DHFR ของเชื้อ *P. vivax* โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR ของเชื้อ *P. vivax* isolate ARI/Pakistan (GenBank accession number X98123) (Pecoulas *et al.*,1998) เป็นต้นแบบ โดยใช้โปรแกรม DNASIS การศึกษาครั้งนี้ ใช้ primer 2 สาย ดังนี้

Name	Sequence	Position
PVF1 (Forward)	5'-ATGGAGGACCTTTCAGATGTATTTGAC-3'	1-27
PVR3 (Reverse)	5'-CCACCTTGCTGTAAACCAAAAAGTCCAG-3'	715-688

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ PCR primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพรเมอร์เรส

องค์ประกอบของ PCR reaction ในปฏิกิริยา 100 µl ประกอบด้วย

- 10X PCR buffer 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100
- MgCl₂ 2.5 mM
- Primer PVF1 0.1 µM
- Primer PVR3 0.1 µM
- dNTPs 100 µM
- DNA template 2-5 µl
- Taq DNA polymerase 2.5 unit
- Mineral oil 100 µl

นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่อง PCR Thermal Cycler

สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน DHFR มีดังนี้

denaturation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที

annealing 45 องศาเซลเซียส 1 นาที

extension 68 องศาเซลเซียส 1 นาที

โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำ 35 รอบ



ตรวจหาผลผลิต PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

เปรียบเทียบขนาดผลผลิต PCR ที่ได้โดยใช้ 1 kb ladder (Promega) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการบอกขนาด ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ดูภายใต้ UV transilluminator และถ่ายภาพด้วยฟิล์ม โพลารอยด์ 667 เก็บไว้ (Sambrook *et al.*, 1989)

การทำให้ผลผลิต PCR ที่ได้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAGEN PCR purification kit (ตามวิธีที่กำหนดไว้ในคู่มือ)

1. เติม PB buffer ลงใน ผลผลิต PCR ในอัตราส่วน PB buffer : PCR product = 5:1 ผสมให้เข้ากัน ใส่ใน QIAquick spin column
2. นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายใน collection tube ทิ้งไป
3. ล้าง QIAquick column ด้วย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้งไป ปั่นซ้ำอีกครั้ง
4. นำ QIAquick spin column ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร
5. แยกดีเอ็นเอออกจาก QIAquick spin column ได้โดยการเติม elution buffer ลงไป 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
6. เก็บสารละลายดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ -20 องศาเซลเซียส

การหาลำดับเบสโดยตรงด้วย fmol DNA Sequencing system (ตามวิธีที่กำหนดไว้ในคู่มือ)

ในการทดลองนี้ ใช้ sequencing primer ซึ่งออกแบบโดยใช้โปรแกรม DNASIS ได้ sequencing primer 2 คู่ เพื่อใช้ในการหาลำดับเบสในส่วนของยีน DHFR ดังแสดงในตารางที่ 2 และ รูปที่ 2

Name	Sequence	Position
PVF2	5'-TTTGACATTTATGCAATTTGCGCCTG-3'	22-47
PVR2	5'-CCAATGATGAAGCATTGTAGTACTT-3'	521-496
PVF461	5'-GCATAGATGACCTACTGCTG-3'	461-480
PVR200	5'-TTCCACTTAGCTTCTCATACTTTG-3'	224-200

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของ sequencing primer ที่ใช้ในการหาลำดับเบส

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.5 ไมโครลิตร 4 หลอด label G A T C ที่ฝาหลอด
2. เติม d/ddNTP Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่เตรียมไว้

ในข้อ 1 เก็บไว้ในน้ำแข็ง

3. เตรียมหลอดทดลองใหม่สำหรับทำปฏิกิริยา Direct PCR Sequencing

Template DNA	500 mol
Sequencing Primer	3.0 pmol
(α - ³⁵ S)dATP(>1,000Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l)	0.5 μ l
fmol Sequencing 5X Buffer	5.0 μ l
sterile H ₂ O to final volume	16 μ l

4. เติม Sequencing Grade Taq DNA polymerase (5U/ μ l) 1.0 μ l ลงใน primer/template mix (ข้อ3) ผสมให้เข้ากัน

5. แบ่งสารละลายในข้อ 4 ลงในหลอดที่มี d/ddNTP (ข้อ 2) หลอดละ 4 μ l ผสมให้เข้ากัน เติม mineral oil หลอดละ 20 μ l

6. นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น ดำเนินปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

denaturation 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที

annealing 42 องศาเซลเซียส 30 วินาที

extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที

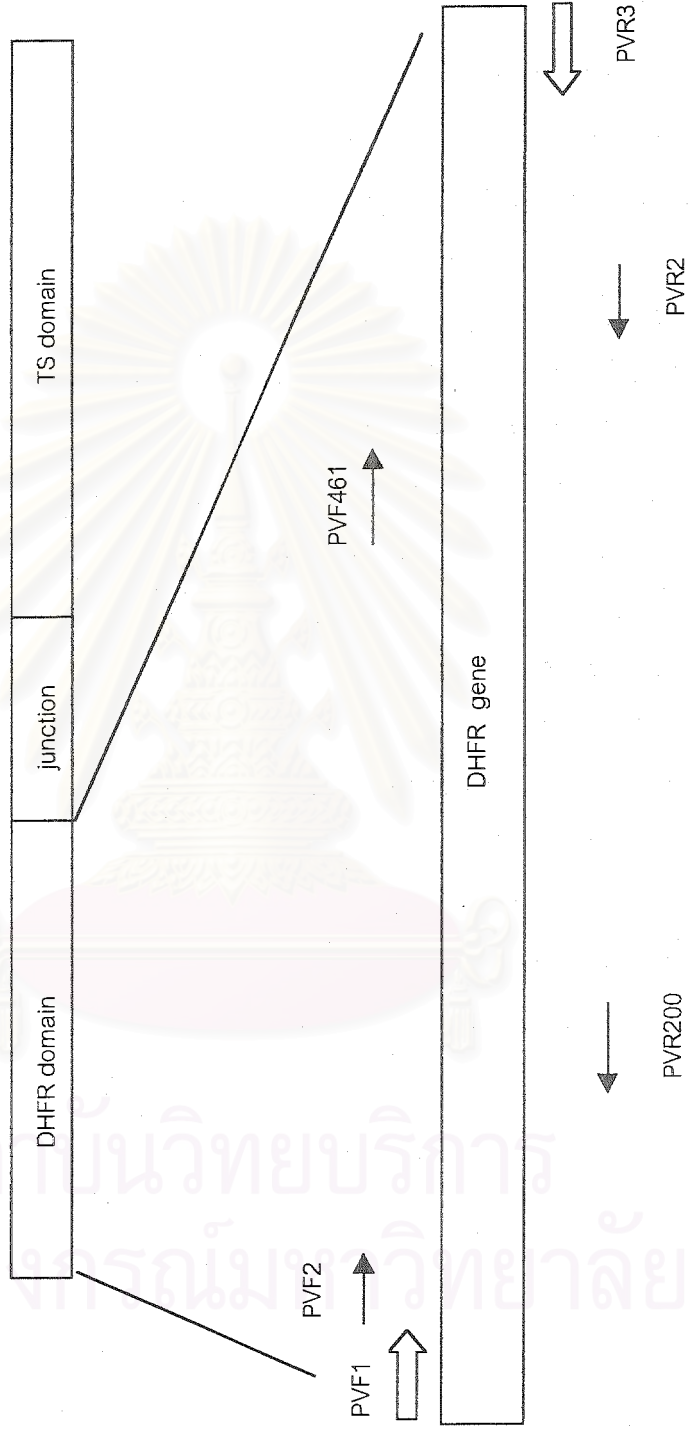
โดยทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ

7. เติม stop solution หลอดละ 3 μ l เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา นำหลอดไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ก่อนที่จะนำไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis และบันทึกสัญญาณกัมมันตรังสีบนแผ่นฟิล์ม (autoradiography) (Sanger *et al.*, 1977 , Sambrook *et al.*, 1989)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แผนภูมิยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสของเชื้อพลาสมาเดี่ยวไมเวกซ์ แสดงส่วนของ PCR primer (PVF1 และ PVR3) และ sequence primer (PVF2 ,PVF461, PVR200 และ PVR2)



ผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย

ในการวิจัยครั้งนี้ ได้กำหนดจำนวนตัวอย่างเชื้อ *P. vivax* เพียง 20 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นการศึกษาเบื้องต้น โดยมีได้กำหนดจำนวนตัวอย่างที่เก็บในแต่ละพื้นที่ เนื่องจากการกระจายของเชื้อ *P. vivax* ในแต่ละพื้นที่ไม่เท่ากัน อีกทั้งฤดูกาลที่มีการระบาดแตกต่างกัน จึงเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งในการเก็บตัวอย่างเชื้อ จากการตรวจวิเคราะห์เลือดผู้ป่วยที่มาทำการรักษาที่มาลาเรียคลินิก โดยการทำแผ่นฟิล์มเลือดและตรวจวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยเจ้าหน้าที่จุลทัศน์กรได้ตรวจจำแนกเป็น *P. vivax* แต่เป็นที่ทราบกันดีว่า การวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ ต้องใช้เจ้าหน้าที่ที่มีความชำนาญและใช้เวลาในการวินิจฉัยตรวจจำแนกชนิดของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากตัวอย่างเลือดที่มีความหนาแน่นของเชื้อต่ำมากๆ ซึ่งความถูกต้องแม่นยำอาจจะน้อยกว่าการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR ในการวิจัยครั้งนี้ เพื่อความถูกต้องจึงได้นำตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่เก็บได้มาทำการตรวจสอบชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีของ Snounou และคณะ (1993) ในห้องปฏิบัติการเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียโดยใช้ small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ซึ่งสามารถจำแนกเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนได้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *P. falciparum* *P. vivax* *P. malariae* และ *P. ovale* ได้อย่างแม่นยำอีกด้วย และพบว่าในจำนวน 25 ตัวอย่างนั้น เมื่อทำการตรวจจำแนกด้วยวิธี PCR แล้ว เป็นชนิด *P. vivax* 18 ตัวอย่าง ชนิด *P. vivax* + *P. falciparum* 2 ตัวอย่าง และชนิด *P. falciparum* 5 ตัวอย่าง จึงได้นำเฉพาะตัวอย่างที่มี *P. vivax* และ *P. vivax* + *P. falciparum* รวม 20 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3 มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol / chloroform เพื่อใช้เป็น DNA template ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสในขั้นตอนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

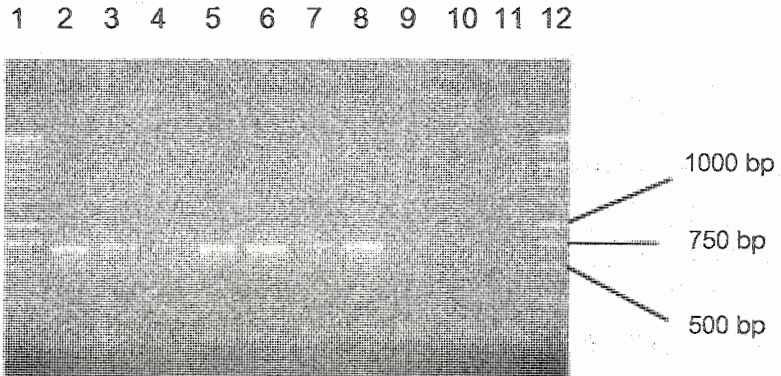
ตารางที่ 3 : ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* และ *P. vivax + P. falciparum*
ที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ

ไอโซเลต	อายุ	เพศ	สถานที่เก็บ	วันที่เก็บ	ชนิดของเชื้อ
PVM1	19	ช	อ.แม่สอด จ. ตาก	14-07-99	Pv
PVM2	60	ญ	อ.แม่สอด จ. ตาก	14-07-99	Pv
PVM3	40	ญ	อ.แม่สอด จ. ตาก	14-07-99	Pv
PVM4	40	ช	อ.แม่สอด จ. ตาก	14-07-99	Pv
PVM5	16	ญ	อ.แม่สอด จ. ตาก	14-07-99	Pv+Pf
PVM6	15	ช	อ.แม่สอด จ. ตาก	15-07-99	Pv
PVM7	20	ญ	อ.แม่สอด จ. ตาก	15-07-99	Pv
PVM8	18	ช	อ.แม่สอด จ. ตาก	15-07-99	Pv
PVM9	55	ช	อ.แม่สอด จ. ตาก	15-07-99	Pv
PVM10	-	ช	อ.แม่สอด จ. ตาก	14-01-01	Pv
PVRN3	50	ญ	อ. เมือง จ.ระนอง	10-07-00	Pv
PVRN4	27	ช	อ. เมือง จ.ระนอง	10-07-00	Pv
PVRN5	32	ช	อ. เมือง จ.ระนอง	17-01-00	Pv
PVRN6	29	ช	อ. เมือง จ.ระนอง	17-01-00	Pv
PVPN1	13	ช	อ.เกาะยาว จ.พังงา	21-01-00	Pv
PVPN2	-	ช	อ.เกาะยาว จ.พังงา	21-01-00	Pv
PVRB1	16	ช	อ. สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	05-06-00	Pv+Pf
PVUB5	36	ช	อ. บุณฑริก จ.อุบลราชธานี	12-12-00	Pv
PVTM115	-	ช	โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน	08-08-99	Pv
PVTM116	-	ช	โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน	08-08-99	Pv

- = no data available

ผลการเพิ่มปริมาณยีน DHFR ของเชื้อ *P. vivax* ด้วยวิธี PCR

การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนของยีน DHFR โดยใช้ primer 1 คู่ คือ PVF1 และ PVR3 ด้วยวิธี PCR ซึ่งครอบคลุมส่วนของ ยีน DHFR ซึ่งในขั้นแรกได้ทดลองปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing ความเข้มข้นของ primer และ ปริมาณดีเอ็นเอที่ใส่ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งผลที่ได้พบว่า ในปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl ,50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.5 mM MgCl₂ , 100 μM dNTPs , 0.1 μM primer แต่ละตัว , 2.5 unit Taq DNA polymerase และปริมาณดีเอ็นเอ 2-5μl ในสภาวะอุณหภูมิที่ใช้ในการ denaturation ที่ 95 ° C นาน 1 นาที , annealing ที่ 45 ° C นาน 1 นาที และ extension ที่ 68 ° C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ดูภายใต้แสง UV ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3 โดยพบว่ามียีนดีเอ็นเอปรากฏ 1 แถบ (แถวที่ 2- 8) บางแถบมีความเข้มต่างกันอาจเกิดจากปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ไม่เท่ากัน ขนาดผลผลิต PCR ที่ได้จาก primer PVF1 และ PVR3 มีขนาด 715 bp เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน(1 Kb DNA ladder, Promega) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของดีเอ็นเอของผู้ป่วย ซึ่งอาจทำให้ผลผิดพลาดได้ โดยอาจเกิดจากการที่ primer จะจับกับดีเอ็นเออื่นที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) อาทิเช่น ดีเอ็นเอของเม็ดเลือดขาวซึ่งไม่สามารถแยกออกจากเชื้อมาลาเรียได้หมด ในการทดลองครั้งนี้ ได้ใช้ดีเอ็นเอของเม็ดเลือดขาว (human white blood cell) และ ดีเอ็นเอของเชื้อ *P. falciparum* เป็นตัวควบคุม (control) รวมทั้ง negative control ซึ่งไม่มีดีเอ็นเอในปฏิกิริยา พบว่า primer ที่ใช้ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอของเม็ดเลือดขาว และ *P. falciparum* ได้ จึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอบนเจลใน แถวที่ 9- 11 จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน DHFR จากตัวอย่างเชื้อ *P. vivax* ทั้ง 20 ไอโซเลต พบแถบดีเอ็นเอปรากฏ 1 แถบในทุกไอโซเลต โดยแสดงผลเพียงบางส่วนในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เมื่อนำมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วย

1% agarose gel electrophoresis

แถบที่ 1 และ 12 คือ DNA marker (1 Kb DNA ladder)

แถบที่ 2 - 8 คือ ตัวอย่างเชื้อ *P. vivax*

แถบที่ 9 คือ *P. falciparum*

แถบที่ 10 คือ human white blood cell

แถบที่ 11 คือ negative control

ผลการหาลำดับเบสของยีน DHFR ด้วยวิธี direct sequencing

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR จำนวน 20 ไอโซเลตจากผู้ป่วยโดยอาศัยเทคนิค PCR เป็นพื้นฐานเพื่อช่วยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน DHFR โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ก่อนด้วย QIAGEN PCR purification kit (QIAGEN) เพื่อกำจัดการปนเปื้อนของสารต่างๆในระหว่างการทำปฏิกิริยา ก่อนที่จะนำมาหาลำดับเบส โดยใช้ Primer 4 สาย คือ PVF2 PVR2 PVF461 และ PVR200 เป็น sequencing primer ในการทำ cycle sequencing เมื่อนำมาแยกแถบดีเอ็นเอโดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis และอ่านสัญญาณที่ปรากฏบน autoradiograph โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR ของเชื้อ *P. vivax* ซึ่งมีผู้ได้ทำการศึกษามาก่อน ได้แก่ ไอโซเลต ARI / Pakistan

(accession number X98123) จาก GenBank (Pecoulas *et al.*, 1998b) ไอโซเลต LFT/Cambodia (accession number AJ003071) และ ไอโซเลต CNC / Thailand (accession number AJ003050) ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าตำแหน่ง 33 ของ *P. vivax* ทั้ง 20 ไอโซเลตที่นำมาทำการศึกษา มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงแบบเดียวคือ CCG (P, Proline) ส่วนตำแหน่ง 57 พบ nucleotide variation 3 แบบ คือ TTC (F, Phenylalanine) จำนวน 7 ไอโซเลต ATA (I, Isoleucine) จำนวน 7 ไอโซเลต และ TTA (L, Leucine) จำนวน 6 ไอโซเลต ตำแหน่ง 58 พบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 1 แบบ คือ AGG (R, Arginine) ตำแหน่ง 61 พบ nucleotide variation 2 แบบ คือ ACG (T, Threonine) จำนวน 7 ไอโซเลต และ ATG (M, Methionine) จำนวน 13 ไอโซเลต ตำแหน่ง 117 พบ nucleotide variation 2 แบบ คือ ACC (T, Threonine) จำนวน 16 ไอโซเลต และ AAC (N, Asparagine) จำนวน 4 ไอโซเลต และ ตำแหน่ง 173 พบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 1 แบบคือ ATT (I, Isoleucine)

นอกจากนี้ เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *P. vivax* ทั้ง 20 ไอโซเลต มาเปรียบเทียบกับ ไอโซเลต ARI / Pakistan พบว่า บริเวณตำแหน่งที่ 88-106 ของยีน DHFR มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำกัน GGDN (short repetitive) 2 แบบ โดยแบบแรก มีการเรียงลำดับของกรดอะมิโน GGDN ซ้ำกัน 3 ชุด เหมือนที่พบในไอโซเลต ARI / Pakistan จำนวน 12 ไอโซเลต (PVM1 PVM2 PVM3 PVM4 PVM5 PVM6 PVM7 PVM8 PVM9 PVM10 PVRN3 และ PVRB1) และแบบที่สอง พบว่ามี deletion ของกรดอะมิโน GGDN 1 ชุด โดยมีการเรียงลำดับกรดอะมิโน GGDN ซ้ำกัน 2 ชุด จำนวน 8 ไอโซเลต (PVRN4, PVRN5, PVRN6, PVPN1, PVPN2, PVUB5, PVTM115 และ PVTM116)

(1) 88 GGG GGT GAC AAC ACA AGC GGT GGT GAC AAC ACA CAC GGT GGT GAC AAC GCC GAC AAG 106
G G D N T S G G D N T H G G D N A D K

(2) 88 GGG GGT GAC AAC ACA AGC GGT GGT GAC AAC — — — — — GCC GAC AAG 106
G G D N T S G G D N - - - - - A D K

รูปที่ 4 แสดงลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำกัน GGDN บริเวณตำแหน่งที่ 88-106 ของยีน DHFR

ตารางที่ 4 แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่พบการเปลี่ยนแปลงในยีน DHFR

Isolates	Amino acid residues					
	33	57	58	61	117	173
ARI/Pakistan	CCG(P)	TTC(F)	AGC(S)	ACG(T)	AGC(S)	ATT(I)
LFT/Cambodia	CCG(P)	TTC(F)	AGG(R)	ACG(T)	AAC(N)	ATT(I)
CNC/Thailand	CCG(P)	CTC(L)	AGC(S)	ACG(T)	AGC(S)	ATT(I)
PVM1	CCG(P)	ATA(I)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVM2	CCG(P)	ATA(I)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVM3	CCG(P)	TTA(L)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVM4	CCG(P)	ATA(I)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVM5	CCG(P)	TTA(L)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVM6	CCG(P)	TTA(L)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVM7	CCG(P)	ATA(I)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVM8	CCG(P)	TTA(L)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVM9	CCG(P)	TTA(L)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVM10	CCG(P)	TTA(L)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVRN3	CCG(P)	ATA(I)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVRN4	CCG(P)	ATA(I)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVRN5	CCG(P)	TTC(F)	AGG(R)	ACG(T)	AAC(N)	ATT(I)
PVRN6	CCG(P)	TTC(F)	AGG(R)	ACG(T)	AAC(N)	ATT(I)
PVPN1	CCG(P)	TTC(F)	AGG(R)	ACG(T)	AAC(N)	ATT(I)
PVPN2	CCG(P)	TTC(F)	AGG(R)	ACG(T)	AAC(N)	ATT(I)
PVRB1	CCG(P)	ATA(I)	AGG(R)	ATG(M)	ACC(T)	ATT(I)
PVUB5	CCG(P)	TTC(F)	AGG(R)	ACG(T)	ACC(T)	ATT(I)
PVTM115	CCG(P)	TTC(F)	AGG(R)	ACG(T)	ACC(T)	ATT(I)
PVTM116	CCG(P)	TTC(F)	AGG(R)	ACG(T)	ACC(T)	ATT(I)



การอภิปรายผล

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR จำนวน 20 ไอโซเลต จากพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย โดยอาศัยเทคนิค PCR และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR ของเชื้อ *P. vivax* มีค่อนข้างจำกัด มีเพียง 30 ไอโซเลตที่ Pecoulas และคณะ (1998a) ได้ทำการศึกษามาก่อนเท่านั้น โดยใช้ตัวอย่างจากประเทศต่างๆ เช่น เยเมน ปากีสถาน อินเดีย กัมพูชา อินโดนีเซีย พม่า ไทย มาดากัสการ์ โดยการ clone และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน DHFR มีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนในบางตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง 33 พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 2 แบบคือ Proline จำนวน 27 ไอโซเลต และ leucine จำนวน 3 ไอโซเลต ตำแหน่ง 57 พบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน 2 แบบคือ Phenylalanine จำนวน 28 ไอโซเลต และ leucine จำนวน 2 ไอโซเลต ตำแหน่ง 58 พบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน 2 แบบ คือ Serine จำนวน 15 ไอโซเลต Arginine จำนวน 15 ไอโซเลต ตำแหน่ง 117 พบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน 2 แบบ คือ Serine จำนวน 16 ไอโซเลต และ Asparagine จำนวน 14 ไอโซเลต และตำแหน่ง 173 พบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน 2 แบบ คือ Isoleucine จำนวน 29 ไอโซเลต และ Leucine พบเพียง 1 ไอโซเลต ซึ่งในการศึกษครั้งนี้ใช้วิธีการคล้ายกับการศึกษาดังกล่าวข้างต้นเพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน DHFR จากเชื้อ *P. vivax* ที่ได้จากผู้ป่วย จำนวน 20 ไอโซเลต โดยการเพิ่มปริมาณยีน DHFR ด้วยวิธี PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในไอโซเลตที่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน ได้แก่ ARI/Pakistan (accession number X98123) จาก GenBank (Pecoulas *et al.*, 1998b) ซึ่งเป็นไอโซเลต wild type ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งยีน คือ DHFR-TS ประกอบด้วย 1872 นิวคลีโอไทด์ โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 623 ตัว เฉพาะส่วนของ DHFR domain มีความยาว 711 นิวคลีโอไทด์ (237 กรดอะมิโน) นอกจากนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบกับไอโซเลต LFT/ Cambodia (accession number AJ003071) และ ไอโซเลต CNC/Thailand (accession number AJ003050) ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าที่ตำแหน่ง 33 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงแบบเดียวคือ CCG (Proline) ส่วนที่ตำแหน่ง 57 นั้นนอกจากจะพบ TTC(Phenylalanine) และ TTA (Leucine) แล้ว ยังพบ ATA(Isoleucine) ซึ่งแตกต่างจากที่ Pecoulas และคณะได้ทำการศึกษามาก่อน ซึ่งพบเพียง 2 แบบ คือ Phenylalanine และ Leucine เท่านั้น ที่ตำแหน่ง 58 พบลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 1 แบบ คือ AGG(Arginine) แตกต่างจากในไอโซเลต CNC/Thailand ที่พบว่าเป็น Serine และนอกจากนี้จะเห็นว่าในจำนวน 30

ไอโซเลตที่ Pecoulas และคณะได้ทำการศึกษา พบว่าที่ตำแหน่งนี้เป็น AGG (Arginine) และ AGC (Serine) ในจำนวนที่เท่ากัน ตำแหน่ง 61 พบ nucleotide variation 2 แบบ คือ ACG (Threonine) และ ATG (Methionine) ซึ่งจากรายงานของ Pecoulas และคณะพบเพียง Threonine เท่านั้น แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบทั้ง Threonine และ Methionine ตำแหน่ง 117 ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา จากที่มีรายงาน พบ nucleotide variation 2 แบบ คือ AGC (Serine) และ AAC (Asparagine) (Pecoulas *et al.*, 1998b, Tahar, *et al.*, 1998) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบ Serine แต่พบ Asparagine จำนวน 4 ไอโซเลตที่เหลืออีก 16 ไอโซเลต เป็น Threonine ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ส่วนตำแหน่ง 173 พบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 1 แบบคือ ATT (Isoleucine) ซึ่งจากรายงานของ Pecoulas และคณะก็พบ Isoleucine เช่นกัน ยกเว้นเพียง 1 ไอโซเลตที่พบว่าเป็น Leucine

การเกิด mutation เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความหลากหลายในสิ่งมีชีวิต ซึ่งในธรรมชาตินั้นการเกิด mutation และ intragenic recombination เป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันในองค์ประกอบทางพันธุกรรม (genetic variation) โดยมีการคัดเลือกทางธรรมชาติ (Natural selection) เพื่อให้ได้สิ่งมีชีวิตที่เหมาะสมคงอยู่ในสภาวะแวดล้อมนั้นได้ เช่นเดียวกับที่พบในเชื้อมาลาเรีย (Walliker, 1983) การเกิด mutation ที่ตำแหน่งต่างๆ ของยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส มีความสัมพันธ์กับระดับการดื้อต่อยาไพริเมธาอิมิน สำหรับเชื้อ *P. falciparum* การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 16 51 59 108 และ 164 ซึ่งเป็นบริเวณ active site ของเอนไซม์ DHFR ทำให้การ binding และ catalysis ของเอนไซม์ต่อยาไพริเมธาอิมินเปลี่ยนไป (Cowman *et al.*, 1988, Plowe *et al.*, 1995, Peterson *et al.*, 1990) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 108 ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยามากขึ้น เมื่อมีการเปลี่ยนจาก Serine ไปเป็น Asparagine (Sirawaraporn *et al.*, 1997) สำหรับเชื้อ *P. vivax* ข้อมูลเกี่ยวกับการทดสอบความไวต่อยาไพริเมธาอิมินทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* มีค่อนข้างจำกัด เนื่องจากยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. vivax* ได้อย่างต่อเนื่องในหลอดทดลอง ดังนั้นจึงต้องอาศัยข้อมูลความรู้เกี่ยวกับเชื้อ *P. falciparum* และมาลาเรียในหนูที่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน เพื่อให้ในการศึกษาเปรียบเทียบการดื้อต่อยาไพริเมธาอิมินของเชื้อ *P. vivax* ซึ่งจากการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 58 (ตรงกับตำแหน่ง 59 ใน *P. falciparum*) จาก Serine (AGC) ไปเป็น Arginine (AGG) และร่วมกับการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 117 (ตรงกับตำแหน่ง 108 ใน *P. falciparum*) จาก Serine (AGC) ไปเป็น Asparagine (AAC) ทำให้เกิดการดื้อต่อยาไพริเมธาอิมินเช่นกัน (Pecoulas *et al.*, 1998a) และการศึกษาเชื้อ *P. vivax* จำนวน

20 ไอโซเลตจากผู้ป่วยไทย ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ พบว่าที่ตำแหน่ง 58 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน จาก Serine ไปเป็น Arginine ในทุกไอโซเลต และเมื่อเกิดร่วมกับการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 117 จาก Serine ไปเป็น Asparagine ในไอโซเลต RN5 RN6 PN1 และ PN2 แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *P. vivax* ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้น่าจะเป็นเชื้อที่ติดต่อยาไพรเมธาซีน นอกจากนี้ยังพบว่าที่ตำแหน่ง 117 นอกจากจะมีการเปลี่ยนแปลงจาก Serine ไปเป็น Asparagine แล้ว ยังพบการเปลี่ยนแปลงจาก Serine ไปเป็น Threonine อีก 16 ไอโซเลต แตกต่างจากที่ Pecoulas และคณะได้ทำการศึกษามาก่อน ซึ่งพบเพียง Serine และ Asparagine เท่านั้น ส่วนตำแหน่ง 61 มีการเปลี่ยนแปลงจาก Threonine ไปเป็น Methionine จำนวน 13 ไอโซเลต ซึ่งจากรายงานของ Pecoulas และคณะ พบเพียง Threonine เท่านั้น ตำแหน่ง 57 จากที่มีรายงานพบเพียง Phenylalanine และ Leucine เท่านั้น แต่จากการศึกษาคั้งนี้ พบ Phenylalanine 7 ไอโซเลต , Leucine 6 ไอโซเลต และ Isoleucine 6 ไอโซเลต นอกจากนี้ยังพบว่า โคดอนที่ใช้สำหรับกรดอะมิโน Leucine ในตำแหน่งที่ 57 นี้ มีความแตกต่างกัน ในผู้ป่วยที่ทำการศึกษาคั้งนี้เป็น TTA ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก CTC ไปเป็น TTA ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous substitution) ส่วนตำแหน่ง 173 ซึ่งเป็น Isoleucine (ตรงกับตำแหน่ง 164 ใน *P. falciparum*) ตำแหน่ง 50 เป็น Asparagine (ตรงกับตำแหน่ง 51 ใน *P. falciparum*) และตำแหน่ง 15 เป็น Alanine (ตรงกับตำแหน่งที่ 16 ใน *P. falciparum*) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่ในบริเวณที่เป็น active site ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างกัน สำหรับ *P. falciparum* พบว่า การเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 16 จาก Alanine ไปเป็น Valine เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา cycloguanil และเมื่อเกิดร่วมกับการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 108 จาก Serine ไปเป็น Threonine ยิ่งทำให้ระดับการดื้อต่อยา cycloguanil เพิ่มมากขึ้น (Peterson *et al.*, 1990 , Foote *et al.*, 1990) ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้พบว่าที่ตำแหน่ง 15 (ตรงกับตำแหน่ง 16 ใน *P. falciparum*) เป็น Alanine ทั้งหมด และตำแหน่งที่ 117(ตรงกับตำแหน่ง 108 ใน *P. falciparum*) พบ Serine เปลี่ยนไปเป็น Threonine 16 ไอโซเลต แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่พบมีแนวโน้มที่จะดื้อต่อยา cycloguanil เช่นกัน

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *P. vivax* ทั้ง 20 ไอโซเลต พบว่าบริเวณตำแหน่งที่ 88-106 ของยีน DHFR พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำกัน GGDN (repetitive) 2 แบบ โดยแบบแรก ซึ่งมีการซ้ำกันของกรดอะมิโน GGDN ซ้ำกัน 3 ครั้งจำนวน 12 ไอโซเลต และแบบที่ 2 ซึ่งเป็นแบบใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน มีลำดับกรดอะมิโน GGDN ซ้ำกัน 2 ครั้ง จำนวน 8 ไอโซเลต จากรายงานที่ Pecoulas และคณะได้ทำการศึกษาในจำนวน 30

ไอโซเลต พบการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ซ้ำกันบริเวณตำแหน่งที่ 88-106 4 แบบ คือ A : 15 ไอโซเลต B: 2 ไอโซเลต C : 12 ไอโซเลต และ D : 1 ไอโซเลต แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบแบบ A จำนวน 12 ไอโซเลต และแบบ E ซึ่งคล้ายกับแบบ C มาก แต่มี deletion ของ asparagine (N) เกิดขึ้น 1 ตำแหน่ง ซึ่งยังไม่มีรายงานมาก่อน จำนวน 8 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 5

(A)	88	G	G	D	N	T	S	G	G	D	N	T	H	G	G	D	N	A	D	K	106		
(B)	88	G	G	D	N	-	-	-	-	-	-	-	T	H	G	G	D	N	A	D	K	106	
(C)	88	G	G	D	N	T	S	G	G	D	N	-	-	-	-	-	-	N	A	D	K	106	
(D)	88	G	G	D	N	T	S	G	G	D	K	R	H	-	-	-	-	-	-	-	-	K	106
(E)	88	G	G	D	N	T	S	G	G	D	N	-	-	-	-	-	-	-	A	D	K	106	

- = deletion

ตารางที่ 5 แสดง short repetitive sequence ในยีน DHFR ของเชื้อ *P. vivax* บริเวณลำดับกรดอะมิโนที่ 88-106

จากการศึกษาในระดับยีนที่ทำหน้าที่สร้างแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย พบว่ามีโครงสร้างพื้นฐานที่แตกต่างกัน (genetic variation) เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิด polymorphism กลไกที่ทำให้เกิดความแตกต่างนี้ อาจเกิดขึ้นจาก repeat variations ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำกันหรือเป็นดีเอ็นเอที่ไม่จำเป็นในการมีชีวิต (non-essential DNA) ซึ่งพบมากถึง 4% ของจีโนมทั้งหมด (Weber., 1988) เชื่อว่ายีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันในมาลาเรียนั้น อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ที่ไม่มีประสิทธิภาพ (ineffective immune response) ทำให้มาลาเรียไม่ถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์ (Bhasin *et al.*, 1985) เช่นที่พบในยีน MSP-1 (Holder *et al.*, 1988, Jongwutiwes *et al.*, 1992) และ ยีน MSP - 2 (Smythe *et al.*, 1988) ซึ่งเป็น candidate vaccine สำหรับเชื้อมาลาเรียที่ตีตัวหนึ่งจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR ระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* พบว่า DHFR domain ของ *P. vivax* มีขนาด 711 bp ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าของ *P. falciparum* ที่มีขนาด 684 bp เนื่องจากมีส่วนของ short repetitive sequence ที่ปรากฏในยีน DHFR ของ *P. vivax* แต่ไม่พบลักษณะเช่นนี้ใน *P. falciparum* และในไอโซเลตที่มี deletion ของส่วน repetitive

นั้น มีทั้งไอโซเลตที่ไวต่อยาและดื้อต่อยาไพริเมธามีน อาจเป็นไปได้ว่าส่วนดังกล่าวไม่มีความจำเป็นสำหรับ DHFR enzymatic activity (Pecoulas et al., 1998a)

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

ยีน DHFR ของเชื้อมาลาเรียเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไทมิดีนของเชื้อมาลาเรียในวิถีโฟเลต ซึ่งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสเป็นเป้าหมายของยาไพริเมธามีนที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรีย การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆของยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทส ทำให้การจับกันของเอนไซม์กับยาไพริเมธามีนเปลี่ยนไป ทำให้ประสิทธิภาพของยาลดลง

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดักเทสของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ที่ได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย จำนวน 20 ไอโซเลต โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่เป็น DHFR domain และทำการหาลำดับเบสของยีนดังกล่าวโดยวิธีการหาลำดับโดยตรง ซึ่งจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR จากผู้ป่วย พบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 57 58 61 และ 117 โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ตำแหน่ง 57 61 และ 117 พบลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากนี้ยังพบ deletion ในส่วนของ short repetitive sequence ที่บริเวณลำดับกรดอะมิโนที่ 88-106 ภายในยีน DHFR ด้วย และเนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียในการศึกษาเพียง 20 ไอโซเลต ซึ่งเป็นการวิจัยเริ่มต้นเท่านั้น ดังนั้นควรจะได้มีการศึกษาโดยใช้จำนวนตัวอย่างมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DHFR ได้มากยิ่งขึ้น หรือทำให้ทราบความหลากหลายของประชากรมาลาเรียในประเทศไทย รวมทั้งแนวโน้มที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาไพริเมธามีนในเชื้อ *P. vivax* โดยการทดสอบทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* ว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์หรือไม่ และจากการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับ specific mutation PCR เพื่อการตรวจวิเคราะห์ จีโนไทป์ของยีน DHFR ได้อย่างรวดเร็วและไม่ต้องใช้วิธีการหาลำดับเบส ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานาน หรืออาจใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะภายในที่สามารถบอกความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

เอกสารอ้างอิง



1. รายงานประจำปีของมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข รายงาน 2539.
2. Basco, L.K., Eldin de Pecoulas, P., Wilson, C.M., Le Bras, J., Mazabraud, A. (1995) Point mutation in the dihydrofolate reductase - thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 69: 135-138.
3. Bhasin, V. K., Clayton, C., Trager, W. and Cross, G.A.M. (1985) Variations in the organization of repetitive DNA sequences in the genomes of *Plasmodium falciparum* clones. Mol. Biochem. Parasitol. 15:149-158.
4. Bzik, D.J., Li, W., Horii, T. and Inselburg, J. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 8360-8364.
5. Cheng, Q. and Saul, A. (1994) The dihydrofolate reductase domain of rodent malaria: point mutations and pyrimethamine resistance. Mol. Biochem. Parasitol. 65: 361-363.
6. Cowman, A.F., Morry, M.J., Biggs, B.A., Cross, G.A.M. and Foote, S.J. (1988) Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 9109-9113.
7. Foote, S.J., Galatis, D. and Cowman, A.F. (1990) Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 3014-3017.
8. Galinski, M.R. and Barnwell, J.W. (1996) *Plasmodium vivax*: merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. Parasitology Today. 12: 20-29.
9. Holder, A.A. (1988). The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. Prog. Allergy. 41: 72-97.
10. Hyde, J.E. (1989) Point mutations and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. Parasitology Today. 5: 252-255.

11. Hyde, J.E. (1990) The dihydrofolate reductase- thymidylate synthetase gene in the drug resistance of malaria parasites. *Pharmacol Ther.* 48:45-59.
12. Inselburg, J., Bzik, D.K. and Horii, T. (1987) Pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum*: overproduction of dihydrofolate reductase by a gene duplication. *Mol. Biochem. Parasitol.* 26: 121-134.
13. Jongwutiwes, S., Tanabe, K., Nakazawa, S., Yanagi, T. and Kanbara, H. (1992) Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitope in P190 (MSA1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51: 81-90.
14. Pecoulas, P. E., Tahar, R., Ouatas, T., Mazabraud, A. and Basco, L.K. (1998a) Sequence variations in the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and their relationship with pyrimethamine resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92:262-273.
15. Pecoulas, P.E., Basco, L.K., Tahar, R., Ouatas, T. and Mazabraud, A. (1998b) Analysis of the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene sequence. *Gene.* 211: 177-185.
16. Peterson, D.S., Milhous, W.K. and Wellems, T.E. (1990) Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 3018-3022.
17. Peterson, D.S., Walliker, D. and Wellems, T.E. (1988) Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 9114-9118.
18. Plowe, C.V., Djimde, A., Bouare, M., Doumbo, O. and Wellems, T.E. (1995) Pyrimethamine and proguanil resistance conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: Polymerase chain reaction methods surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52: 565-568.
19. Rieckmann, K.H., Davis, D.R. and Hutton, D.C. (1989) *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet.* 239: 487-491.
20. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd edition New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

21. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.
22. Schunrkamp, G.J., Spicer, P.E., Keren, R.K., Bulungol, P.K. and Rieckmann, K.H. (1992) Chloroquine - resistant *Plasmodium vivax* in Papua New Guinea. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 86: 121-122.
23. Sirawaraporn, W., Sathitkul, T., Sirawaraporn, R., Yuthavong, Y., Santi, D.V. (1997) Antifolate mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 1124-1129.
24. Smythe, J.A., Coppel, R.L., Day, K.P., Martin, R.K., Oduola, A.M.J., Kemp, D.J. and Anders, R.F. (1991) Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 1751-1755.
25. Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S. and Brown, K.N. (1993) Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol. Biochem. Parasitol. 58: 283-292.
26. Tahar, R., Pecoulas, P.E., Mazabraud, A and Basco, L.K. (1998) *Plasmodium vivax*: rapid detection by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the key mutation in dihydrofolate reductase- thymidylate synthase gene associated with pyrimethamine resistance. Exp. Parasitology. 89: 343-346.
27. Tanaka, M., Gu, H.M., Bzik, D.J., Li, W.B. and Inselburg, J.W. (1990) Dihydrofolate reductase mutations and chromosomal change associated with pyrimethamine resistance of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 39: 127-134.
28. Van Dijk M.R., McConkey G.A., Vinkenoog R., Waters, A.P. and Janse, C.J. (1990) Mechanisms of pyrimethamine resistance in two different strains of *Plasmodium berghei*. Mol. Biochem. Parasitol. 68: 167-171.
29. Walliker, D. (1983) The genetic basis of diversity in malaria parasites. Adv. In Parasitology. 22: 217-257.
30. Wornsdorfer, W.H. and Dayne, D. (1991) The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. Pharmacol. Ther. 50: 95-121.

31. Weber, J.L. (1988) Molecular biology of malaria parasites. *Exp. Parasitol.* 66: 143-170.
32. Zolg, J.W., Plitt, J.R., Chen G.X. and Palmer, S. (1989) Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36: 253-262.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย