

ความหลากหลายของรูปแบบในจีนของ Pfc155/RESA  
ของ *Plasmodium falciparum* ที่พบในประเทศไทย



นางสาว อธิวิดิ ชมเดช

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-861-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19176013

**ALLELIC POLYMORPHISM IN P155/RESA GENE  
OF PLASMODIUM FALCIPARUM  
IN THAILAND**



**MISS SIRIWADEE CHOMDEJ**

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

**Department of Biology**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

**1996**

**ISBN 974-634-861-2**

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความหลากหลายของรูปแบบในจีนของ Pf155/RESA ของ

*Plasmodium falciparum* ที่พบในประเทศไทย

โดย

นางสาวศิริวดี ชมเดช

ภาควิชา

ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ศศศรี ไทยทอง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาดมหลักสูตรปริญญาโทมหาบัณฑิต



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ อุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



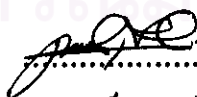
.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ชัยชังชาวด)



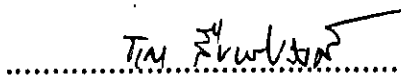
.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ศศศรี ไทยทอง)



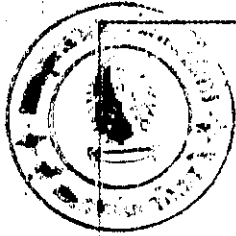
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร. พงษ์ชัย หาญยุทธนากร)



.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พงษ์ธาดา สืบหลินวงศ์)



สิริวดี ชมเดช : ความหลากหลายของรูปแบบในจีน Pf155/RESA ของ *Plasmodium falciparum* ที่พบในประเทศไทย (ALLELIC POLYMORPHISM IN PF155/RESA GENE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN THAILAND)

อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ศดศรี ไทยทอง , 96 หน้า. ISBN 974-634-861-2

Ring-infected stage erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ได้มีการศึกษาและถูกเสนอให้เป็นโปรตีนที่มีแนวโน้มในการใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในอนาคต การศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ขอบเขตของความหลากหลายในนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 2727 ถึง 2846 โดยใช้ปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าว แล้วทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามี 4 รูปแบบอัลลิลิกของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจำนวน 124 ไอโซเลต ที่ได้จากผู้ป่วยในจังหวัดตาก ชลบุรี ตราด จันทบุรี สงขลา และโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน กรุงเทพ ในช่วงปี พ.ศ. 2523-2536 โดยพบว่ารูปแบบ F32 เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด (63%) รูปแบบที่พบรองลงมาคือรูปแบบ 3<sup>rd</sup> (19%) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากรูปแบบ F32 เพียง 1 ตำแหน่งที่ตำแหน่ง 2828 และ พบอีก 14 % เป็นรูปแบบ 4<sup>th</sup> ที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากรูปแบบ F32 1 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 2828 รูปแบบที่พบน้อยที่สุดคือรูปแบบ FC27 (4%) มีลำดับกรดอะมิโนที่ต่างจากรูปแบบ F32 6 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 2764, 2772, 2774, 2782, 2788 และ 2828 การเปลี่ยนแปลงของชนิดเบสส่วนใหญ่เป็นแบบ transversion และทุกตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนด้วยทุกครั้ง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....ชีววิทยา  
สาขาวิชา.....สัตววิทยา  
ปีการศึกษา.....2539

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

## C625263  
KEY WORD:

: MAJOR ZOOLOGY

PLASMODIUM FALCIPARUM / ALLELIC POLYMORPHISM / Pf155/RESA

SIRIWADEE CHOMDEJ : ALLELIC POLYMORPHISM IN Pf155/RESA GENE OF  
PLASMODIUM FALCIPARUM IN THAILAND.

THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SODSRI THAITHONG, 96 pp.


ISBN 974-634-861-2

The ring-infected stage erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) have been characterized and proposed as a falciparum malarial vaccine candidate. To further investigate the diversity of the Pf155/RESA antigen in the area of 2727<sup>th</sup> -2846<sup>th</sup> of the upstream C-terminal, DNA fragment encompassing this region was amplified, by the polymerase chain reaction, and followed by sequencing. Four different alleles were obtained from *P. falciparum* 124 isolates collected from Tak, Chonburi, Trad, Chantaburi, Songkla province and Tropical Medicine Hospital, Bangkok during 1980-1993, their sequences were compared with those previously reported. The most prevalent allelic variant is the F32-type which was present in 63% of the samples. Less abundant allele, 3<sup>rd</sup> type, was detected only 19% among all isolates. The 3<sup>rd</sup> type was identical to the F32-type except for one amino acid replacement at position 2828 nucleotide. The 4<sup>th</sup> type was found 14% and had one amino acid change compared to F32-type at position 2828. The FC27-type had found in the lowest frequency (4%) but had amino acid changes at positions 2764, 2772, 2774, 2782, 2788 and 2828 . Analysis of nucleotide substitutions in this block had shown that tranversion occurred more frequently than transition and all changes were nonsynonymous substitutions.

ภาควิชา.....ที่วทยา.....

สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....

ปีการศึกษา.....2539.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จสู่ดวงใจได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่อง วิทยานิพนธ์มาด้วยดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย และขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. พงษ์ หาดยุดธนากร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์นี้มาโดยตลอด

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ รองศาสตราจารย์ พญ.ชานดา สืบหลินวงศ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.เนาวรัตน์ สีสด ดร.จุฑาพันธุ์ พิณสวัสดิ์ คุณกาญจนา รังษิหิรัญรัตน์ คุณอารีย์ เสือก้อน คุณณภาพร ศิริพิบูล ฝ่ายศูนย์วิจัยมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาลินี ฉัตรมงคลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาช่วยแนะนำเทคนิค ให้คำปรึกษาตลอดจนให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนใหญ่จากเงินทุนที่ทางองค์การอนามัยโลกมอบให้แก่ รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง ในโครงการ ID 880 279 Epidemiology and immune response to potential candidate vaccine antigen for a *Plasmodium falciparum* blood stage vaccine และบางส่วนจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบคุณองค์การอนามัยโลกและบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไว้ ณ ที่นี้ด้วย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้กรุณาให้กำลังใจสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จสู่ดวงใจด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ง
สารบัญรูป.....	ช
คำอธิบายคำย่อ.....	ฉ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. สอบสวนเอกสาร.....	4
3. วิธีการทดลอง.....	26
4. ผลการทดลอง.....	38
5. วิจัยรณัผลการทดลอง.....	57
6. สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	70
รายการอ้างอิง.....	72
ภาคผนวก.....	90
ประวัติผู้เขียน.....	96

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	แสดงช่วงเวลาของชีวิตที่แตกต่างกันของเชื้อมาลาเรีย ที่ทำให้เกิดโรคในคน .....	7
2-2	แสดงผลการศึกษาภาวะหลายรูปแบบในบริเวณ T cell ของจีน Circumsporozoite protein.....	9
4-1	แสดงตำแหน่งเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละรูปแบบอัลลีล Pf155/RESA โดยเปรียบเทียบกับรูปแบบ F32.....	44
4-2	แสดงชนิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสที่ทำให้กรดอะมิโน เปลี่ยนแปลง .....	46
4-3	แสดงผลการของรูปแบบอัลลีลจีน Pf155/RESA ในตัวอย่าง ที่ได้จากจังหวัดต่างๆ.....	51
4-4	แสดงจำนวนรูปแบบอัลลีล Pf155/RESA ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ <i>P.falciparum</i> ในประเทศไทยในการทดลองครั้งนี้ .....	52
4-5	แสดงการกระจายของรูปแบบอัลลีลของตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย ในพื้นที่ๆทำการศึกษา (นับรวมประชากรผสม).....	55
5-1	แสดงผลการศึกษาของรูปแบบอัลลีล Pf155/RESA ของเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัม.....	63
5-2	แสดงความถี่ของรูปแบบอัลลีล Pf155/RESA ที่พบในประเทศไทย .....	64
5-3	แสดงความถี่ของรูปแบบอัลลีล Pf155/RESA ของเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัมที่เก็บตั้งแต่ปี 2521-2537.....	65
5-4	แสดงรูปแบบอัลลีลจีน Pf155/RESA , MSP1 และ MSP2 ในตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจังหวัดตาก.....	66
5-5	แสดงรูปแบบอัลลีลจีน Pf155/RESA , MSP1 และ MSP2 ในตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจังหวัดตราด.....	67



ตารางที่		หน้า
5-6	แสดงรูปแบบอัลถิลจีน Pfl55/RESA , MSP1 และ MSP2 ในตัวอย่างเชื่อมมาตาเรือจังหวัดชลบุรี.....	68
5-7	แสดงคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อกรดอะมิโน เปลี่ยนแปลง.....	69



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2-1	แสดงวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย..... 6
2-2	แสดงโครงสร้างของจีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน circumsporozoite (CSP) ของเชื้อมาลาเรียที่ ทำให้เกิดโรคในคน..... 10
2-3	แสดงโครงสร้างและความหลากหลายของจีน MSP1 ในสายพันธุ์ต่างๆ ของ <i>P.falciparum</i> ..... 12
2-4	แสดงโครงสร้างของจีน MSP 2 ..... 14
2-5	แสดงโครงสร้างของจีน S-Ag ในสายพันธุ์ต่างๆ..... 16
2-6	แสดงโครงสร้างของจีน FIRA ..... 17
2-7	แสดงโครงสร้างของจีน GLURP..... 17
2-8	แสดงแผนที่ของจีน Pf155/RESA (สายพันธุ์ FC27)..... 20
3-1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีลจีน Pf155/RESA ตำแหน่ง PCR primer และ sequencing primer..... 33
3-2	การแยกผลิตภัณฑ์ PCR ให้เป็นสายเดี่ยว..... 34
4-1	แสดง PCR product ของ 17 ไอโซเลตที่ใช้ในการทดลอง โดยแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide ..... 39
4-2	แสดงการตรวจสอบการจับกันของ Streptavidin beads กับ Biotin-DNA โดย 1% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide ..... 40
4-3	แสดงออโตเรดิโอแกรมของรูปแบบอัลลีลจีน Pf155/RESA จำนวน 4 รูปแบบ คือ F32, FC27, 3 <sup>rd</sup> และ 4 <sup>th</sup> ..... 42
4-4	แสดงออโตเรดิโอแกรมของรูปแบบอัลลีลจีน Pf155/RESA ที่เป็นรูปแบบผสมระหว่าง F32/3 <sup>rd</sup> ; F32/4 <sup>th</sup> ; F32/FC27 FC27/4 <sup>th</sup> ; 3 <sup>rd</sup> /4 <sup>th</sup> ..... 43

รูปที่	หน้า
4-5	แสดงลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละอัลลิล ..... 47
4-6	แสดงลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละอัลลิล..... 48
4-7	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความถี่ของรูปแบบอัลลิล Pf155/RESA ที่พบในประเทศไทยในการทดลองครั้งนี้..... 53
4-8	แสดงการกระจายของรูปแบบอัลลิล Pf155/RESA ของ <i>P.falciparum</i> ที่พบในประเทศไทย ปี 2523-2536..... 54
4-9	แสดงความถี่ของรูปแบบอัลลิล Pf155/RESA ของ <i>P.falciparum</i> ที่พบในประเทศไทย ปี 2523-2536..... 56

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำย่อ

bp	Base pair
°C	Degree celsius
Ci	Curie
ddH <sub>2</sub> O	Double distilled water
EDTA	Disodium ethylenediamine tetraacetic
g	Gram
Kb	Kilobase
KD	Kilodalton
l	Litre
mg	Milligram
ml	Millilitre
mM	Millimolar
mmole	Millimole
ng	Nanogram
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates
PBS	Phosphate buffered saline
SDS	Sodium dodecyl sulfata
V	Volt
μM	Micromolar
μl	Microlitre