การสร้างดีเอ็นเอตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพของเชื้อมาเลเรีย

(Plasmodium falciparum) เพื่อตรวจหาเชื้อในยุงก้นปล่องที่ได้รับเชื้อ

นางสาวปิยาภรณ์ วิลาสินีกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2530

ISBN 974-568-035-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012545 I 10298927

CONSTRUCTION OF APPROPRIATE DNA PROBES OF *Plasmodium falciparum* FOR DETECTION OF INFECTED MOSQUITOES

Miss Piyaporn Vilasineekul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Botany

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-568-035-4

Thesis Title	Construction of Appropriate DNA Probes of *Plasmodium falciparum* for Detection of Infected Mosquitees
By	Miss Piyaporn Vilasineekul
Department	Botany
Thesis Advisor	Associate Professor Prapon Wilairat, Ph.D. Assistant Professor Mukda Nudasomboon

---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya .....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Obchant Thaithong .....Chairman

(Associate Professor Obchant Thaithong, Ph.D.)

Prapon Wilairat .....Thesis Advisor

(Associate Professor Prapon Wilairat, Ph.D.)

Mukda Nudasomboon .....Thesis Advisor

(Assistant Professor Mukda Nudasomboon)

Sakol Panyim .....Member

(Associate Professor Sakol Panyim, Ph.D.)

Sodsri Thaithong .....Member

(Associate Professor Sodsri Thaithong)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างดีเอ็นเอตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพของเชื้อมาเลเรีย *(Plasmodium falciparum)* เพื่อตรวจหาเชื้อในยุงก้นปล่อง ที่ได้รับเชื้อ
ชื่อนิสิต	นางสาวปิยาภรณ์ วิลาลินีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ประพนธ์ วิไลรัตน์
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มุกดา ณัฏฐสมบูรณ์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ได้ทำการโคลนนิ่ง(cloning)ของเชื้อมาเลเรีย *Plasmodium falciparum* โดยสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ K1 ที่พบในประเทศไทย และตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ EcoRI* นำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอ พาหะได้แก่ พลาสมิด pUN 121 ที่ตำแหน่งของเอ็นไซม์ EcoRI คัดเลือก transformants โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะเตตราไซคลินได้ 20,000 clones และในจำนวนนี้ได้คัดเลือก recombinant clones ที่มีดีเอ็นเอที่ซ้ำ ๆ กันได้ 53 clones โดยใช้วิธี colony hybridization pUNK1-32, -34, -43, -45 และ 51 คือพลาสมิดที่คัดได้จากวิธี Southern hybridization และ pUNK1-34, pUNK1-45 เป็น recombinants ที่มีความไวต่อการตรวจ DNA ของ *P. falciparum* ในปริมาณ 0.005 ตัวต่อเม็ดเลือดแดง 100 เซลล์ (0.005% parasitemia) จากเลือด 20 ไมโครลิตร นอกจากนี้ pUNK1-45 ยังไม่จับกับดีเอ็นเอของคน, ยุงพาหะ หรือเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น เช่น *P. chabaudi, P. knowlesi, P. cynomolgi, P. vivax* พลาสมิด pUNK1-34 ไม่จับกับดีเอ็นเอของคน ยุงพาหะ และเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นยกเว้น *P. chabaudi*

เมื่อใช้ pUNK1-45 ตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ระยะ oocyst และ sporozoite ในยุงพาหะ พบว่า pUNK1-45 สามารถตรวจหาเชื้อได้ในยุงเพียงตัวเดียวหรือน้อยกว่านั้น และจำนวน sporozoite น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้คือ 5,000-1,000 ตัว

จากการศึกษา restriction map ของพลาสมิด pUNK1-34 และ pUNK1-45 และศึกษาการกระจายของยีนดีเอ็นเอของพลาสมิด pUNK1-34 และ pUNK1-45 ใน genome ของ *P. falciparum* พบว่ายีนดีเอ็นเอทั้ง 2 น่าจะมีลำดับนิวคลิโอไทด์แตกต่างกัน ซึ่งสามารถคำนวณได้ว่ายีนดีเอ็นเอของ pUNK1-34 มีจำนวน 25 ชุดบน genome ของ *P. falciparum* และยีนดีเอ็นเอของ pUNK1-45 มีจำนวน 120 ชุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Construction of Appropriate DNA Probes of *Plasmodium falciparum* for Detection of Infected Mosquitoes
Name	Miss Piyaporn Vilasineekul
Thesis Advisor	Associate Professor Prapon Wilairat, Ph.D. Assistant Professor Mukda Nudasomboon
Department	Botany
Academic Year	1986

ABSTRACT

DNA from *Plasmodium falciparum*, Thai isolate K1, was purified and fragmented using restriction endonuclease EcoRI*. These DNA fragments were inserted into pUN121 at the EcoRI site and cloned in *E. coli* strain JM 107. A library containing 20,000 tetracycline-resistant transformants were obtained. Using colony hybridization technique, 53 recombinant DNA clones were selected. From Southern hybridization of 53 recombinant plasmids, pUNK1-32, -34, -43, -45, -51 were selected. The two sensitive recombinant DNA probes. pUNK1-34 and pUNK1-45, were able to detect a parasitemia of at least 0.005% in 20 µl of infected blood. pUNK1-45 did not cross-hybridize with DNA from other plasmodial species, eg. *P. chabaudi, P. knowlesi* and *P. cynomolgi* nor with man and mosquito. The plasmid pUNK1-34 did not cross-hybridize with other DNA except from *P. chabaudi*,

Using pUNK1-45 as probe, oocysts and sporozoites could be detected in only one or less infected mosquito. The probe was able to detect at least 5000-1000 sporozoites.

Studies of restriction map and organization of the DNA inserts of pUNK1-34 and pUNK1-45 in genome of *P. falciparum* showed that the two fragments were not homologous. The estimated copy number of pUNK 1-34 and pUNK1-45 in the genome of *P. falciparum* was about 25 and 120.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank the Chairman of my thesis committee for her criticisms. I would like to express my deepest gratitude to Associate Professor Dr.Prapon Wilairat and Assistant Professor Mukda Nudasomboon, advisors of my thesis for their advice and criticisms.

I am very grateful to Associate Professor Dr.Sakol Panyim for being on the committee and for his helpful suggestions during the conduct of the thesis.

I am very thankful to Associate Professor Sodsri Thaithong for being on the committee and for her comments regarding this thesis.

I would like to thank Mr.Worawut Chulalaksananukul for his help and suggestions.

Special appreciation is expressed to Miss Kosum Chansiri for her kindness in helping in the detection of parasites in infected blood.

I wishes to thank Miss Sumalee Tungpradubkul and Mr. Chokchai Intapruk for their training in basic genetic engineering techniques. Sincere appreciation is expressed to all members in B 309 and B 315 for their help and friendship.

I am extremely grateful to the Center for Molecular Genetics-Genetic Engineering, Mahidol University for providing all the facilities during the period of this investigation, and to Armed Force Research Institute of Medical Science, Bangkok and Biology Department, Faculty of Science, Mahidol University, for providing infected *Anopheles dirus* specimens.

This research was supported by Graduate School Chulalongkorn University, and a grant from the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Ministry of Science, Technology and Energy.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

PAGE

Abstract in Thai..... D

Abstract in English..... F

Acknowledgements..... H

List of Tables..... K

List of Figures..... L

Abbreviations..... O

Chapter

1 Introduction..... 1

2 Materials and Methods..... 12

3 Results..... 40

4 Discussion..... 81

5 Conclusion..... 94

References..... 96

Vita..... 104

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1	10 x Buffer for restriction endonuclease digestion	19
2	Restriction endonuclease enzyme used in the experiment	20
3	Size of recombinant plasmids	57
4	Comparision of sensitivity of pUNK1-34 and pUNK1-45 with other DNA probes.....	88

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1	Life Cycle of *Plasmodium* spp.....	4
2	Cloning strategy of *Plasmodium falciparum*, KI isolate, in *Escherichia coli*	11
3	Diagram of Southern transfer set.....	34
4	The absorption spectrum of extracted *P. falciparum* strain K1 DNA	41
5	Gel analysis of DNA after digestion with restriction enzymes	42
6	Gel analysis of *P. falciparum* DNA after digestion with restriction endonucleases, EcoRI and EcoRI*	44
7	Ethidium bromide staining of ligated product	45
8	Autoradiograms of colony hybridization of 20,000 colonies with total genomic DNA of K1 probe	46
9	Autoradiograms of hybridization of 400 selected colonies with total genomic DNA of K1 probe ...	47
10	Ethidium bromide staining pattern of the digested plasmids on 0.7% agarose gel	49
11	Autoradiograms of Southern blot hybridization of figure 11 with K1 genomic DNA probe	52

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
12	Ethidium bromide staining of digested plasmids which strong signal in figure 11 compaired with plasmid pBRK1-14 and Rep 20	55
13	Autoradiogram of Southern blot hybridization of figure 12 with *P. falciparum* K1 genomic DNA probe	56
14	Histogram showing the frequency of insert size of 53 recombinant plasmids	59
15	Autoradiogram of dot blot hybridization of recombinant plasmids pUNK1-32, pUNK1-54, pUNK1-43, pUNK1-45 and pUNK1-51 with *P. falciparum* K1 genomic DNA probe	62
16	Autoradiogram of recombinant plasmids pUNK1-32, pUNK1-34, pUNK1-45, pUNK1-51 with other plasmodial DNA, *An.dirus* DNA and human DNA mixed probes	63
17	Autoradiogram of slot blot hybridization of infected blood with pUNK1-32 probe	64
18	Autoradiogram of slot blot hybridization of infected blood with pUNK1-34 probe	65
19	Autoradiogram of slot blot hybridization of infected blood with pUNK1-45 probe	66

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
20	Autoradiogram of slot blot hybridization of sporozoites with pUNK1-34 probe	68
21	Autoradiogram of slot blot hybridization of sporozoites and oocysts in homogenized infected mosquito with pUNK1-45 probe	69
22	Autoradiogram of slot blot hybridization of infected mosquito salivary gland with pUNK1-45 probe	70
23	Autoradiogram of Southern blot of *P. falciparum* K1 DNA digested with various enzymes	72
24	Autoradiogram of Southern blot of *P. falciparum* K1 DNA digested with Bam HI, Hind III, EcoRI and Sal I	73
25	Gel analysis of recombinant plasmid pUNK1-34 digestion with endonuclease	75
26	Gel analysis of recombinant plasmid pUNK1-45 digestion with restriction endonuclease	77
27	A restriction map of pUNK1-34	79
28	A restriction map of pUNK1-45	80

ABBREVIATIONS

bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
Ci	Curie
CsCl	cesium chloride
$CaCl_2$	calcium chloride
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase I	deoxyribonuclease I
DMSO	dimethylsulfoxide
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
g	centrifugal force
g	gram
HB solution	hybridization solution
HCl	hydrochloric acid
Kb	kilobase pair
LB	Luria-Bertani medium
M	molar
$MgCl_2$	magnesium chloride
min	minute

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ml	millilitre
$MgSO_4$	magnesium sulfate
μ	10^{-6}
n	10^{-9}
NaCl	sodium chloride
NaOH	sodium hydroxide
OD	optical density
PHB solution	prehybridization solution
RNA	ribonucleic acid
RNase "A"	ribonuclease A
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	standard saline citrate (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate pH7.5)
TBE	89 mM Tris HCl pH 8.3,89 mM boric acid and 2.5 mM EDTA
TCA	trichloroacetic acid
TE	10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 7.4
Tris	tris (hydroxymethyl) aminoethane
U	unit

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย