รูปแบบโครโมโซมของ พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม โดยใช้

- พัลส์ฟิลเกรเดียนเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

นางสาวอัญชลี พันธุ์ภักดีคุณ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2535

ISBN 974-579-753-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018162 W4528595

Chromosome Patterns in *Plasmodium falciparum* by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis

Miss Anchalee Punpuckdeekoon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Biology
Graduate School
Chulalongkorn University
1992

ISBN 974-579-753-7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis title	Chromosome Patterns in Plasmodium falciparum by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis.
By	Miss Anchalee Punpuckdeekoon
Department	Biology
Thesis Advisor	Associate Professor Sodsri Thaithong
Co-Advisor	Associate Professor Tada Sueblinvong

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

S. Patinavin

----------Chairman

(Associate Professor Sudsanong Patinavin, Ph.D.)

Sodsri Thaithong

----------Thesis Advisor

(Associate Professor Sodsri Thaithong)

Tada Seublinvong

----------Member

(Associate Professor Tada Seublinvong)

Jintana Patarapotikul

----------Member

(Jintana Patarapotikul, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

Anchalee Punpuckdeekoon : Chromosome Patterns in Plasmodium falciparum by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. Thesis advisor : Asso. Prof. Sodsri Thaithong. Thesis co-advisor : Asso. Prof. Tada Sueblinvong. 116 PP.

The chromosomal DNA from 1 isolate and 28 clones of Plasmodium falciparum which were resistant to pyrimethamine at different MIC level were studied by pulse field gradient gel electrophoresis. At least 11 chromosomes were separated according to their different molecular weights. When compared with the chromosomes of S. cerevisiae , the chromosome size of P. falciparum were approximately 600-4100 kb. Chromosome size polymorphism was found even among the subclones. Thus, pulse field gradient gel electrophoresis can serve for malaria characterization.

Consequently, dot blot analysis was then done to determine this relationship. DNA from one pyrimethamine-sensitive clone (T9/94) of P. falciparum and one (TM 4 C8.2) clone that was intermediate resistant to pyrimethamine were hybridized with DHFR gene and β-tubulin gene. THe result revealed no amplification of DHFR-TS gene.

ภาควิชา ชีววิทยา
สาขาวิชา สัตววิทยา
ปีการศึกษา 2534

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

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อัญชลี พันธุ์ภักดีคุณ : รูปแบบโครโมโซมของ พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม โดยใช้พัลส์ฟิลด์เกรเดียนเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (Chromosome Patterns in Plasmodium falciparum by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis) อ. ที่ปรึกษา : รศ. สดศรี ไทยทอง อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. พญ. ธาดา ลีนหลินวงศ์, 116 หน้า. ISBN 974-579-753-7

การศึกษาโครโมโซมของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ที่ดื้อต่อยาพริเมธามีน ในระดับต่างกัน จำนวน 1 ไอโซเลตและ 28 สายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยใช้พัลส์ฟิลด์เกรเดียนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเชื้อเหล่านี้ มีจำนวนโครโมโซมอย่างน้อย 11 โครโมโซม ซึ่งแยกออกจากกันได้ตามลำดับน้ำหนักโมเลกุล เมื่อเปรียบเทียบกับครโมโซมจากยีสต์ (แซคคาโรไมซิส เซอรีวิซี) โครโมโซมของเชื้อมาลาเรียจะมีขนาดประมาณ 600-4100 กิโลเบส รูปแบบโครโมโซมที่ได้ มีขนาดโครโมโซมแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แม้แต่ในระดับสายพันธุ์บริสุทธิ์ ดังนั้น จึงสามารถบอกความแตกต่างของเชื้อมาลาเรียในระดับสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ โดยการศึกษาด้วยวิธีพัลส์ฟิลด์เกรเดียนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าว โดยนำ ดีเอ็นเอ จากเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม มาทดสอบด้วยวิธีดอท-บลอท แล้วไฮบริไดซ์ด้วยยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดัคเทส และ ยีนเบต้า-ทูบูลิน พบว่า จำนวนชุดของยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดัคเทส ในสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ไวต่อยาไพริเมธามีน (T9/94) และ ในสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ดื้อต่อยาไพริเมธามีนระดับปานกลาง (TM4 C8.2) มีจำนวนเท่ากัน ดังนั้น การดื้อต่อยาไพริเมธามีนของเชื้อมาลาเรียในการทดลองด้วยวิธีดอท-บลอทนี้ จึงไม่ได้เกิดจากการขยายตัวของยีนไดไฮโดรโฟเลตรีดัคเทส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

Acknowledgements

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Sodsri Thaithong from Department of Biology, Faculty of Science, and co-advisor, Associate Professor Tada Seublinvong, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their perfect unite of intellectual supervision and eloquent encouragement throughout my study.

My whole-hearted gratitude to Dr. Mike Goman from Institute of Cell and Molecular Biology (ICMB), University of Edinburgh, UK for his indefatigable suggestions and courteously assistance during my five-month visiting.

Much appreciation is expressed to Professor G.H. Beale from Institute of Animal Genetics, University of Edinburgh, UK for his inexhaustible patience in revising my winding manuscript.

I am very grateful to Associate Professor Dr. Sudsanong Patinawin from Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for her valuable criticisms and serving as the Chairman.

Special thanks to Dr. Jintana Patarapotikul from Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for her recommendation and serving as the supervisory committee.

I would also like to thank staffs at Malaria Unit Cell,

Chulalongkorn University.

I am so much indepted to Dr. Robert Ridley and everyone in ICMB, University of Edinburgh, UK for their excellent help and friendliness.

My sincere thanks to Dr. Thomas Wellems, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA and Dr. Chris Janse, Laboratory for Parasitology, Leiden, The Netherlands for their valuable suggestions of densitometer readings.

This work has been generously supported by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Ministry of Science, Technology and Energy, and also by Faculty of Graduate Studies, Chulalongkorn University.

Ultimately, much appreciation is specially mentioned to my beloved family for the most steadfast financial support and the warmhearted understanding.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS

Page

ENGLISH ABSTRACT..... iv

THAI ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

LIST OF TABLES..... x

LIST OF FIGURES..... xi

LIST OF ABBREVIATIONS..... xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION..... 1

II REVIEW OF LITERATURES

1. Life cycle..... 6

2. Characterization of Malaria Parasites..... 9

3. Pulse Field Gradient Gel Electrophoresis.. 13

4. Genetics by PFGE..... 17

5. Pyrimethamine Resistance and Mechanism.... 24

III MATERIAL AND METHODS

1. P. falciparum Samples and in vitro Cultivation..... 32

2. DNA Preparation for PFGE..... 41

3. Pulse Field Gradient Gel Electrophoresis.. 42

4. Dot Blot Analysis..... 45

IV RESULTS

1. Pulse Field Gradient Gel Electrophoresis.. 48

page

2. Chromosome Size Polymorphism..... 50

3. Chromosome 4 Polymorphism..... 54

4. Dot Blot Analysis..... 56

V DISCUSSION

1. General Ramarks about Pulse Field Gradient Gel Electrophoresis of Plasmodium Chromosome..... 76

2. Chromosome Size Polymorphism in Plasmodium 78

3. Chromosome 4 Polymorphism..... 82

4. Dot Blot Analysis..... 83

VI CONCLUSION..... 87

BIBLIOGRAPHY..... 89

APPENDIX

I 103

II 110

III 115

BIOGRAPHY..... 116

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1. Parasites studied in PFGE..... 33
2. Parasites studied in dot blot analysis..... 36
3. Liquid scintillation data showing the radioactivity from dot blot of P. falciparum DNA..... 75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	The life cycle of *P. falciparum*.....	8
2.	Schematic illustration of DNA migration in response to alternate pulsed perpendicular electric fields.	15
3.	Proposed separation mechanism for PFGE.	16
4.	Illustration of the electrode configurations used in the double inhomogeneous and double homogeneous model of PFGE.	18
5.	Voltage clamping by the CHEF-DR II system.	18
6.	Structure of pyrimethamine compared with its natural substrate, dihydrofolate.	25
7.	Site of action of pyrimethamine drug in folate metabolic pathway.	25
8.	Organisation of the gene for DHFR-TS.	27
9.	Two apparatus used in PFGE analysis.	43
10.	PFGE analysis of chromosomal DNA from 1 isolate and 28 clones of *P. falciparum*.	58
11.	Plot of relative mobilities versus molecular sizes of chromosome marker, *S. cerevisiae*. ...	70
12.	A schematic montage of the karyotypes from various gels as shown in figure 10.	71

Figure Page

13. Densitometric tracings of the chromosomal DNA from 4 clone of P. falciparum. 72

14. Southern blot of the gel in figure 10.7 hybridized with radiolabelled DHFR - TS probe. 73

15. Dot blot analysis. 74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

^{o}c	=	degree Celsius
cm	=	Centimeter
gm	=	Gram
g	=	Gravitational acceleration
hr	=	Hour
l	=	Litre
M	=	Molar
mA	=	Milliampere
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mM	=	Millimolar
ng	=	Nanogram
nm	=	Nanometer
no.	=	Number
rpm	=	Revolutions per minute
sec	=	Second
µg	=	Microgram
µl	=	Microliter
uv	=	Ultraviolet
V	=	Volt
w/v	=	Weight/volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย