

การจำแนกชนิดโดยใช้ลำดับเบสของยีน Small Subunit Ribosomal RNA(SSUrRNA)  
และการเพิ่มจำนวนยีน Rhopty Associated Protein-1 (rap-1) ของเชื้อมาลาเรียไก่ที่ระบาดในประเทศไทย  
ด้วยเทคนิคโพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน



นายทวี สายวิชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-669-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION OF AVIAN MALARIA PARASITE TRANSMITTED IN THAILAND BASED ON SMALL  
SUBUNIT RIBOSOMAL RNA(SSUrRNA) AND AMPLIFICATION OF RHOPTRY ASSOCIATED  
PROTEIN-1(rap-1) GENE USING POLYMERASE CHAIN REACTION



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

Department of Pathology  
Faculty of Veterinary Science  
Chulalongkorn University  
Academic Year 1999  
ISBN 974-334-669-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การจำแนกชนิดโดยใช้ลำดับเบสของยีน Small Subunit Ribosomal RNA(SSUrRNA) และการเพิ่มจำนวนยีน Rhopty Associated Protein-1(*rap-1*) ของเชื้ออมาลาเรียไก่ที่ระบาดในประเทศไทยด้วยเทคนิคโพลีเมอเรสเชนรีแอกชัน

โดย                              นายทวี สายวิชัย

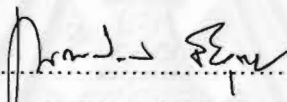
ภาควิชา                        พยาธิวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา            รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.สุวรรณี นิธิอุทัย

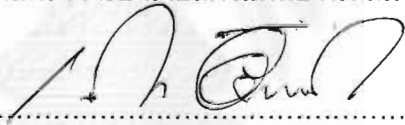
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม      รองศาสตราจารย์ ดร. โกลุม จันทศิริ


                                      อาจารย์ ดร. พงษ์ ชาญยุทธนากร

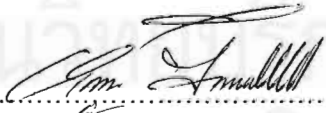
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

 .....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นงรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 .....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เล็ก อัครพลังชัย)

 .....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย)

 .....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร. โกลุม จันทศิริ)

 .....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(อาจารย์ ดร. พงษ์ ชาญยุทธนากร)

 .....กรรมการ  
(ศาสตราจารย์กิตติคุณ สดศรี ไทยทอง)

ทวิ สายวิชัย : การจำแนกชนิดโดยใช้ลำดับเบสของยีน small subunit ribosomal RNA และการเพิ่มจำนวนยีน rhopty associated protein-1 (*rap-1*) ของเชื้อมาลาเรียไก่ที่ระบาดในประเทศไทย ด้วยเทคนิคโพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (Identification of Avian Malarial Parasite Transmitted in Thailand Based on Small Subunit Ribosomal RNA[SSUrRNA] and Amplification of Rhopty associated protein-1 [*rap-1*] gene Using Polymerase Chain Reaction) อ.ที่ปรึกษา : รศ.สพ.ญ.ดร.สุวรรณี นิธิอุทัย อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.โกสุม จันทศิริ และ อ.ดร.พงษ์หาญยุทธนากร ; 98 หน้า. ISBN 974-334-669-4

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียไก่ 3 ไอโซเลท ที่พบในพื้นที่รอบนอกของกรุงเทพมหานครและจังหวัดข้างเคียง โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนของยีนที่มีรหัสในการสร้าง small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA) ช่วงลำดับเบสที่ 1,422 ถึง 1,702 ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction และเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้กับยีนที่มีรหัสในการสร้าง SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียที่พบในสัตว์ปีก 3 ชนิดอื่นในฐานข้อมูล GeneBank คือ *Plasmodium gallinaceum*, *P. lophurae* และ *P. relictum* จากการเปรียบเทียบลำดับเบสด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่าลำดับเบสที่ได้มีความเหมือนกันกับยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. gallinaceum* ถึง 100 % และมีความเหมือนกันกับยีน SSUrRNA เชื้อมาลาเรียชนิด *P. lophurae* และ *P. relictum* ที่ 56.2 % และ 58.0 % ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันว่าเชื้อมาลาเรียในไก่ทั้ง 3 ไอโซเลทที่ระบาดในพื้นที่รอบนอกของกรุงเทพมหานครและจังหวัดข้างเคียงเป็นเชื้อมาลาเรียชนิด *P. gallinaceum*

เมื่อทำการขยายจำนวนดีเอ็นเอจากยีน rhopty associated protein-1 (*rap-1*) ของเชื้อ *P. gallinaceum* โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียในคนชนิด *P. falciparum* ซึ่งมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม หลังการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *rap-1* จากเชื้อ *P. gallinaceum* ในขณะที่เชื้อ *P. falciparum* มีแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน จากการทดลองดังกล่าวพบว่า primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน *rap-1* ของเชื้อ *P. falciparum* ไม่สามารถขยายจำนวนดีเอ็นเอจากยีน *rap-1* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะยีน *rap-1* มีความแตกต่างจาก *P. falciparum* หรือไม่มียีนดังกล่าวอยู่ใน *P. gallinaceum*

ภาควิชา พยาธิวิทยา

สาขาวิชา พยาธิชีววิทยา

ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต..... ทวิ สายวิชัย

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... รศ.ดร.โกสุม จันทศิริ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... รศ.ดร.สุวรรณี นิธิอุทัย

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... อ.ดร.พงษ์หาญยุทธนากร

##4075553231 : MAJOR PATHOBIOLOGY

KEYWORD: *Plasmodium gallinaceum* / SSUrRNA / RHOPTRY / PCR

TAWEE SAIWICHAI : IDENTIFICATION OF AVIAN MALARIA PARASITE TRANSMITTED IN THAILAND BASED ON SMALL SUBUNIT RIBOSOMAL RNA(SSUrRNA) AND AMPLIFICATION OF RHOPTRY ASSOCIATED PROTEIN-1(*rap-1*) GENE USING POLYMERASE CHAIN REACTION. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SUWANEE NITHIUTHAI, Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. KOSUM CHANSIRI, Ph.D., PONGCHAI HARNYUTTANAKORN, Ph.D. 98 pp. ISBN 974-334-669-4

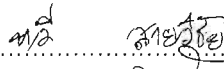
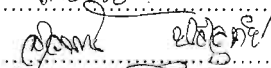

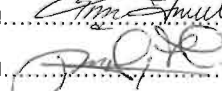
Aim of this experiment is to identify 3 isolates of avian malarial parasite transmitted in Thailand using a part of small subunit ribosomal RNA ( SSUrRNA ) gene sequence. DNA are extracted from blood stage parasites and a part of SSUrRNA gene (1,422-1,702) is amplified by polymerase chain reaction. DNA sequence is analyzed and compared with 3 other species of avian malaria SSUrRNA gene sequence from GeneBank database ( *Plasmodium gallinaceum*, *P. lophurae* and *P. relictum* ). Computer analysis software DNASIS is used in this analysis. In the comparison, there are 100% similarity of SSUrRNA gene sequence between tested avian malaria parasite and *P. gallinaceum*. On the other hand, it shows 56.2% and 58.0% similarity to the SSUrRNA gene sequence of *P. lophurae* and *P. relictum* respectively. The result suggested that the avian malaria parasite transmitted in Thailand is *P. gallinaceum*.

Polymerase chain reaction of *P. gallinaceum* DNA were performed using primers for rhoptry associated protein-1 (*rap-1*) from genetically related *P. falciparum*. No PCR product was found after several trial conditions while positive control (*P. falciparum*) DNA showed clear PCR product in all experiment. The result suggested that the *P. falciparum rap-1* gene primers may not able to amplify *rap-1* gene from *P. gallinaceum*. This may be because there are differences in *rap-1* gene sequence between these two species or the absence of *rap-1* gene in *P. gallinaceum*.

ภาควิชา พยาธิวิทยา

สาขาวิชา พยาธิสัตว์วิทยา

ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีของ รศ.สพ.ญ.ดร.สุวรรณี นิธิอุทัย รศ.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆในการวิจัยมาด้วยดีตลอด ที่ขาดไม่ได้คือ อ.ดร.พงษ์ หาญยุทธนากร ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดการทดลอง และเนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณคณะอาจารย์และเจ้าหน้าที่หน่วยปริสตีวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะ รศ.น.สพ.ดร.มานพ ม่วงใหญ่ ผศ.ดร.สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา และคุณสุดจิตต์ จุงพิวัฒน์ สำหรับความช่วยเหลือและให้คำแนะนำมากมาย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่นักวิจัยฝ่ายศูนย์วิจัยมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกๆท่าน ดร.เนาวรัตน์ กาญจนาคาร คุณอารีย์ เสือก้อน คุณกาญจนา รัชชิรัญรัตน์ คุณนภาพร ศิริพูล คุณเทพนาฏ พุ่มไพบูลย์ และคุณสุชาติ เทพนิมิตร สำหรับความช่วยเหลือในระหว่างการทำงาน การพูดคุยและแลกเปลี่ยนความคิดเห็นในหลายๆเรื่อง และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและสารเคมีตลอดการทดลอง

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ญาติพี่น้องทุกคน ที่ได้สนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอดการศึกษา

นายทวี สายวิชัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

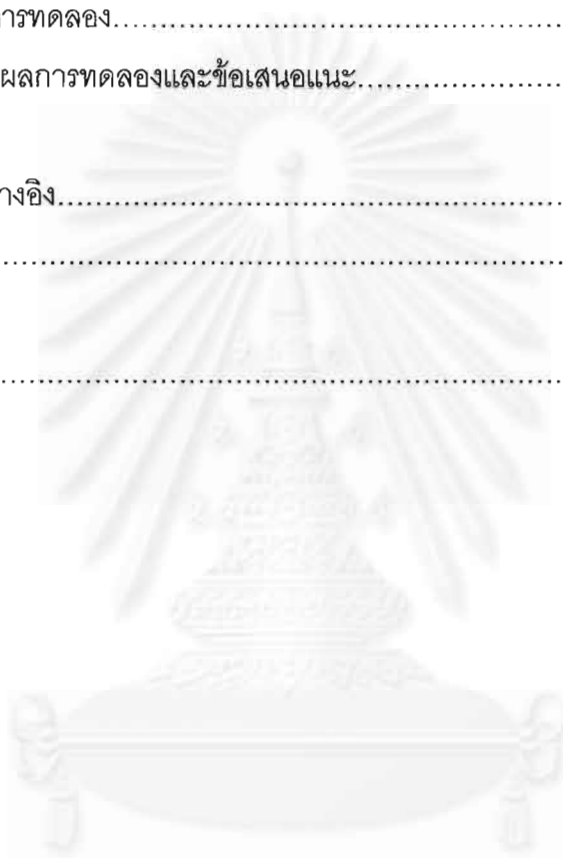
## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญภาพ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาคผนวก.....	ญ
สารบัญรูปภาพของภาคผนวก.....	ฎ
สารบัญตารางของภาคผนวก.....	ฏ
คำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
แนวคิดและทฤษฎี.....	3
การจำแนกชั้นและลักษณะที่สำคัญของเชื้อมาลาเรีย.....	3
การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียทางสัณฐานวิทยา.....	4
การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล.....	6
Ribosomal RNA.....	6
มาลาเรียในสัตว์ปีก.....	7
วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่.....	10
การเข้าสู่เซลล์โฮสต์และบทบาทของ rhoptry.....	11
วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย.....	12
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีเนินการวิจัย.....	15
วัสดุและอุปกรณ์.....	15
เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์.....	15
สารเคมี.....	16

	หน้า
สัตว์ทดลองและเชื้อมาลาเรียที่ใช้.....	17
วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
การเตรียมเชื้อมาลาเรียไก่.....	17
การสกัดดีเอ็นเอ.....	23
การจำแนกเชื้อมาลาเรียไก่โดยการขยายจำนวน DNA จากยีน SSUrRNA.....	23
การออกแบบไพรเมอร์.....	23
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR.....	24
การตรวจสอบผลิตภัณฑ์.....	24
การแยกบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ.....	25
การหาลำดับเบสดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย.....	25
การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ.....	25
การศึกษา ยีน <i>rap-1</i> ของเชื้อมาลาเรียไก่โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ.....	25
ต่อเชื้อมาลาเรียของคน	
การเพิ่มจำนวนยุง.....	26
การเตรียมเชื้อระยะสปอโรซอยต์ในยุง.....	26
การแยกเชื้อระยะสปอโรซอยต์.....	26
การขยายจำนวนดีเอ็นเอของยีน rhoptry associated protein-1.....	27
( <i>rap-1</i> ) ด้วยปฏิกิริยา PCR	
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	28
การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียไก่.....	28
ผลการเตรียมเชื้อมาลาเรียในไก่ทดลอง.....	28
ผลการแยกเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี differential centrifugation.....	32
ผลการสกัดดีเอ็นเอ.....	33
การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน SSUrRNA.....	35
การเพิ่มจำนวนยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียไก่และการตรวจสอบ.....	39
ผลิตภัณฑ์	
ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ.....	42
ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ.....	43
ผลการเพิ่มจำนวนยีน rhoptry associated protein-1( <i>rap-1</i> ) ด้วยเทคนิค PCR.....	56



การแยกบริสุทธิ์เชื้อระยะ sporozoite.....	56
ผลการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนยีน rhoptry associated .....57	57
protein-1( <i>rap-1</i> ) ด้วยเทคนิค PCR	
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ.....	62
สรุปผลการทดลอง.....	62
อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	63
รายการเอกสารอ้างอิง.....	68
หมวดภาคผนวก.....	77
ประวัติผู้เขียน.....	98



## สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 ภาพขยาย 3,000 เท่าแสดงลักษณะระยะ schizont ของเชื้อมาลาเรียชนิด.....4	
<i>P. gallinaceum</i>	
2.2 แสดงลักษณะระยะ schizont ของเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. relictum</i> .....5	
2.3 แสดงลักษณะระยะ schizont ของเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. lophurae</i> .....5	
2.4 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีก.....9	
2.5 ก. เชื้อมาลาเรียระยะ ookinete ข. ภาพขยายส่วนประกอบของ apical complex.....12	
3.1 แสดงขั้นตอนการล้างเซลล์เม็ดเลือดไก่.....19	
3.2 แสดงขั้นตอนการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงไก่แตก.....20	
3.3 แสดงขั้นตอนการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออก.....20	
3.4 แสดงการปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อที่ความเร็ว 3,214xg.....21	
3.5 แสดงการปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อที่ความเร็ว 4,629xg.....21	
3.6 แสดงการปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อที่ความเร็ว 12,857xg.....22	
3.7 แสดงการปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อที่ความเร็ว 21,728xg.....22	
3.8 แสดงขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา PCR.....25	
4.1 फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซ่า 10% กำลังขยาย 4,000 เท่า แสดงเชื้อมาลาเรียไก่.....29	
ระยะไม่มีเพศอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง	
4.2 फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซ่า 10% กำลังขยาย 4,000 เท่า แสดงเชื้อมาลาเรียไก่.....30	
ระยะที่มีและไม่มีเพศอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง	
4.3 ระดับการติดเชื้อในกระแสเลือด และระยะเวลาการเป็นโรคมาลาเรียในไก่.....31	
อายุ 3 สัปดาห์	
4.4 ภาพขยาย 4,000 เท่าจากกล้องจุลทรรศน์แสดงส่วนที่ตกตะกอนหลังจากปั่น.....32	
21,728xg	
4.5 แสดงแถบดีเอ็นเอเชื้อมาลาเรียไก่ NJTH2539 ที่สกัดด้วย phenol และ chloroform.....34	
4.6 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบส SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกที่ใช้.....37	
ในการออกแบบไพรเมอร์	
4.7 แผนภูมิเปรียบเทียบลำดับเบสของ SSUrRNA จากเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> , <i>P. lophurae</i> .....38	
และ <i>P. relictum</i>	
4.8 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากยีน SSUrRNA ของตัวอย่างเชื้อมาลาเรียไอโซเลท NJTH2539...40	

4.9 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากยีน SSUrRNA ของตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย C5TH2542 และ.....	41
C5TH2543	
4.10 ดีเอ็นเอจากยีน SSUrRNA ที่แยกบริสุทธิ์แล้ว.....	42
4.11 ลำดับเบสของยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียโกไอโซเลท NJTH2539.....	43
C5TH2542 และ C5TH2543	
4.12 Four-color electropherogram จากการหาลำดับเบสของ NJTH2539.....	44
4.13 Four-color electropherogram จากการหาลำดับเบสของ NJTH2539.....	45
4.14 Four-color electropherogram จากการหาลำดับเบสของ C5TH2542.....	46
4.15 Four-color electropherogram จากการหาลำดับเบสของ C5TH2542.....	47
4.16 Four-color electropherogram จากการหาลำดับเบสของ C5TH2543.....	48
4.17 Four-color electropherogram จากการหาลำดับเบสของ NJTH2539.....	49
4.18 Four-color electropherogram จากการหาลำดับเบสของ NJTH2539.....	50
4.19 Four-color electropherogram จากการหาลำดับเบสของ NJTH2539.....	51
4.20 ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 ไอโซเลท.....	52
และเชื้อ <i>P. gallinaceum</i>	
4.21 ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 ไอโซเลท.....	53
และเชื้อ <i>P. lophurae</i>	
4.22 ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 ไอโซเลท.....	54
และเชื้อ <i>P. relictum</i>	
4.23 ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 ไอโซเลท.....	55
และเชื้อ <i>P. gallinaceum, P. lophurae P. relictum</i>	
4.24 แผ่นฟิล์มบางและย้อมด้วยสี giemsa 10% ของเชื้อมาลาเรียไก่อาระยะสปอโรซอยต์.....	56
4.25 การทดลองขยายจำนวนยีน <i>rap-1</i> ที่ anneal temp 25 และ 35 °C.....	61

สารบัญตาราง

หน้า

1. แสดงผลการทดลองขยายจำนวนยีน *rap-1* ของ NJTH2539 .....58  
 ที่อุณหภูมิ anneal 53 50 และ 48 องศาเซลเซียส

2. แสดงผลการทดลองขยายจำนวนยีน *rap-1* ของ NJTH2539 .....59  
 ที่อุณหภูมิ anneal 45 40 และ 35 องศาเซลเซียส

3. แสดงผลการทดลองขยายจำนวนยีน *rap-1* ของ NJTH2539 .....60  
 ที่อุณหภูมิ anneal 30 25 และ 20 องศาเซลเซียส



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาคผนวก

หน้า

ภาคผนวก.....	77
ก. น้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	78
ข. รายละเอียดของขั้นตอนและผลการแยกเชื้อมาลาเรียไก่ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	81
ค. ภาพถ่ายจากการทดลองการเพิ่มจำนวนยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียไก่อ.....	89
ง. ภาพถ่ายจากการทดลองการเพิ่มจำนวนยีน <i>rap-1</i> ของ NJTH2539.....	92
จ. การวิเคราะห์ลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตต่างๆในฐานข้อมูลซึ่งมีลักษณะเปรียบเทียบ.....	94
ได้กับเชื้อมาลาเรียไก่อ	



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูปภาพของภาคผนวก

หน้า

ผ1. फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซำ 10% เตรียมจากเลือดที่ล้างด้วย PBS.....	82
ผ2. फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซำ 10% เตรียมจากชั้นเม็ดเลือดขาว.....	83
ผ3. फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซำ 10% เตรียมจากตะกอนส่วนล่างการปั่น 3,214xg.....	84
ผ4. फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซำ 10% เตรียมจากตะกอนส่วนบนกการปั่น 3,214xg.....	85
ผ5. फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซำ 10% เตรียมจากตะกอนที่ได้จากการปั่น 4,629xg.....	86
ผ6. फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซำ 10% เตรียมจากตะกอนที่ได้จากการปั่น 12,857xg.....	87
ผ7. फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซำ 10% เตรียมจากตะกอนที่ได้จากการปั่น 21,728xg.....	88
ผ8. การทดลองขยายจำนวนยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียไก่ทั้ง 3 ไส้เลข.....	89
ผ9. แสดงแถบดีเอ็นเอหลังจากแยกบริสุทธิ์.....	89
ผ10. การทดลองขยายจำนวนยีน SSUrRNA ของ Csth2542 และ Csth2543.....	90
ผ11. แสดงแถบดีเอ็นเอหลังจากแยกบริสุทธิ์ของ Csth2542 และ Csth2543.....	90
ผ12. การทดลองขยายจำนวนยีน SSUrRNA ของ NJth2539.....	91
ผ13. แสดงแถบดีเอ็นเอหลังจากแยกบริสุทธิ์ของ NJth2539.....	91
ผ14. การทดลองขยายจำนวนยีน <i>rap-1</i> ที่ anneal temp 50 °C.....	92
ผ15. การทดลองขยายจำนวนยีน <i>rap-1</i> ที่ anneal temp 30 °C.....	92
ผ16. การทดลองขยายจำนวนยีน <i>rap-1</i> ที่ anneal temp 25 °C.....	93
ผ17. การทดลองขยายจำนวนยีน <i>rap-1</i> ที่ anneal temp 40 °C.....	93

## สารบัญตารางของภาคผนวก

	หน้า
ผ1. ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างที่ forward primer สามารถเข้าจับได้.....	94
ผ2. ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างที่ reverse primer สามารถเข้าจับได้.....	95
ผ3. เปรียบเทียบความเหมือนกันของ NJTH2539 Csth2542 และ Csth2543.....	96
กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ	



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญย่อ

bp	Base pair
°C	Degree celsius
ddH <sub>2</sub> O	Double distilled water
EDTA	Disodium ethylenediamine tetraacetic
g	Gram
Kb	Kilobase
kD	Kilodalton
mg	Milligram
ml	Millilitre
mM	Millimolar
nm	Nanometre
mmole	Millimole
ng	Nanogram
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates
PBS	Phosphate buffer saline
SDS	Sodium dodecyl sulfat
V	Volt
μM	Micromolar
μl	Microlitre
μm	Micrometre





## บทที่ 1

### บทนำ (Introduction)

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมาลาเรียมีสาเหตุเกิดจากโปรโตซัวสกุล พลาสโมเดียม (*Plasmodium*) โดยมียุงเป็นพาหะนำ พบได้ในคนและสัตว์หลายชนิด เช่น ลิง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก เป็นต้น จากรายงานขององค์การอนามัยโลก ในปี 2531 ได้ประเมินว่ามีประชากรทั่วโลกที่เป็นโรคนี้นับถึง 270 ล้านคน (WHO, 1990) การกระจายของโรคเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางและแพร่หลายทั้งทวีปแอฟริกาและเอเชีย พบมากในหลายจังหวัดของประเทศไทย เมื่อเปรียบเทียบกับโรคที่เกิดจากเชื้อปรสิตชนิดอื่นๆ โรคนี้นับเป็นสาเหตุสำคัญที่สุดในการเสียชีวิตอันเนื่องมาจากเชื้อปรสิต และเป็นโรคที่มีอาการรุนแรงอีกโรคหนึ่ง ถ้าหากไม่รักษาอย่างถูกวิธีก็อาจทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิตได้

สำหรับโรคมาลาเรียในสัตว์นั้น ในประเทศไทยจนถึงปัจจุบันได้มีรายงานการระบาดของโรคมาลาเรียไก่ใน 17 จังหวัด โดยเกิดการระบาดขึ้นครั้งแรกในฟาร์มไก่แห่งหนึ่งที่อยู่ในเขตมีนบุรี กรุงเทพมหานคร และอำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายกในระหว่างต้นเดือนสิงหาคมและกันยายน 2538 ไก่มีอัตราการป่วยร้อยละ 50.0-55.0 อัตราการตายร้อยละ 11.0-20.0 (ทัศนีย์ และคณะ 2538) ความสูญเสียที่เกิดขึ้นจากการระบาดของโรคมาลาเรียไก่ในครั้งนั้น จากที่ประเมินความเสียหายของฟาร์มไก่เนื้อจำนวน 4 ฟาร์ม คิดเป็นมูลค่าถึง 1 ล้านบาท และในช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน 2540 ชิตและชัยศิริ(2541) ได้ทำการสำรวจโรคจากไก่จำนวน 96,665 ตัว พบว่ามาลาเรียเป็นโรคที่ทำให้ความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่เนื้อมากกว่าโรคอื่นๆ โดยพบว่าไก่เนื้อมีอัตราการป่วยเป็นโรคมาลาเรียสูงถึงร้อยละ 14.2 และจากรายงานของปิยนุชและทัศนีย์ (2541) พบว่าไก่ไข่มีการติดเชื้อมาลาเรียได้เช่นเดียวกัน มีผลทำให้ไก่มีอัตราการตายสูงขึ้นถึงร้อยละ 20-48 และไข่ลดร้อยละ 10-30

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการพบเชื้อ ไก่ที่ป่วยและตายเนื่องจากโรคมาลาเรียในช่วงปี พ.ศ. 2538 และปีถัดๆมา พบว่ามีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว(ทัศนีย์และคณะ 2538; ปิยนุชและทัศนีย์ 2541) จึงกล่าวได้ว่าโรคมาลาเรียไก่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก และเป็นสิ่งที่น่าศึกษาและติดตามเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะการหาแนวทางในการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคไม่ให้แพร่ระบาดไปยังฟาร์มอื่นต่อไป ปัจจุบันหนทางที่จะควบคุมโรคอาจมีหลายทางที่สามารถนำมาใช้ อาทิเช่น การให้ยารักษาเมื่อตรวจพบเชื้อระยะที่อยู่ในกระแสเลือด การกำจัดและป้องกันไม่ให้ยุงซึ่งเป็นพาหะนำกัดไก่ เป็นต้น และในอนาคตที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย(Conway, 1997)

การให้ยาเพื่อรักษาโรคมาลาเรียในไก่ ยาที่ใช้กันส่วนมากจะเป็น Chloroquine Quinine Pyrimethamine ซึ่งจะให้ผลดีถ้าใช้ยาในช่วงแรกของการติดเชื้อและเชื้อมีปริมาณน้อย แต่ก็มักมีปัญหาการดื้อยาก่อนข้างสูงถ้าใช้ยาติดต่อกันนานหลายเดือน(Gwadz,1982) ในการป้องกันไม่ให้ยุงกัดนั้นได้มีเกษตรกรหลายรายพยายามนำมุ้งมากันยุงกัดในเวลากลางคืน แต่ก็ได้ผลไม่เต็มที่นักเนื่องจากยุงบางสปีชีส์ยังสามารถเล็ดลอดเข้าไปได้ สำหรับการลดปริมาณยุงโดยวิธีใช้กับดักยุง (Light trap) ติดตั้งไว้ในเล้าไก่ก็เป็นที่ยอมรับกันมาก แต่ให้ผลค่อนข้างต่ำและการกำจัดยุงนั้นแทบจะไม่มีโอกาสเลย เนื่องจากสถานที่ตั้งโรงเรือนเลี้ยงไก่ส่วนใหญ่ตั้งอยู่บริเวณแหล่งที่มีน้ำขังหรือก่อสร้างอยู่บนบ่อน้ำขนาดใหญ่

นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียที่มีการระบาดอยู่ในฟาร์มไก่อย่างแพร่หลายในขณะนี้ยังมีการศึกษาทางชีวภาพค่อนข้างน้อยเช่น การจำแนกชนิดของเชื้อ *Plasmodium gallinaceum* ขึ้นอยู่กับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจากกล้องจุลทรรศน์เท่านั้น และเนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีหลายชนิดที่มีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกัน การวินิจฉัยยืนยันโดยศึกษาจากลักษณะทางพันธุกรรมโดยวิธีทางชีวโมเลกุลจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งเป็นจุดประสงค์ของงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียไก่จำนวน 3 ไอโซเลทในประเทศไทยจาก small subunit ribosomal RNA(SSUrRNA) ด้วยเทคนิค PCR
2. ศึกษา ยีน rhopty associated protein-1(*rap-1* gene) ของเชื้อมาลาเรียไก่

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียไก่ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทย
2. ความจำเพาะทางพันธุกรรมของเชื้อสามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยยืนยันการจำแนกชนิด
3. เป็นพื้นฐานของการศึกษาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียไก่ในระดับอนุชีวโมเลกุล

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

1. เชื้อมาลาเรียในไก่ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยเป็น *Plasmodium gallinaceum*
2. ลำดับเบสยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียที่ศึกษาในครั้งนี้ไม่แตกต่างจากลำดับเบสยีน SSUrRNA ของเชื้อ *P. gallinaceum* จากฐานข้อมูล GeneBank
3. ลำดับเบสยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียที่ศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างจากลำดับเบสยีน SSUrRNA ของ *P. relictum* และ *P. lophurae* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียสัตว์ปีกเช่นเดียวกัน
4. *rap-1* gene ของ *P. gallinaceum* และ *P. falciparum* มีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

##### การจำแนกชั้นและลักษณะที่สำคัญของเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียเป็นโปรโตซัวที่อยู่ในสกุล *Plasmodium* ไฟลัม Apicomplexa (Schmidt and Roberts, 1989) (แผนภูมิที่ 1) มีลักษณะเด่นคือ ส่วนหน้าของเชื้อระยะต่างๆมักมีอวัยวะที่เรียกว่า apical complex (รูปที่ 2.5) ประกอบด้วย โพลาริง (polar ring), ไมโครนีม (microneme) โคนอยด์ (conoid) และร็อพทรี (rhoptry) จากการศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโครงสร้างโพลาริงมีลักษณะที่บ่งชี้เป็นวงกลม (encircles) อยู่ทางส่วนหน้าสุด ร็อพทรีมีหนึ่งคู่หรือมากกว่าลักษณะที่บ่งชี้คล้ายหยดน้ำ (electron dense) ไมโครนีมมีจำนวนมากรูปร่างขนาดเล็กที่บ่งชี้มีบทบาทสำคัญในการเข้าเซลล์ของโฮสต์ (Bannister *et al.*, 1975)

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียค่อนข้างซับซ้อนมีการสืบพันธุ์เป็นแบบมีเพศและไม่มีเพศสลับกัน เชื้อบางระยะอาศัยอยู่ในโฮสต์ที่มีกระดูกสันหลังและบางระยะอยู่ในโฮสต์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง การสืบพันธุ์แบบมีเพศเกิดขึ้นในโฮสต์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังเท่านั้น โฮสต์ที่มีกระดูกสันหลังได้แก่ คน ไพรเมท สัตว์แทะ สัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก ส่วนโฮสต์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังได้แก่ ยุง ซึ่งเป็นพาหะนำที่สำคัญของเชื้อนี้ (Thathy *et al.*, 1994) เชื้อมาลาเรียที่มีรายงานในคนและสัตว์ต่างๆมีมากกว่า 90 ชนิด สำหรับชนิดที่มีความก่อโรครุนแรง มีความสำคัญทางสาธารณสุขและทางเศรษฐกิจ คือชนิดที่พบในคนและในไก่ (ทักษิณีย์และคณะ 2538 ; Knudsen and Slooff, 1992)

Kingdom Protista

SubKingdom Protozoa

Phylum Apicomplexa

Class Sporozoa

Subclass Coccidia

Order Eucoccidiida

Suborder Haemosporina

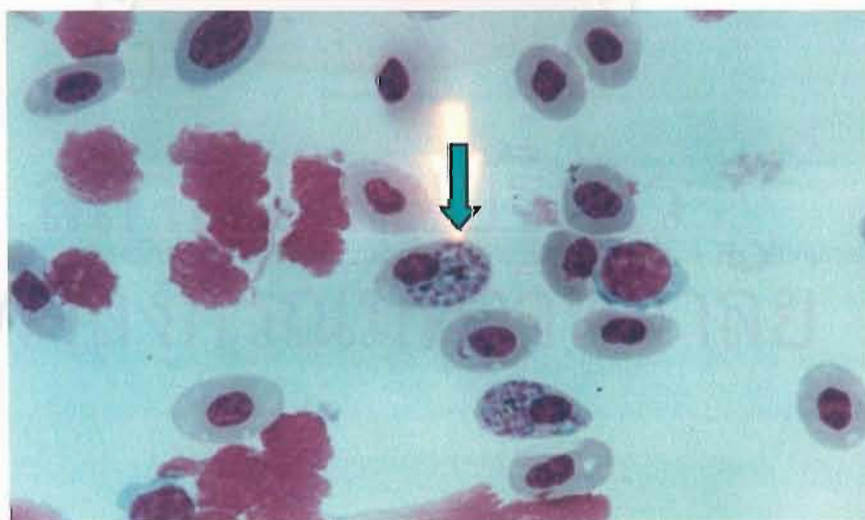
Family Plasmodiidae

Genus *Plasmodium*

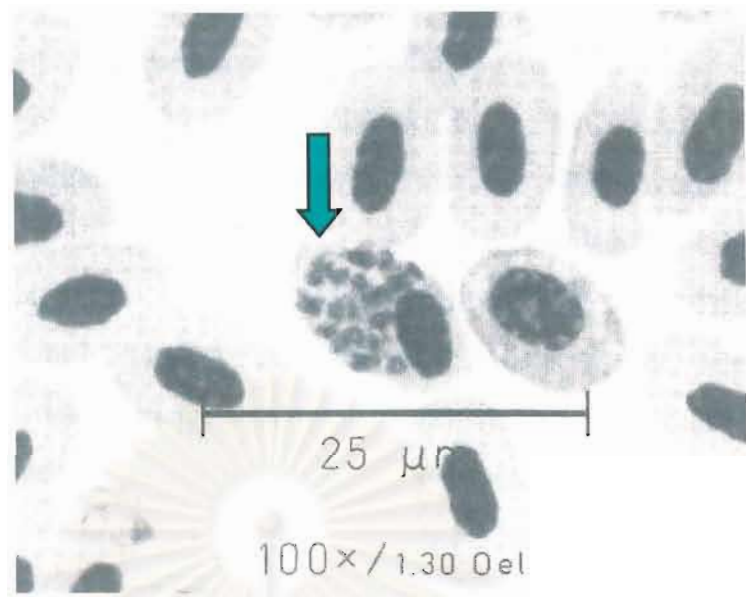
**แผนภูมิที่ 1** การจำแนกชั้นของเชื้อมาลาเรีย (Classification of *Plasmodium*) (Schmidt and Robert, 1989)

### การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียทางสัณฐานวิทยา

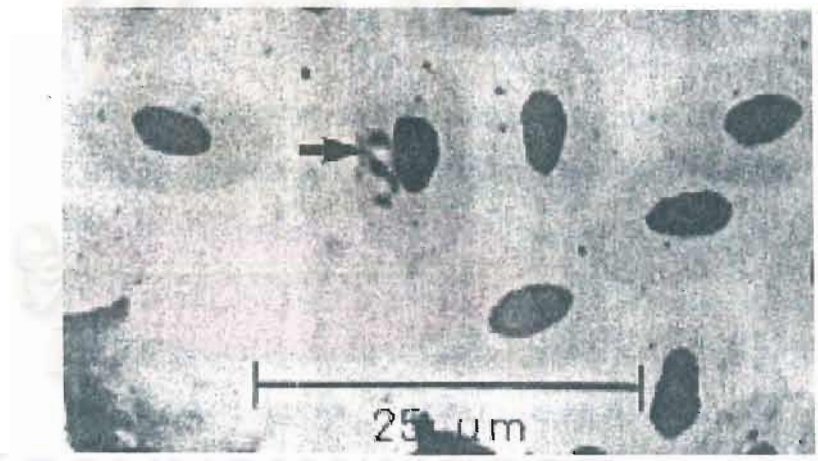
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกที่นิยมใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ ระยะเวลา schizont ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยศึกษาจากตำแหน่งของ schizont ต่อนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง ขนาด รูปร่างลักษณะ จำนวน merozoite ที่อยู่ใน schizont และการกระจายตัวของเม็ดสีมาลาเรีย(malarial pigment) ตัวอย่างเช่น ลักษณะ schizont ของ *P. gallinaceum*, *P. relictum* และ *P. lophurae* ดังรูปที่ 2.1, 2.2 และ 2.3 ตามลำดับ แต่กระนั้นก็ตามการจำแนกเชื้อโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้าน



**รูปที่ 2.1** ภาพขยาย 3,000 เท่า แสดงลักษณะระยะ schizont ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. gallinaceum*



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะระยะ schizont ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. relictum* (Laird, 1997)



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะระยะในกระแสเลือดของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. lophurae* (Laird, 1997)

## การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

เนื่องจากรูปร่างลักษณะของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกมีลักษณะใกล้เคียงกัน การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา(morphology) ในการจำแนกชนิดจึงทำได้ยาก ปัจจุบันจึงมีผู้นิยมจำแนกชนิดของปรสิตและสิ่งมีชีวิตอื่นในระดับชีวโมเลกุลมากขึ้นเรื่อยๆ โดยการใช้ลำดับเบสของยีนต่างๆในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบกัน ยีนที่นิยมนำมาใช้ในการเปรียบเทียบกันเช่น cytochrome b (Susan *et al.*, 1989) และที่เป็นที่นิยมมากคือการจำแนกชนิดโดยใช้ ribosomal RNA(Liang *et al.*, 1986; Dorothy *et al.*, 1988; Akhil *et al.*, 1989; Michael *et al.*, 1991; Waters *et al.*, 1991; Ananias and Francisco, 1994) การศึกษาเชื้อมาลาเรียเหล่านี้ในระดับชีวโมเลกุลจึงมีความจำเป็นทั้งนี้ก็เพื่อที่จะสามารถจำแนกเชื้อได้อย่างถูกต้องและเป็นพื้นฐานสำคัญที่จะนำไปสู่การวิจัยด้านอื่นๆ เช่นยาที่ใช้ในการรักษา การเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง (*in vitro*) และวัคซีนป้องกันเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งความรู้พื้นฐานทางด้านพันธุกรรม

### Ribosomal RNA

Ribosome เป็นออร์แกเนลที่อยู่ในไซโตพลาสซึมทำหน้าที่เปลี่ยนรหัสเบสจาก mRNA ของเซลล์ให้เป็นลำดับโปรตีน แต่ละ ribosome ของเซลล์ยูคาริโอต(Eukaryotic cell) ประกอบด้วย subunit ย่อย 2 ส่วนที่มีขนาดต่างกันคือ 40s(MW 1,400,000) มี subunit ประกอบด้วย 18s rRNA และโปรตีนประมาณ 33 ชนิด และขนาด 60s(MW2,800,000) มี subunit เป็นส่วนประกอบของ rRNA 3 ชนิด ได้แก่ 28s, 5s และ 5.8s มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 49 ชนิด แต่ละ subunit จะคงหน้าที่จำเพาะในการแปลรหัสจาก mRNA ให้เป็นโปรตีน ทั้ง 2 subunit ต้องการ rRNA สำหรับการทำงานดังกล่าว(Campbell *et al.*, 1999)

การใช้ประโยชน์จากยีน SSUrRNA นั้นมีด้วยกัน 3 ประการคือ ใช้การศึกษาในระดับชีวโมเลกุล การหาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต และนำมาประยุกต์ใช้ในงานการตรวจวินิจฉัย (Waters, 1994) เนื่องจากลำดับเบสของ 18s rRNA ในสิ่งมีชีวิตเดียวกันมีความเหมือนกันและแตกต่างจากลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จึงนิยมใช้ลำดับเบสของ small subunit ribosomal RNA ของสิ่งมีชีวิตต่างๆมาเปรียบเทียบกันเพื่อใช้ในการจัดกลุ่มและหาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต(Waters *et al.*, 1991; Ananias and Francisco., 1994)

การใช้ยีนภายใน rRNA ในการจำแนกและศึกษาความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นเมื่ออย่างแพร่หลาย เช่นการศึกษาความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมของเชื้อปรสิตหนอนพยาธิชนิด *Nematospiroides dubius*, *Hymenolepis diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *Oncocerca gibsoni* และ *Brugia pahangi* ใช้ลำดับเบสเพียงจำนวนแค่ 208 เบสในการเปรียบเทียบ ซึ่งสามารถกระทำได้แม้ว่าจะมีเซลล์เนื้อเยื่อของเชื้อปรสิตดังกล่าวอยู่ไม่มาก(Liang

et al., 1986) การศึกษาลำดับยีน SSUrRNA ของสัตว์เซลล์เดียวพวก *Babesia* (Gozar and Bagnara, 1995) เชื้อโปรโตซัว *Acanthamoeba castellanii* (Lonergan and Gray, 1994) หนอนพยาธิใบไม้ตับชนิด *Opisthorchis viverrini* (Korbsrisate et al., 1992) หาลำดับยีน SSUrRNA ของเชื้อบิดชนิด *Entamoeba dispar* แล้วเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. histolytica* (Novati et al., 1996) เชื้อ *Nematodirus battus* (Zarlengar et al., 1994) เชื้อ *Trypanosoma cruzi* จากนั้นหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับเชื้อ *Trypanosome* ชนิดอื่น (Hernandez et al., 1990) การใช้ SSUrRNA ในการจำแนกชนิดของเชื้อ *Leishmania talentorae* (Briones et al., 1992) เชื้อ *L. texa* และเปรียบเทียบกับเชื้อ *Leishmania* ชนิดอื่น (van Eys et al., 1992) เชื้อ *P. malariae* (Michael et al., 1991) เชื้อมาลาเรียชนิด *P. berghei* (van Spaendonk et al., 1999) การศึกษาลำดับยีน SSUrRNA ของเชื้อ *Theileria* ที่ได้จากแหล่ง ระบาดต่างๆ กัน (Chae et al., 1998) มีการนำยีน SSUrRNA มาใช้ในการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อ *Babesia canis canis*, *B. canis vogeli*, และ *B. canis rossi* โดยใช้เทคนิค PCR RFLP (restriction fragment length polymorphism) จากนั้นเปรียบเทียบกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม กับเชื้อ *Babesia* ชนิดอื่นได้แก่ *B. divergens* และ *B. odocoilei* (Carret et al., 1999)

Waters และคณะ (1991) ใช้ยีน SSUrRNA หาความสัมพันธ์ของเชื้อมาลาเรียในคนชนิด *P. falciparum* กับเชื้อมาลาเรียที่ปรากฏในโฮสต์ชนิดอื่นคือ เชื้อมาลาเรียในสัตว์ฟันแทะ (*P. berghei*) เชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีก (*P. gallinaceum* และ *P. lophurae*) เชื้อมาลาเรียในลิง simian (*P. fragile*) เชื้อมาลาเรียชนิดอื่นที่พบในคน (*P. vivax*) และเชื้อปรสิตที่ต่างสกุลกันกับ มาลาเรีย พบว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมกับเชื้อ มาลาเรียในสัตว์ปีกและเชื้อมาลาเรียในสัตว์ฟันแทะมาก Qari และคณะ (1996) ทำการหาลำดับเบสในยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* และ *P. ovale* เปรียบเทียบกับเชื้อ มาลาเรียชนิดต่างๆ 13 ชนิดเพื่อดูความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรม พบว่า *P. vivax* มีพันธุกรรม ใกล้เคียงกับเชื้อมาลาเรียในลิงชนิด *P. cynomolgi*, *P. fragile* และ *P. knowlesi* ในขณะที่ *P. ovale* มีลำดับยีนแตกต่างกันออกไปมาก แต่ก็มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับ *P. vivax* มากกว่า *P. malariae* และ *P. falciparum*

### มาลาเรียในสัตว์ปีก

มาลาเรียในสัตว์ปีกพบมีรายงานมากกว่า 20 ชนิด (Garnham, 1966) ชนิดที่สำคัญและ ก่อให้เกิดอันตรายคือ *P. gallinaceum*, *P. lophurae*, *P. juxtannucleare*, *P. circumflexum*, *P. relictum* และ *P. cathemerium* โดยชนิดที่ก่อโรครุนแรงและทำอันตรายสูงต่อไก่เลี้ยงและ ทำให้เกิดปัญหาทางเศรษฐกิจของประเทศไทยคือ *P. gallinaceum* (ทัศนีย์และคณะ 2538 : ปิยนุช

และทัศน์ีย์ 2541) เชื้อมาลาเรียโก่ชนิดนี้แต่เดิมมักนิยมใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในคน ทั้งในแง่ของคุณสมบัติทางชีวภาพ วงชีวิต ประสิทธิภาพของยา การดื้อยา ความคุ้มกันโรคและอื่นๆ เป็นต้น(Janse and Waters, 1995) มาลาเรียในสัตว์ปีกถูกจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะของเชื้อในระยะมีเพศ(gamonts) กลุ่มที่ 1 ระยะมีเพศมีลักษณะรูปร่างกลม และเบียดนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ให้อยู่ชิดที่ มี 5 ชนิดได้แก่ *P. cathemerium*, *P. gallinaceum*, *P. griffithsi* , *P. juxtannuclearae* และ *P. relictum* กลุ่มที่ 2 ระยะมีเพศลักษณะรูปร่างค่อนข้างยาวและนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์อยู่ตำแหน่งเดิมมี 9 ชนิด ได้แก่ *P. circumflexum*, *P. durae*, *P. fallax*, *P. elongatum*, *P. galare*, *P. rouxi*, *P. hexamerium*, *P. lophurae* และ *P. vaughani*(Levines, 1989)

#### *P. relictum* Grassi and Feletti, 1891 (รูปที่ 2.2)

พบได้ในสัตว์ปีก 141 ชนิด ปกติมักพบใน นกกระจอกบ้าน นกพิราบ เป็ด และนกป่าหลายชนิด(Ganham, 1966) เชื้อระยะเมอโรนต(meronts) และแกมมอนต(gamonts) มีลักษณะกลม เชื้อมาลาเรียซึ่งมีขนาดโตเต็มที่ นิวเคลียสของเซลล์โฮสต์จะถูกเบียดออกทางด้านข้างเซลล์ เม็ดสีของแกมมอนตมีขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป สำหรับเมอโรนตที่เจริญเต็มที่ประกอบด้วย เมอโรซอยต์(merozoite) 8-32 เซลล์(Levine, 1985) ยุงที่สามารถเป็นพาหะนำของมาลาเรียชนิดนี้ได้แก่ ยุงก้นปล่อง(*Anopheles*) 5 ชนิด ยุงลาย(*Aedes*) 4 ชนิด และยุงรำคาญ(*Culex*) 2 ชนิด (Huff, 1965)

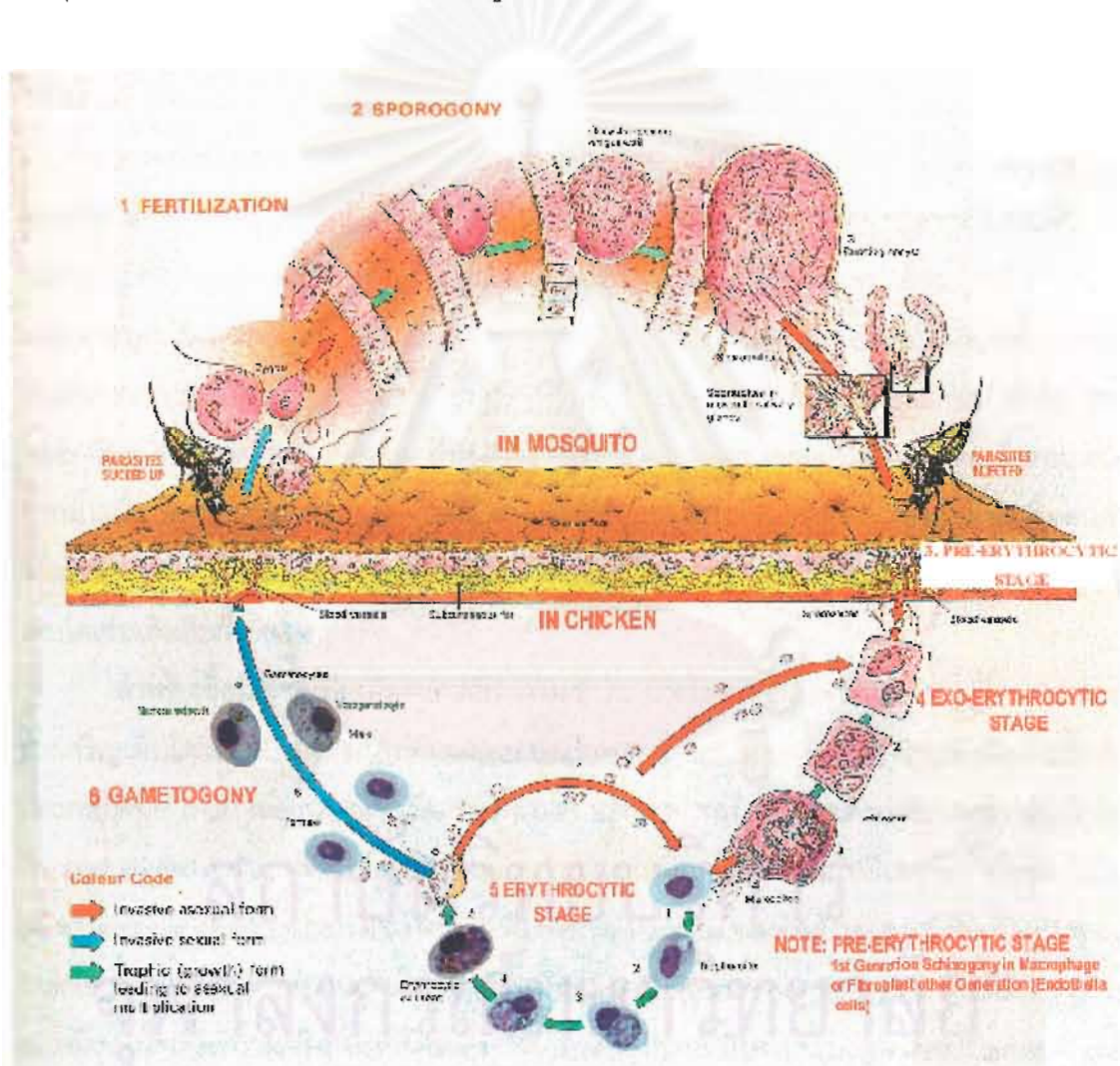
#### *Plasmodium lophurae* Coggeshall 1938 (รูปที่ 2.3)

ต้นกำเนิดของเชื้อได้มาจากไก่ฟ้า(Bornean Pheasant) ที่สวนสัตว์ New York Zoological Park โฮสต์ตามธรรมชาติคือ Crested Fireback(*Lophura ignita ignita*) มีมากในประเทศมาเลเซีย จะปรากฏระยะ schizont หลังได้รับเชื้อ 36 ชั่วโมงแต่พอจะสังเกตได้ตั้งแต่วันที่ 24(Garhnam, 1966) เมื่อเจริญเป็น mature schizont แล้วภายในจะมี merozoite ขนาดค่อนข้างใหญ่(ขนาดใกล้เคียงกับกับ *P. circumflexum*) อยู่เพียงแค 8-18 อัน โดยทั่วไปแล้ว mature schizont มักจะมีลักษณะค่อนข้างยาวและเป็น loop ซึ่งมีเม็ดสีมาลาเรีย(malarial pigment) อยู่ 1 หรือ 2 ที่ๆละ 4-7 เม็ด เท่านั้น schizont จะวางตัวตามยาวติดกันกับนิวเคลียสเม็ดเลือดแดงของโฮสต์ ในขณะที่ schizont ที่อ่อนกว่าจะยังไม่ไปติดกันกับนิวเคลียสเม็ดเลือดแดงของโฮสต์ ที่แตกต่างจากเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นคือ นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงโฮสต์จะยังคงอยู่ตรงกลางเซลล์แต่จะมีขนาดเล็กลง ระยะมีเพศลักษณะยาวแต่นิวเคลียสของเชื้อมีรูปร่างกลมอยู่ด้านข้างของนิวเคลียสของโฮสต์เซลล์



*Plasmodium (Haemamoeba) gallinaceum* Brumpt 1935 (รูปที่ 2.1)

พบครั้งแรกโดย Broussais ในปี 1910 ไก่บ้านแถบอินโดจีน นอกจากนั้นสามารถพบได้ใน ไก่ป่าสีแดงและนกเลี้ยง จากนั้นก็ได้มีรายงานการพบเชือดังกล่าวมาเรื่อยๆ ที่กัมพูชาและเกาะ สุมาตรา(Crawford, 1984) จนกระทั่ง Brumpt ได้เขียนรายงานการระบาดของเชื้อไว้ใน Veterinary Bulletin ในปี 1935 โดยใช้ชื่อว่า *Plasmodium gallinaceum*(Laird, 1987) ยุงที่เป็น พาหะของเชือนี้มี 6 สกุลคือ *Aedes*, *Culex*, *Armigeres*, *Culiseta*, *Mansonia* และ *Anopheles* โดยยุง *Aedes aegypti* มีอัตราการติดเชืดยุงถึงร้อยละ 100 (Huff, 1965)



รูปที่ 2.4 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีก(ระยะที่ในโฮสต์มีกระดุกสันหลังดัดแปลงมาจาก Knell ,1991)

### วงชีวิตของมาลาเรียในไก่ (รูปที่ 2.4)

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียในไก่โดยทั่วไปจะคล้ายคลึงกับวงชีวิตของเชื้อมาลาเรียในคน เว้นแต่ระยะที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดงไก่ (Garnham, 1966) และชนิดของยุงซึ่งเป็นพาหะนำ (Weathersby, 1960) ที่มีความแตกต่างกัน ยุงที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียไก่มีหลายสกุลคือ ยุงลาย (*Aedes spp.*) ยุงบ้านหรือยุงรำคาญ (*Culex spp.*) ยุงก้นปล่อง (*Anopheles spp.*) (Weathersby, 1960 ; Beasley, 1972; Grotendorst *et al.*, 1986; Freier and Friendman, 1987) เชื้อที่เจริญเติบโตในไก่มี 3 ระยะคือ ระยะที่เจริญอยู่ที่ผิวหนัง (pre-exoerythrocytic stage) ระยะที่เจริญอยู่นอกเม็ดเลือดแดง (exo-erythrocytic stage) และระยะที่เจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage) สำหรับระยะที่เจริญในยุงมีเพียงระยะเดียวคือ sporogony (Garnham, 1966)

ระยะที่เจริญเติบโตอยู่ที่ผิวหนัง เริ่มต้นจากในขณะดูดเลือด ยุงปล่อย sporozoite ออกมาจากต่อมน้ำลาย เข้าสู่โฮสต์ไปอยู่ในไซโตพลาซึมของแมคโครฟาจและไฟโบรบลาสต์บริเวณผิวหนัง ในตำแหน่งที่ยุงดูดเลือด เจริญเติบโตและแบ่งตัวแบบไม่มีเพศเป็น schizont ที่สมบูรณ์ ภายในมี merozoite จำนวนมากใช้เวลาประมาณ 36 ชั่วโมง เมื่อ schizont เจริญเต็มที่และแตกออก merozoite จะกระจายไปทั่วร่างกาย เข้าไปอาศัยอยู่ในไซโตพลาซึมของ endothelial cells ของหลอดเลือด ซึ่งพบมากบริเวณหลอดเลือดของม้าม ตับ และสมอง เจริญเป็น schizont อีกรอบหนึ่ง จากนั้นเมื่อ merozoite เจริญเต็มที่และแตกออกมา จะเข้าไปอยู่ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดง หรือบางส่วนอาจย้อนกลับเข้าไปอาศัยอยู่ใน endothelial cells ของหลอดเลือด แล้วมีการเจริญเติบโตเช่นเดิมอีกก็ได้ (Garnham, 1966)

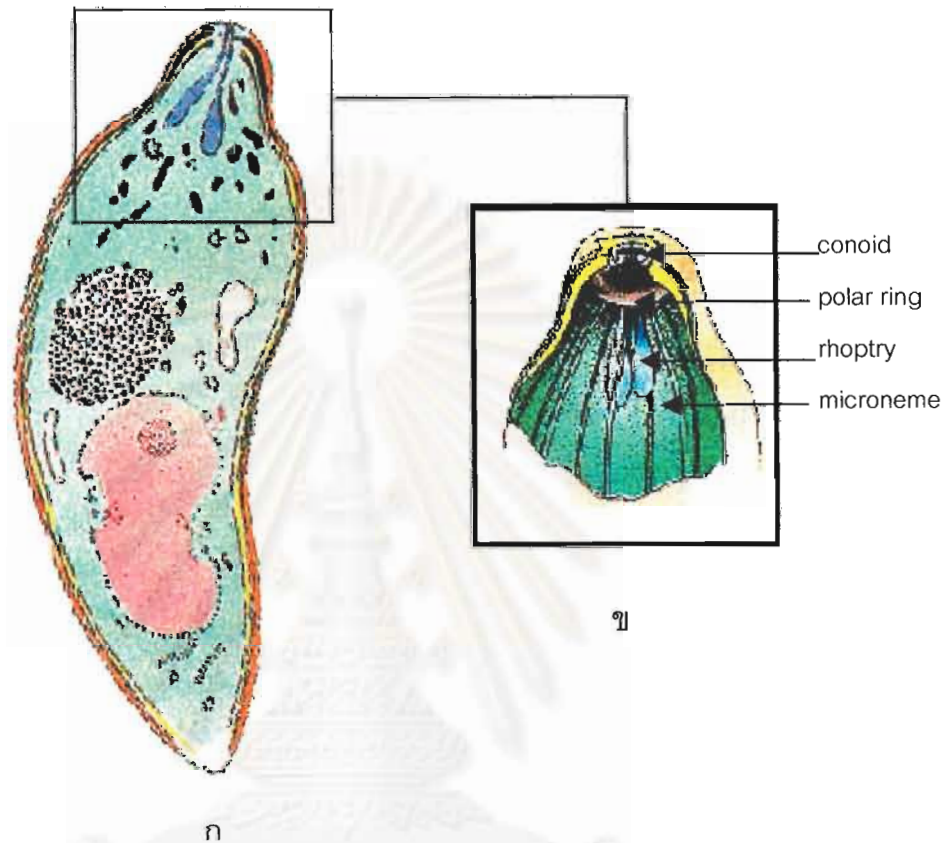
สำหรับเชื้อที่เข้าสู่เม็ดเลือดแดงนั้น เมื่อเข้าไปในไซโตพลาซึมแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเจริญเติบโตและแบ่งตัวแบบไม่มีเพศ (schizogony) แต่ละ schizont ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ประกอบด้วย 8-30 merozoites เมื่อ merozoite ออกมาจากเม็ดเลือดแดงบางส่วนจะกลับเข้าไปใน endothelial cells หรือเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่และเจริญเติบโตแบบไม่มีเพศอีก หรือเข้าไปในเม็ดเลือดแดงและเจริญเติบโตแบบมีเพศกลายเป็นเซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgametocyte) หรือเซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (macrogametocyte) เชื้อที่มีการเจริญแบบมีเพศนี้จะไม่มีการเจริญในไก่อีกต่อไป เว้นแต่จะมียุงที่เป็นพาหะมาดูดเลือด (Carter and Gwadz, 1980) เชื้อตัวผู้และตัวเมียที่อยู่ในเลือดจะเข้าไปสะสมอยู่ในกระเพาะอาหารส่วนกลางของยุง นาน 10-15 นาที จากนั้นจึงเกิด microgamete รูปแฉี่ (exflagellation) เข้าไปปฏิสนธิกับ macrogamete กลายเป็น zygote เรียกว่า ookinete เคลื่อนที่เข้าไปฝังตัวอยู่ทางผนังด้านนอกของกระเพาะอาหารส่วนกลางแล้วพัฒนาเป็นโอโอซิสต์ (oocyst) ซึ่งจะแบ่งตัวและเจริญเป็น sporozoite จำนวนมาก เมื่อ oocyst เจริญเติบโตเต็มที่ก็จะแตกออก sporozoite กระจายไปทั่ว

แต่ส่วนมากจะสะสมอยู่ที่ต่อมน้ำลายรอเวลาที่ถูกถ่ายทอดไปยังโฮสต์ขณะที่ยุงดูดเลือดต่อไป (Garhnam, 1966)

### การเข้าสู่เซลล์โฮสต์และบทบาทของ rhoptry

ในวงจรชีวิตของมาลาเรีย ระยะ sporozoite และ merozoite เป็นระยะที่เข้าสู่เซลล์ (invasion stages) ซึ่งมีความสำคัญมาก กระบวนการเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์มีขั้นตอนค่อนข้างซับซ้อน เริ่มต้นจากเชื้อมี initial recognition ไปเกาะที่ผิวของเซลล์โฮสต์โดยใช้ส่วนหน้าที่เราเรียกว่า apical complex ทำหน้าที่ช่วยให้เชื้อเข้าสู่เซลล์โฮสต์ได้ เมื่อ apical complex แตะที่ผิวโฮสต์แล้ว เชื่อกันว่า rhoptry และ micronemes จะปล่อยสารโปรตีนออกมาที่ผิวเซลล์โฮสต์เป็นผลทำให้ผนังเซลล์ขยายตัว sporozoite และ merozoite จึงสามารถเข้าสู่เซลล์ไปอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ได้ (Bannister *et al.*, 1975; Perkins, 1989) ความสามารถของเมอโรซอยต์ในการจดจำ receptor ของเม็ดเลือดแดงนั้นขึ้นอยู่กับโปรตีนของเชื้อปรสิตที่เรียกว่า receptor-binding proteins (RBP) ที่มีความหลากหลายกันไปตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย (Perkins, 1989) สำหรับ rhoptry นั้น นอกจากจะมีบทบาทในการขับโปรตีนออกมาเพื่อช่วยในการเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์แล้ว ใน *P. falciparum* พบว่ามีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้โฮสต์สร้างภูมิคุ้มกันได้ด้วย จึงทำให้มีผู้วิจัยโปรตีนจาก rhoptry กันอย่างกว้างขวาง (Jakobsen *et al.*, 1996)

## ookinete



รูปที่ 2.5 ก. เชื้อมาลาเรียระยะ ookinete

ข. ภาพขยายส่วนประกอบของ apical complex ดัดแปลงมาจาก Knell

(1991)

### วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

การค้นคว้าและพัฒนาเกี่ยวกับวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียในคนได้มีการศึกษามาตั้งแตปี 1978 เพื่อที่ใช้ในการผลิตวัคซีน 3 ระยะคือ sporozoite, gametocyte และ asexual blood stage

วัคซีนที่ตอบสนองต่อเชื้อระยะ sporozoite มีการพัฒนาไปมากที่สุดและเคยนำมาทดลองใช้ในคนหลายครั้ง มี 3 ประเภทคือ attenuated sporozoite vaccine, circumsporozoite protein, subunit sporozoite vaccine

Rieckmann และคณะ (1979) ใช้ sporozoite ของเชื้อ *P. falciparum* ที่ทำให้อ่อนกำลังด้วยการฉายรังสี (radiation attenuated sporozoite) ฉีดเข้าหนูทดลองเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ พบว่าได้ผลดี และต่อมามีการศึกษาทดลองในลิงวอก (*Rhesus*) และคนที่เป็

อาสาสมัครระหว่างปี 1971-1975 ยังสามารถกระตุ้นให้ตอบสนองต่อวัคซีนทำให้เกิดภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน (Gwadz *et al.*, 1979 ; Clyde *et al.*, 1973 ; Rieckman *et al.*, 1979) จนถึงปัจจุบันมีเพียง attenuated sporozoites เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นให้โฮสต์สร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียได้ อย่างไรก็ตามวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อระยะสปอโรซอยต์สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะต่อชนิดและเฉพาะ sporozoite เท่านั้น (Gwadz *et al.*, 1979) ในทางปฏิบัติจึงทำได้ค่อนข้างยากเนื่อง การผลิตวัคซีนดังกล่าวต้องใช้ sporozoite ที่มีมาตรฐานเดียวกันเป็นจำนวนมาก

ดังนั้นจึงมีผู้สนใจผลิตวัคซีนระยะอื่นคือ วัคซีนต่อระยะที่มีเพศ (gametocyte) หรือที่เรียกว่า transmission blocking vaccines และวัคซีนต่อเชื้อระยะที่แบ่งตัวแบบไม่มีเพศในเลือด (asexual blood stage) เช่น merozoite surface antigens , erythrocytes surface antigens, rhoptry antigens

ในระยะแรกๆ จากหลายรายงานได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของโปรตีนของ rhoptry ของ *P. falciparum* พบว่ามีสารประกอบจำพวกโปรตีนอีกหลายชนิดซึ่งมีมวลโมเลกุลระหว่าง 40-240 kDa ที่สามารถกระตุ้นให้โฮสต์ให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียได้ (Roger *et al.*, 1988 ; Ridley *et al.*, 1990a ; Holder and Freeman, 1981) แอนติเจนจาก rhoptry ของเชื้อ *P. falciparum* ระยะ merozoite ที่มีศักยภาพการกระตุ้นให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันโรคได้มีขนาดโมเลกุล 135/155 kD, 40/80 kD, 105/130/140 kD และ 225/240 kD (Campbell *et al.*, 1984; Holder *et al.*, 1985 ; Howard *et al.*, 1984 ; Roger *et al.*, 1988 ; Siddiqui *et al.*, 1987) Perrin และคณะ (1981) ได้ทดลองใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนของ rhoptry ที่มีมวลโมเลกุล 41 kD ศึกษาการเข้าสู่เซลล์โฮสต์ในหลอดทดลองของเชื้อ *P. falciparum* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อไม่ให้เข้าสู่เซลล์ได้

จากการทดลองเบื้องต้นในสัตว์ทดลอง การผลิต monoclonal antibody ต่อ rhoptry antigen ขนาด 235 kD สามารถป้องกันหนู mice จากการให้เชื้อในปริมาณที่ทำให้ตาย (lethal infection) ได้ (Freeman *et al.*, 1980)

โปรตีนที่อยู่ใน rhoptry ของ *P. falciparum* ที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายที่คาดกันว่าน่าจะเป็นแอนติเจนที่สำคัญและมีศักยภาพสูงพอที่จะพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย มี 2 ชนิดคือ rhoptry associated proteins-1 (*rap-1*) และ rhoptry associated protein-2 (*rap-2*) ซึ่งมีมวลโมเลกุล 80 kDa และ 42 kDa protein ตามลำดับ (Ridley *et al.*, 1990a ; Saul *et al.*, 1992 )

การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunization) ของหนู BALB/c ด้วยแอนติเจนจากระยะเมอโรซอยต์ของเชื้อ *P. knowlesi* ที่เตรียมได้จากวิธี affinity-purified สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Deans *et al.*, 1984)

Ridley และคณะ (1990b) ใช้ rhoptry-associated protein-1 (*rap-1*) gene มาฉีดให้ลิงกระรอก (*Saimiri sciureus*) สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *P. falciparum* ป้องกันไม่ให้ลิงกระรอกติดเชื้อมาลาเรียได้ การศึกษาการทำวัคซีนของ *P. falciparum* อาจใช้เป็นแนวทางสำหรับพัฒนาวัคซีนมาลาเรียไก่อจาก rhoptry associated protein ซึ่งเป็นความคาดหวังสูงสุดสำหรับวิชาชีพสัตวแพทย์และเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่อเป็นอุตสาหกรรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทที่ 3

## วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย



### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

#### 3.1.1 เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

เครื่อง Thermal Cycler (TC-I ; Perkin ElmerCetus)

Gel electrophoresis apparatus (Mini-Sub Cell GT ของ BioRad)

UV Transilluminator (3-3102 ; Foto Dyne Incorporated)

กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์ (5-533 ; Foto Dyne Incorporated)

ฟิล์มโพลาไรซ์ (No.667 ; Fabriqu'au Royaume-Uni par Polaroid, Ltd.)

Laminar Flow (5000E ; Astecair)

หน้ากากกันแสงอัลตราไวโอเล็ต (Foto Dyne Incorporated)

เครื่องปั่นเย็น (Varifuge 20 RS ; Heraeus sepatech)

เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (PHM 83 Autocal pH meter ; Radiometer)

ตู้แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส (UE 650 ; Kelvinator)

Micropipettes (BIOHIT)

เครื่อง vortex (G-560E ; Scientific Industries)

Magnetic stirrer (pyro-magnestir No.1267 ; Lab-line instruments, Inc)

ถังใส่ Liquid Nitrogen (506-075-G1 ; TAYLOR-WHARTON)

Microwave (R-4A52, Carousel ; Sharp)

เครื่องชั่งแบบละเอียด (BP310S ; Sartorius)

Hair Dryer (EH5741 ; National ; Matsushita Electric Work, Ltd.)

เครื่องแก้ว (PYREX)

20 ml, 10 ml และ 3 ml Disposable Syringe ( NIPRO)

Water bath (GFL-1086 ; GESELLSCHATT Fur Labortechnik mbH)

Microcentrifuge tube 1.5 ml (PLASTIBRAND)

กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

ชุดทำฟิล์มเลือดบาง

กล่องเย็นหรือกระติกน้ำแข็ง

หลอด PCR tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร

สำลี

แอลกอฮอล์  
ที่วางหลอดทดลอง

### 3.1.2 สารเคมี

Heparin (Leo)  
Proteinase K (BioRad)  
Potassium dihydrogen phosphate (MERCK)  
Isoamyl alcohol (SIGMA)  
Absolute ethanol (MERCK)  
Phenol (MERCK)  
Chloroform (MERK)  
Mineral oil (SIGMA)  
Magnesium chloride (BDH)  
Agarose gel (BRL)  
Bromphenol blue (SIGMA)  
Sodium chloride (BDH)  
Ethylenediamine tetra-acetic acid (SIGMA)  
Ethidium bromide (SIGMA)  
1 Kb ladder DNA Marker (PHARMACIA)  
dNTP (BioRad)  
*Taq* DNA polymerase (BioRad)  
Boric acid (BioRad)  
Primers (BSU Lab ; NSTDA)  
Tris (Hydroxymethyl)-aminomethane (Fluka)  
Hydrochloric acid (MERCK)  
Sodium acetate (MERCK)  
Sodium Dodecyl Sulfate (BRL)



### 3.1.3 สัตว์ทดลองและเชื้อมาลาเรียที่ใช้

ลูกไก่เพศผู้พันธุ์ White leg horn

เชื้อมาลาเรียไก่ 3 ไอโซเลท(isolate) คือ (NJTH2539) จากไก่เนื้อในเขตหนองจอก กทม ปี พ.ศ. 2538 (CSTH2542) จากไก่ไขในจังหวัดฉะเชิงเทราปี พ.ศ.2542 และ (CSTH2543) จากไก่ไขในจังหวัดฉะเชิงเทราปี พ.ศ.2543

ยุงลาย (*Aedes aegypti*) สายพันธุ์ Liverpool (laboratory strain)

### 3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

แผนการทดลองครั้งนี้แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนคือ การเตรียมเชื้อมาลาเรียไก่ การสกัดดีเอ็นเอ การจำแนกชนิด โดยการขยายจำนวนดีเอ็นเอจากยีน SSUrRNA (การทดลองที่ 1) และการศึกษายีน *rap-1* ของเชื้อมาลาเรียไก่ (การทดลองที่ 2)

#### 3.2.1. การเตรียมเชื้อมาลาเรียไก่

3.2.1.1 เชื้อมาลาเรียไก่ เชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้มี 3 ไอโซเลท คือ NJTH2539 เป็นเชื้อที่ได้จากการสุ่มตรวจเลือดไก่เนื้อที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียที่ฟาร์มแห่งหนึ่งในเขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2539 CSTH2542 เป็นเชื้อที่ได้จากการสุ่มตรวจเลือดไก่ไขที่ฟาร์มแห่งหนึ่งในอำเภอแปดริ้ว จังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อปี พ.ศ. 2542 และ CSTH2543 เป็นเชื้อที่ได้จากการสุ่มตรวจเลือดไก่ไขที่ฟาร์มแห่งหนึ่งในเขตอำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทราปี พ.ศ. 2543 นำมาเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในไก่ทดลอง

3.2.1.2 ไก่ทดลองที่ใช้สำหรับการฉีดเชื้อตลอดการศึกษาก่อนเป็นไก่ไข เพศผู้อายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 150 ตัว เลี้ยงขังกรงและคลุมด้วยมุ้งเพื่อป้องกันไม่ให้ยุงกัด ใช้อาหารสำเร็จรูปสูตรไก่เนื้อ อายุไม่เกิน 5 สัปดาห์ ให้กินอาหารและน้ำดื่มที่ทุกวัน ที่หน่วยประสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

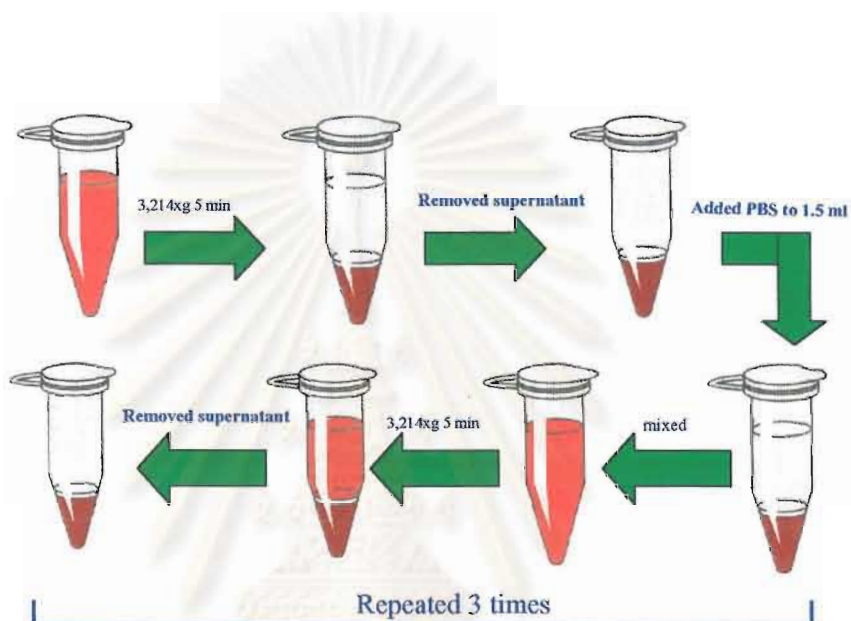
3.2.1.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียไก่อย่างต่อเนื่อง ใช้กระบอกฉีดขนาด 3 มิลลิลิตร เข็มฉีดยาเบอร์ 21 ที่เคลือบเฮปาริน 50  $\mu$ l ดูดเลือดที่มีเชื้อในกระแสเลือดระดับ 50 % จากเส้นเลือดดำที่คอไก่ (jugular vein) นำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังหรือฉีดเข้าในเส้นเลือดไก่ ทดลองจากข้อ 3.2.1.2 จำนวน 10 ตัว ตัวละ 200  $\mu$ l ตรวจหาและประเมินระดับเชื้อในเลือดทุกวัน เมื่อไก่ตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่มมีระดับเชื้อขึ้นสูง 50 % จึงทำการผ่านเชื้อเข้าไก่ทดลองรุ่นใหม่ 10 ตัว ตามวิธีเดิม และเมื่อระดับเชื้อขึ้นสูง 80 % จึงนำไปใช้ในการแยกเชื้อและสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 3.2.1.5 และ 3.2.1.6 เพื่อนำไปใช้ในการทดลองที่ 1 และ 2 ต่อไป

3.2.1.4 การตรวจหาและประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือด ทำฟิล์มเลือดบาง โดยใช้เข็มเบอร์ 23 เจาะเส้นเลือดที่บริเวณน้อก ป้ายเลือดลงบนสไลด์ด้วย cover glass เบอร์ 22x22 มิลลิเมตร ที่งไว้ให้แห้ง นำไปจุ่มลงใน absolute methanol นาน 1-2 นาที ที่งไว้ให้แห้ง ย้อมด้วยสี ยิมซ้า 10 % นาน 10 นาที และตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยายวัตถุ 40 เท่า นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 1,000 เซลล์ คำนวณหาระดับการ ติดเชื้อ (%) จากสูตร

$$\frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ} \times 100}{1,000}$$

3.2.1.5 การเตรียมและแยกเชื้อมาลาเรียออกจากเม็ดเลือดแดงไก่

เชื้อมาลาเรียไก่ทั้ง 3 ไอโซเลท ตามข้อ 3.2.1.1 และทำการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องตามข้อ 3.2.1.3 จนกระทั่งระดับเชื้อขึ้นสูง 80 % หรือมากกว่า ดูดเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตรที่บรรจุเฮปาริน 200  $\mu$ l ดูดเลือดจากไก่ได้ ปริมาณมากที่สุด แบ่งเลือดใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร ปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,241Xg นาน 5 นาที ดูดส่วนบนที่เป็นพลาสมาออก ล้างด้วย PBS (0.05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 M NaCl, pH 7.4) ที่เย็น โดยเติม PBS ลงไปจนครบ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว นำไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,214xg นาน 5 นาที ล้างด้วย PBS ซ้ำอีก 2 ครั้ง ดูดส่วนบนที่เป็น PBS ออก แล้วตั้งหลอดให้ตรง วางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ เม็ดเลือดขาวที่ชั้น buffy coat เรียงตัวที่ผิวอย่างสม่ำเสมอ ก่อนนำไปแช่ใน  $-20$  องศาเซลเซียส (ตั้งหลอดให้ตรง) นานข้ามคืน จากนั้นนำออกมาเติม PBS (อุณหภูมิห้อง) กลับหลอดไปมาเบาๆ จนกระทั่งชั้น buffy coat หลุดออกจึงดูดทิ้ง วางไว้ที่อุณหภูมิห้องปล่อยให้ตะกอนเลือดส่วนที่เหลือ ละลายหมด เติม PBS ให้ครบ 1.5 มิลลิลิตร vortex อย่างแรงนาน 30 วินาทีก่อนนำไปปั่นด้วย แรงเหวี่ยงที่แตกต่างกัน (differential centrifugation) 4 ระดับดังแผนภูมิในรูปที่ 3.1-3.7 หลังการ ปั่นแต่ละครั้ง ดูดสารส่วนบนใส่ลงในหลอด microcentrifuge อันใหม่ เติม PBS ให้ครบ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปปั่นในครั้งต่อไป ตะกอนที่ได้จากการปั่นในแต่ละครั้งจะถูกนำไป ป้ายสไลด์ทำแผ่นฟิล์มบางย้อมสียิมซ้าเพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรีย ตะกอนที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) ของเชื้อมาลาเรียระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดก่อนทำการสกัด ดีเอ็นเอตามข้อ 3.2.1.5



รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการล้างเซลล์เม็ดเลือดไก่ 3 ครั้งโดยใช้ PBS บัณฑิตความเร็ว 3,214Xg นาน 5 นาที

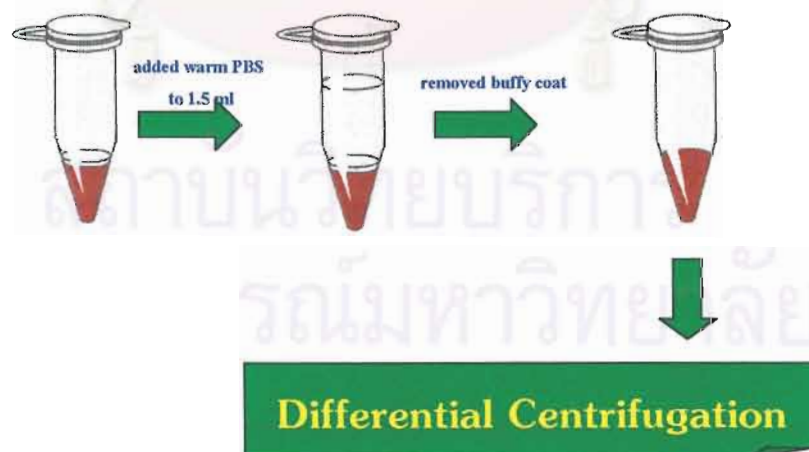
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## Red Cell Lysis



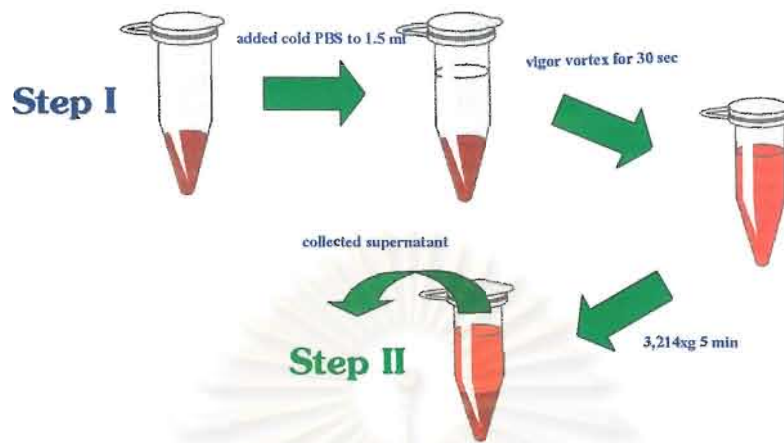
รูปที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

## WBC Removal

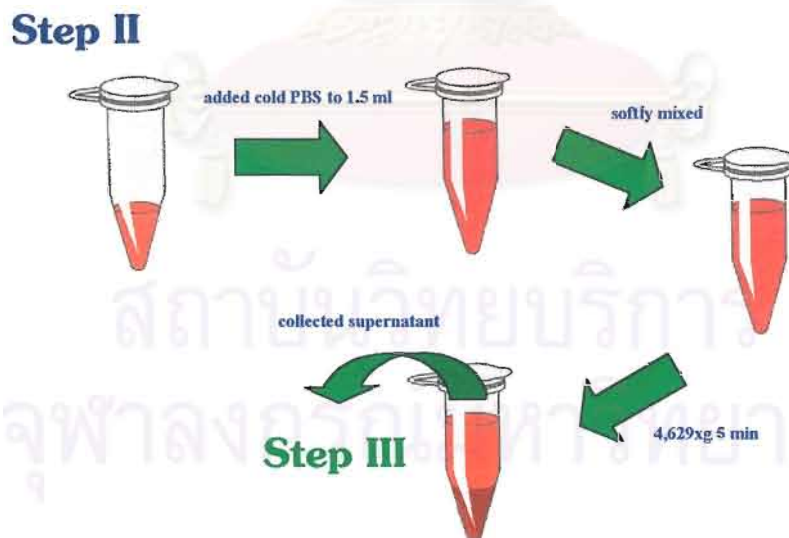


รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออก

## Differential Centrifugation (4 steps)

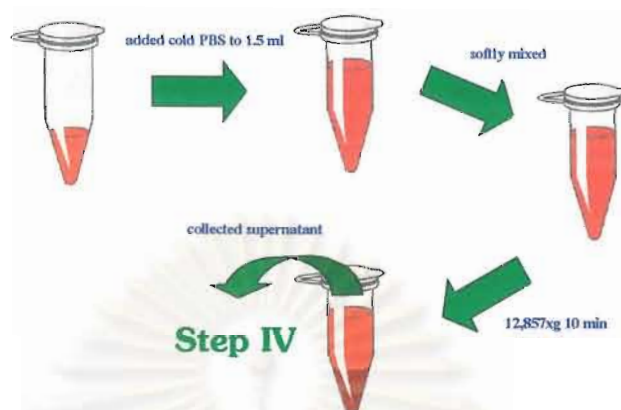


รูปที่ 3.4 แสดงการปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อที่ความเร็ว 3,214Xg



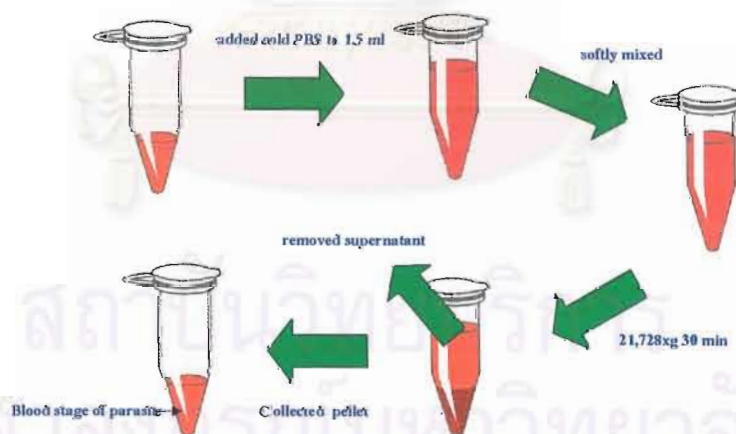
รูปที่ 3.5 แสดงการปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อที่ความเร็ว 4,629Xg

### Step III



รูปที่ 3.6 แสดงการปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อที่ความเร็ว 12,857Xg

### Step IV



รูปที่ 3.7 แสดงการปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อที่ความเร็ว 21,728Xg

### 3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

กระทำตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดย เติม lysis buffer (0.2 M NaOH ใน 10% SDS) 500  $\mu$ l และสารละลาย Proteinase K 20  $\mu$ l ลงในตะกอนเชื้อมาลาเรียทุกตัวอย่างที่เตรียมตามข้อ 3.2.1.4 เขย่าให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน water bath หรือ incubator นาน 8 ชั่วโมง นำมาสกัดด้วย phenol โดยการเติม tris-equilibrate phenol 500  $\mu$ l เขย่าอย่างแรงให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบน มาสกัดด้วย phenol ซ้ำ 2 รอบ จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม phenol/chloroform 400  $\mu$ l เขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบน เติม 3 M sodium acetate pH 5.2 ลงไปปริมาตร 1 ใน 10 ของสารที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากัน เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากัน ถ้าไม่ปรากฏตะกอนของ DNA นำไปแช่ในตู้เย็นที่  $-20$  องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน นำออกมามีปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% เอทานอล เปิดฝาหลอด ตั้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเหลือแต่ตะกอน จึงเติมสารละลาย TE ( 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 20  $\mu$ l นำสารละลาย ดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาความเข้มข้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.2.3 การทดลองที่ 1 การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียไก่อโดยการขยายจำนวนดีเอ็นเอจากยีน SSrRNA

#### 3.2.3.1 การออกแบบไพรเมอร์

ใช้โปรแกรม DNASIS ในการออกแบบ primers โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ small subunit ribosomal RNA จากเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกที่ตรวจหาได้จาก GenBank และหาค่า melting temperature ( $T_m$ ) รวมทั้งการทำนายขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำปฏิกิริยา PCR ในรูปที่ 4.7 แสดงตำแหน่งของลำดับยีน SSUrRNA

3.2.3.2 ดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียไก่อ นำดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียไก่อทั้ง 3 ไอโซเลท บางตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาใช้ในการทดลองตามข้อ 3.2.3.3

### 3.2.3.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยา PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 3.2.2 ทดสอบด้วยปฏิกิริยา PCR ในหลอด โดยเติมสารละลายต่างๆที่ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปริมาตรรวม 20  $\mu$ l ตามสัดส่วนความเข้มข้นดังนี้

	ความเข้มข้นต่อปฏิกิริยาการทดลอง
Primer 1	0.2 $\mu$ M
Primer 2	0.2 $\mu$ M
dNTP	200 $\mu$ M
<i>Taq</i> DNA polymerase	2.5 U/100 $\mu$ l
10X buffer	10X
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM
DNA template	1 $\mu$ l
Oil	2 หยด

นำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจำนวน 30 รอบโดยใส่ในเครื่อง Thermal cycler ที่มีสภาวะของ denaturation annealing และ extension ดังนี้

รอบที่ 1

Denaturation	95 °C	1 นาที
Annealing	45-55 °C	1 นาที
Extension	72 °C	1 นาที

รอบที่ 2-30

Denaturation	95 °C	30 วินาที
Annealing	45-55 °C	30 วินาที
Extension	72 °C	3 นาที

ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ตามวิธีในข้อ 3.2.3.4

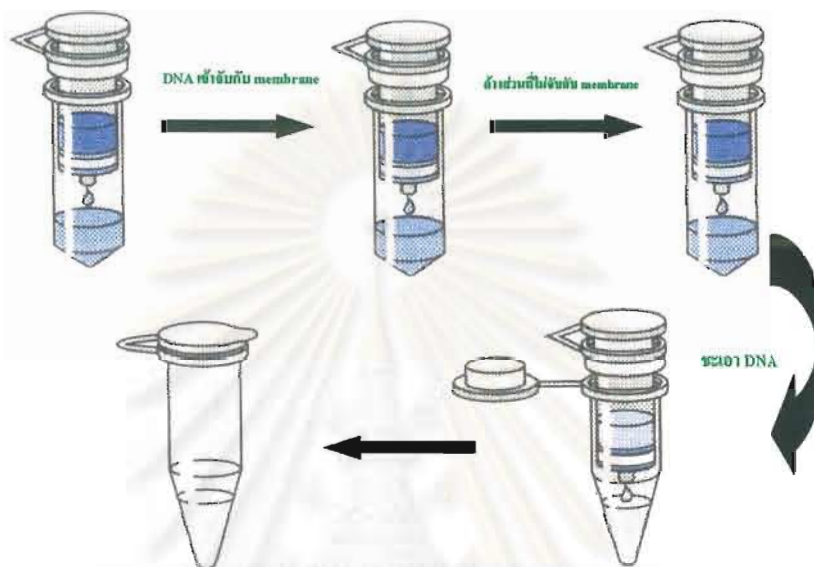
### 3.2.3.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์

ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่องมือ gel electrophoresis ใช้ 1.5% agarose gel ใน 1XTBE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมสีด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ศึกษาและบันทึกแถบดีเอ็นเอ ด้วย UV transilluminator ถ่ายรูปด้วยกล้องโฟลารอยด์



### 3.2.3.5 การแยกบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ

นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit (Qiagen) ตามวิธีมาตรฐานของผู้ผลิต (QIAquick™ Spin Handbook) ตามขั้นตอนดังรูป 3.9



รูปที่ 3.8 ภาพแสดงขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ PCR purification kit (Qiagen) (QIAquick™ Spin Handbook)

### 3.2.3.6 การหาลำดับเบสดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย

ส่งดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากข้อ 3.2.3.5 จำนวน 2 ตัวอย่างต่อไอโซเลท โปรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR จำนวน 1 คู่ หาลำดับเบสโดยเครื่องมืออัตโนมัติที่หน่วยบริการชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ(สวทช.) ถนนพระราม 6 พญาไท ราชเทวี กรุงเทพมหานคร

### 3.2.3.7 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

ใช้โปรแกรม DNASIS ในการวิเคราะห์ผลของลำดับเบสที่ได้มา เปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีน SSUrRNA จากที่หาลำดับเบสได้เปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอยีนของ SSUrRNA จากเชื้อมาลาเรียสัตว์ปีกชนิดต่างๆที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่เชื้อ *P. gallinaceum*, *P. lophurae* และ *P. relictum*

### 3.2.4 การทดลองที่ 2 ศึกษา *rap-1* ของเชื้อมาลาเรียโดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียของคน (Harnyuttanakorn *et al.*, 1992)

#### 3.2.2.1 การเพิ่มจำนวนยุง

ให้ยุงดูดเลือดไก่ปกติเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไก่ออกจากกรงยุงแล้วเลี้ยงยุงด้วยน้ำตาลาน (glucose) 10% และวิตามินบีคอมเพล็กซ์ ทำการเปลี่ยนน้ำตาลานให้ยุงทุกวัน วางสำลีลงในถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตรถึงระดับคอถ้วย ชูบน้ำให้ชุ่ม วางกระดาษกรองทับรอให้น้ำซึมขึ้นกระดาษกรองจนชุ่มจึงนำไปวางในกรงยุงให้ยุงวางไข่ ทำการเปลี่ยนถ้วยสำหรับยุงวางไข่อันใหม่ทุกวัน นำกระดาษกรองที่ยุงวางไข่แล้วไปวางที่อากาศโล่งให้แห้ง ปล่อยให้ฟักทันทีโดยการแช่กระดาษกรองที่มีไข่ยุงลงในน้ำแช่ฟางข้าวหรือเศษหญ้าแห้ง ไข่ยุงที่แห้งแล้วเก็บในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไข่ยุงที่เก็บไว้นานเกิน 3 เดือน จะมีอัตราการฟักต่ำมาก

#### 3.2.2.2 การเตรียมเชื้อระยะสปอโรซอยต์ในยุง

นำไก่ที่มีเชื้อมาลาเรียระยะมีเพศ 1-3 % มาให้ยุงดูดเลือดในกรงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ป้องกันไม่ให้ไก่ตื่นโดยการใส่ลงในถุงเท้า แยกยุงตัวเมียที่ดูดเลือดไก่มาใส่ในกระป๋องพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร โดยใช้หลอดดูดยุง ใส่ยุงลงในกระป๋องพลาสติกกระป๋องละ 25 ตัว เลี้ยงยุงด้วยน้ำตาลาน 10% และวิตามินบีคอมเพล็กซ์ โดยใช้สำลีชุบแล้วมาวางบนตาข่ายปากกระป๋อง ทำการเปลี่ยนน้ำตาลานทุกวัน ทำการชำแหละ (dissect) เพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียระยะ สปอโรซอยต์ใน mature oocyst ของกระเพาะอาหารส่วนกลางและต่อมน้ำลายยุงทุกวัน

#### 3.2.2.3 การแยกเชื้อระยะสปอโรซอยต์

เชื้อมาลาเรียระยะสปอโรซอยต์ถูกแยกออกจากต่อมน้ำลายและใน mature oocyst ของกระเพาะอาหารส่วนกลางของยุงปรับปรุงมาจากวิธีของ Ozaki และคณะ (1984) โดยเจาะรูหลอด microfuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตรด้วยเข็มเบอร์ 20 จี อุดก้นหลอดด้วย glasswool แล้วนำไปวางลงในหลอด microfuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้ pipette ดูดเอาสปอโรซอยต์ที่ปนกับเซลล์อื่นๆที่ได้จากการชำแหละมาจากยุงหลายๆตัวมาหยดลงบนผิว glasswool ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีก่อนนำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที สปอโรซอยต์จะลงมาตกตะกอนที่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

### 3.2.2.4 การขยายจำนวนดีเอ็นเอของยีน rhoptry associated protein-1 (*rap-1*)

ด้วยปฏิกิริยา PCR

การเพิ่มจำนวนยีน rhoptry associated protein-1 (*rap-1*) ของไอโซเลท NJTH2538 ด้วยเทคนิค PCR ใช้สภาวะการเพิ่มจำนวนเช่นเดียวกับข้อ 3.2.9 โดย forward primer 5' GAG CTC TTA ATC TAA TCT GAA GGC A 3' reverse primer 5' CTA GAG ATG AGT TTC TAT TTG GGT AGC TT 3' ซึ่งจำเพาะต่อยีน *rap-1* ของเชื้อ *P. falciparum* ที่สภาวะของปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส เว้นแต่ annealing temperature 20, 25, 30, 35, 40, 45, 48, 50, 53 และ 55 องศาเซลเซียส



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

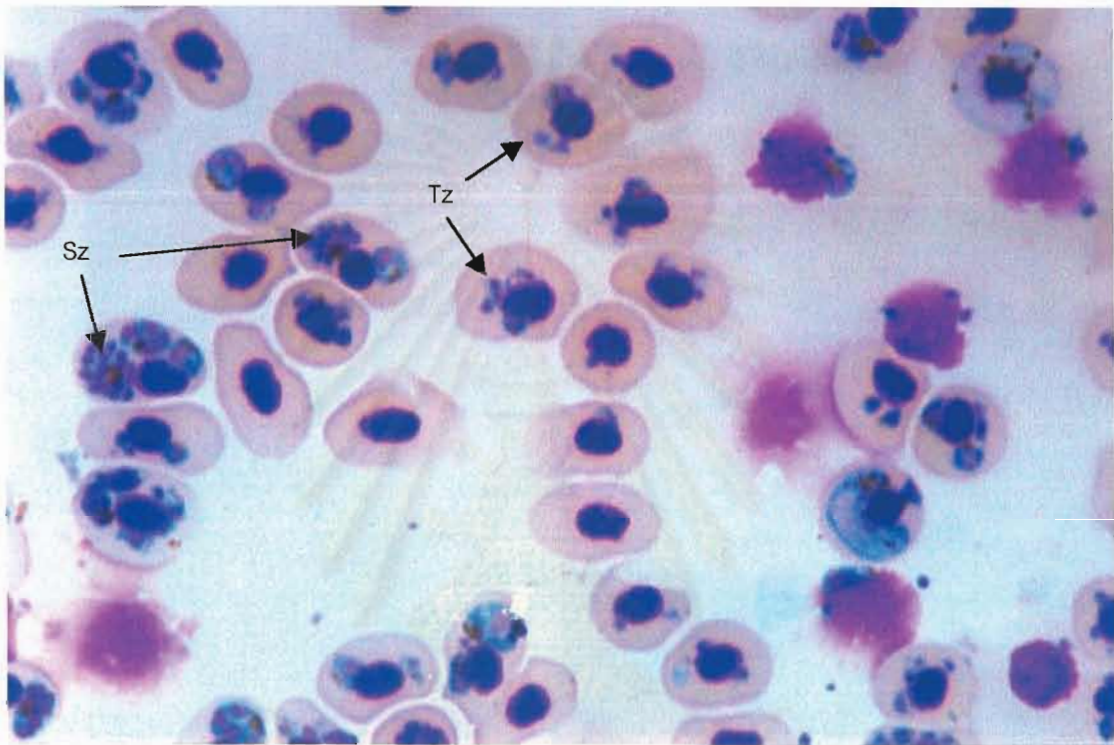
#### 4.1 การเตรียมเชื้อมาลาเรียในตัวไก่ทดลอง

จากการนำเชื้อมาลาเรียไก่ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ NJTH2539 CSH2542 และ CSH2543 ที่เก็บได้จากภาคสนาม 3 แห่ง เชื้อจากแต่ละแหล่งนำมาเพิ่มจำนวนฉีดเข้าไก่อย่างต่อเนื่องโดยฉีดเข้าที่ระดับเชื้อ 70% เข้าทางผิวหนังและเส้นเลือดดำ ผลปรากฏว่าเชื้อระยะที่ไม่มีเพศคือ trophozoite และ schizont (รูปที่ 4.1) พบได้ปริมาณสูงในวันที่ 7 และ 3 ตามลำดับ เชื้อระยะที่มีเพศคือ gametocyte (รูปที่ 4.2) เริ่มตรวจพบในวันที่ 10 และ 5 หลังการฉีดเข้าเชื้อเข้าได้ผิวหนังและหลอดเลือดดำตามลำดับ

สำหรับไก่ไอโซเลท NJTH2539 ซึ่งนำมาทำ serial dilution มีปริมาณเชื้อ  $6, 6 \times 10^1, 6 \times 10^2, 6 \times 10^3$  และ  $6 \times 10^4$  เมื่อฉีดเข้าได้ผิวหนังไก่ทดลองอายุ 3 สัปดาห์กลุ่มละ 5 ตัว ผลปรากฏดังรูปที่ 4.3 ไก่ทุกตัวมีอัตราการติดเชื้อ 100% ระยะเวลาของการติดเชื้อ(course of infection) ของไก่แต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันคือประมาณ 5.2 วัน ทุกกลุ่มเริ่มตรวจพบเชื้อในวันที่ 7 และตายในวันใกล้เคียงกันคือระหว่างวันที่ 12 ถึงวันที่ 18 เชื้อที่พบในกระแสเลือดของไก่แต่ละกลุ่มมีระดับแตกต่างกันตลอดการทดลอง ไก่กลุ่มที่ได้รับปริมาณเชื่อน้อยระดับของเชื้อในกระแสเลือดจะพบได้ช้ากว่าไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อในปริมาณมาก(รูปที่ 4.3)

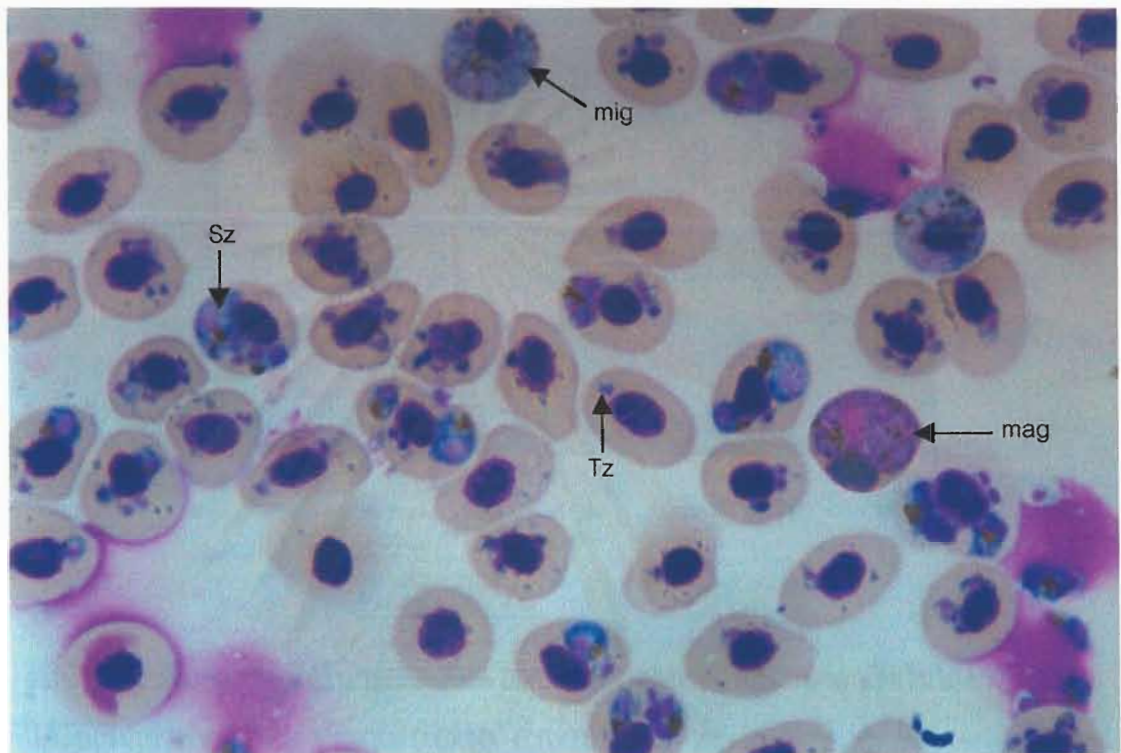
#### 4.2 การแยกเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี differential centrifugation

เชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการทดลองที่ 1 และ 2 เตรียมจากไก่ทดลองที่ฉีดเชื้อปริมาณ 200  $\mu$ l เข้าทางผิวหนัง และในกระแสเลือดมีระดับเชื้อระยะที่ไม่มีเพศสูงกว่า 80% หลังจากการปั่นล้างด้วย PBS แยกเม็ดเลือดขาว แยกเชื้อออกจากเม็ดเลือดแดงตามวิธีในข้อ 3.1.2.5 ผลปรากฏดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.1 फिल्मเลือดบางย้อมสีิมซา 10% กำลังขยาย 4,000 เท่าแสดงเชื้อมาลาเรียไก่อ่  
ระยะที่ไม่มีเพศอยู่ในเม็ดเลือดแดง ระดับการติดเชื้ 70% Tz=trophozoite และ Sz=schizont

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



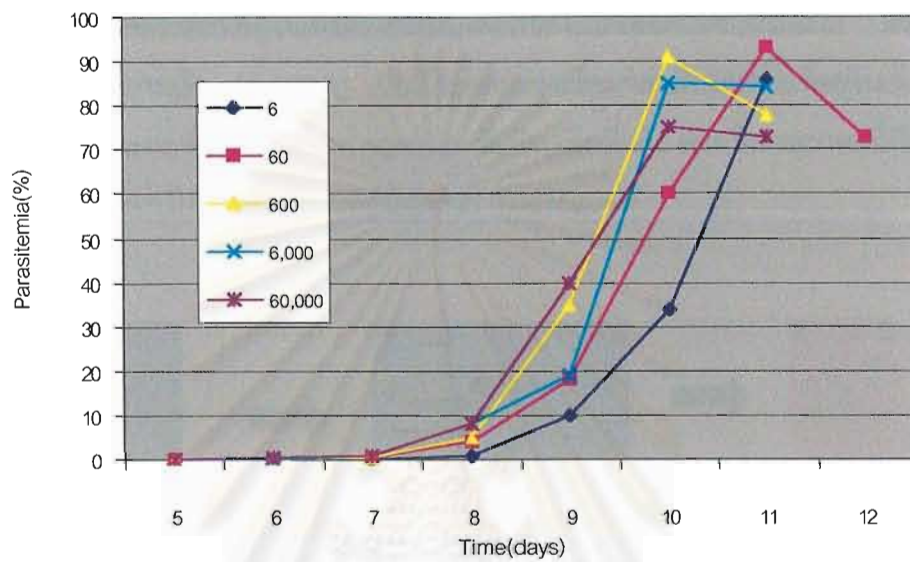
รูปที่ 4.2 ฟิล์มเลือดบางย้อมสียิมซา 10% กำลังขยาย 4,000 เท่า แสดงเชื้อมาลาเรียไก่อ่  
ระยะที่มีและไม่มีเพศในเม็ดเลือดแดง ระดับการติดเชื้ 70%

mag=macrogametocyte

mig=microgametocyte

Tz=trophozoite

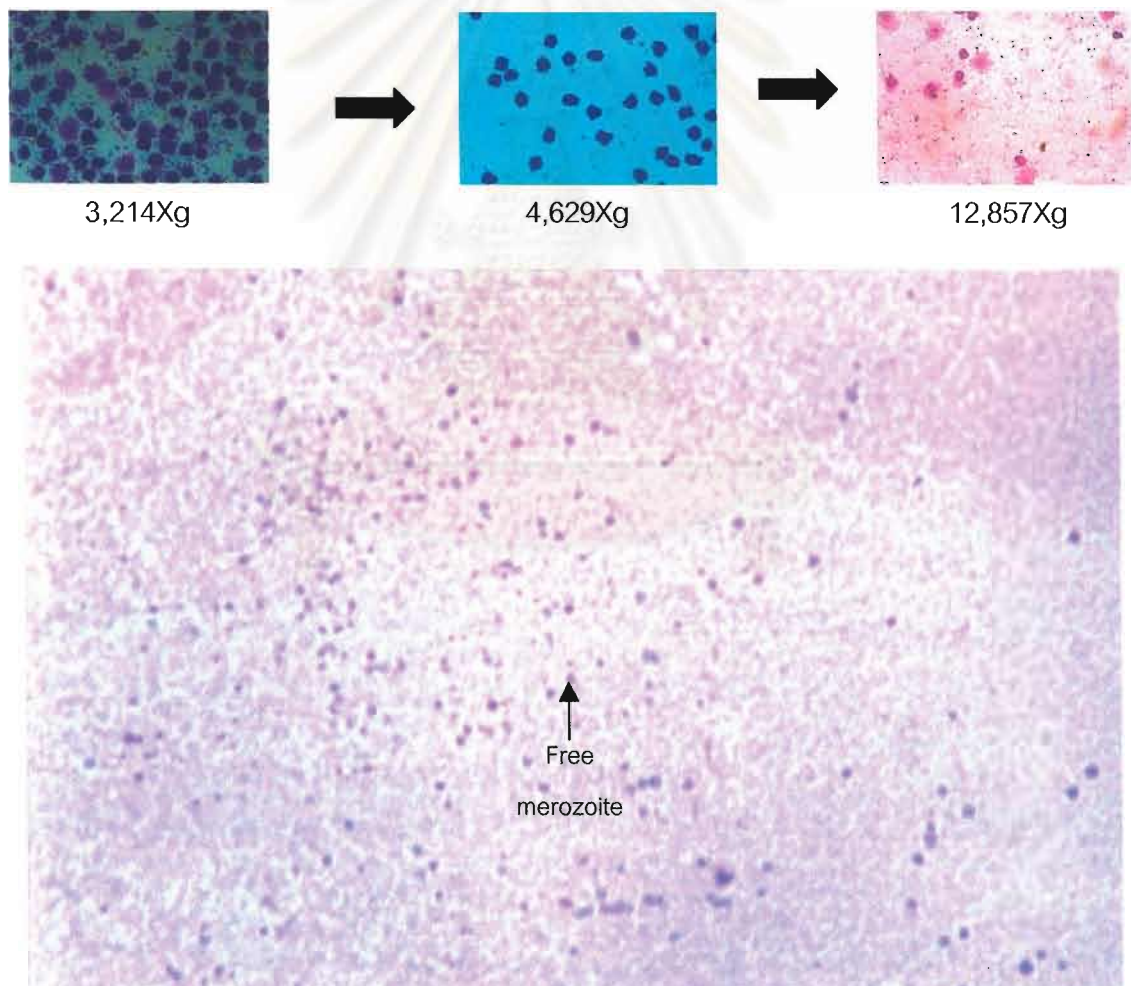
Sz=schizont



รูปที่ 4.3 ระดับการติดเชื้อในกระแสเลือด และระยะเวลาการเป็นโรคมalaria เร็วในไก่อายุ 3 สัปดาห์ที่ได้รับเชื้อเข้าทางผิวหนัง ปริมาณ  $0.6 \times 10^1 - 0.6 \times 10^5$  ตัว

การแยกเชื้อมาลาเรียออกจากเลือดไก่

การแยกเชื้อระยะในเลือดออกจากนิวเคลียสและเม็ดเลือดขาวของไก่(รูปที่ 4.4) ใช้การปั่นแยกที่ความเร็วต่างกัน(ขั้นตอน วิธีการและผลแสดงในภาคผนวก) เมื่อนำตะกอนจากการปั่นที่ความเร็วต่างๆกัน พบว่าที่ความเร็ว 3,214Xg ตะกอนประกอบด้วย นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเชื้อที่เป็นอิสระ ที่ความเร็ว 4,629Xg ตะกอนประกอบด้วยนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเชื้อที่เป็นอิสระ ที่ความเร็ว 12,857Xg ตะกอนส่วนใหญ่จะเป็น เซลล์ของเชื้อมาลาเรียระยะที่อยู่ในเลือดแต่มิมีนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงปนไม่มาก ส่วนสุดท้ายของการปั่นแยกที่ความเร็ว 21,728xg นั้นเป็นเซลล์ของเชื้อมาลาเรียไก่อระยะที่อยู่ในเลือด ส่วนใหญ่จะเป็น merozoite ที่แตกออกจาก schizont ที่เจริญเต็มที่แล้ว ส่วนที่ตกตะกอนนี้มีนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวปนอยู่น้อยกว่า 0.001%



รูปที่ 4.4 ภาพถ่ายขยาย 4,000 เท่าจากกล้องจุลทรรศน์แสดงส่วนที่ตกตะกอนหลังการปั่น 21,728xg นาน 30 นาที เตรียมโดยการทำแผ่นฟิล์มบางและย้อมด้วยสียิมซ่า

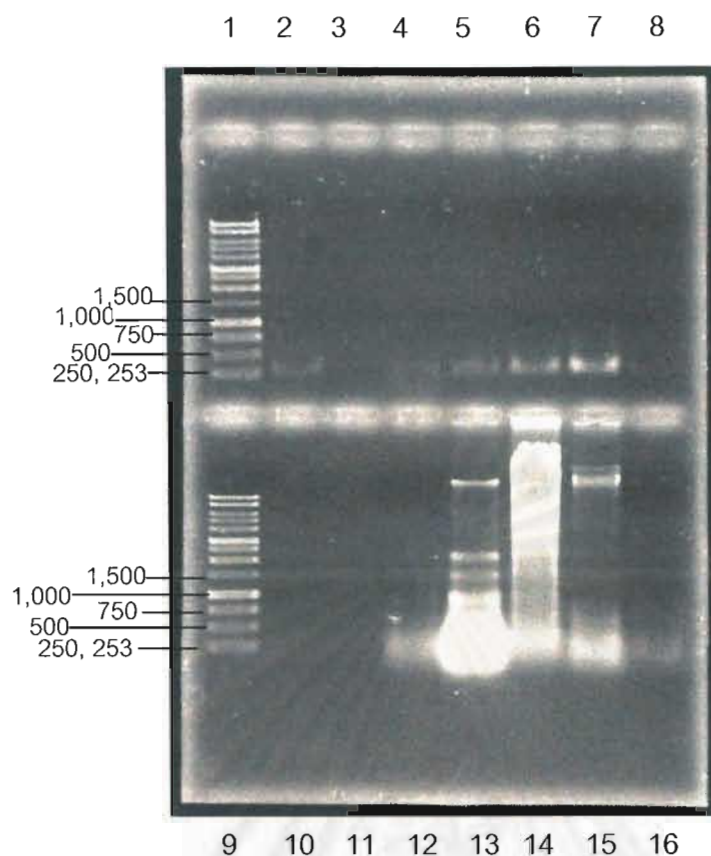


#### 4.3 การสกัดดีเอ็นเอเชื้อมาลาเรียไก่

ผลการสกัดดีเอ็นเอเชื้อมาลาเรียไก่ที่แยกออกจากเม็ดเลือดด้วย phenol chloroform extraction ปรากฏว่าได้ผลดีมากสายดีเอ็นเอที่สกัดได้มีลักษณะเป็นเส้นสีขาวปริมาณมาก เมื่อทำการตกตะกอนด้วย absolute ethanol และนำมาตรวจสอบโดยใช้ gel electrophoresis พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นสูง(รูปที่ 4.5)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูปที่ 4.5** แสดงแถบดีเอ็นเอเชื้อมาลาเรียไก่ NJTH2539 ที่สกัดได้ด้วย phenol และ chloroform ตรวจสอบความยาวเบสด้วยวิธี gel electrophoresis ใน agarose gel 0.8 % กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 25 นาที

แถวที่ 1= DNA Marker(1 kb ladder)

2=เลือดไก่ปกติ

3= ตะกอนจากการปั่น 12,857Xg

4= ตะกอนจากการปั่น 4,629Xg

5= ตะกอนจากการปั่น 3,214Xg

6-7= ตะกอนจากการปั่น 21,728Xg

8= ระยะเวลาสปอโรซอยต์

9= DNA Marker(1 kb ladder)

10= ยุงปกติ

11= ไม่มีตัวอย่าง

12-16= เลือดไก่ที่เป็นมาลาเรีย

#### 4. 4 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียไก่

ผลการค้นหาลำดับเบสดีเอ็นเอของ SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกจากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเชื้อมาลาเรีย 3 ชนิดมีลำดับเบสส่วนใหญ่มีส่วนคล้ายคลึงกัน(รูปที่ 4.6) คือ *P. gallinaceum* , *P. lophurae* และ *P. relictum*

*Plasmodium gallinaceum* asexually expressed ribosomal RNA small subunit. Accession M61723. Medline 91195308. (Water *et al.*, 1991)

*Plasmodium lophurae* ribosomal RNA small subunit. Access X13706. Medline 89160334. (Water, 1989)

*Plasmodium relictum* clone K592.2 18s ribosomal RNA gene, partial sequence. Accession AF145399. (Jarvi *et al.*, 1999)

สำหรับบางช่วงของลำดับเบสที่มีความแตกต่างกันของเชื้อแต่ละชนิด คือลำดับเบสที่ระหว่าง 1,422 ถึง 1,702 ซึ่งมีความยาวประมาณ 280 เบส (รูปที่ 4.6)

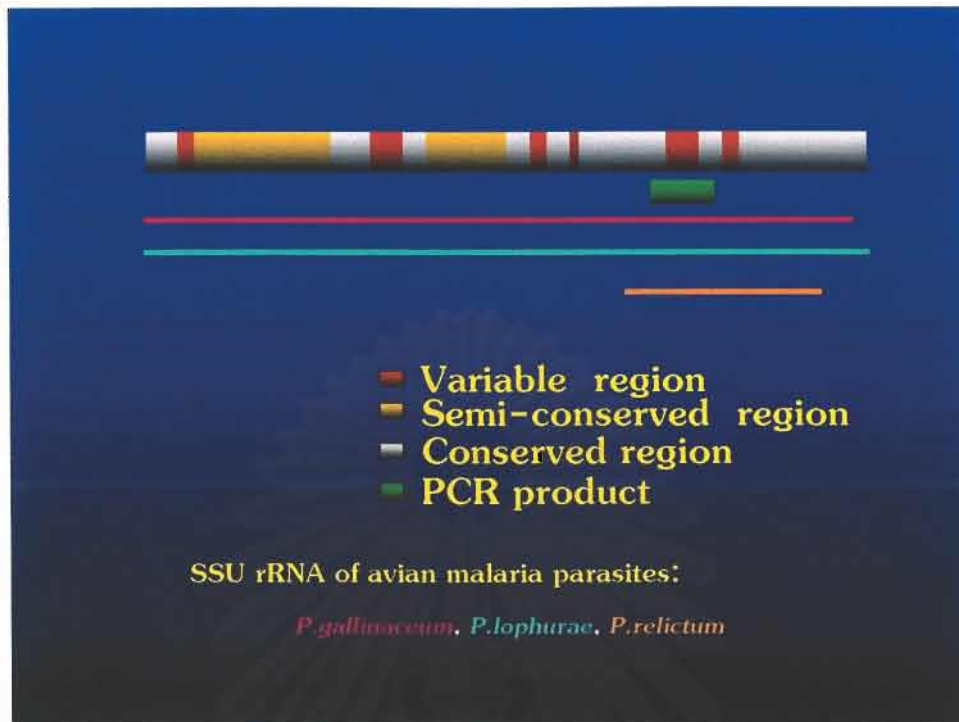
		10	20	30	40	50	
GALLINAC. SEQ	1	AACCTGGTTC	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTCCTCAA	AGATTAAGCC	50
LOPHURAE. SEQ	1	AACCTGGTTC	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTCCTAAA	AGATTAAGCC	50
RELICTUM. SEQ	1	-----	-----	-----	-----	-----	50
		60	70	80	90	100	
GALLINAC. SEQ	51	ATGCAAGTGA	AAGTATATAT	ATATTTATTA	TATAGAAACT	GCGAACGGCT	100
LOPHURAE. SEQ	51	ATGCAAGTGA	AAGTATATAT	ATATTTATTA	TATAGAAACT	GCGAACGGCT	100
RELICTUM. SEQ	51	-----	-----	-----	-----	-----	100
		110	120	130	140	150	
GALLINAC. SEQ	101	CATTAACA	GTTAATCT	ACTTGACAT	TTTTTATAA	GGATAACTAC	150
LOPHURAE. SEQ	101	CATTAACA	GTTAATCT	ACTTGACAT	TTTTT-ATAA	GGATAACTAC	150
RELICTUM. SEQ	101	-----	-----	-----	-----	-----	150
		160	170	180	190	200	
GALLINAC. SEQ	151	GGAAAAGCTG	TAGCTAATAC	TTGACCGATT	GTTCCCTCATC	GCCTTTATAG	200
LOPHURAE. SEQ	151	GGAAAAGCTG	TAGCTAATAC	TTGATCGATT	TTCTTCAAAA	CCCCAAAAG	200
RELICTUM. SEQ	151	-----	-----	-----	-----	-----	200
		210	220	230	240	250	
GALLINAC. SEQ	201	GTAATGAAGA	ACACGTATTT	GTTAAGCCTT	ATAAGAAAAA	AGTTATTAAT	250
LOPHURAE. SEQ	201	GTTCTGTGA	ACACGTATTT	GTTAAGCCTT	ATAAGAAAAA	AGTTACTAAC	250
RELICTUM. SEQ	201	-----	-----	-----	-----	-----	250
		260	270	280	290	300	
GALLINAC. SEQ	251	TAAAGGAATT	ATAACAAAGA	AGCAACACAT	AATAAACTT	TGTTTATTT	300
LOPHURAE. SEQ	251	TAAAGGAATT	ATAACAAAGA	AGCAACACAT	AATAAAGCTG	CGTCTTATTT	300
RELICTUM. SEQ	251	-----	-----	-----	-----	-----	300
		310	320	330	340	350	
GALLINAC. SEQ	301	AGTGTGTATC	AATCGAGTTT	CTGACCTATC	AGCTTTTGAT	GTTAGGGTAT	350
LOPHURAE. SEQ	301	AGTGTGTATC	AATCGAGTTT	CTGACCTATC	AGCTTTTGAT	GTTAGGGTAT	350
RELICTUM. SEQ	301	-----	-----	-----	-----	-----	350
		360	370	380	390	400	
GALLINAC. SEQ	351	TGGCCTAACA	TGGCTATGAC	GGGTAACGGG	GAATTAGAGT	TCGATTCCGG	400
LOPHURAE. SEQ	351	TGGCCTAACA	TGGCTATGAC	GGGTAACGGG	GAATTAGAGT	TCGATTCCGG	400
RELICTUM. SEQ	351	-----	-----	-----	-----	-----	400
		410	420	430	440	450	
GALLINAC. SEQ	401	AGAGGGAGCC	TGAGAAATAG	CTACCACATC	TAAAGGAAGC	AGCAGGCGCG	450
LOPHURAE. SEQ	401	AGAGGGAGCC	TGAGAAATAG	CTACCACATC	TAAAGGAAGC	AGCAGGCGCG	450
RELICTUM. SEQ	401	-----	-----	-----	-----	-----	450
		460	470	480	490	500	
GALLINAC. SEQ	451	TAAATTACCC	AATTCTAAAG	AAGAGAGGTA	GTGACAAGAA	ATAACAATGC	500
LOPHURAE. SEQ	451	TAAATTACCC	AATTCTAAAG	AAGAGAGGTA	GTGACAAGAA	ATAACAATGC	500
RELICTUM. SEQ	451	-----	-----	-----	-----	-----	500
		510	520	530	540	550	
GALLINAC. SEQ	501	AAGGCCAAAT	TTTGATTTTG	CAATTGGAAT	GATAGGAATT	TAAAACCTTC	550
LOPHURAE. SEQ	501	AAGGCCAAAT	TTTGATTTTG	CAATTGGAAT	GATAGGAATT	TAAAACCTTC	550
RELICTUM. SEQ	501	-----	-----	-----	-----	-----	550
		560	570	580	590	600	
GALLINAC. SEQ	551	C-TAAAGTAA	CAATUGGAGG	GCAAGTCTGG	TGCCAGCAGC	CGGGTAATTT	600
LOPHURAE. SEQ	551	CCTAAAGTAA	CAATUGGAGG	GCAAGTCTGG	TGCCAGCAGC	CGGGTAATTT	600
RELICTUM. SEQ	551	-----	-----	-----	-----	-----	600



		1710	1720	1730	1740	1750	
GALLINAC.SEQ	1701	AAACAGGCTCG	TGATGTCCTT	AGATGAACCTA	GGCTGCACGC	GTGCTACACT	1750
LOPHURAE.SEQ	1701	AAACAGGCTCG	TGATGTCCTT	AGATGAACCTA	GGCTGCACGC	GTGCTACACT	1750
RELICTUM.SEQ	1701	AAACAGGCTCG	TGATGTCCTT	AGATGAACCTA	GGCTGCACGC	GTGCTACACT	1750
		1760	1770	1780	1790	1800	
GALLINAC.SEQ	1751	GATATATATA	ACGAGTTATT	AAAAATATAC	GAATGTATAT	ATATTTT---	1800
LOPHURAE.SEQ	1751	GATATATATA	ACGAGTTACT	AAAAATATAT	CATTGTATAT	GTATTT----	1800
RELICTUM.SEQ	1751	GATATATATA	ACGAGTTATT	AAAAGTATAT	CTTTGTATAT	ATATATTCCTG	1800
		1810	1820	1830	1840	1850	
RELICTUM.SEQ	1801	TATATATATA	CAAAAGGTAT	AATTTTCCTC	CACTGAAAAG	TGTAGGTAAT	1850
		1860	1870	1880	1890	1900	
GALLINAC.SEQ	1851	CTTTATCAAT	ATATATCGTG	ATGGGGATAG	ATTATTGCAA	TTATTAATCT	1900
LOPHURAE.SEQ	1851	CTTTATCAAT	ATATATCGTG	ATGGGGATAG	ATTATTGCAA	TTATTAATCT	1900
RELICTUM.SEQ	1851	CTTTATCAAT	ATATATCGTG	ATGGGGATAG	ATTATTGCAA	TTATTAATCT	1900
		1910	1920	1930	1940	1950	
GALLINAC.SEQ	1901	TGAACGAGGA	ATGCCTAGTA	AGCATGATTT	-ATCAGATTG	TGCTGACTAC	1950
LOPHURAE.SEQ	1901	TGAACGAGGA	ATGCCTAGTA	AGCATGATTC	-ATCAGATTG	TGCTGACTAC	1950
RELICTUM.SEQ	1901	TGAACGAGGA	ATGCCTAGTA	AGCATGATTT	CATCAGATTG	TGCTGACTAC	1950
		1960	1970	1980	1990	2000	
GALLINAC.SEQ	1951	GTCCCTGCC	TTTGTACACA	CCGCCCGTCG	CTCCTACCGA	TTGAAAGATA	2000
LOPHURAE.SEQ	1951	GTCCCTGCC	TTTGTACACA	CCGCCCGTCG	CTCCTACCGA	TTGAAAGATA	2000
RELICTUM.SEQ	1951	GTCCCTGCC	TTTGTACACA	CCGCC-----	-----	-----	2000
		2010	2020	2030	2040	2050	
GALLINAC.SEQ	2001	TGATGAATTG	TTTGGACAAG	AAGAAATAAA	ATTTATATTT	TGTTTTTTTT	2050
LOPHURAE.SEQ	2001	TGATGAATTG	TTTGGACAAG	AAAAATAAA	--TTTATAT	TGTTTTTTTT	2050
RELICTUM.SEQ	2001	-----	-----	-----	-----	-----	2050
		2060	2070	2080	2090	2100	
GALLINAC.SEQ	2051	TGGAAAAACC	GTAATCCTA	TCTTTTAAAG	GAAGGAGAAG	TCGTAACAAG	2100
LOPHURAE.SEQ	2051	TGGAAAAACC	GTAATCCTA	TCTTTTAAAG	GAAGGAGAAG	TCGTAACAAG	2100
RELICTUM.SEQ	2051	-----	-----	-----	-----	-----	2100
		2110	2120	2130	2140	2150	
GALLINAC.SEQ	2101	GTTTCCGTAG	GTGAA-----	-----	-----	-----	2150
LOPHURAE.SEQ	2101	GTTTCCGTAG	GTGAACCTGC	GGAAGGATCA	TTA-----	-----	2150
RELICTUM.SEQ	2101	-----	-----	-----	-----	-----	2150

รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบส SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกที่ใช้ ออกแบบไพรเมอร์ GALLINAC.SEQ=ลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum* (ความยาว 2,102 เบส), LOPHURAE.SEQ=ลำดับเบสของเชื้อ *P. lophurae* (ความยาว 2,118 เบส), และ RELICTUM.SEQ=ลำดับเบสของเชื้อ *P. relictum* (ความยาว 543 เบส) ลำดับเบสสีน้ำเงินแสดงส่วนที่มีลำดับเบสเหมือนกัน ลำดับเบสสีดำแสดงส่วนที่มีลำดับเบสแตกต่างกันของเชื้อมาลาเรีย ทั้ง 3 ชนิด ลำดับเบสสีแดงแสดงส่วนของยีนที่เป็นผลิตภัณฑ์ของ PCR ลำดับเบสส่วนที่ขีดเส้นใต้ แสดงลำดับเบสของส่วนที่เป็นไพรเมอร์

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสในยีน SSUrRNA ของสัตว์ปีกทั้ง 3 ชนิด พบว่าสามารถ แยกยีน SSUrRNA ออกเป็น 3 บริเวณ บริเวณที่มีลำดับเบสเหมือนกัน บริเวณที่มีลำดับเบส ต่างกันเล็กน้อย และบริเวณที่มีลำดับเบสแตกต่างกันมาก ไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งสายบนและ สายล่าง มีความยาว 25 เบสเท่ากัน forward 5' AGT TCG TGA ATA TGA TTT GTC TGG T 3' reverse 3' TTG TTG CCT TAA ACT TCC TTG TGT T 5' ไพรเมอร์ที่ออกแบบจะมีลำดับเบสอยู่ใน บริเวณของยีนที่มีลำดับเบสเหมือนกัน โดยส่วนของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะครอบคลุม ตั้งแต่เบสลำดับที่ 1,422 ถึง 1,702 (รูปที่ 4.6) หรือมีขนาดประมาณ 280 เบส ซึ่งมีขนาดพอเหมาะ ในการหาลำดับเบสได้ด้วยปฏิกิริยา DNA sequencing เพียงครั้งเดียว



รูปที่ 4.7 แผนภูมิเปรียบเทียบลำดับเบสของ SSUrRNA จากเชื้อ *P. gallinaceum*(เส้นสีชมพู), *P. lophurae*(เส้นสีฟ้า) และ *P. relictum*(เส้นสีเหลือง) จาก GenBank ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ แถบสลับสีแสดงส่วนของยีน SSUrRNA ที่เหมือนกัน(สีขาว) ส่วนที่มีความแตกต่างกันเล็กน้อย(สีเหลือง) และส่วนที่มีความแตกต่างกันมาก(สีแดง) แถบสีเขียวด้านล่างแสดง ความยาวของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้

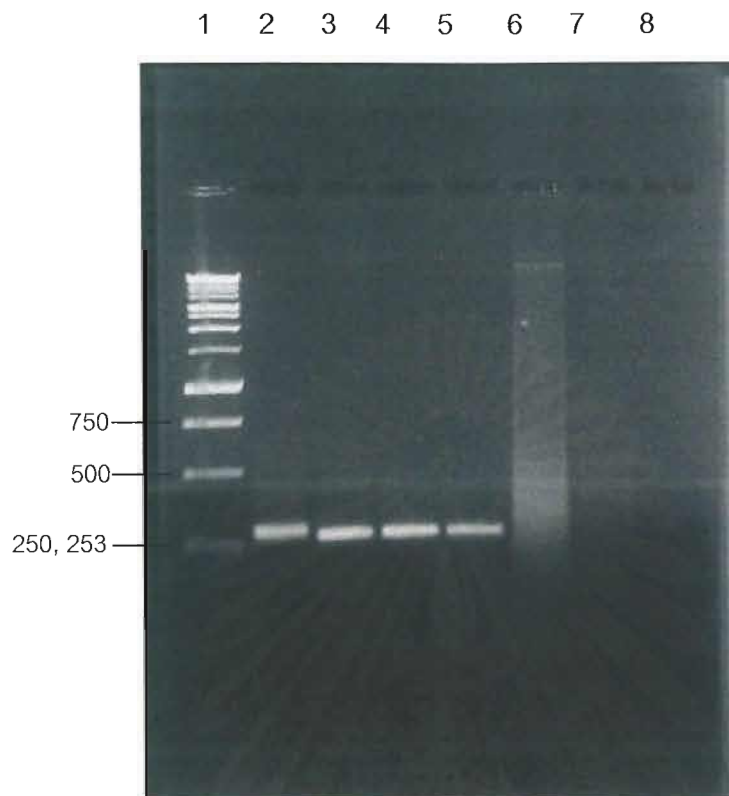
การสังเคราะห์ไพรเมอร์ผลิตขึ้นโดยหน่วยบริการชีวภาพ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ราชเทวี กรุงเทพมหานคร ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ forward 5' AGT TCG TGA ATA TGA TTT GTC TGG T 3' reverse 3' TTG TTG CCT TAA ACT TCC TTG TGT T 5'

#### 4.5 การทดลองที่ 1 การเพิ่มจำนวนของยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียไก่ด้วยวิธี PCR และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์

การเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอของ SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียไก่ โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่คือ forward 5' AGT TCG TGA ATA TGA TTT GTC TGG T 3' reverse 3' TTG TTG CCT TAA ACT TCC TTG TGT T 5' และทำปฏิกิริยา PCR ที่สภาวะ denature 95 องศาเซลเซียส anneal 58 องศาเซลเซียส และ extension 72 องศาเซลเซียส และตรวจหาแถบดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียไก่ด้วยวิธี gel electrophoresis ผลที่ปรากฏคล้ายคลึงกันทั้ง 3 ไอโซเลทที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยการเจือจางกับ น้ำกลั่นที่ตั้งแต่อัตราส่วน 1:2, 1:10 และ 1:100 และเชื้อ *P. falciparum* ที่ความเจือจาง 1:10 พบว่าความเข้มข้น ตำแหน่งและลักษณะของแถบดีเอ็นเอ ไม่มีความแตกต่าง แถบดีเอ็นเออยู่ที่ความยาวประมาณ 280 เบสเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.8 และ 4.9) ลักษณะของแถบชัดเจนความเข้มข้นสูงใกล้เคียงกัน



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูปที่ 4.8** ผลิตรากษัตริย์เอ็นเอที่ได้จากยีน SSUrRNA ของตัวอย่างดีเอ็นเอใน agarose gel 1.5 % กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45 นาที

แถบที่ 1 =DNA Marker(1 kb ladder)

2 =ดีเอ็นเอเจือจางจากเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* สายพันธุ์T9/94RC17 เจือจาง 1:10

3 =NJTH2539 เจือจาง 1: 2

4= NJTH2539 เจือจาง 1:10

5= NJTH2539 ไก่เจือจาง 1:100

6-7= เม็ดเลือดแดงไก่ปกติ

8=น้ำกลั่นที่ใช้ในการทดลอง(negative control)





**รูปที่ 4.9** ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากยีน SSUrRNA ของตัวอย่างดีเอ็นเอใน agarose gel 0.8 % กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 25 นาที

แถบที่ 1 =DNA Marker(1 kb ladder)

2 =CSTH2542

3 =CSTH2543

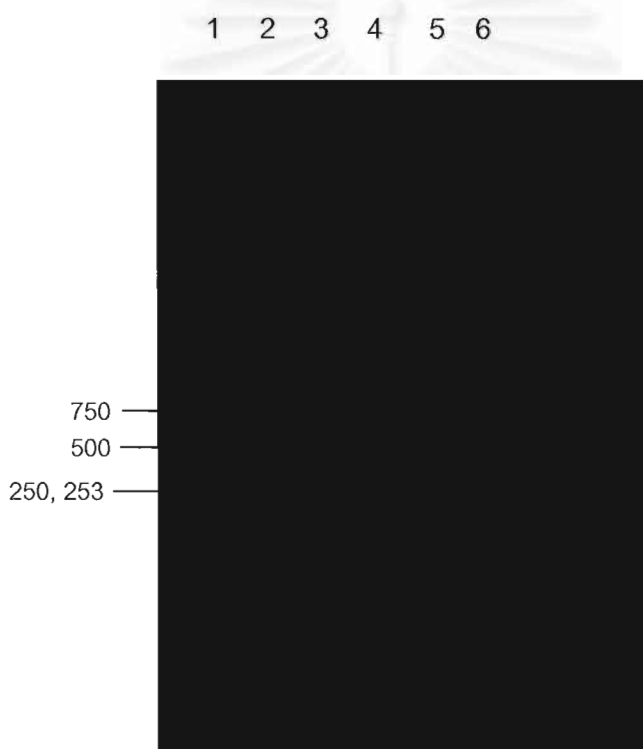
4= *P. falciparum* สายพันธุ์T9/94RC17 เจือจาง 1:10

5= เลือดไก่ปกติ

6= น้ำกลั่นที่ใช้ในการทดลอง(negative control)

#### 4.6 การแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของ SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มาแยกบริสุทธิ์ด้วย spin column ขั้นตอนการทำให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ กระทำโดยการนำสารละลายผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอไปผ่าน spin column เพื่อให้บริสุทธิ์ สารละลายผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ผ่าน spin column ออกมาในขั้นตอนแรกจะถูกนำมาผ่าน spin column อีกครั้งหนึ่งและทำตามวิธีการเช่นเดิม เมื่อทดสอบหาดีเอ็นเอที่เหลืออยู่หลังการผ่าน spin column ในขั้นตอนแรก ผลการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะถูกจับไว้ใน spin column ในขั้นตอนแรก เห็นได้จากแถบดีเอ็นเอแถวที่ 2 มีความเข้มมากกว่าแถวที่ 3 อย่างเห็นได้ชัด(รูปที่ 4.10)



**รูปที่ 4.10** ดีเอ็นเอจากยีน SSUrRNA ที่แยกบริสุทธิ์แล้ว ใน agarose gel 1.5 % กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45 นาที

แถบที่ 1=DNA Marker(1 kb ladder)

2=ตัวอย่างที่ 1 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 1

3=ตัวอย่างที่ 2 แยกครั้งที่ 1

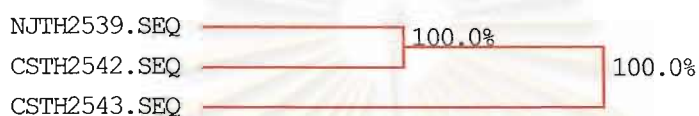
4=ตัวอย่างที่ 1 แยกครั้งที่ 2 ,

5=ตัวอย่างที่ 2 แยกครั้งที่ 2

6=น้ำกลั่นที่ใช้ในการทดลอง(negative control)

### 4.7 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

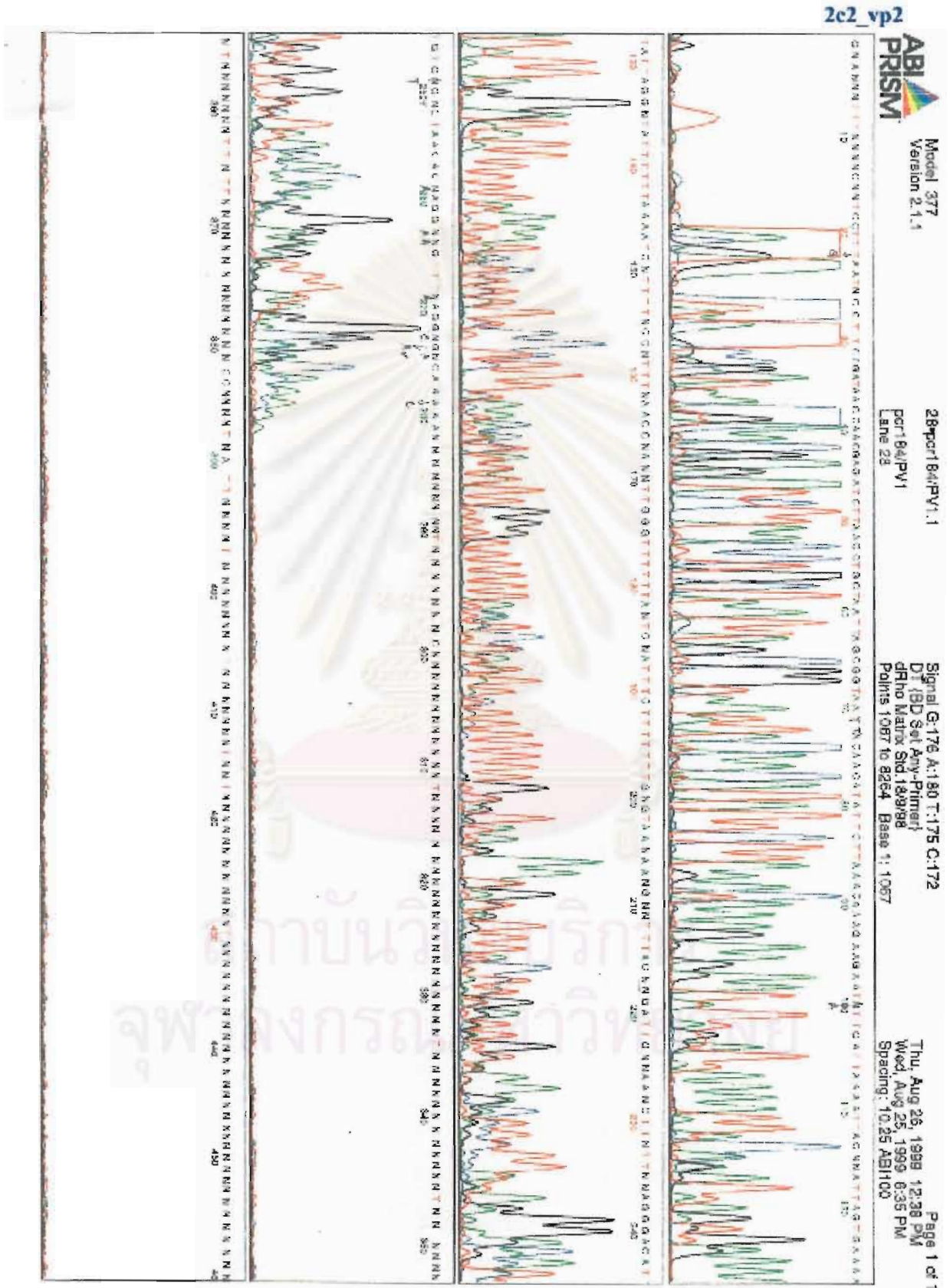
ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วถูกส่งไปหาลำดับเบสโดยใช้ ABI PRIM Dye Terminate Cyde Sequencing Ready Reaction kit ณ หน่วยบริการชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ราชเทวี กรุงเทพมหานคร ผลของ four-color electropherogram ของเชื่อมาลาเรียไก่อทั้ง 3 ไอโซเลขในรูปที่ 4.12 ถึง 4.19 ลำดับเบสของยีน SSUrRNA ความยาว 279 เบสที่ได้จากเชื่อมาลาเรียไอโซเลข NJTH2539, CSTH2542 และ CSTH2543 โดยไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 ไอโซเลข(รูปที่ 4.11)



	10	20	30	40	50		
NJTH2539.SEQ	1	TAGTTCGTGA	ATATGATTTG	TCTGGTTAAT	TCCGATAACG	AACGAGATCT	50
CSTH2542.SEQ	1	TAGTTCGTGA	ATATGATTTG	TCTGGTTAAT	TCCGATAACG	AACGAGATCT	50
CSTH2543.SEQ	1	TAGTTCGTGA	ATATGATTTG	TCTGGTTAAT	TCCGATAACG	AACGAGATCT	50
	60	70	80	90	100		
NJTH2539.SEQ	51	TAACTGCTA	ATTAGCGGTA	AATACAACAT	ATTCTTAAAC	AAAGAAGAAT	100
CSTH2542.SEQ	51	TAACTGCTA	ATTAGCGGTA	AATACAACAT	ATTCTTAAAC	AAAGAAGAAT	100
CSTH2543.SEQ	51	TAACTGCTA	ATTAGCGGTA	AATACAACAT	ATTCTTAAAC	AAAGAAGAAT	100
	110	120	130	140	150		
NJTH2539.SEQ	101	ATAGATAAAA	ATTACAAATA	AGTGAAAATA	TTAGGATATT	TTTTAATATC	150
CSTH2542.SEQ	101	ATAGATAAAA	ATTACAAATA	AGTGAAAATA	TTAGGATATT	TTTTAATATC	150
CSTH2543.SEQ	101	ATAGATAAAA	ATTACAAATA	AGTGAAAATA	TTAGGATATT	TTTTAATATC	150
	160	170	180	190	200		
NJTH2539.SEQ	151	CTTTTCCTT	TTCAACTTAT	TTTGTFTTTT	TTACTCTATT	TCTTTTFTTG	200
CSTH2542.SEQ	151	CTTTTCCTT	TTCAACTTAT	TTTGTFTTTT	TTACTCTATT	TCTTTTFTTG	200
CSTH2543.SEQ	151	CTTTTCCTT	TTCAACTTAT	TTTGTFTTTT	TTACTCTATT	TCTTTTFTTG	200
	210	220	230	240	250		
NJTH2539.SEQ	201	TATAAGAATG	TATTTACTTG	ATTGTAAAGC	TTCTTAGAGG	GACATTGTGT	250
CSTH2542.SEQ	201	TATAAGAATG	TATTTACTTG	ATTGTAAAGC	TTCTTAGAGG	GACATTGTGT	250
CSTH2543.SEQ	201	TATAAGAATG	TATTTACTTG	ATTGTAAAGC	TTCTTAGAGG	GACATTGTGT	250
	260	270	280	290	300		
NJTH2539.SEQ	251	GTCTAACACA	AGGAAGTTTA	AGGCAACAA	.....	.....	300
CSTH2542.SEQ	251	GTCTAACACA	AGGAAGTTTA	AGGCAACAA	.....	.....	300
CSTH2543.SEQ	251	GTCTAACACA	AGGAAGTTTA	AGGCAACAA	.....	.....	300

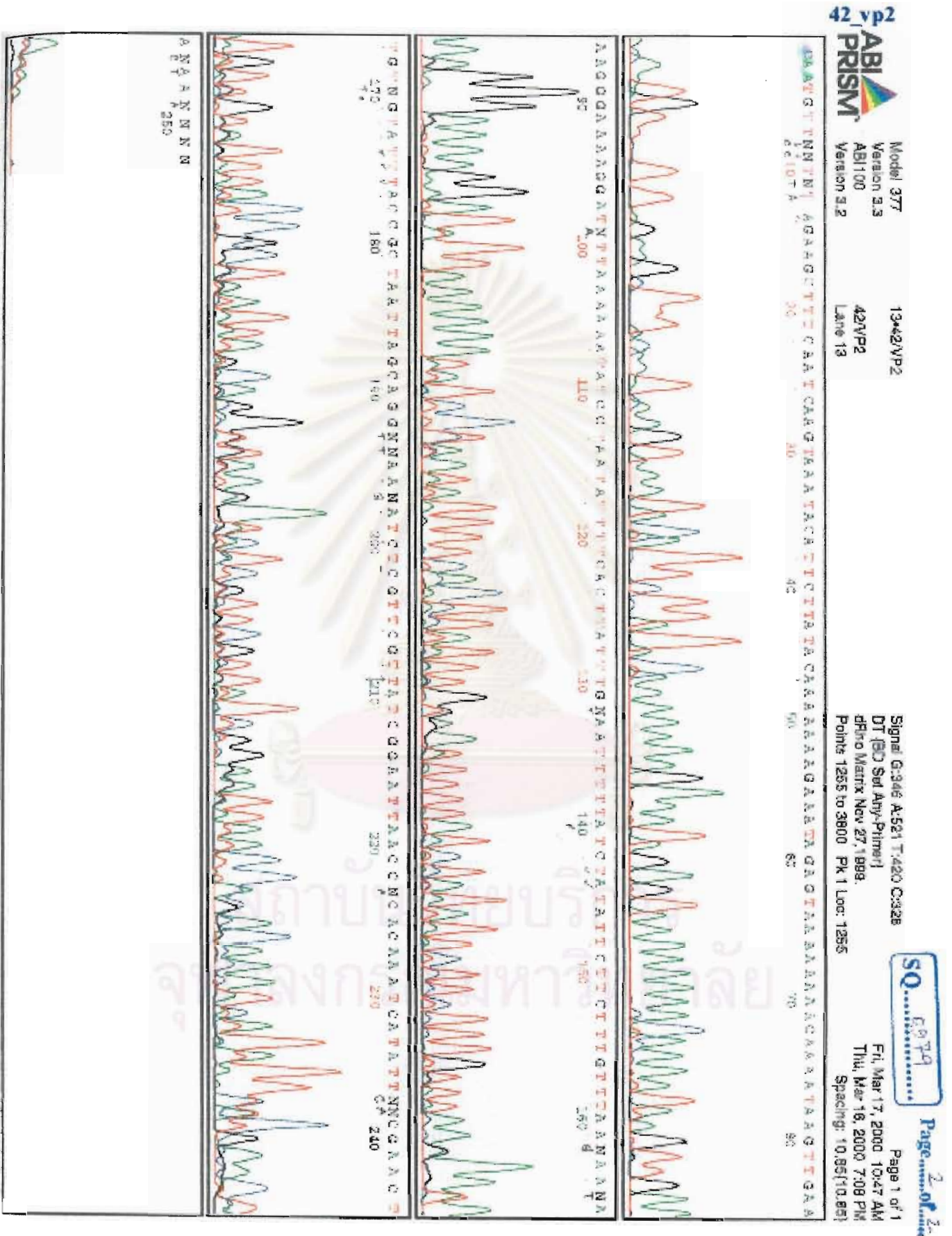
รูปที่ 4.11 ลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน SSUrRNA ของเชื่อมาลาเรียไก่อที่ได้จากการหาลำดับเบส NJTH2539.SEQ=ไอโซเลข NJTH2539 CSTH2542= ไอโซเลข CSTH2542 และ CSTH2543 = ไอโซเลข CSTH2543 ลำดับเบสสีแดงแสดงส่วนของลำดับเบสที่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบและเป็นส่วนที่เหมือนกัน



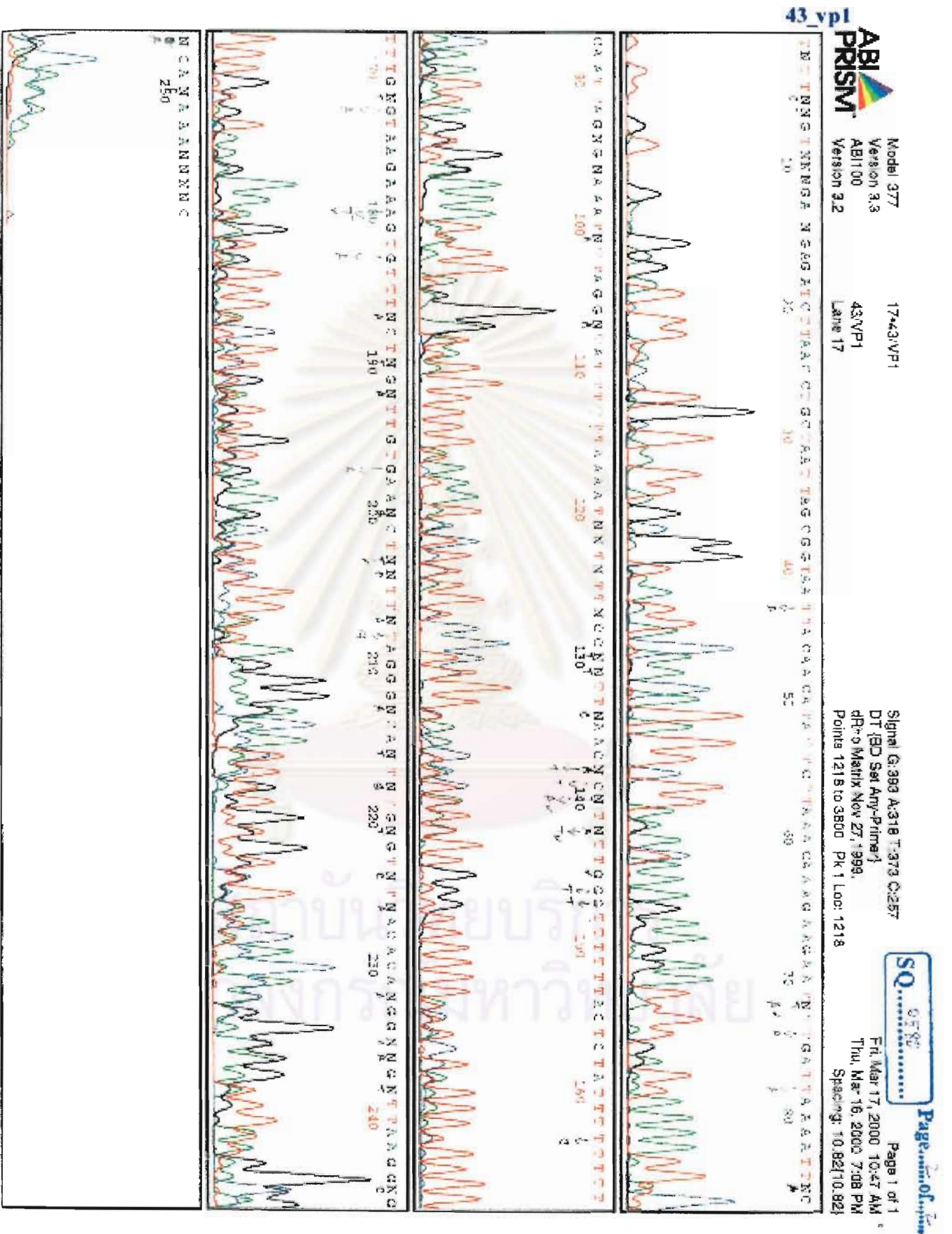


รูปที่ 4.13 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อมาลาเรียไอโซเลท NJTH2539 โดยใช้ reverse primer





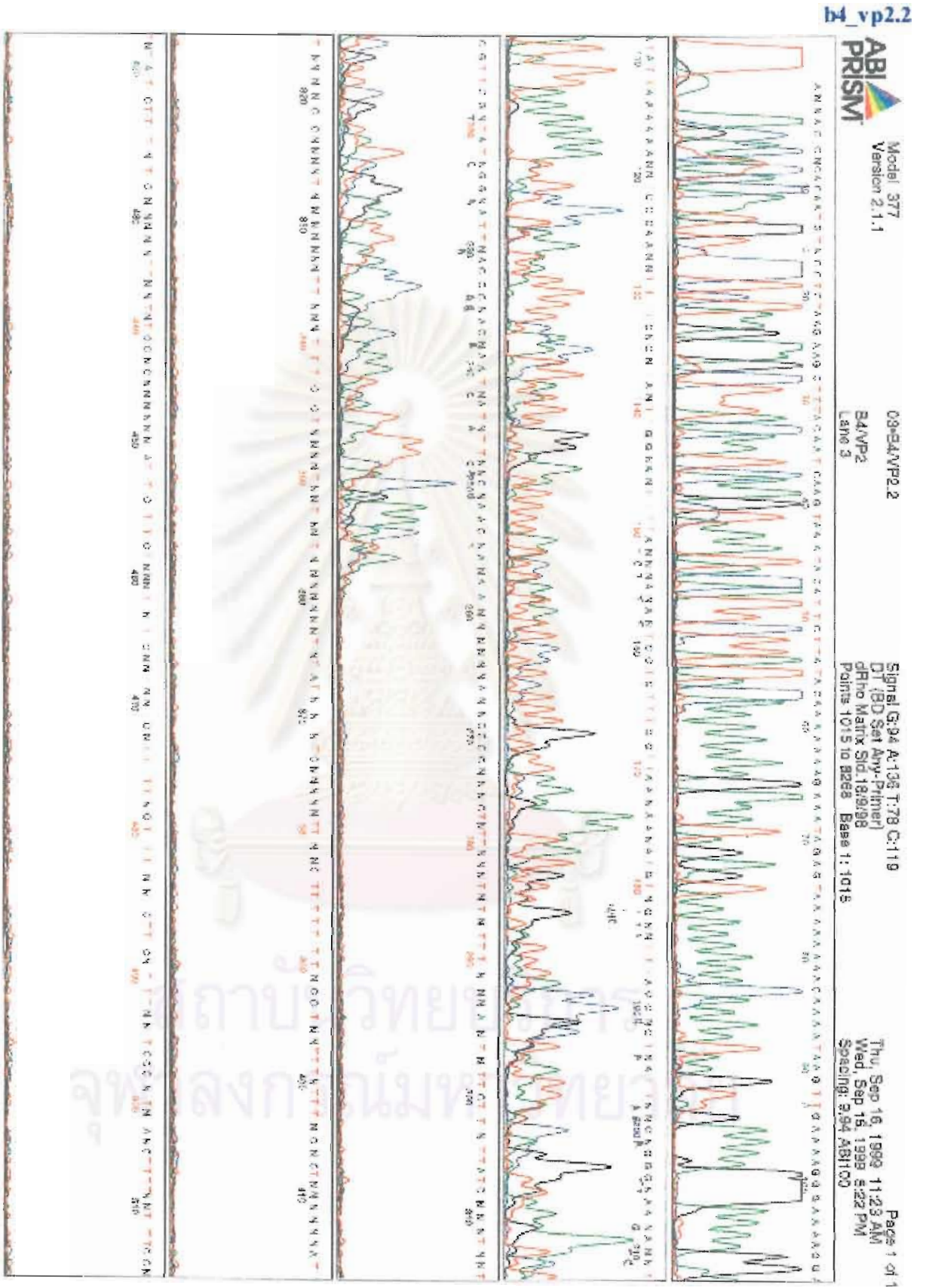
รูปที่ 4.15 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อมาลาเรียไอโซเลต CSH2542 โดยใช้ reverse primer



รูปที่ 4.16 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อมาลาเรียไอโซเลท CSH2543 โดยใช้ forward primer



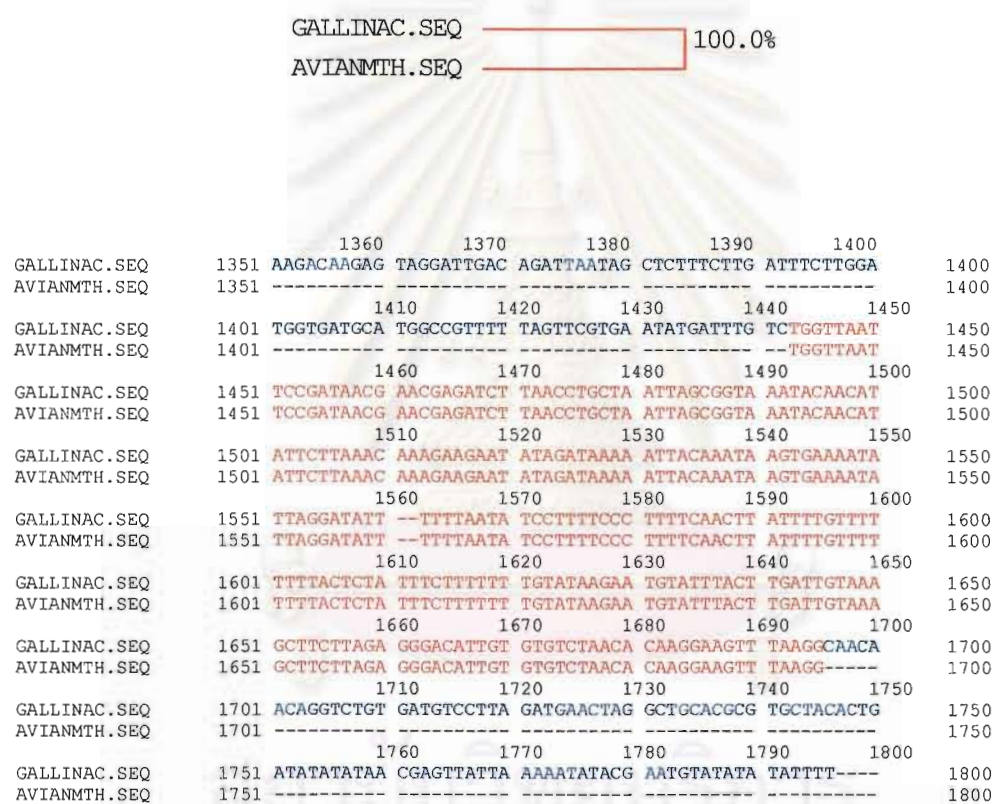




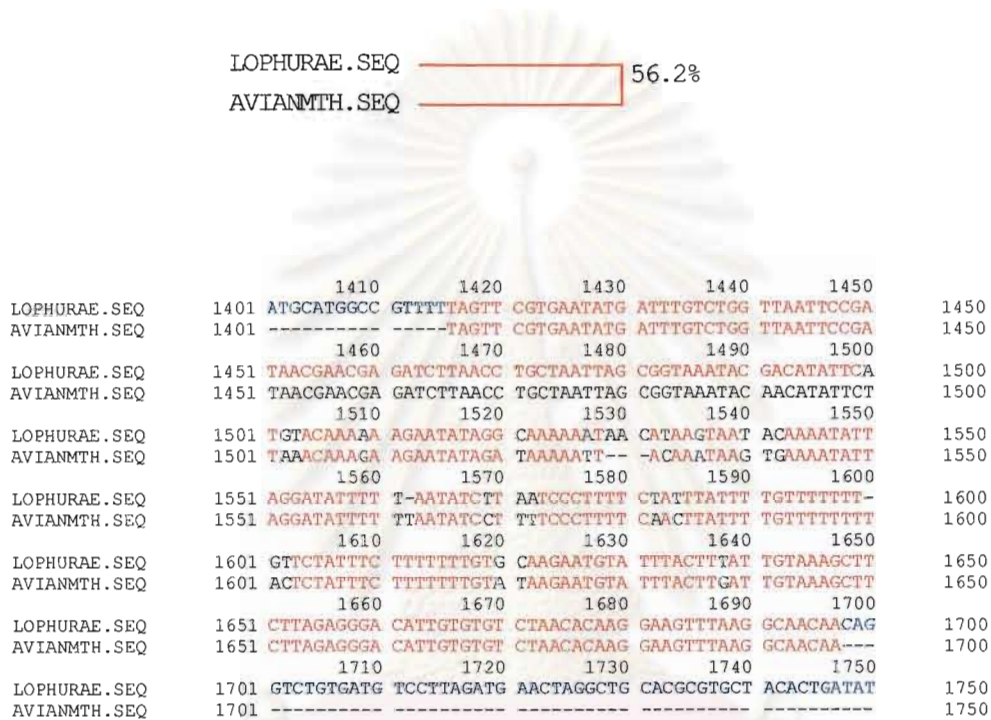
รูปที่ 4.18 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อมาลาเรียไอโซเลต NJTH2539 โดยใช้ reverse primer



ลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียไก่ 3 ไอโซเลท คือ NJTH2539 CSH2542 และ CSH2543 นำมาเปรียบเทียบกับโดยใช้โปรแกรม DNASIS พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท มีจำนวนและลำดับเบสเหมือนกันทุกประการ(AVIANMTH) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับยีน SSUrRNA ของ *P. gallinaceum* จากฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความคล้ายกัน 100 % (รูป 4.20) ในขณะที่มีความคล้ายกันกับ *P. lophurae* และ *P. relictum* 56.2 และ 58.0 % ตามลำดับ (รูปที่ 4.21 และ 4.22)



รูปที่ 4.20 ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรีย AVIANMTH (Thai avian malaria ไอโซเลท NJTH2539 CSH2542 และ CSH2543) และเชื้อ *P. gallinaceum* จาก GenBank ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1,416 ถึง 1,694 ลำดับเบสนำเงินแสดงส่วนของลำดับเบสที่ไม่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบ ลำดับเบสสีแดงแสดงส่วนของลำดับเบสที่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบและเป็นส่วนที่เหมือนกัน

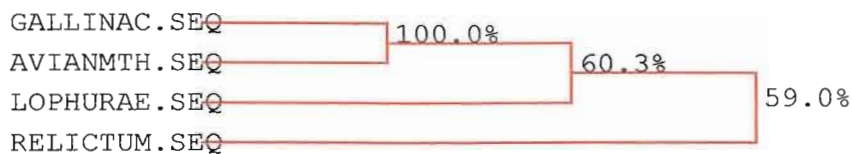


รูปที่ 4.21 ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรีย AVIANMTH (Thai avian malaria ไอโซเลท NJTH2539 CSH2542 และ CSH2543) และเชื้อ *P. lophurae* จาก GenBank ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1,416 ถึง 1,697 ลำดับเบสสีน้ำเงินแสดงส่วนของลำดับเบสที่ไม่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบ ลำดับเบสสีแดงแสดงส่วนของลำดับเบสที่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบและเป็นส่วนที่เหมือนกัน ลำดับเบสสีดำแสดงส่วนที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน

RELICTUM.SEQ 58.0%  
 AVIANMTH.SEQ

		10	20	30	40	50	
RELICTUM.SEQ	1	-----	--ATGATT	TCTGGTTAAT	TCCGATAACG	AACGAGATCT	50
AVIANMTH.SEQ	1	TAGTTCGTGA	ATATGATT	TCTGGTTAAT	TCCGATAACG	AACGAGATCT	50
		60	70	80	90	100	
RELICTUM.SEQ	51	TAACCTGCTA	ATTAGCGGTA	AATACAACAT	ATTCTTAAAGT	AAATAAGAAT	100
AVIANMTH.SEQ	51	TAACCTGCTA	ATTAGCGGTA	AATACAACAT	ATTCTTAAAC	AAAGAAGAAT	100
		110	120	130	140	150	
RELICTUM.SEQ	101	ATAGATAAAA	ATAACAAATA	AGAGAACATA	TTAAGATGTT	ATATATAATG	150
AVIANMTH.SEQ	101	ATAGATAAAA	ATTACAAATA	AGTGAARATA	TTAGGATATT	TTTTAATATC	150
		160	170	180	190	200	
RELICTUM.SEQ	151	TCTTTTCCC	TGTTCTTCTT	ATTGTTTTTT	T-ATTCTATT	TCTTTTTTTA	200
AVIANMTH.SEQ	151	CTTTTCCCTT	TTCAACTTAT	TTTGTTTTTT	TTACTCTATT	TCTTTTTTTG	200
		210	220	230	240	250	
RELICTUM.SEQ	201	CGTAAGAATG	TATTTACTTG	ATTGTAAAGC	TTCTTAGAGG	GACATTGTGT	250
AVIANMTH.SEQ	201	TATAAGAATG	TATTTACTTG	ATTGTAAAGC	TTCTTAGAGG	GACATTGTGT	250
		260	270	280	290	300	
RELICTUM.SEQ	251	GTCTAACACA	AGGAAGTTTA	AGGCAACAAC	AGGTCTGTGA	TGTCCTTAGA	300
AVIANMTH.SEQ	251	GTCTAACACA	AGGAAGTTTA	AGGCAACAA-	-----	-----	300
		310	320	330	340	350	
RELICTUM.SEQ	301	TGAACTAGGC	TGCACGCGTG	CTACACTGAT	ATATATAACG	AGTTATTAAA	350
AVIANMTH.SEQ	301	-----	-----	-----	-----	-----	350

**รูปที่ 4.22** ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรีย AVIANMTH (Thai avian malaria ไอโซเลท NJTH2539 C5TH2542 และ C5TH2543) และเชื้อ *P. relictum* จาก GenBank ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 279 ลำดับเบสน้ำเงินแสดงส่วนของลำดับเบสที่ไม่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบ ลำดับเบสสีแดงแสดงส่วนของลำดับเบสที่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบและเป็นส่วนที่เหมือนกัน ลำดับเบสสีดำแสดงส่วนที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน



	1360	1370	1380	1390	1400	
GALLINAC.SEQ	1351 AAGACAAGAG	TAGGATTGAC	AGATTAATAG	CTCTTTCTTG	ATTTCCTGGA	1400
AVIANMTH.SEQ	1351 -----	-----	-----	-----	-----	1400
RELICTUM.SEQ	1351 -----	-----	-----	-----	-----	1400
LOPHURAE.SEQ	1351 AAGACAAGAG	TAGGATTGAC	AGATTAATAG	CTCTTTCTTG	ATTTCCTGGA	1400
	1410	1420	1430	1440	1450	
GALLINAC.SEQ	1401 TGGTGATGCA	TGGCCGTTTT	TAGTTCGTGA	ATATGATTG	TCTGGTTAAT	1450
AVIANMTH.SEQ	1401 -----	-----	-----	-----	---TGGTTAAT	1450
RELICTUM.SEQ	1401 -----	-----	-----	--ATGATTG	TCTGGTTAAT	1450
LOPHURAE.SEQ	1401 TGGTGATGCA	TGGCCGTTTT	TAGTTCGTGA	ATATGATTG	TCTGGTTAAT	1450
	1460	1470	1480	1490	1500	
GALLINAC.SEQ	1451 TCCGATAACG	AACGAGATCT	TAACCTGCTA	ATTAGCGGTA	AATACAACAT	1500
AVIANMTH.SEQ	1451 TCCGATAACG	AACGAGATCT	TAACCTGCTA	ATTAGCGGTA	AATACAACAT	1500
RELICTUM.SEQ	1451 TCCGATAACG	AACGAGATCT	TAACCTGCTA	ATTAGCGGTA	AATACAACAT	1500
LOPHURAE.SEQ	1451 TCCGATAACG	AACGAGATCT	TAACCTGCTA	ATTAGCGGTA	AATACGACAT	1500
	1510	1520	1530	1540	1550	
GALLINAC.SEQ	1501 ATTCTTAAAC	AAAGAAGAAT	ATAGATAAAA	ATTACAAATA	AGTGAATAA	1550
AVIANMTH.SEQ	1501 ATTCTTAAAC	AAAGAAGAAT	ATAGATAAAA	ATTACAAATA	AGTGAATAA	1550
RELICTUM.SEQ	1501 ATTCTTAAAGT	AAATAAGAAT	ATAGATAAAA	ATAACAAATA	AGAGAACATA	1550
LOPHURAE.SEQ	1501 ATTCATGTAC	AAAAAGAAT	ATAGGCAAAA	AATAACATA	GTAATACAAA	1550
	1560	1570	1580	1590	1600	
GALLINAC.SEQ	1551 TTAGGATATT	--TTTTAATA	TCCTTTTCCC	TTTTCAACTT	ATTTTGTTTT	1600
AVIANMTH.SEQ	1551 TTAGGATATT	--TTTTAATA	TCCTTTTCCC	TTTTCAACTT	ATTTTGTTTT	1600
RELICTUM.SEQ	1551 TTAAGATGTT	ATATATAATG	TCCTTTTCCC	TGTTCTTCTT	ATT--GTTTT	1600
LOPHURAE.SEQ	1551 ATATTAGGAT	ATTTTAAATA	TCTTAAFCCC	TTTTCTATTT	ATTTTGTTTT	1600
	1610	1620	1630	1640	1650	
GALLINAC.SEQ	1601 TTTTACTCTA	TTTCTTTTTT	TGTATAAGAA	TGTATTACT	TGATTGTAAA	1650
AVIANMTH.SEQ	1601 TTTTACTCTA	TTTCTTTTTT	TGTATAAGAA	TGTATTACT	TGATTGTAAA	1650
RELICTUM.SEQ	1601 TTT-ATTCTA	TTTCTTTTTT	TACGTAAAGAA	TGTATTACT	TGATTGTAAA	1650
LOPHURAE.SEQ	1601 TTT-GTTCTA	TTTCTTTTTT	TGIGCAAGAA	TGTATTACT	TTATTGTAAA	1650
	1660	1670	1680	1690	1700	
GALLINAC.SEQ	1651 GCTTCTTAGA	GGGACATTGT	GTGCTAACA	CAAGGAAGTT	TAAGGCAACA	1700
AVIANMTH.SEQ	1651 GCTTCTTAGA	GGGACATTGT	GTGCTAACA	CAAGGAAGTT	TAAGG-----	1700
RELICTUM.SEQ	1651 GCTTCTTAGA	GGGACATTGT	GTGCTAACA	CAAGGAAGTT	TAAGGCAACA	1700
LOPHURAE.SEQ	1651 GCTTCTTAGA	GGGACATTGT	GTGCTAACA	CAAGGAAGTT	TAAGGCAACA	1700
	1710	1720	1730	1740	1750	
GALLINAC.SEQ	1701 ACAGGCTGT	GATGTCCTTA	GATGAAGTAG	GCTGCACGCG	TGCTACACTG	1750
AVIANMTH.SEQ	1701 -----	-----	-----	-----	-----	1750
RELICTUM.SEQ	1701 ACAGGCTGT	GATGTCCTTA	GATGAAGTAG	GCTGCACGCG	TGCTACACTG	1750
LOPHURAE.SEQ	1701 ACAGGCTGT	GATGTCCTTA	GATGAAGTAG	GCTGCACGCG	TGCTACACTG	1750
	1760	1770	1780	1790	1800	
GALLINAC.SEQ	1751 ATATATATAA	CGAGTTATTA	AAAATATACG	AATGTATATA	TATTTT----	1800
AVIANMTH.SEQ	1751 -----	-----	-----	-----	-----	1800
RELICTUM.SEQ	1751 ATATATATAA	CGAGTTATTA	AAAATATATC	TTTGTATATA	TATATICTGT	1800
LOPHURAE.SEQ	1751 ATATATATAA	CGAGTTACTA	AAAATATATC	ATTGTATATG	TATTT-----	1800
	1810	1820	1830	1840	1850	
GALLINAC.SEQ	1801 ATATATATAC	ATTTTGATA	ATTTTCCTCC	ACTGAAAAGT	GTAGGTAATC	1850
AVIANMTH.SEQ	1801 -----	-----	-----	-----	-----	1850
RELICTUM.SEQ	1801 ATATATATAC	AAAAGGTATA	ATTTTCCTCC	ACTGAAAAGT	GTAGGTAATC	1850
LOPHURAE.SEQ	1801 ATACATATAC	ATTTGGTATA	ATTTTCCTCC	ACTGAAAAGT	GTAGGTAATC	1850

รูปที่ 4.23 ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรีย AVIANMTH (Thai avian malaria ไอโซเลท NJTH2539 CSH2542 และ CSH2543) และเชื้อ *P. gallinaceum*, *P. lophurae* และ *P. relictum* จาก GenBank ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1,443 ถึง 1,695 ลำดับเบสสีน้ำเงินแสดงส่วนของลำดับเบสที่ไม่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบ ลำดับเบสสีแดงแสดงส่วนของลำดับเบสที่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบและเป็นส่วนที่เหมือนกัน ลำดับเบสสีดำแสดงส่วนที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน

#### 4.8 ผลการเพิ่มจำนวนยีน rophry associated protein-1 (*rap-1*) ด้วยเทคนิค PCR

##### 4.8.1 การเตรียมและแยกเชื้อมาลาเรียไก่อระยะสปอโรซอยต์

สปอโรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียไก่อที่ฆ่าเหาะออกจากต่อมน้ำลายยุงและย้อมด้วยสียิมซา 10% มีลักษณะเรียวยาวขนาด 9  $\mu\text{m}$  นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ติดสีน้ำเงินเข้มอยู่ตรงกลาง(รูปที่ 4.17) ไฮโดพลาซึมติดสีน้ำเงินอ่อน เชื้อที่ได้มักมีเซลล์ของต่อมน้ำลายปนอยู่และทำการแยกเชื้อ โดยปรับปรุงจากวิธีของ Ozaki และคณะ(1984)



รูปที่ 4.24 แผ่นฟิล์มบางและย้อมด้วยสี giemsa 10 % ของเชื้อมาลาเรียไก่อระยะสปอโรซอยต์จากต่อมน้ำลายยุง กำลังขยาย 4,000 เท่า



#### 4.8.2 การทดลองที่ 2 การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน rhoptry associated protein-1 (*rap-1*) ด้วยเทคนิค PCR

ดีเอ็นเอที่เตรียมจากสปอโรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียไก่เมื่อนำมาวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer มีความเข้มข้น 0.3-23  $\mu\text{g/ml}$

ผลการขยายจำนวนดีเอ็นเอจากยีนของ *rap-1* ใน *P. gallinaceum* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *rap-1* ของ *P. falciparum* และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี gel electrophoresis การทดลองพบว่าในสภาวะของ denaturation temperature ที่ 95 องศาเซลเซียส annealing temperature ระหว่าง 20-53 องศาเซลเซียส และ extension temperature 72 องศาเซลเซียส การเติมดีเอ็นเอของ *P. falciparum* เป็น ดีเอ็นเอแม่แบบ(template) จำนวน 200 ถึง 500 ng ลงในปฏิกิริยาจะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทุกอุณหภูมิที่ใช้การทดลองยกเว้นที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่วนตัวอย่างที่ใช้ดีเอ็นเอของ *P. gallinaceum* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ไพรเมอร์ที่ใช้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน *rap-1* ได้ในทุกสภาวะที่ทำการทดลอง แม้แต่ตัวอย่างเดี่ยวดังในตารางที่ 1, 2 และ 3

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดลองขยายจำนวนยีน *rap-1* ของเชื้อ *P. gallinaceum* (NJTH2539) ที่ความเข้มข้นและสภาวะอุณหภูมิ anneal ที่ 53 50 และ 48 องศาเซลเซียส

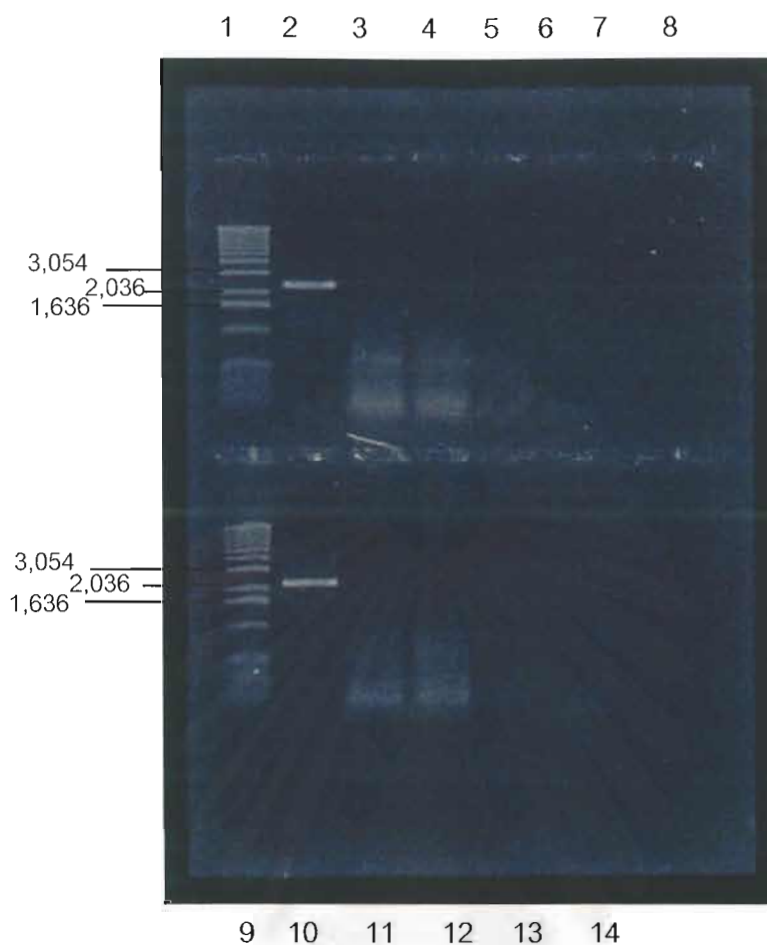
DNA concentration (ng)	PCR Condition			DNA band	
	Denature Temp (°C)	Anneal Temp (°C)	Extension Temp (°C)	<i>P.falciparum</i>	<i>P.gallinaceum</i>
2000	95	53	72	-	-
1000	95	53	72	-	-
500	95	53	72	+	-
400	95	53	72	+	-
200	95	53	72	+	-
20	95	53	72	-	-
2000	95	50	72	-	-
1000	95	50	72	-	-
500	95	50	72	+	-
400	95	50	72	+	-
200	95	50	72	+	-
20	95	50	72	-	-
2000	95	48	72	-	-
1000	95	48	72	-	-
500	95	48	72	+	-
400	95	48	72	+	-
200	95	48	72	+	-
20	95	48	72	-	-

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดลองขยายจำนวนยีน *rap-1* ของเชื้อ *P. gallinaceum* (NJTH2539) ที่ความเข้มข้นและสภาวะอุณหภูมิ anneal ที่ 45 40 และ 35 องศาเซลเซียส

DNA concentration (ng)	PCR Condition			DNA band	
	Denature Temp (°C)	Anneal Temp (°C)	Extension Temp (°C)	<i>P.falciparum</i>	<i>P.gallinaceum</i>
2000	95	45	72	-	-
1000	95	45	72	-	-
500	95	45	72	+	-
400	95	45	72	+	-
200	95	45	72	+	-
20	95	45	72	-	-
2000	95	40	72	-	-
1000	95	40	72	-	-
500	95	40	72	+	-
400	95	40	72	+	-
200	95	40	72	+	-
20	95	40	72	-	-
2000	95	35	72	-	-
1000	95	35	72	-	-
500	95	35	72	+	-
400	95	35	72	+	-
200	95	35	72	+	-
20	95	35	72	-	-

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดลองขยายจำนวนยีน *rap-1* ของเชื้อ *P. gallinaceum* (NJTH2539) ที่ความเข้มข้นและสภาวะอุณหภูมิ anneal ที่ 30 25 และ 20 องศาเซลเซียส

DNA concentration (ng)	PCR Condition			DNA band	
	Denature Temp (°C)	Anneal Temp (°C)	Extension Temp (°C)	<i>P.falciparum</i>	<i>P.gallinaceum</i>
2000	95	30	72	-	-
1000	95	30	72	-	-
500	95	30	72	+	-
400	95	30	72	+	-
200	95	30	72	+	-
20	95	30	72	-	-
2000	95	25	72	-	-
1000	95	25	72	-	-
500	95	25	72	+	-
400	95	25	72	+	-
200	95	25	72	+	-
20	95	25	72	-	-
2000	95	20	72	-	-
1000	95	20	72	-	-
500	95	20	72	-	-
400	95	20	72	-	-
200	95	20	72	-	-
20	95	20	72	-	-



**รูปที่ 4.25** ภาพถ่ายจากกล้องโพลาไรซ์แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้เมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบชนิดต่างๆที่ agarose gel 0.8 % กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 25 นาที

แถบที่ 1-6 ใช้อุณหภูมิ anneal ที่ 25 องศาเซลเซียส      แถบที่ 9-14 ใช้อุณหภูมิ anneal ที่ 35 องศาเซลเซียส

1=DNA Marker(1 kb ladder)	9= DNA Marker(1 kb ladder)
2= <i>P. falciparum</i> สายพันธุ์T9/94RC17 เจือจาง 1:10	10= <i>P. falciparum</i> สายพันธุ์T9/94RC17 เจือจาง 1:10
3=NJTH2539 เจือจาง 1:5	11=NJTH2539 เจือจาง 1:5
4=NJTH2539 เจือจาง 1:10	12=NJTH2539 เจือจาง 1:10
5=NJTH2539 เจือจาง 1:100	13=NJTH2539 เจือจาง 1:100
6=negative control	14= negative control



### 5.1 สรุปผลการทดลอง

เชื้อมาลาเรียจากไก่เนื้อและไก่ไข่ที่เก็บตัวอย่าง 3 ไอโซเลท สามารถนำมาเพิ่มจำนวนในลูกไก่ตัวผู้ให้ระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูง นำไปใช้ในการฉีดเชื้ออย่างต่อเนื่องเพื่อแยกและเตรียมดีเอ็นเอเพื่อการศึกษาในครั้งนี้ การใช้เชื้อมาลาเรียไก่ที่มีระดับเชื้อในกระแสเลือด 70 % ปริมาณ 200  $\mu$ l ฉีดเข้าใต้ผิวหนังสามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดระยะที่ไม่มีเพศภายใน 7 วัน และตรวจพบเชื้อระยะที่มีเพศภายใน 10 วัน ในกรณีที่ฉีดเชื้อเข้าทางเส้นเลือดดำสามารถตรวจพบเชื้อระยะที่ไม่มีเพศภายใน 3 วันและเชื้อระยะที่มีเพศภายใน 5 วัน(รูปที่ 4.3) เชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดที่มีระดับสูง 80% ขึ้นไป มีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตกง่ายด้วยวิธี freezing-thawing และสามารถแยกเชื้อออกจากเม็ดเลือดแดงได้โดยวิธี differential centrifugation

การเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอของยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียไก่ทั้ง 3 ไอโซเลทที่เก็บจากภาคสนาม 3 แห่งด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่มี 25 เบสคือ forward 5' AGT TCG TGA ATA TGA TTT GTC TGG T 3' reverse 3' TTG TTG CCT TAA ACT TCC TTG TGT T 5' ในสภาวะอุณหภูมิ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส annealing 50, 55, 58 และ 60 องศาเซลเซียส และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่าเชื้อมาลาเรียไก่ทั้ง 3 ไอโซเลท ให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันมีความยาว 279 เบสเท่ากัน โดยอยู่ในช่วงลำดับที่ 1,422 ถึง 1,702 และมีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *P. gallinaceum*, *P. relictum* และ *P. lophurae* คิดเป็น 100, 58.0 และ 56.2% ตามลำดับ

สำหรับการทดลองเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอของยีน rhoptry associated protein-1 (*rap-1*) ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท NJTH2539 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *rap-1* gene ของ *P. falciparum* จำนวน 1 คู่ forward 5' GAG CTC TTA ATC TAA TCT GAA GGC A 3' และ reverse 3' CTA GAG ATG AGT TTC TAT TTG GGT AGC TT 5' สภาวะอุณหภูมิ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส annealing 20, 25, 30, 35, 40, 45, 48, 50, 53 และ 55 องศาเซลเซียส และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ผลการตรวจสอบของปฏิกิริยาลูกโซ่ปรากฏว่าไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *rap-1* ของเชื้อ *P. falciparum* ไม่สามารถนำมาใช้ในการขยายจำนวนดีเอ็นเอยีน *rap-1* ของเชื้อมาลาเรียไก่ ไอโซเลท NJTH2539 ได้

กล่าวโดยสรุป การศึกษาครั้งนี้สามารถพิสูจน์ยืนยันได้ว่าเชื้อมาลาเรียที่ระบาดอยู่ใน 3 แห่งของประเทศไทยคือ *Plasmodium gallinaceum* ซึ่งมีสายพันธุ์เดียวกันทั้งชนิดที่พบในไก่เนื้อ

1 ไอโซเลท(NJTH2539)และไก่ไข่ 2 ไอโซเลท(CSTH2542 และ CSTH2543) โดยมีลำดับเบส SSUrRNA เหมือนกันกับ *P. gallinaceum* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

นอกจากนี้ยังทดลองพบว่ายีน *rap-1* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มีความจำเพาะสูง การหาลำดับเบสยีน *rap-1* ของมาลาเรียไก่จำเป็นต้องศึกษาค้นคว้าเพื่อออกแบบและผลิตไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. gallinaceum* โดยตรง

## 5.2 อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้เชื้อมาลาเรียไก่ที่ฉีดเข้าได้ผิวหนังจะปรากฏในกระแสเลือดช้ากว่าเชื้อที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ โดยมีระยะฟักตัวนาน 7 และ 3 วันตามลำดับ Garnham (1966) รายงานว่าเชื้อ *P. gallinaceum* ที่เข้าสู่ทางใต้ผิวหนังของสัตว์ปีกที่เป็นโฮสต์ต้องผ่านชั้นตอนที่เชื้อแบ่งตัวใน macrophage, fibroblast และ/หรือ endothelial cell ที่ผนังหลอดเลือดก่อนจะเข้าเม็ดเลือดแดงและถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือด แต่เชื้อที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดสามารถเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงใหม่ได้โดยตรง และยังขึ้นกับปัจจัยอื่นหลายประการเช่น อายุของโฮสต์ substrain ของเชื้อ ปริมาณเชื้อ และวิธีการฉีดเข้าสัตว์ เป็นต้น ระยะฟักตัวของเชื้อ *P. gallinaceum* โดยเฉลี่ยใช้เวลา 2.7-9 วัน ขึ้นกับวิธีการที่ฉีดเข้าตัวสัตว์ ถ้าฉีดเข้าทางหลอดเลือด ระยะฟักตัวจะสั้นกว่าวิธีอื่น นอกจากนี้ยังขึ้นกับปริมาณของเชื้อที่ให้ ถ้าใช้เชื้อในปริมาณมาก ระยะฟักตัวจะสั้น สามารถตรวจพบในกระแสเลือดได้เร็วกว่าการให้เชื้อในปริมาณน้อย Huff (1952) ทำการทดลองฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* จำนวนน้อยๆ(2-3 ตัว) เข้าทางหลอดเลือดพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตในกระแสเลือดได้โดยตรงและแบ่งตัวแบบไม่มีเพศ(schizogony) อยู่ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงครบวงจรรอบทุก 36 ชั่วโมง จึงตรวจพบเชื้อมีปริมาณสูงสุดในเที่ยงคืน และเที่ยงวันสลับกันไป ขณะที่ Soni และ Cox (1974) ทดลองฉีดเชื้อเข้าทางผิวหนังไก่ด้วยปริมาณเชื้อที่แตกต่างกัน พบว่าฉีดเชื้อด้วยปริมาณ  $10^6$ - $10^8$  เริ่มตรวจพบเชื้อในวันที่ 3-4 โดยถ้าให้เชื้อในปริมาณ  $10^6$  ระดับเชื้อจะขึ้นสูงสุดในวันที่ 9 แต่ถ้าให้เชื้อในปริมาณ  $10^8$  ไก่มักตายเร็ว ระดับเชื้อในกระแสเลือดไม่แน่นอน นอกจากนี้ Garnham (1966) เคยรายงานไว้ว่า ระดับเชื้อในกระแสเลือด อัตราการติดเชื้อ และอัตราการตายของไก่ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ขึ้นกับอายุและน้ำหนักสัตว์ด้วยเช่นกัน ไก่อายุน้อยและน้ำหนักต่ำกว่า 250 กรัม ระดับเชื้อจะขึ้นได้สูงมาก อัตราการติดโรคและตาย 100% เมื่อสัตว์อายุและน้ำหนักมากขึ้น ระดับเชื้อที่ปรากฏในกระแสเลือดจะไม่สูงนัก และอัตราการติดเชื้อต่ำลงเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่ติดเชื้อเลยในไก่ที่โตเต็มที่

สำหรับการใช้เชื้อปริมาณต่างๆฉีดเข้าไก่ทดลองในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไก่ทดลองได้รับเชื้อตั้งแต่ 6 ถึง  $6 \times 10^4$  ตัว มีอัตราการติดโรค 100% ระยะฟักตัวเฉลี่ย 5.2 วัน ไก่ที่ได้รับเชื้อ

ปริมาณมากมีระยะฟักตัวสั้นกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อในปริมาณต่ำ(รูปที่ 4.3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Soni และ Cox (1974)

การเตรียมและแยกเชื้อมาลาเรียไก่อระยะสปอโรซอยต์ในต่อมน้ำลายยุงลาย(*Aedes aegypti*) และภายในโอโอซิสต์ของกระเพาะอาหารส่วนกลาง ปกติเชื้อมาลาเรียระยะที่เป็นสปอโรซอยต์จะแตกออกจากโอโอซิสต์ไปทั่วร่างกายของซึ่งโดยมากจะไปรวมกันอยู่ที่ต่อมน้ำลายยุง แต่เนื่องจากการทดลองนี้ต้องการใช้ สปอโรซอยต์มาสกัดดีเอ็นเอให้มากที่สุดจึงทำการแยกเอาสปอโรซอยต์จากทั้งต่อมน้ำลายและกระเพาะอาหารส่วนกลางของยุงในวันที่ 13 หลังจากยุงดูดเลือดไก่ที่มีเชื้อ วิธีการแยกสปอโรซอยต์ให้บริสุทธิ์ประยุกต์มาจาก Ozaki และคณะ (1984) พบว่า glasswool สามารถเป็นตัวกรองกั้นเซลล์ต่อมน้ำลายและกระเพาะของยุงทำให้ลดการปนเปื้อนของสปอโรซอยต์ได้มากกว่าวิธีอื่น(รูปที่ 4.24) และสปอโรซอยต์ที่ได้อาจมีชีวิตอื่น โดยทั่วไปสปอโรซอยต์สามารถอาศัยอยู่ในต่อมน้ำลายเป็นเวลาหลายสัปดาห์หรือหลายเดือนแต่จะมีจำนวนลดลงเรื่อยๆขึ้นกับจำนวนครั้งที่ยุงดูดน้ำหวานหรือเลือด และจะลดลงประมาณ 90% หลังจาก 1 เดือน(Garnham, 1966)

สำหรับการแยกเชื้อมาลาเรียออกจากเม็ดแดงไก่ในครั้งนี้นับว่า เม็ดเลือดแดงที่มีระดับการติดเชื้อมากกว่า 80% สามารถทำให้แตกได้ง่ายด้วยการแช่แข็งข้ามคืน และทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธีการปั่นด้วยความเร็วต่างกัน(differential centrifugation) จากหลายรายงานกล่าวว่า เชื้อ *P. gallinaceum* ในระยะแรกเริ่มที่เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง เชื้อที่มีขนาดเล็กมักเกาะติดกับนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไก่อย่างหนาแน่น แต่เมื่อเชื้อมีขนาดใหญ่ขึ้นและระดับเชื้อสูงมากขึ้นเรื่อยๆ มีผลกระทบทำให้ใช้เม็ดเลือดแดงใช้อาหารของเซลล์โฮสต์โดยการเปลี่ยน pyruvate เป็น lactate มากขึ้น เมื่ออาหารภายในเซลล์ของโฮสต์ลดลง เชื้อมาลาเรียจึงพร้อมที่จะแตกออกมานอกเซลล์เพื่อหาเซลล์ใหม่ที่ยังมีอาหารสมบูรณ์ ทำให้ความสามารถในการยึดติดกับนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงน้อยลง(Garnham, 1966 ; Greenwood *et al.*, 1978 ; McGhee, 1988) นอกจากนี้จากภาวะของน้ำเลือดที่เปลี่ยนแปลงไปจึงทำให้เม็ดเลือดแดงปกติที่ไม่มีเชื้ออาศัยอยู่แตกตัวได้ง่ายเช่นกัน ดังนั้นการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกครั้งนี้จึงอาศัยทฤษฎีของการแช่แข็งและการทำละลาย(Mazur, 1970) เพื่อให้เม็ดเลือดแดงที่มีและไม่มีเชื้ออยู่ในสภาพเปราะบาง เกิดการแตกออกและเชื้อออกมานอกเซลล์ การปั่นแยกเชื้อออกจากเซลล์ของโฮสต์อาศัยแนวความคิดที่ว่าวัตถุนั้นกว่าจะใช้แรงปั่นในการทำให้ตกตะกอนน้อยกว่า นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของไก่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ของเชื้อมาลาเรียหลายเท่าจึงสามารถปั่นให้ตะกอนได้โดยใช้แรงปั่นน้อยกว่า เซลล์ของเชื้อมาลาเรียสามารถปั่นให้ตกตะกอนได้ด้วยความเร็ว 21,728xg นาน 30 นาที การศึกษาครั้งนี้นับเป็นรายงานการแยกบริสุทธิ์เชื้อมาลาเรียไก่อระยะที่ไม่มีเพศในเม็ดเลือดแดงได้เป็นผลสำเร็จ



การขยายจำนวนดีเอ็นเอที่มีรหัสการสร้าง SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียไก่ไอโซเลท NJTH2539, Csth2542 และ Csth2543 อุณหภูมิ annealing ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนั้น ได้ทดลองใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 50, 53, 58 และ 60 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสให้ผลดีที่สุด โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด เนื่องจากอุณหภูมิ จุดหลอมเหลว ( $T_m$ ) ของไพรเมอร์ที่ออกแบบคือ 60 องศาเซลเซียส ดังนั้นการใช้อุณหภูมิ annealing ที่ต่ำกว่าค่า  $T_m$  ของไพรเมอร์เล็กน้อยจะทำให้การเข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (template) ได้ดีขึ้นจึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมากขึ้น

ลำดับเบสดีเอ็นเอของมาลาเรียไก่ไอโซเลท NJTH2539, Csth2542 และ Csth2543 ที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองนี้มีความยาวจำนวน 279 เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบส ดีเอ็นเอของมาลาเรียในสัตว์ปีก 3 ชนิดจาก GenBank พบว่าลำดับเบสดังกล่าว มีความเหมือนกับ มาลาเรียไก่ชนิด *P. gallinaceum* 100% คล้ายกับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. lophurae* 56.2% และ คล้ายกับ *P. relictum* 58.0% นั่นคือเชื้อมาลาเรียที่มีการระบาดในไก่กระทงและไก่ไข่ทั้ง 3 ไอโซเลทจึงเป็นเชื้อมาลาเรียชนิด *P. gallinaceum*

การที่ได้ทราบว่าเป็นเชื้อมาลาเรียไก่ทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นเชื้อมาลาเรียชนิด *P. gallinaceum* จึงเป็นข้อสันนิษฐานยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยทางสัตวฐานวิทยาได้แต่เนื่องจากไพรเมอร์ที่ออกแบบและนำมาใช้เพิ่มจำนวนยีน SSUrRNA ครั้งนี้ได้ออกแบบให้มีความจำเพาะต่ำด้วยการอาศัยลำดับเบส ของยีนดังกล่าวจาก conserve region ที่สามารถจับกับเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีก 3 ชนิดคือ *P. gallinaceum*, *P. lophurae* และ *P. relictum* เชื้อมาลาเรียในคนชนิด *P. falciparum* และเชื้อ มาลาเรียในไพรเมทชนิด *P. fragile* ดังนั้นไพรเมอร์ดังกล่าวจึงสามารถจับกับเชื้อมาลาเรียชนิด อื่นๆหลายชนิด ซึ่งครอบคลุมถึงเชื้อมาลาเรียในคน สัตว์ปีก สัตว์แทะและไพรเมทเกือบทุกชนิด ดังแสดงในตารางที่ ผ1 และ ผ2 ในภาคผนวก ดังนั้นในการที่จะนำไปทำเป็นชุดตรวจสอบเพื่อการ วินิจฉัยหาความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียชนิด *P. gallinaceum* การศึกษาความหลากหลายทาง ชีวภาพ(biodiversity) ในไก่และเชื้อในยุ้งจึงจำเป็นต้องออกแบบไพรเมอร์อีกคู่หนึ่งที่มีความจำเพาะต่อเชื้อชนิดนี้เพื่อที่จะนำไปใช้เป็น specific diagnostic primer สำหรับ *P. gallinaceum* จึงจะทราบได้ว่ามาลาเรียไก่ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยนั้นเกิดจากเชื้อชนิด *P. gallinaceum* เท่านั้นหรือเกิดจากเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นด้วย นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการ screen โรคนี้ในสัตว์ปีกอื่นที่นำเข้ามาจากต่างประเทศหรือนกป่าที่นำเข้ามาเลี้ยง ทั้งนี้เพื่อ ป้องกันการแพร่ระบาดของโรคมมาลาเรียไก่ที่เลี้ยงในทางอุตสาหกรรม(Feldman *et al.*, 1995 ; McConkey *et al.*, 1996)

เนื่องจากยีนที่มีลำดับการสร้าง SSUrRNA เป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการสร้าง rRNA ที่เป็น องค์ประกอบสำคัญของ ribosome อันมีหน้าที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตทั้งหลายเกี่ยวกับการสังเคราะห์

โปรตีน การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีนจะมีผลต่อการทำงานและโครงสร้างของ ribosome สิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษใกล้เคียงกันจึงมีความแตกต่างของลำดับเบสน้อยมาก ในขณะที่เดียวกันสิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษใกล้เคียงกันก็ยังคงมีความคล้ายของลำดับเบสในยีนดังกล่าวด้วยเช่นกัน Goman และคณะ(1991) ศึกษาลำดับสมบูรณของยีน SSUrRNA ของเชื้อ *P. malariae* พร้อมกับเปรียบเทียบกับ SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น พบว่ายีนดังกล่าวมีลำดับเบสเป็น 2 ส่วน คือ variable region และ conserve region และใช้ลำดับเบสส่วนที่จำเพาะต่อ *P. malariae* นำไปออกแบบเป็น specific diagnostic probe สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ได้ เช่นเดียวกันกับการทดลองนี้ โดยปกติแล้วลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SSUrRNA มีความ conserve การเปลี่ยนแปลงภายในโครงสร้างระหว่างไรโบโซมของเชื้อแต่ละชนิดมีน้อยมาก ความต่างนี้รวมถึงไรโบโซมซึ่งพบได้มากในเชื้อ *Plasmodium* จึงเป็นสาเหตุให้มีการพัฒนางาน diagnostic probe ที่ใช้ลำดับของยีน SSUrRNA โดยการมีส่วนต่าง(variable part) ของลำดับยีนมาเปรียบเทียบ

ในการทดลองใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน *rap-1* ของเชื้อ *P. falciparum* นำมาขยายดีเอ็นเอของยีน rhoptry associated protein-1(*rap-1*) ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท NJTH2539 ปรากฏว่าไม่สามารถขยายดีเอ็นเอของเชื้อดังกล่าวได้อาจเนื่องมาจากสาเหตุ 2 ประการคือ ประการแรกเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท NJTH2539 อาจไม่มียีน *rap-1* ประการที่สอง ไอโซเลท NJTH2539 อาจมียีน *rap-1* แต่มีลำดับเบสแตกต่างกันกับยีน *rap-1* ของเชื้อ *P. falciparum* ดังนั้นความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้จึงไม่สามารถขยายจำนวนดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบจาก NJTH2539 ในทุกสภาวะความเข้มข้นที่ทดลอง

Sam-Yellowe(1996) กล่าวว่าโดยทั่วไป rhoptry ที่ isolate จาก zoite ของ apicomplexan เช่น *P. falciparum*, *Eimeria*, *Babesia* และ *Toxoplasma* พบว่ามีลักษณะที่ share high density ของ 1.13-1.18 g/ml โดยโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จาก rhoptry ลักษณะเป็น complex mixture ของ polypeptides (Perkins, 1992) ซึ่ง polypeptides ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มโรคได้(Doury *et al.*, 1994 ; Sam-Yellow *et al.*, 1995) Howard และคณะ(1993) ทำการศึกษาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของ rhoptry ซึ่งมีมวลโมเลกุล 82 kDa หรือที่เรียกว่า p82(protein 82) หรือ *rap-1* ซึ่งสามารถยับยั้งการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง อีกทั้งในสัตว์พบว่าสามารถมีภูมิคุ้มต่อเชื้อได้ ลำดับดีเอ็นเอที่เปรียบเทียบกันของยีน *rap-1* จาก 2 ไอโซเลท มีลักษณะทางพันธุกรรม แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่ามีลำดับเบสคล้ายคลึงกันมากโดยมีส่วนที่เหมือนกันเหมือนกันมากกว่า 99% และระหว่าง allele ทั้ง 2 นี้ส่วนของยีนมีทั้งที่เป็นส่วนของ repetitive และ non-repetitive ดังนั้นจึงเป็นที่เชื่อกันว่าถ้ามีการกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่สามารถยับยั้ง epitope ที่อยู่บน p82 ได้ แอนติบอดีนี้จะทำให้คนที่

ติดเชื้อมาลาเรียมี protective immunity ต่อเชื้อแต่ละไอโซเลตได้ Scholfield และคณะ(1986) ศึกษาซีรัมของคนป่วยด้วย *P. falciparum* พบว่ามีแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน p82 โดยมี epitope อยู่ที่ N-terminal half ของ p82 ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโน 7 ชนิดคาดกันว่าเป็นส่วนที่มีคุณสมบัติเป็น immunogen มากที่สุดของโมเลกุล

ตามปกติ rhoptry จะหลั่งสารโปรตีนและของเหลวที่ใช้ขณะเข้าสู่เซลล์ ที่ apical complex ของ *Plasmodium* ซึ่งจะถูกรหัสด้วย multigene families ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ร่วมกันบางส่วน (share structure and function) ดังนั้นหากใช้ความรู้ในส่วนนี้มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถขยายจำนวนยีนนี้ได้ทั้งใน *Plasmodium* และ *Babesia* น่าจะมีความเป็นไปได้ที่ product ที่ได้มีความเกี่ยวข้องกับยีนดังกล่าว rap-1 multigene families มีการกำหนดโดยดูจาก amino acid ที่ conserve 306 ตัว ที่ N-terminal นอกจากนี้พบว่า rhoptry epitope ของ *P. falciparum* นั้นเป็นมีความจำเพาะต่อระยะของเชื้อและไม่ conserve กันระหว่างระยะเมอโรซอยต์และสปอโรซอยต์ rhoptry component มีลักษณะที่จำเพาะเฉพาะชนิดของปรสิตที่อยู่ในไฟลัมเดียวกัน มีความแตกต่างกันแม้จะอยู่ในสกุลเดียวกันก็ตาม จึงเป็นคำตอบที่ว่าทำไมไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน rap-1 ของ *P. falciparum* จึงไม่สามารถขยายจำนวนยีน rap-1 ของเชื้อ *P. gallinaceum* ได้

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ชิต ศิริวรรณ และชัยศิริ มหันตชัยสกุล 2541 Highlight สุขภาพสัตว์ จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ปีที่ 7 ฉบับที่ 2 ประจำเดือนมีนาคม-เมษายน
- ทัศนีย์ ชมภูจันทร์ ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์ และชัยศิริ มหันตชัยสกุล 2538 การระบาดของโรคมาลาเรียในไก่กระทง จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ปีที่ 4 เล่มที่ 6 ประจำเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม
- ปิยนุช ประสิทธิ์รัตน์ และ ทัศนีย์ ชมภูจันทร์ 2541 มาลาเรีย วิกฤตการณ์ใหม่ในไก่ไข่ จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ปีที่ 7 ฉบับที่ 3 ประจำเดือน พฤษภาคม-มิถุนายน

### ภาษาอังกฤษ

- Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege JR. 1978. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasites. *Journal of Cell Biology*; 77 : 72-82.
- Akhil BV, Rama A and Kathleen S. 1989. Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 35;97-108.
- Ananias AE and Francisco JA. 1994. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium* , derived from rRNA gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91; 11373-11377.
- Bannister LH, Butcher GA, Dennis ED and Mitchell GH. 1975. Structure and invasive behavior of *Plasmodium knowlesi* merozoites in vitro. *Parasitology*. 71; 483-491.
- Bannister LH and Dluzewski AR. 1990. The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections : a review. *Blood Cells*. 16:2-3; 257-292.
- Beasley SJ. 1972 *Plasmodium gallinaceum* : comparative infection rates in *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus*. *Experimental Parasitology*. 32, 11-20.

- Briones MR, Nelson K, Beverley SM, Affonso HT, Camargo EP and Floeter-Winter LM. 1992. *Leishmania tarentorae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 53(1); 121-127.
- Campbell GH, Miller LH, Hudson D, Franco EL, Andrysiak PM. 1984. Monoclonal antibody characterization of *Plasmodium falciparum* antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* ; 33 : 1051-1054.
- Campbell NA, Reece JB and Mitchell LG. 1999. *Biology* 5<sup>th</sup> edition. An imprint of Addison Wesley Longman, Inc. 1175 p.
- Carret W, Walas F, Carcy B, Grande N, Precigout E, Moubri K, Schetters and Gorenflot A. 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46(3); 298-303.
- Carter R and Gwadz, R.W., (1980). Infection and gamete immunization in malaria. In *Malaria: Immunization* (Kreier, J.P., ed) Academic Press, New York, vol.3: 263.
- Chae J, Lee J, Kwon O, Holman PJ, Waghela SD and Wagner GG. 1998. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene variable(V4) region among and within geographic isolates of *Theileria* from cattle, elk and white-tail deer. *Veterinary Parasitology*. 75(1); 41-52.
- Clyde DF, Most H, McCarthy V and Vanderberg JP. 1973. Immunization of man against sporozoite-induced *falciparum* malaria. *American Journal of Medical Science* 266; 169-177.
- Coatney GR, Cooper WC. 1944. The prophylactic effect of sulfadiazine and sulfaguanidine against mosquito-borne *Plasmodium gallinaceum* infection in the domestic fowl , preliminary report. *Public Health Reports* ; 59: 1455-1458.
- Coatney GR, Cooper WC. 1948. Symposium on exoerythrocytic forms of malarial parasites. III. The chemotherapy of malaria in relation to our knowledge of exoerythrocytic forms. *Journal of Parasitology*.; 34:275-289.

- Coatney GR, Cooper WC, Eddy NB, Greenberg J. 1953. Survey of antimalarial agents chemotherapy of *Plasmodium gallinaceum* infections, toxicity, correlation of structure and action. Public Health Service Publication 193 and Public Health Monographs 9, Washington.
- Conway DJ. 1997. Natural selection on polymorphic malaria antigens and the search for a vaccine. *Parasitology Today*. 13, 1 ; 26-29.
- Crawford RD. 1984. Domestic fowl, in evolution of domesticated animals, 1<sup>st</sup> edition. L. Mason London NewYork : Longman, p. 298-311.
- Davey DG. 1946. The use of avian malaria for discovery of drugs effective in the treatment and prevention of human malaria. I . Drugs for clinical treatment and clinical prophylaxis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* ; 40 : 52-73.
- Davey DG. 1946. The use of avian malaria for the discovery of drugs effective in the treatment and prevention of human malaria. II. Drugs for causal prophylaxis and radical cure or the chemotherapy of exo-erythrocytic forms. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* ; 40 : 453-471.
- Davis LGD, Kuehl WM and Battey JF.1994. Basic method in molecular biology. 2nd edition. Library of congress cataloging in publication data. Printed in USA. 777 p.
- Deans JA, Thomas AW, Alderson T, Cohen S. 1984. Biosynthesis of a putative *Plasmodium knowlesi* merozoite antigen. *Molecular and Biochemical Parasitology* ; 11 : 189-204.
- Dorothy E, Shippen-Lentz and Anne CV. 1988. The three 5S rRNA genes from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* are linked. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 27;263-274.
- Doury JC; Bonnefoy S; Roger N; Dubremetz JF and Mercereau-Puijalon O. 1994. Analysis of the high molecular weight rhoptry complex of *Plasmodium falciparum* using monoclonal antibodies. *Parasitology*. 108 ; 269-280.
- Dyorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. 1975. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* ; 187 : 748-749.
- Etzion Z, Murray MC and Perkins ME. 1991. Isolation and characterization of rhoptries of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 47; 51-62.

- Feldman RA, Freed LA and Cann RL. 1995. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Molecular Ecology*. 4; 663-673.
- Freeman RR, Tredosiewicz AJ, Cross GAM. 1980. Protective monoclonal antibodies recognizing stage specific merozoite antigens of a rodent malaria parasite. *Nature* ; 284 : 366-368.
- Freier JE and Friedman S. 1987. Effect of *Plasmodium gallinaceum* infection on the mortality and body weight of *Aedes aegypti* (Diptera: CULICIDAE). *Journal of Medicine Entomology*. vol 24, No 1:6-10. January.
- Garnham, P.C.C.(1966). *Malaria parasites and other haemosporidia*. Blackwell, Oxford.
- Gilbert SC and Hill AVS. 1997. Protein particle vaccine against malaria. *Parasitology Today*, vol 13, No 8; 302-306.
- Goman M, Mons B and Scaife J. 1991. The complete sequence of a *Plasmodium malariae* SSUrRNA gene and its comparison to other plasmodial SSUrRNA genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 45 ; 281-288.
- Gozar MM and Bagnara AS. 1995. An organelle-like small subunit ribosomal RNA gene from *Babesia bovis*: nucleotide sequence secondary structure of the transcript and preliminary phylogenetic analysis. *International journal of Parasitology*. 25 (8); 929-938.
- Greenwood BN, Stratton D and Willison WA. 1978. A study of the role of immunological factors in the pathogenesis of the anaemia of acute malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 72(4) ;378-385.
- Grotendorst CA, Cater R, Rosenberg R and Koontz LC. 1986. Complement effects on the infectivity of *Plasmodium gallinaceum* to *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Immunology*. vol 136, No 11 June 1.
- Gwadz RW. 1982. Animal model for malaria research. *Immunoparasitology: Principle and methods in malaria and schistosomiasis research*. edited by G. Thomas Strichland, M.D., Ph.d.
- Gwadz RW, Cochrane AH, Nussenzweig V and Nussenzweig RS. 1979. Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. *Bulletin of WHO* 57(suppl1.); 165-173.

- Harnyuttanakorn P, McBride JS, Donachie S, Heidrich Hg and Ridley RG. 1992. Inhibitory monoclonal antibodies recognize epitopes adjacent to a proteolytic cleavage site on the RAP-1 protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 55; 177-186.
- Hernandez R, Rios P, Valdes AM and Pinero D. 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 41(2) ;207-212.
- Holder AA, Freeman RR. 1981. Immunization against blood stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature*. 294; 361-364.
- Holder AA, Freeman RR, Uni S, Aikawa M. 1985. Isolation of *Plasmodium falciparum* rhoptry protein. *Molecular and Biochemical Parasitology* ; 14 : 293-303.
- Howard RF, Stanley HA, Campbell GH, Reese RT. 1984. Protein responsible for a punctate fluorescence pattern in *Plasmodium falciparum* merozoites. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* ; 33 : 1055-1059.
- Howard RF, Jensen JB and Franklin HL. 1993. Reactivity profile of human anti-82-kilodalton rhoptry protein antibodies generated during natural infection with *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*. July ; 2960-2965.
- Huff CG. 1952. Studies on the exo-erythrocytic stage of *Plasmodium gallinaceum* during the transitional phase. *Experimental Parasitology*. 1;392-405.
- Huff CG. 1965. Susceptibility of mosquitos to avian malaria. *Experimental Parasitology*. 16, 107-132.
- Jakobsen PH, Lemnge MM, Abu-Zeid YA, Msangeni HA, Salum FM, Mhina JIK, Akida JA, Ruta AS, Ronn AM, Heegaard PMH, Ridley RG and Bygbjerg IC. 1996. Immunoglobulin G reactivities to rhoptry-associated Protein-1 associated with decreased levels of *Plasmodium falciparum* parasitemia in Tanzanian children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.55(6) : 642-646.
- Janse CJ and Waters AP. 1995. *Plasmodium berghei*: The application of cultivation and purification techniques to molecular studies of malaria parasites. *Parasitology Today*. 11; 4; 138-143.



- Jarvi SI, Schultz JJ and Atkinson CT. 1999. Direct submission. Submitted (26-April-1999) Wildlife Disease Laboratory, PIERC USGS-BRD, Crater Rim Drive, Hawaii Volcanoes National Park. 96718, USA.
- Jeffrey TJ, Susan MA, Thomas U, Odile P and Dyann FW. 1989. Characterization of conserved extrachromosomal element isolates from the avian malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Molecular and Cellular Biology*. Sept; 3621-3629.
- Levines, ND. 1989. Bird Malaria. *Veterinary Protozoology*. Iowa State University Press Ames. USA. P. 265-240.
- Knell AJ. 1991. Malaria: A publication of the tropical program of the wellcome trust. Oxford New York Tokyo. Oxford University Press. 94 p.
- Knudsen AB and Slooff R. 1992. Vectore-borne disease problems in rapid urbanization : New approaches to vector control. *Bulletin of WHO*. 70 ; 1-6.
- Korbsrisate S, Mongkolsuk S, Haynes JR, Wong Q and Sirisinha S. 1992. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from *Opisthorchis viverrini*. *Parasitology*. 104(4); 323-329.
- Laird M. 1997. Avian malaria in Asian tropical subegion. Springer-Verlag Singapore Pte.Ltd. 130 p.
- Levine ND. 1985. *Veterinary Protozoology*. Iowa State University Press Ames. P. 265-295.
- Liang HQ, Normal H, Lee G, Leslie C, Monique N and Jean-Pierre B. 1986. Phylogeny of helminths determined by rRNA sequence comparison. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 20;93-99.
- Lonergan KM and Gray MW. 1994. The ribosomal RNA gene region in *Acanthamoeba castellanii* mitochondrial DNA. A case of evolutionary transfer of introns between mitochondria and plastids. *Journal of Molecular and Biology*. 239(4); 476-499.
- Mazur P. 1970. Cryobiology : The freezing of biology systems. *Science*. 168 ; 939-949.
- McConkey GA, Jun LL, Roger MJ, Seeley DC, Graczyk TK, Cranfield MR and McChutchan TF. 1996. Parasite diversity in an endemic region for avian malaria and identification of a parasite causing penquin mortality. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 43: 5 ; 393-399.

- McGhee RB. 1988. Major animal models in malaria research: Avian. In: Principle & Practical of Malariology. Vol 2 ;1545-1575.
- Michael G, Barend M and John S. 1991. The complete sequence of a *Plasmodium malariae* SSUrRNA gene and its comparison to other plasmodium SSUrRNA genes. Molecular and Biochemical Parasitology. 45;281-288.
- Novati S, Sironi M, Granata S, Bruno A, Gatti S, Scaglia M and Bandi C. 1996. Direct sequencing of the PCR amplified SSUrRNA gene of *Entamoeba dispar* and the design of primers for rapid differentiation from *Entamoeba histolytica*. Parasitology. 112(4); 363-369.
- Ozaki LS, Gwadz RW and Godson GN. 1984. Simple centrifugation method for rapid separation of sporozoites from mosquitoes. Journal of Parasitology 70(5); 831-833.
- Perkins ME. 1989. Erythrocyte invasion by the malarial merozoites : recent advances. Experimental Parasitology ; 69 : 94-99.
- Perkins ME. 1992. Rhoptry organelles of Apicomplexan parasites. Parasitology Today. 8 :1 ; 28-32.
- Perrin LH, Merkli B, Loche L, Chizzolini C, Smart J, Richie R. 1984. Antimalarial immunity in *Saimiri* Monkeys. Immunization with surface components of asexual blood stages. Journal of Experimental Medicine ; 160 : 441.
- Perrin LH, Ramirez E, Lambert PH, Meischer PA. 1981. Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies. Nature ; 289 : 301-303.
- Qari SH, Shi YP, Pieniazek NJ, Collins WE and Lal AA. 1996. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequence; monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Molecular Phylogenetic Evolution. 6(1); 157-163.
- Rieckmann KH, Beaudoin RL, Cassels JS and Sell KW. 1979. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against *falciparum* malaria. Bulletin of WHO 57(suppl.1); 261-2655.
- Ridley RG, Takacs B, Etlinger H, Scaife JG. 1990b. A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* is protective in *Saimiri* monkeys. Parasitology. 101; 187-192.

- Ridley RG, Takacs B, Lahm H-W, Deves CJ, Goman M, Certa U, Matile H, Woollett GR and Scaife JG. 1990a. Characterization and sequence of a protective rhoptry antigen from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41; 125-134.
- Roger N, Dubremetz J-F, Deplace P, Fortier B, Tronchin G and Vernes A. 1988. Characterization of a 255 kilodalton rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 27; 135-142.
- Sambrook.J.,Maniatis.T., and Fritsch.E.F. (1989) *Molecular cloning a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.
- Sam-Yellowe TY. 1996. Rhoptry organelles of the Apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitology Today*.12:8;308-316.
- Sam-Yellowe TY, Shio H and Perkins ME. 1988. Secretion of *Plasmodium falciparum* rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes. *The Journal of Cell Biology*. 106; 1507-1513.
- Saul A, Cooper J, Hauquitz D. 1992. The 42 kilodalton rhoptry-associated protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 50; 139-150.
- Schmidt GD and Robert LS. 1989. *Foundation of Parasitology*. 4<sup>th</sup> edition. Times Mirror/Mosby. College publishing. USA.
- Schofield L, Bushell GR, Cooper JA, Saul AJ, Upcroft JA and Kidson C. 1986. A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* contains conserved and variable epitopes recognized by inhibitory monoclonal antibody. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 18; 183-195.
- Siddiqui WA, Tam LG, Kramer KJ, Hui GSN, Case SE, Yamaga KM, Chang SP, Chan EBT and Kan S. 1987. Merozoite surface coat precursor protein completely protect Aotus monkey against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 84; 3014-3018.
- Soni JL and Cox HW. 1974. Pathogenesis of acute avian malaria I. Immunologic reaction associated with anemia, splenomegaly and nephritis of acute *Plasmodium gallinaceum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 23 ; 577-585.
- Susan ML, Jeffrey TJ and Dyann FW. 1989. Sequence identification of cytochrome *b* in *Plasmodium gallinaceum*. *Molecular and Cellular Biology*. Sept; 1614-1620.

- Thathy V, Severson DW and Christensen BM. 1994. Reinterpretation of the genetics of susceptibility of *Aedes aegypti* to *Plasmodium gallinaceum*. *Journal of Parasitology*. 80(5) ; 705-12
- van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC and Ebeling SB. 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. 51(1); 133-142.
- van Spaendonk RM, McConkey GA, Ramesar J, Gabrielian A, McCutchan TF, Jane CJ and Waters AP. 1999. Identification of transcription initiation site of the asexually expressed rRNA genes of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 99(2); 193-205.
- Waters AP. 1994. The ribosomal RNA genes of *Plasmodium*. *Advances in Parasitology*. 34; 33-79.
- Waters AP, Higgins DG and McCutchan TF. 1991. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian malaria and human hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 3140-3144.
- Waters AP, Unnasch TR, Wirth DF and McCutchan TF. 1989. Sequence of small ribosomal RNA gene from *Plasmodium lophurae*. *Nucleic Acid Research*. 17(4) ; 1763.
- Weathersby AB. 1960. Experimental infection of *Aedes aegypti* with exo-erythrocytic stage of *Plasmodium gallinaceum*. *Experimental Parasitology*, 9 ; 334-337.
- World Health Organization. 1990. World malaria situation. *Wkly Epidem Rec*. 25(22 June) ; 189.
- Zarlenga DS, Lichtenfels JR and Stringfellow F. 1994. Cloning and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene from *Nematodirus battus*. *Journal of Parasitology*. 80(2); 342-344.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ก. น้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ใช้สารเคมีหลายชนิดมาผสมกันเป็นสารละลายต่างๆ นำไปใช้ในงานทดลองที่แตกต่างกันออกไป น้ำที่ใช้ในการเตรียมสารทั้งหมดเป็นน้ำที่ผ่านการกรองมาแล้วสองครั้ง (double distilled water) สารละลายที่ใช้และวิธีการเตรียมสารเป็นดังนี้

### สารเคมี

#### 0.5 M EDTA pH 8.0

เติม disodium ethylenediamine tetra-acetate 186.1 กรัม ลงในน้ำกลั่นสองครั้ง ( $2H_2O$ ) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH (NaOH เม็ด ~ 20 กรัม) พร้อมกับคนด้วย magnetic stirrer อย่างแรงจนสารเข้ากัน ฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

#### Ethidium bromide (10 mg/ml)

เติม ethidium bromide 1 กรัม ลงในน้ำ 100 มิลลิลิตร คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลานานหลายชั่วโมงจนกว่าจะมั่นใจว่า ethidium bromide ละลายเข้ากับน้ำจนหมด ใช้ aluminium foil ปิดภาชนะที่ใช้บรรจุเก็บสารในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

#### 1 M $MgCl_2$

ละลาย  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  จำนวน 203.3 กรัม ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave

ข้อสำคัญ :  $MgCl_2$  นั้นมีความเป็น extremely hygroscopic การซื้อจึงควรซื้อที่ปริมาณการบรรจุน้อยเช่น ขนาดบรรจุ 100 กรัม เวลาใช้ไม่ควรเปิดขวดนาน

#### Phenol : Chloroform

ผสม phenol และ chloroform เข้ากันในปริมาตรเท่ากัน ทำให้ส่วนผสมดังกล่าวสมดุล (equilibrate) ของส่วนผสมดังกล่าวโดยการสกัดซ้ำหลายครั้งด้วย 0.1 M Tris•Cl (pH 7.6) เก็บส่วนที่ผ่านการ equilibrate แล้วใน 0.01 M Tris•Cl (pH 7.6) ปริมาตรเท่ากันที่ 4 °C บรรจุในขวดสีชา

#### Phosphate-buffered saline (PBS)

ละลาย NaCl จำนวน 8 กรัม, KCl 0.2 กรัม,  $Na_2HPO_4$  1.44 กรัม และ  $KH_2PO_4$  จำนวน 0.24 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1

ลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave 20 นาทีที่ความดัน 15 lb/sq จากนั้นสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้

### 3 M Sodium acetate pH 5.2

ละลาย sodium acetate  $3\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 408.1 กรัม ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.2 ด้วย glacial acetic acid ปรับปริมาตรของสารละลายให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อด้วย autoclave 20 นาทีที่ความดัน 15 lb/sq

### 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS (electrophoresis grade) 100 กรัม เข้ากับน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนถึง  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  เพื่อให้ความสามารถในการละลายดีขึ้น เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แล้วแบ่งสารตามปริมาตรที่ต้องการ

### 1 M Tris Cl(pH 8.0)

ละลาย Tris base 121.1 กรัม ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ใช้ HCl เข้มข้นในการปรับ pH ให้ได้ 8.0 เติมน้ำให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร นำไป autoclave 20 นาทีที่ความดัน 15 lb/sq

### Proteinase K

ละลาย Proteinase K หนัก 20 มิลลิกรัมลงในน้ำ 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลายหลอด เก็บไว้ในตู้เย็น  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

### 5XTris-borate (TBE)

ความเข้มข้นของ stock solution ใน 1 ลิตร

5X : 54 g Tris base

27.5 g Boric acid

20 ml 0.5 EDTA (pH 8.0)

ก่อนใช้นำมาทำให้เจือจาง(working solution)

Working solution 0.5X : 0.045 M Tris-borate

0.01 M EDTA

ละลาย Tris base 54 กรัม กรด Boric 27.05 กรัม ลงใน 800 มิลลิลิตร คนจนสารละลายหมด เติมน้ำ 0.5 M EDTA(pH 8.0) ลงไป 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

### 6X Gel loading buffer

ละลาย bromophenol blue 0.25 กรัม Xylene cyanol FF 0.025 กรัม และน้ำตาลซูโครส 4 กรัม ลงในน้ำ 10 มิลลิลิตร คนให้ละลายแบ่งใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

### สีที่ใช้ย้อมแผ่นฟิล์มเลือด

#### Stock giemsa

ใช้ข้อดักสารอันเล็กดักสี( 6 กรัม)ใส่ลงในครกบดสีที่ละเอียด เต็มกลีเซอริน ลงทีละน้อยบดให้เข้ากันทำอย่างนี้เรื่อยๆประมาณว่าให้เต็มกลีเซอริน ครบ 250 มิลลิลิตรพอดีกับเต็มสีครบ 6 กรัม ใช้กลีเซอรินที่เหลือที่เหลือ 250 มิลลิลิตร ในการล้างอุปกรณ์บดสี กลีเซอรินจะมีลักษณะค่อนข้างเหนียวเพราะเป็นน้ำเชื่อม(น้ำตาลโมเลกุลคู่) นำสีที่ได้(giemsa+กลีเซอริน) ไปบ่มที่ 56 องศาเซลเซียสในเครื่อง water bath เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง(overnight) แล้วนำมาเติม methanol 500 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เขียนวัน เดือน ปี ชื่อผู้เตรียมติดไว้ข้างขวด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือนจึงนำออกมาใช้ย้อมได้ซึ่งสี giemsa powder 6 กรัม ใช้เตรียม giemsa ได้ 1 ลิตร

#### Buffer

Buffer สำหรับการเตรียมสี Giemsa

#### สารละลาย A

ละลาย  $\text{NaHPO}_4$  9.464 กรัมและ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  23.876 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### สารละลาย B

ละลาย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  9.073 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### การเจือจางสีสำหรับย้อมแผ่นฟิล์มเลือด

Buffer สำหรับนำมาเจือจางสี giemsa ได้จากการผสมกันของ Solution A : Solution B : giemsa stain ในอัตราส่วน 5:4:1 (ผสมก่อนใช้)



**ข. รายละเอียดของขั้นตอนและผลการแยกเชื้อมาลาเรียไก่ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง**

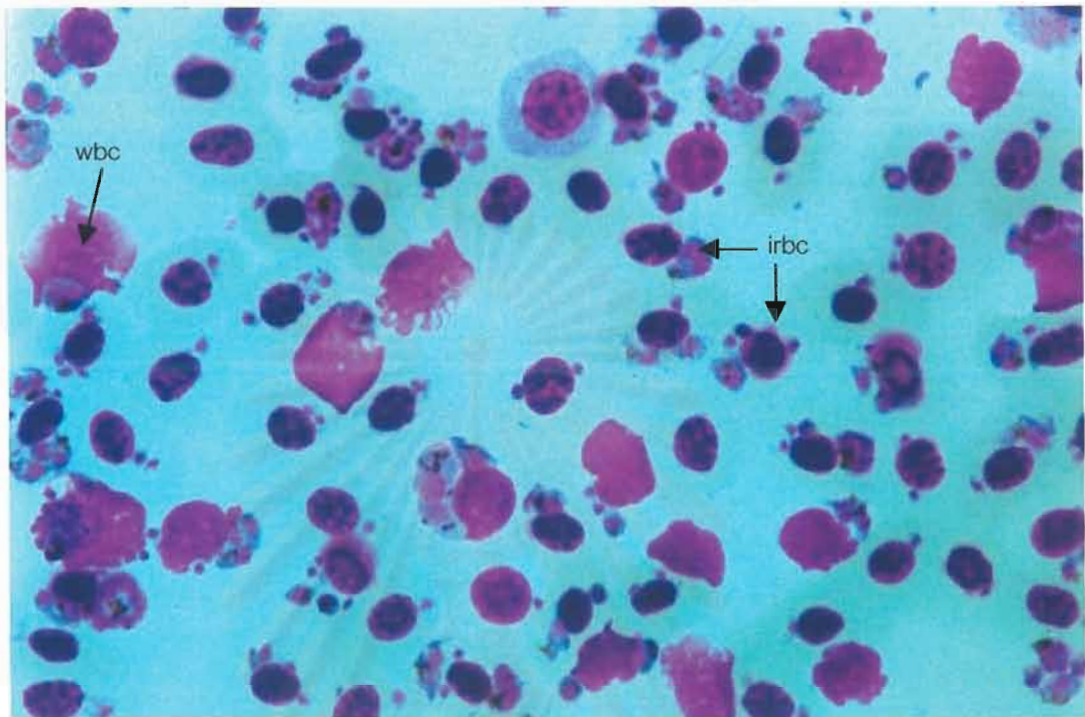
เลือดไก่อหลังจากล้างด้วย PBS สภาพเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวมีผนังสมบูรณ์เชื้อ  
ระยะไม่มีเพศอยู่ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงมีลักษณะปกติ(รูปที่ ผ1)

ภายหลังจากการปั่นและแช่ที่  $-20$  องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมงชั้นบนสุด(ชั้น buffy coat)  
เม็ดเลือดขาวรวมตัวกันหนาแน่นกันมาก(รูปที่ ผ2) และมีเม็ดสีมาลาเรีย (malarial pigment) ปน  
อยู่เล็กน้อย ในชั้นเม็ดเลือดแดง ภายหลังจากแช่แข็งพบว่าเม็ดเลือดแดงแตก เมอร์โรซอยต์ เม็ดสี  
มาลาเรียและนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงกระจายอยู่ทั่วไป เม็ดเลือดขาวจำนวนหนึ่งปนอยู่  
ประปราย

ตะกอนที่ได้จากการปั่นที่  $3,214 \times g$  นาน 5 นาที พบนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง และเมอร์  
โรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียจำนวนมากปนกันอยู่(รูปที่ ผ3 และ ผ4)

สารส่วนบนซึ่งได้จากการปั่น  $3,214 \times g$  เมื่อนำมาปั่นต่อที่ความเร็ว  $4,629 \times g$  นาน 5 นาที  
ตะกอนประกอบด้วยนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงและเมอร์โรซอยต์ปนอยู่เล็กน้อย (รูปที่ ผ5)

สารส่วนบนจากการปั่น  $4,629 \times g$  เมื่อนำมาปั่นต่อที่ความเร็ว  $12,857 \times g$  นาน 10 นาที ตก  
ตะกอนส่วนใหญ่เป็นนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงและมีเชื้อปนอยู่บ้าง(รูปที่ ผ6) และสารส่วนบนที่  
ได้เมื่อบั่นต่อที่ความเร็ว  $21,728 \times g$  นาน 30 นาที ส่วนที่ตกตะกอนเป็นเชื้อมาลาเรียระยะไม่มีเพศ  
ในเลือดตรวจพบนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงปนอยู่น้อยกว่า  $0.001\%$  (รูปที่ ผ7)

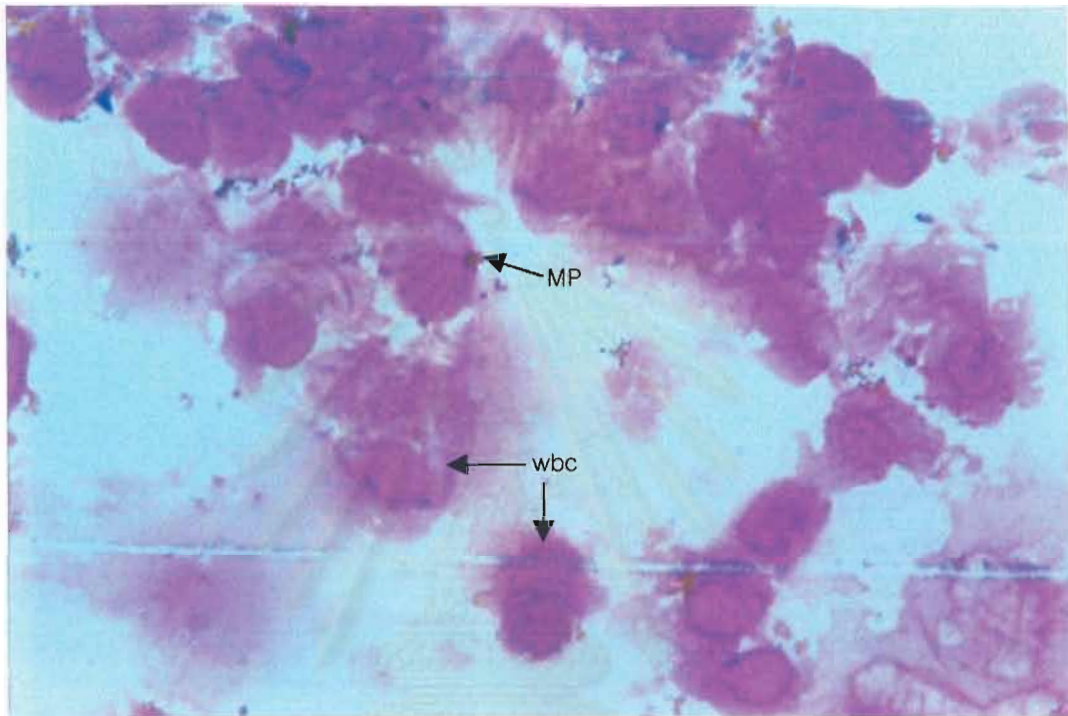


รูปที่ ๘1 ฟิล์มเลือดบางย้อมสียิมซ่า 10% เตรียมจากเลือดที่ล้างด้วย PBS กำลังขยาย 4,000 เท่าระดับการติดเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงไ้สูงกว่า 80%

wbc=เม็ดเลือดขาว

irc=เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียในไซโตพลาซึม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

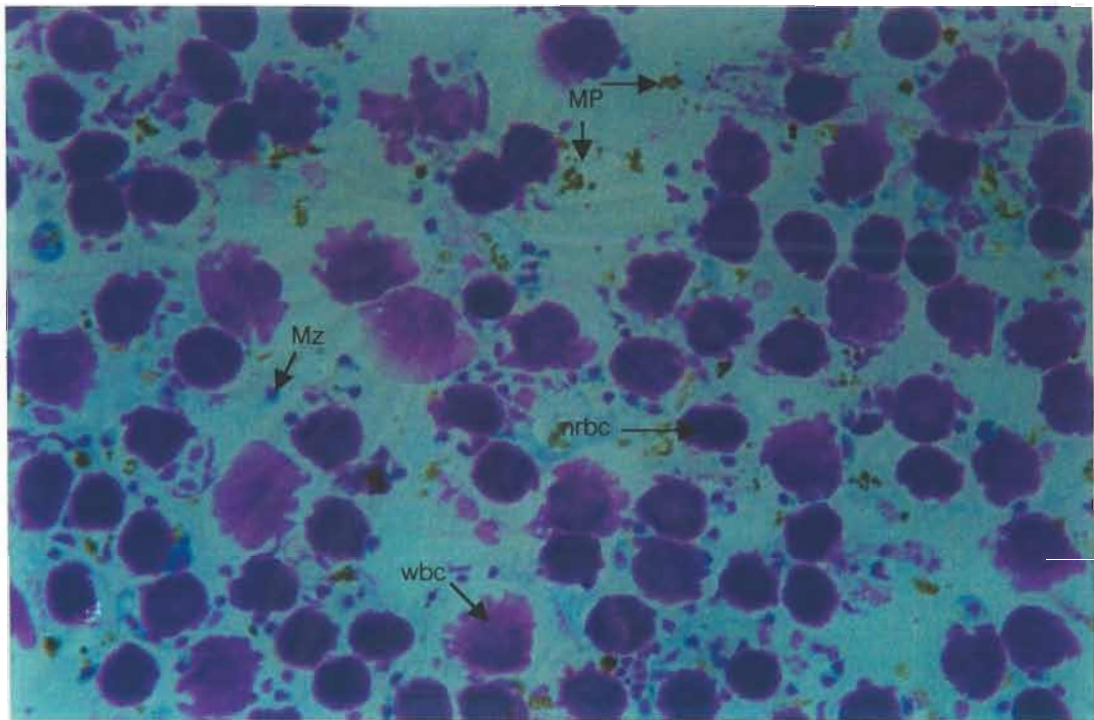


รูปที่ ผ2 फिल्मเลือดบางย้อมสีิมซำ 10% เตรียมจากชั้นเม็ดเลือดขาวภายหลังการแช่ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  นาน 8 ชั่วโมง กำลังขยาย 4,000 เท่า

wbc=เม็ดเลือดขาว

MP=malarial pigment

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ๘3 พิล์มเลือดบางย้อมสียิมซำ 10% เตรียมจากตะกอนส่วนล่างที่ได้จากการปั่นเม็ดเลือดแดงที่ 3,214xg ที่ 4 °C นาน 5 นาที กำลังขยาย 4,000 เท่า

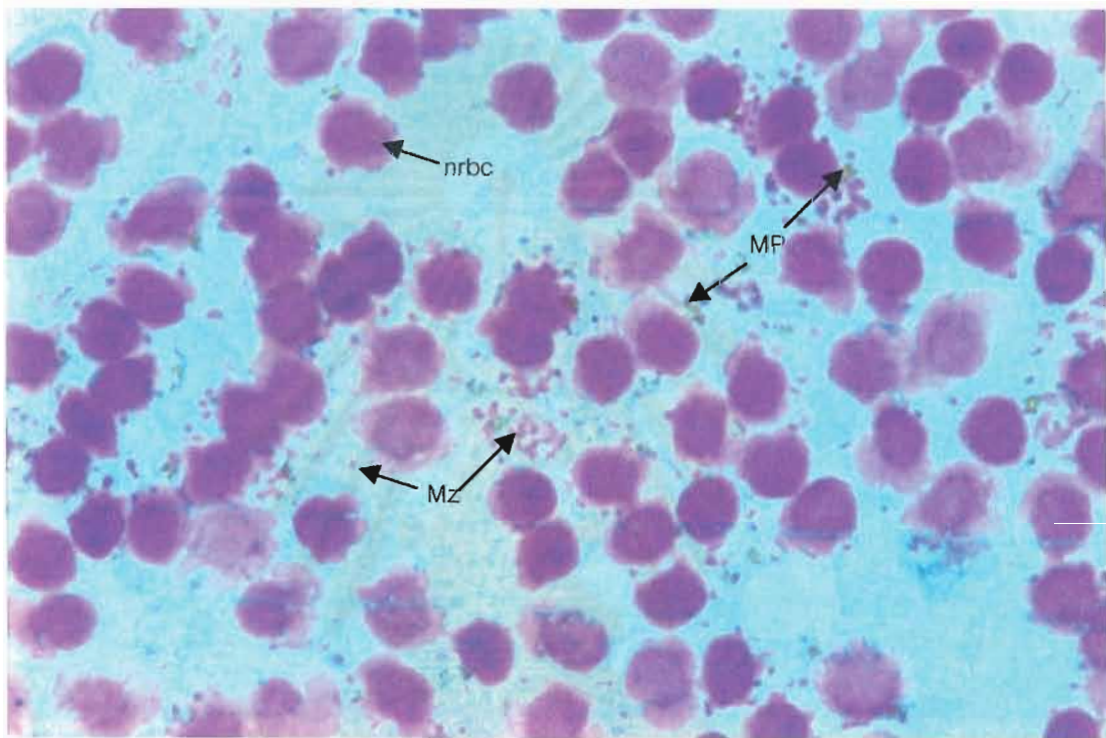
wbc=เม็ดเลือดขาว

MP=malarial pigment

nrbc=นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง

Mz=merozoite ของเชื้อมาลาเรียไก่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



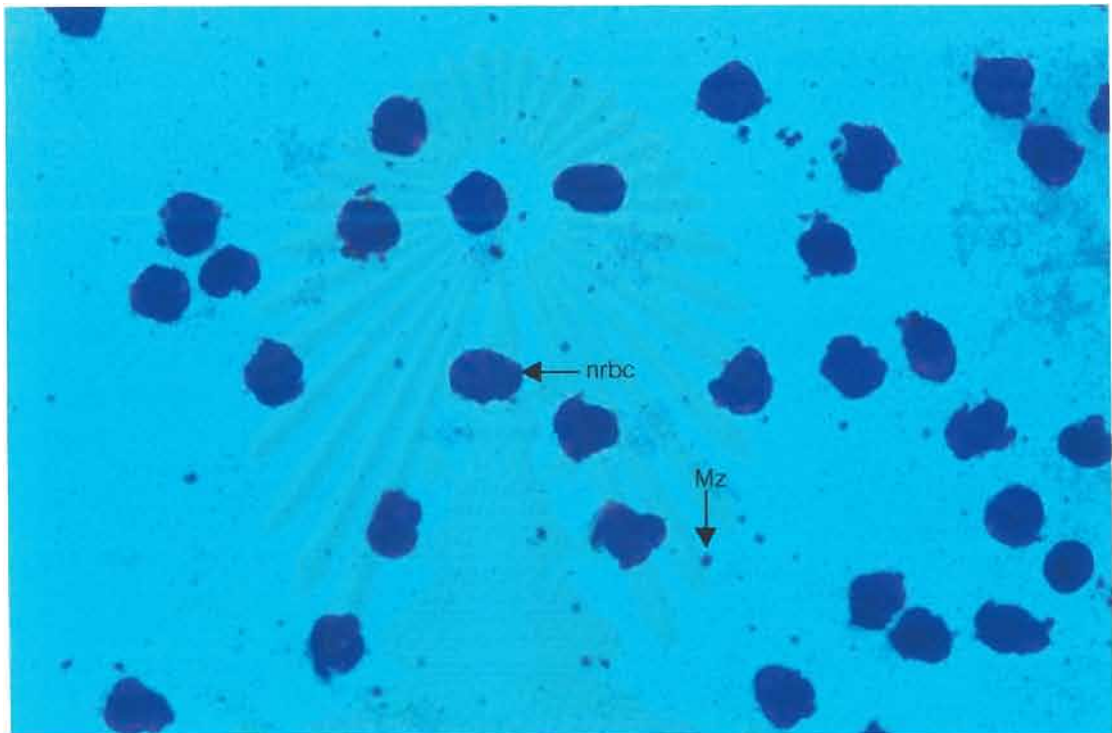
รูปที่ ๘4 फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซา 10% เตรียมจากตะกอนส่วนบนที่ได้จากการปั่นเม็ดเลือดแดงที่ 3,214xg ที่ 4 °C นาน 5 นาที กำลังขยาย 4,000 เท่า

MP=malarial pigment

Mz=merozoite ของเชื้อมาลาเรียไก่

nrbc=นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง

สงวนลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย



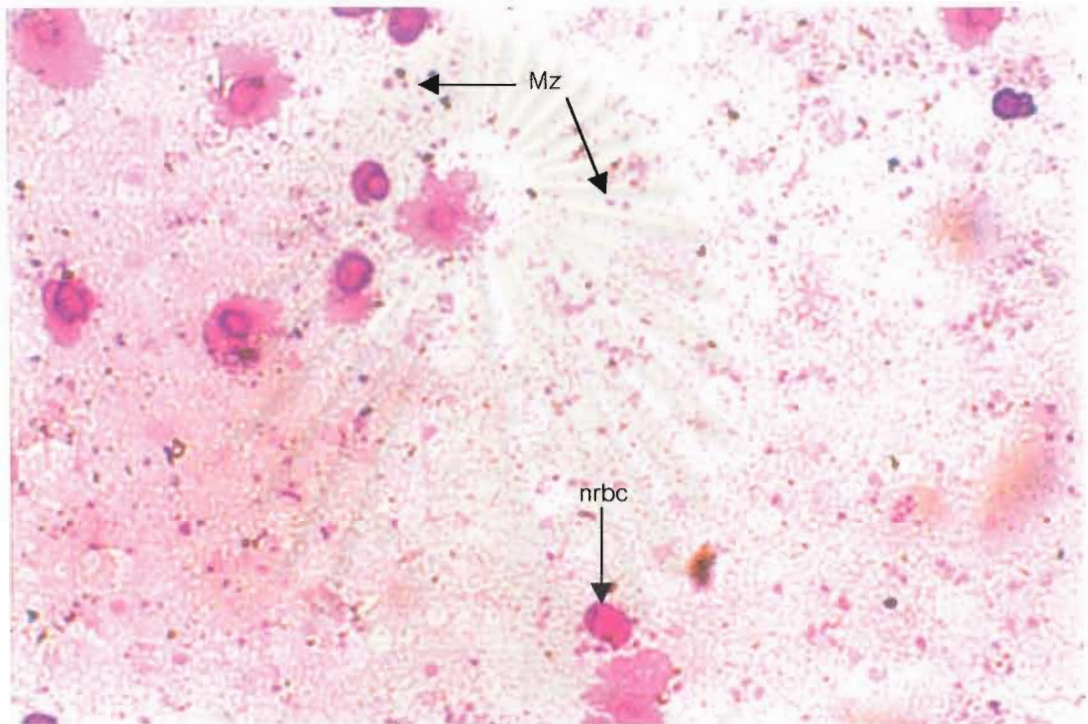
รูปที่ ๗5 फिल्मเลือดบางย้อมสียิมซึก 10% เตรียมจากตะกอนที่ปั่นด้วยความเร็ว 4,629xg  
นาน 5 นาที กำลังขยาย 4,000 เท่า

MP=malarial pigment

Mz=merozoite ของเชื้อมาลาเรียไก่

nrbc=นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

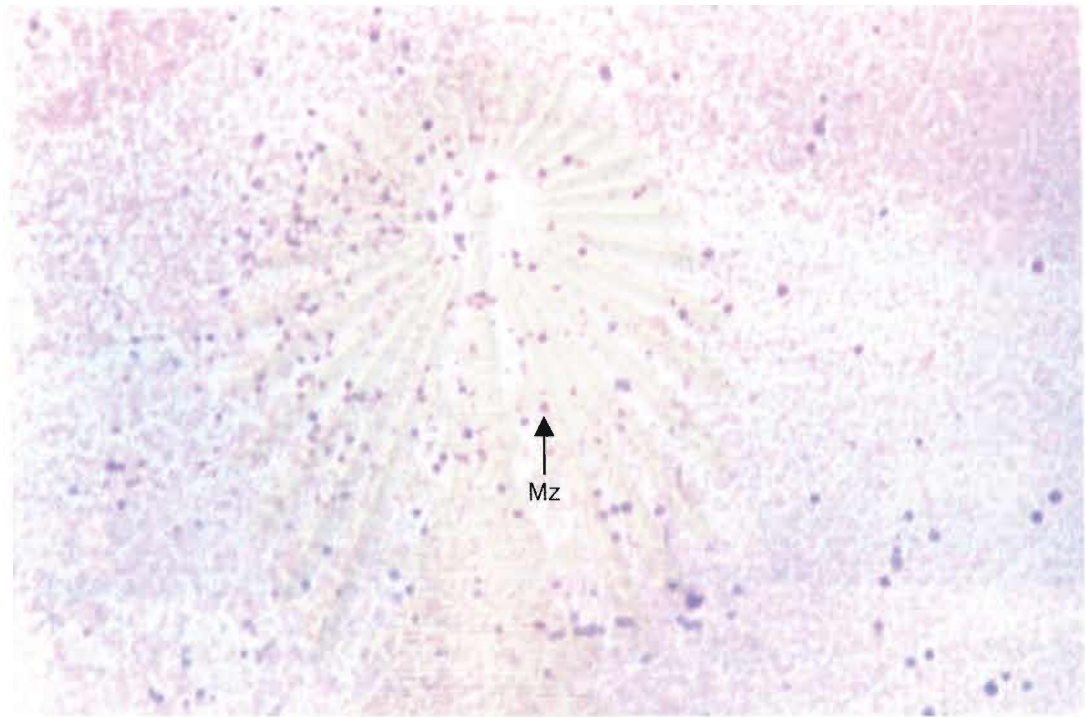


รูปที่ ผ6 फिल्मเลือดบางย้อมสีิมซา 10% เตรียมจากตะกอนที่ปั่นด้วยความเร็ว 12,857xg นาน 5 นาที กำลังขยาย 4,000 เท่า

MP=malarial pigment

Mz=merozoite ของเชื้อมาลาเรียไก่

nrbc=นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง



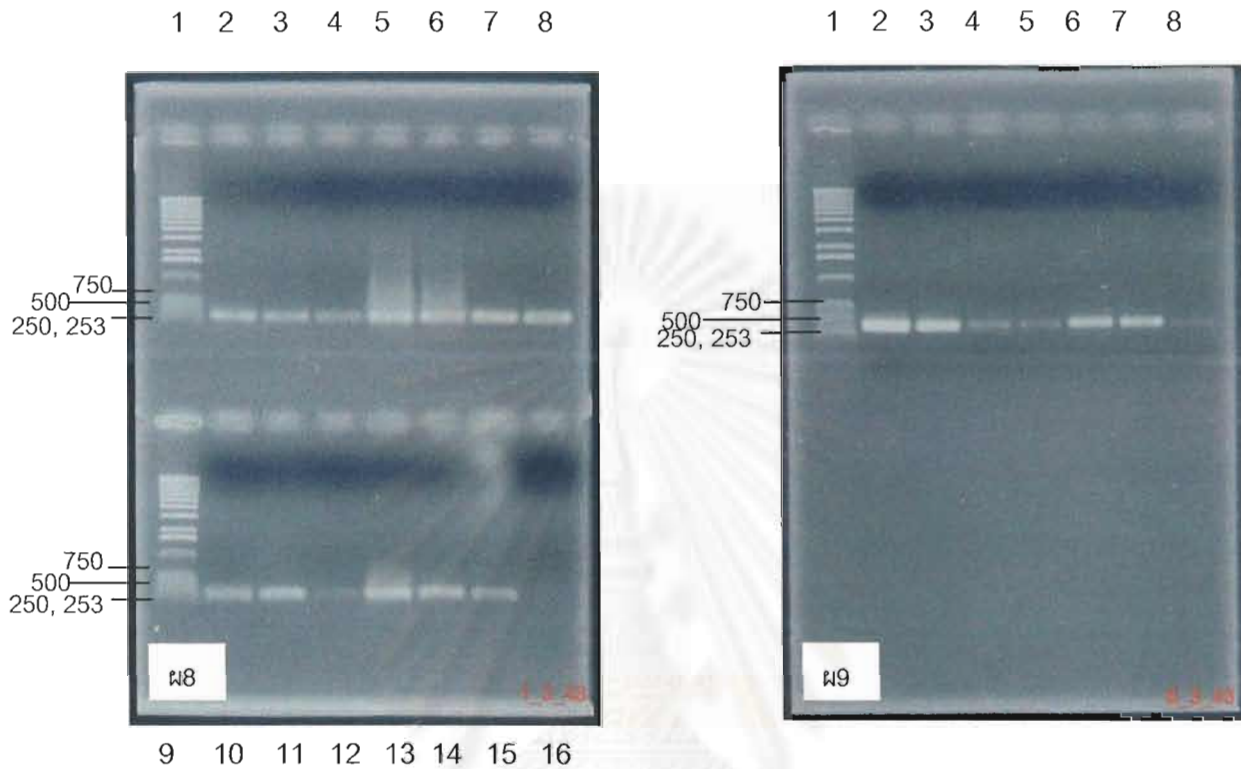
รูปที่ ๗7 फिल्मเลือดบางย้อมสีิมซำ 10% เตรียมจากตะกอนที่ปั่นด้วยความเร็ว 21,728xg นาน 5 นาที กำลังขยาย 4,000 เท่า

Mz=merozoite ของเชื้อมาลาเรียไก่

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ค. ภาพถ่ายจากการทดลองการเพิ่มจำนวนยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียไก่



รูปที่ ผ8 ภาพถ่าย agarose 0.8%, 80 โวลต์, 25 นาที

แถบที่ 1 = DNA Marker 9 = DNA Marker

(1 kb ladder)

(1 kb ladder)

2= Csth2542.1 1:5

10= Csth2543.1 1:5

3=Csth2542.1 1:10

11=Csth2543.1 1:10

4=Csth2542.1 1:100

12=Csth2543.1 1:100

5= Csth2542.2 1:5

13= Csth2543.2 1:5

6= Csth2542.2 1:10

14= Csth2542.2 1:10

7= Csth2542.2 1:100

15= Csth2542.2

8= negative control

1:100

16= negative control

รูปที่ ผ9 agarose 0.8%, 80 โวลต์, 25 นาที

แถบที่ 1 = DNA marker(1 kb ladder)

2= Csth2542 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 1

3=Csth2543 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 1

4=Csth2542 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 2

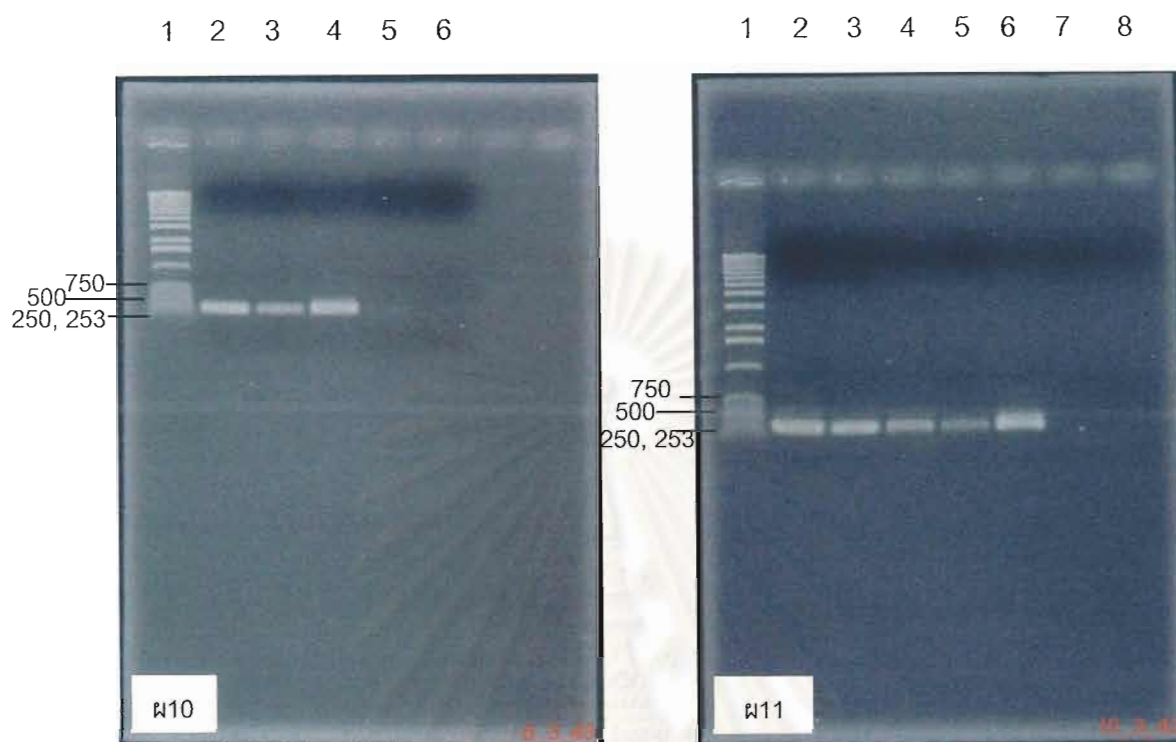
5= Csth2543 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 2

6= Csth2542 (ผลิตภัณฑ์ PCR)

7= Csth2543 (ผลิตภัณฑ์ PCR)

8= negative control ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยานี้ใช้ไม่

ได้เพราะมีการปนเปื้อนใน negative control



รูปที่ ฝ10 ภาพถ่าย agarose gel 0.8%, 80 โวลต์ 25 นาที

แถบที่ 1 = DNA Marker(1 kb ladder)

2= C5TH2542

3=C5TH2543

4= *P. falciparum* สายพันธุ์ T9/94RC17 เจือจาง 1:10

5= เลือดไก่ที่ไม่มีการติดเชื้อมาลาเรีย

6= negative control

รูปที่ ฝ11 agarose 0.8%, 80 โวลต์, 25 นาที แถบที่ 1 = DNA Marker(1 kb ladder)

2= C5TH2542 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 1

3=C5TH2543 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 1

4=C5TH2542 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 2

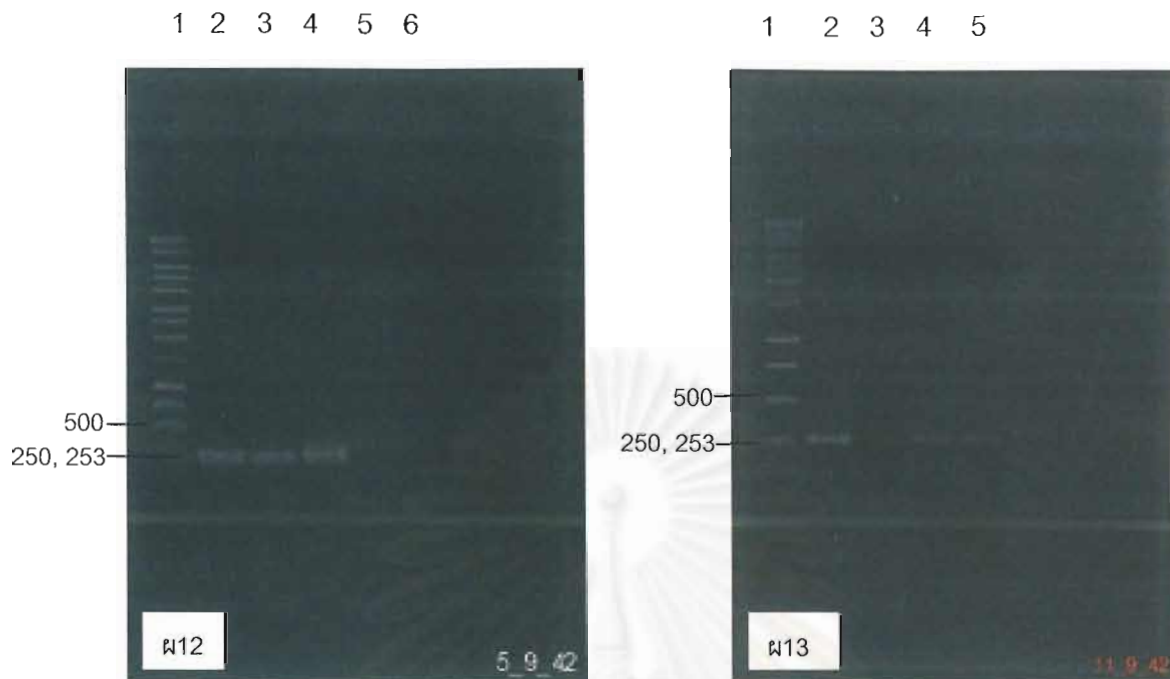
5= C5TH2543 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 2

6= *P. falciparum* สายพันธุ์ T9/94RC17 เจือจาง 1:10,

จาง 1:10,

7= เลือดไก่ที่ไม่มีการติดเชื้อมาลาเรีย

8= negative control



รูปที่ 12 ภาพถ่าย agarose gel 1.5%, 100

โวลต์ 40 นาที

แถบที่ 1 = DNA Marker(1 kb ladder)

2= NJTH2539.1

3=NJTH2539.2

4= *P. falciparum* สายพันธุ์ T9/94RC17 เจือ

จาง 1:10

5= เลือดไก่ที่ไม่มีการติดเชื้อมาลาเรีย

6= negative control

รูปที่ 13 ภาพถ่าย agarose gel 1.5%, 100

โวลต์ 40 นาที

แถบที่ 1 = DNA Marker(1 kb ladder)

2= NJTH2539 ตัวอย่างที่ 1 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 1

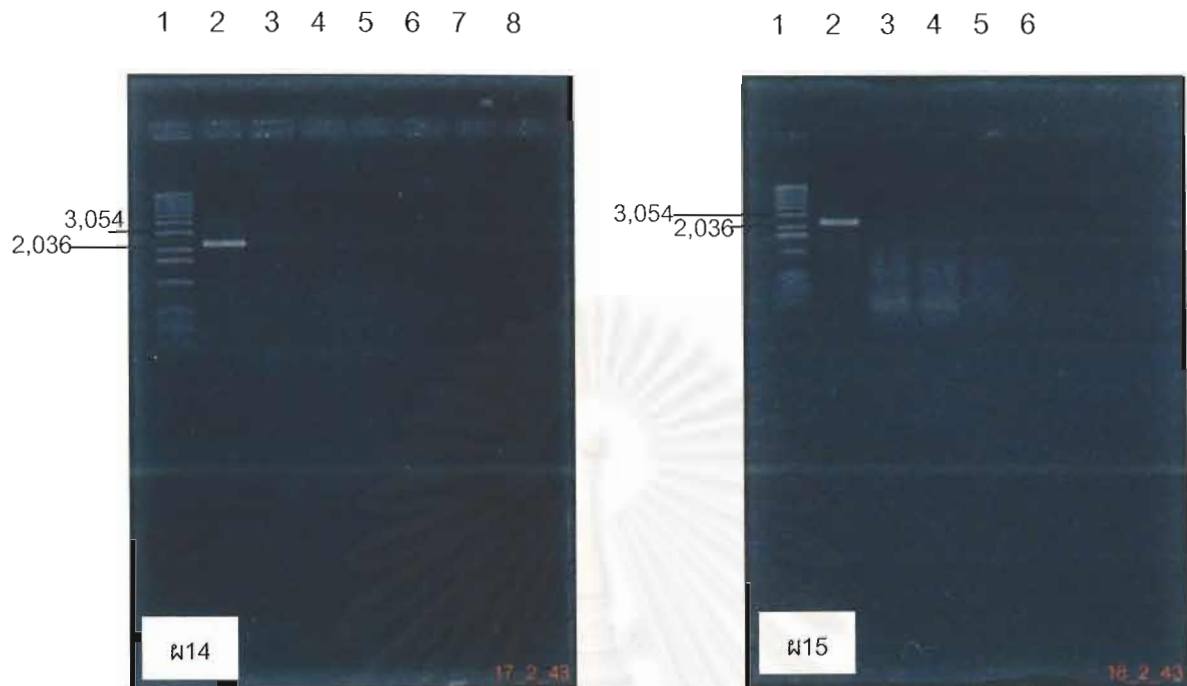
3= NJTH2539 ตัวอย่างที่ 2 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 1

4= NJTH2539 ตัวอย่างที่ 1 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 2

5= NJTH2539 ตัวอย่างที่ 2 แยกบริสุทธิ์ครั้งที่ 2

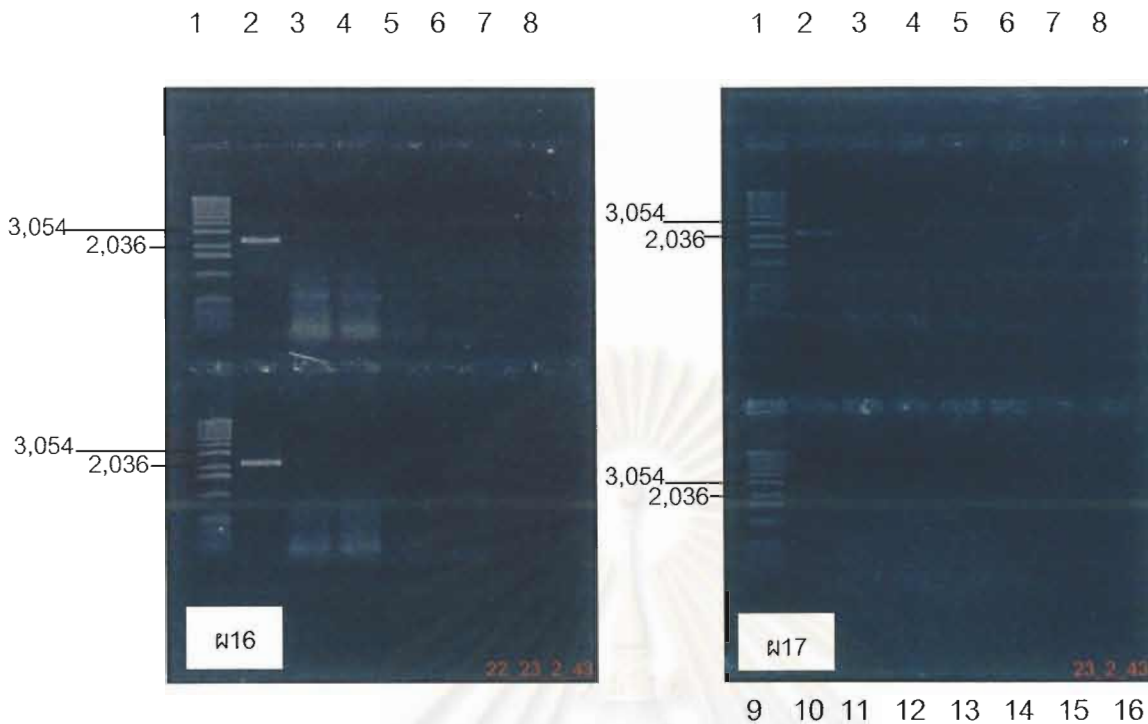
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ง. ภาพถ่ายจากการทดลองการเพิ่มจำนวนชิ้น *rap-1* ของ NJTH2539



รูปที่ ผ14 ภาพถ่าย agarose gel 0.8% 80 โวลต์ 25 นาที ใช้อุณหภูมิ anneal ที่ 50 °C  
 แถบที่ 1 = DNA Marker(1 kb ladder)  
 2= *P. falciparum* สายพันธุ์ T9/94RC17 เจือจาง 1:10  
 3 = เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:5  
 4= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:10  
 5= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:100  
 6= negative control

รูปที่ ผ15 ภาพถ่าย agarose gel 0.8% 80 โวลต์ 25 นาที ใช้อุณหภูมิ anneal ที่ 30 °C  
 แถบที่ 1 = DNA Marker(1 kb ladder)  
 2= *P. falciparum* สายพันธุ์ T9/94RC17 เจือจาง 1:10  
 3= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:5  
 4= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:10  
 5= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:100  
 6= negative control



**รูปที่ 16** ภาพถ่าย agarose gel 0.8% 80 โวลต์ 25 นาที ใช้อุณหภูมิ anneal ที่ 25 °C

แถบที่ 1 = DNA marker(1 kb ladder)

2= *P. falciparum* สายพันธุ์ T9/94RC17 เจือจาง 1:10

3= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:5

4= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:10

5= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:100

6= negative control

**รูปที่ 17** ภาพถ่าย agarose gel 0.8% 80 โวลต์ 25 นาที ใช้อุณหภูมิ anneal ที่ 40 °C

แถบที่ 1 = DNA Marker(1 kb ladder)

2= *P. falciparum* สายพันธุ์ T9/94RC17 เจือจาง 1:10

3= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:5

4= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:10

5= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:100

6= negative control

แถบที่ 9-14 ใช้อุณหภูมิ anneal ที่ 20 °C

9= DNA marker(1 kb ladder)

10=*P. falciparum* สายพันธุ์ T9/94RC17 เจือจาง 1:10

11= เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:5

12=เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:10

13=เชื้อมาลาเรียโกไอโซเลข NJTH2539 เจือจาง 1:10

14= negative control

## จ. การวิเคราะห์ลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตต่างๆในฐานข้อมูลซึ่งมีลักษณะเปรียบเทียบกับเชื้อมาลาเรียได้

จากการค้นหาลำดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ไพรเมอร์สำหรับ NJTH2539, CSTH2542 และ CSTH2543 สามารถเข้าจับได้เพิ่มเติมโดยการให้โปรแกรม BLASTN 2.0.9 [May-07-1999] จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) National Library of Medicine National Institutes of Health มีดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตต่างๆที่จับได้ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ ๗1 แสดงดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆที่ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (forward primer) สำหรับ NJTH2539, CSTH2542 และ CSTH2543 สามารถเข้าจับได้

---

Sequences producing significant alignments:

---

Sequences producing significant alignments:

gb|U72542|PKU72542 *Plasmodium knowlesi* small subunit riboso...  
 emb|AL010278|PFSC04100 *Plasmodium falciparum* DNA \*\*\* SEQUEN...  
 gb|U93233|PVU93233 *Plasmodium vivax* 18S ribosomal RNA gene,...  
 gb|L48987|PFASSURA *Plasmodium ovale* small subunit ribosomal...  
 gb|M14599|PFARGSS *P.berghei* small subunit rRNA gene.  
 gb|M19712|PFARGDC *P.berghei* 18S rRNA C subunit gene.  
 emb|X13706|PLRNASSU *Plasmodium lophurae* ribosomal RNA small...  
 gb|U03079|PVU03079 *Plasmodium vivax* Sal 1 blood stage small...  
 gb|M61723|PFARRSSAE *Plasmodium gallinaceum* asexually expres...  
 gb|M19172|PFARGEA *P.falciparum* 18S ribosomal RNA in asexual...  
 gb|U03080|PVU03080 *Plasmodium vivax* SAL 1 sporozoite small ...  
 gb|U72541|PIU72541 *Plasmodium inui* small subunit ribosomal ...  
 emb|X13926|PVRNSSU *Plasmodium vivax* small subunit (SSU) rR...  
 gb|U07368|PVU07368 *Plasmodium vivax* El Salvador sporozoite ...  
 gb|L07559|PFARRXX *Plasmodium cynomolgi* rRNA sequence.  
 gb|L08241|PFARNASSA *Plasmodium cynomolgi* small subunit rRN...  
 emb|AJ001527|PMNGARRNA *Plasmodium ovale* small subunit ribos...  
 gb|U93234|PVU93234 *Plasmodium vivax* sporozite 18S ribosomal...  
 gb|U83877|PVU83877 *Plasmodium vivax* small subunit ribosomal...  
 emb|X99790|PORIBORNA *P.ovale* rRNA gene  
 gb|M19173|PFARGE B *P.falciparum* 18S ribosomal RNA not in ase...  
 gb|L48986|PFASSUR *Plasmodium ovale* clone 26 SSU ribosomal R...  
 gb|M14821|PFARGSA *Plasmodium lophurae* 17S ribosomal RNA gene.  
 gb|L08242|PFARNASSB *Plasmodium cynomolgi* small subunit rRN...  
 gb|M61722|PFARRSS *Plasmodium fragile* asexually expressed ri...  
 gb|U69605|PSU69605 *Plasmodium simium* small subunit ribosoma...  
 gb|AF130735.1|AF130735 *Plasmodium brasilianum* 18S ribosomal...  
 gb|L07560|PFARRSSU *Plasmodium knowlesi* small subunit riboso...  
 gb|L11716|PFARG18S Unidentified *Haemosporida* 18S ribosomal ...  
 gb|L11717|PFARDE Unidentified *Haemosporida* 18S ribosomal RN...  
 gb|U07367|PVU07367 *Plasmodium vivax* El Salvador asexual blo...  
 gb|M54897|PFARGBAB *P.malariae* small subunit ribosomal RNA g...  
 emb|Z25819|PRSSRRNA *P.reichenowi* small subunit rRNA (from A...  
 gb|U83876|PKU83876 *Plasmodium knowlesi* small subunit riboso...

---

ตารางที่ ผ2 แสดงดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆที่ไพรเมอร์ตัวที่ 2 (reverse primer) สำหรับ NJTH2539, CSH2542 และ CSH2543 สามารถเข้าจับได้

---

Sequences producing significant alignments:

---

gb|AF145337.1|AF145337 Plasmodium ovale small subunit ribos...  
 gb|AF145336.1|AF145336 Plasmodium malariae small subunit ri...  
 gb|AF145335.1|AF145335 Plasmodium vivax small subunit ribos...  
 gb|AF145334.1|AF145334 Plasmodium falciparum small subunit ...  
 gb|AF130735.1|AF130735 Plasmodium brasilianum 18S ribosomal...  
 gb|U93234.1|PVU93234 Plasmodium vivax sporozite 18S ribosom...  
 gb|U93233.1|PVU93233 Plasmodium vivax 18S ribosomal RNA gen...  
 gb|U83877.1|PVU83877 Plasmodium vivax small subunit ribosom...  
 gb|L48987.1|PFASSURA Plasmodium ovale small subunit ribosom...  
 gb|L48986.1|PFASSUR Plasmodium ovale clone 26 SSU ribosomal...  
 gb|U03079.1|PVU03079 Plasmodium vivax Sal 1 blood stage sma...  
 gb|U03080.1|PVU03080 Plasmodium vivax SAL 1 sporozoite smal...  
 gb|U72542.1|PKU72542 Plasmodium knowlesi small subunit ribo...  
 gb|U72541.1|PIU72541 Plasmodium inui small subunit ribosoma...  
 gb|U69605.1|PSU69605 Plasmodium simium small subunit riboso...  
 emb|AL031746.9|PFMAL1P3 Plasmodium falciparum MAL1P3, compl...  
 emb|AJ243513.1|PBE243513 Plasmodium berghei 18S rRNA gene, ...  
 gb|L11716.1|PFARG18S Unidentified Haemosporida 18S ribosoma...  
 gb|L11717.1|PFARDE Unidentified Haemosporida 18S ribosomal ...  
 gb|M19173.1|PFARGEB P.falciparum 18S ribosomal RNA not in a...  
 emb|X13926.1|PVRRNSSU Plasmodium vivax small subunit (SSU) ...  
 emb|X99790.1|PORIBORNA P.ovale rRNA gene  
 emb|AJ001527.1|PMNGARRNA Plasmodium ovale small subunit rib...  
 emb|X13706.1|PLRNASSU Plasmodium lophurae ribosomal RNA sma...  
 emb|AL010278.1|PFSC04100 Plasmodium falciparum DNA \*\*\* SEQU...  
 gb|L07559.1|PFARRXX Plasmodium cynomolgi rRNA sequence  
 gb|L07560.1|PFARRSSU Plasmodium knowlesi small subunit ribo...  
 gb|M61723.1|PFARRSSAE Plasmodium gallinaceum asexually expr...  
 gb|M61722.1|PFARRSS Plasmodium fragile asexually expressed ...  
 gb|M14599.1|PFARGSS P.berghei small subunit rRNA gene  
 gb|M14821.1|PFARGSA Plasmodium lophurae 17S ribosomal RNA gene  
 gb|M19172.1|PFARGEA P.falciparum 18S ribosomal RNA in asexu...  
 gb|M19712.1|PFARGDC P.berghei 18S rRNA C subunit gene  
 gb|M54897.1|PFARGBAB P.malariae small subunit ribosomal RNA...  
 gb|L08242.1|PFARRNASSB Plasmodium cynomolgi small subunit r...  
 gb|L08241.1|PFARRNASSA Plasmodium cynomolgi small subunit r...  
 gb|U07368.1|PVU07368 Plasmodium vivax El Salvador sporozoit...  
 gb|U07367.1|PVU07367 Plasmodium vivax El Salvador asexual b...  
 gb|U81581.1|SRU81581 Strongyloides ratti 18S small subunit ...  
 gb|AF036605.1|AF036605 Strongyloides ratti small subunit ri...  
 gb|U83876.1|PKU83876 Plasmodium knowlesi small subunit ribo...  
 emb|Z25819.1|PRSSRRNA P.reichenowi small subunit rRNA (from...  


---

ตารางที่ ผ3 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนกันของ NJTH2539, Csth2542 และ Csth2543 กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ซึ่งมีความเหมือนกับเชื้อ *P.gallinaceum* asexually expressed ribosomal subunit 100 เปอร์เซ็นต์

Sequences producing significant alignments:

---

```

gb|M61723.1|PFARRSSAE Plasmodium gallinaceum asexually expr...
gb|AF145399.1|AF145399 Plasmodium relictum clone K592.2 18S...
gb|AF145396.1|AF145396 Plasmodium relictum clone H614.2 18S...
gb|AF145394.1|AF145394 Plasmodium relictum clone H619.2 18S...
gb|AF145393.1|AF145393 Plasmodium relictum clone K583.1 18S...
gb|AF145392.1|AF145392 Plasmodium relictum clone H619.1 18S...
gb|AF145391.1|AF145391 Plasmodium relictum clone H614.1 18S...
gb|AF145390.1|AF145390 Plasmodium relictum clone K589.1 18S...
gb|AF145389.1|AF145389 Plasmodium relictum clone K589.2 18S...
gb|AF145388.1|AF145388 Plasmodium relictum clone K583.2 18S...
gb|AF145395.1|AF145395 Plasmodium relictum clone K592.1 18S...
emb|X13706.1|PLRNASSU Plasmodium lophurae ribosomal RNA sma...
gb|M14821.1|PFARGSA Plasmodium lophurae 17S ribosomal RNA gene
gb|AF145336.1|AF145336 Plasmodium malariae small subunit ri...
gb|AF130735.1|AF130735 Plasmodium brasilianum 18S ribosomal...
gb|U07367.1|PVU07367 Plasmodium vivax El Salvador asexual b...
gb|AF145398.1|AF145398 Plasmodium relictum clone H622.2 18S...
gb|L11717.1|PFARDE Unidentified Haemosporida 18S ribosomal ...
gb|AF145335.1|AF145335 Plasmodium vivax small subunit ribos...
gb|U93234.1|PVU93234 Plasmodium vivax sporozite 18S ribosom...
gb|U93233.1|PVU93233 Plasmodium vivax 18S ribosomal RNA gen...
gb|U83877.1|PVU83877 Plasmodium vivax small subunit ribosom...
gb|U83876.1|PKU83876 Plasmodium knowlesi small subunit ribo...
gb|U03079.1|PVU03079 Plasmodium vivax Sal 1 blood stage sma...
gb|U03080.1|PVU03080 Plasmodium vivax SAL 1 sporozoite smal...
gb|U72541.1|PIU72541 Plasmodium inui small subunit ribosoma...
gb|U69605.1|PSU69605 Plasmodium simium small subunit riboso...
emb|X13926.1|PVRNSSU Plasmodium vivax small subunit (SSU) ...
gb|L07559.1|PFARRXX Plasmodium cynomolgi rRNA sequence
gb|L07560.1|PFARRSSU Plasmodium knowlesi small subunit ribo...
gb|L08242.1|PFARRNASSB Plasmodium cynomolgi small subunit r...
gb|L08241.1|PFARRNASSA Plasmodium cynomolgi small subunit r...
gb|U07368.1|PVU07368 Plasmodium vivax El Salvador sporozoit...
gb|AF145397.1|AF145397 Plasmodium relictum clone H622.1 18S...
emb|AL031746.9|PFMAL1P3 Plasmodium falciparum MAL1P3, compl...
gb|M19173.1|PFARGE P.falciparum 18S ribosomal RNA not in a...
gb|M54897.1|PFARGBAB P.malariae small subunit ribosomal RNA...
gb|AF145337.1|AF145337 Plasmodium ovale small subunit ribos...
gb|M61722.1|PFARRSS Plasmodium fragile asexually expressed ...
gb|L11716.1|PFARG18S Unidentified Haemosporida 18S ribosoma...
emb|AJ243513.1|PBE243513 Plasmodium berghei 18S rRNA gene, ...
gb|AF145334.1|AF145334 Plasmodium falciparum small subunit ...
gb|L48987.1|PFASSURA Plasmodium ovale small subunit ribosom...
gb|L48986.1|PFASSUR Plasmodium ovale clone 26 SSU ribosomal...
emb|X99790.1|PORIBORNA P.ovale rRNA gene
emb|Z25819.1|PRSSRRNA P.reichenowi small subunit rRNA (from...
emb|AJ001527.1|PMNGARRNA Plasmodium ovale small subunit rib...
emb|AL010278.1|PFSC04100 Plasmodium falciparum DNA *** SEQU...
gb|M14599.1|PFARGSS P.berghei small subunit rRNA gene
gb|M19172.1|PFARGE P.falciparum 18S ribosomal RNA in asexu...
gb|M19712.1|PFARGDC P.berghei 18S rRNA C subunit gene
emb|AJ250705.1|PVI250705 Plasmodium vivax partial 18S rRNA ...
emb|AJ250704.1|PVI250704 Plasmodium vivax partial 18S rRNA ...
emb|AJ250703.1|PVI250703 Plasmodium vivax partial 18S rRNA ...
emb|AJ250702.1|PVI250702 Plasmodium vivax partial 18S rRNA ...

```



gb|U72542.1|PKU72542 Plasmodium knowlesi small subunit ribo...  
gb|AF014942.1|AF014942 Plasmodium malariae 18S ribosomal RN...  
gb|U78741.1|PMU78741 Plasmodium malariae 18S ribosomal RNA ...  
gb|U93235.1|PVU93235 Plasmodium vivax oocyst 18S ribosomal ...  
gb|U78740.1|POU78740 Plasmodium ovale 18S ribosomal RNA gen...  
emb|AJ250701.1|POV250701 Plasmodium ovale partial 18S rRNA ...  
gb|U78739.1|POU78739 Plasmodium ovale 18S ribosomal RNA gen...  
gb|U93095.1|PVU93095 Plasmodium vivax 18S ribosomal RNA gen...  
gb|U36466.1|PFU36466 Plasmodium falciparum 18S rRNA sexuall...

---



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ประวัติผู้เขียน

นายทวี สายวิชัย เกิดวันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ.2517 ที่อำเภอบ้านฝ้อ จังหวัดอุดรธานี สำเร็จปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการเพาะขยายพันธุ์สัตว์ โครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์สัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพยาธิชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย