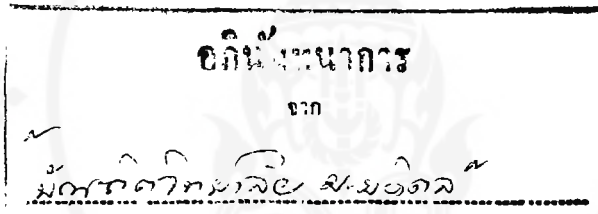


4 Feb 1993

CONSTRUCTION OF DNA PROBE FOR THE DETECTION OF *PLASMODIUM VIVAX*

PIENGCHAN RAJKULCHAI

~



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

1992

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสร้างดีเอ็นเอติดตาม เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อมาลาเรียชนิด พลาสโมเดียม ไวแวกซ์

ผู้วิจัย เพียงจันทร์ ราชกุลชัย

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 29 ตุลาคม พ.ศ.2535

บทคัดย่อ

ในประเทศไทย ผู้ป่วยเนื่องจาก การติดเชื้อมาลาเรียชนิด พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ (*Plasmodium vivax*) มีจำนวนสูงถึง 45% ดีเอ็นเอติดตาม เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจเชื้อมาลาเรียที่มีความไว และความจำเพาะสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดีเอ็นเอติดตามที่ใช้ในการตรวจเชื้อ *P. falciparum* ได้มีการพัฒนาจนสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ สำหรับการสร้างดีเอ็นเอติดตามชนิดที่ใช้ในการตรวจเชื้อ *P. vivax* นั้น ประสบปัญหาเนื่องจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดคนไข้ที่มีการติดเชื้อ *P. vivax* นั้น จะมีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของคนมาด้วยเสมอ

ในการทดลองนี้ ได้ทำการสกัด ดีเอ็นเอของเชื้อ *P. vivax* ซึ่งผ่านขั้นตอนการลดการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของคน โดยทำให้มีปริมาณเชื้อสูงขึ้นไปกว่าปกติถึง 300 เท่า หลังจากนั้น นำไปสร้างธนาคารดีเอ็นเอของ *P. vivax* โดยสร้างขึ้นในดีเอ็นเอพาหะ Bluecribe M13+ แล้วนำเข้าแบคทีเรีย *Escherichia coli* ดีเอ็นเอสายผสม ประมาณ 4,000 โคลน ได้ถูกคัดเลือกเพื่อหาโคลนที่มีความจำเพาะต่อ *P. vivax* โดยวิธีไฮบริดเชซัน พบว่า 1 ใน 3 โคลนนั้น B2 แสดงความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของ *P. vivax* สูงกว่าดีเอ็นเอของคน จากการศึกษาพบว่า B2 ประกอบด้วยดีเอ็นเอพาหะ 2 ชุด ขึ้นดีเอ็นเอจากคนขนาด 1.3 กิโลเบส และขึ้นดีเอ็นเอจากเชื้อ *P. vivax* ขนาด 1.1 กิโลเบส ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1.1 กิโลเบสนี้ แสดงความจำเพาะต่อ *P. vivax* โดยไม่ไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอของคน ยุง และพลาสโมเดียมชนิดอื่น ๆ หลังจากนั้นได้นำขึ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อ *P. vivax* นี้ เข้าสู่ Bluescribe

M13+ ได้โคลน pMU-PV2 จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pMU-PV2 พบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อ *P.vivax* ขนาด 1,161 เบส มีลำดับเบสอะดีนีน (A) และ ไซโทซีน (T) ติดต่อกันหลายชุด และยังพบลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 6 เบสที่มีความซ้ำๆ กันด้วย

เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อมาลาเรียชนิด *P.vivax* อย่างมีประสิทธิภาพ ดีเอ็นเอติดตามจำเป็นจะต้องมีความจำเพาะและความไวสูงด้วย จึงได้ดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี polymerase chain reaction มาใช้ โดย pMU-PV2 ถูกนำมาเป็นเป้าหมายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อ *P.vivax* ภายหลังการศึกษา และปรับปรุงวิธีการในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าชิ้นดีเอ็นเอขนาด 183 เบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเชื้อ *P.vivax* ในเลือดโดยตรง สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อ *P.vivax* ได้ โดยมีความไวในการตรวจหาเชื้อ *P.vivax* เพียง 1 ตัว ในเลือด 20 ไมโครลิตร

จากการตรวจเชื้อมาลาเรียในภาคสนาม จำนวน 233 ราย ด้วยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังกล่าว เปรียบเทียบกับการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์พบว่า วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีความไว และความจำเพาะ เท่ากับ 70.8 และ 75.6% ตามลำดับ ทั้งนี้โดยมีผลไม่สอดคล้องกับกล้องจุลทรรศน์ 25.3%

Thesis Title Construction of DNA Probe for the Detection of
Plasmodium vivax

Name Piengchan Rajkulchai

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisor Committee

Prapon Wilairat, Ph.D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Date of Graduation 29 October B.E. 2535 (1992)

ABSTRACT

Approximately 45% of malaria cases in Thailand are caused by *Plasmodium vivax*. Unlike *P.falciparum*, *in vitro* culture of *P.vivax* has not been successful. Previous molecular cloning of *P.vivax* specific DNA probe had failed due to human DNA contamination. In this study, DNA isolated from *P.vivax*-enriched patients blood was used to construct a genomic library. DNA was digested with Sau3A I and ligated to Bluescribe M13+ vector at BamH I site. Approximately 4,000 recombinant clones were screened for repetitive DNA using *P.vivax* DNA as the probe. From 23 clones containing repetitive DNA, 7 clones did not hybridize with human DNA. When these DNA clones were further hybridized with *P.falciparum* DNA followed by *P.vivax* DNA, 3 clones gave positive signal with *P.vivax* DNA probe. One of these clones, designated B2 contained 2 vectors and 2 inserted DNA. The 1.1 Kb inserted DNA fragment of B2 could detect *P.vivax* DNA to the level of 6.25 ng and did not hybridize to human, *P.falciparum*,

P.chabaudi, *P.berghei*, *P.cynomolgi* and mosquito DNA. This *P.vivax* specific fragment was subcloned into Bluescribe M13+ vector and named pMU-PV2. The nucleotide sequence of pMU-PV2 was determined. It contained 1,161 bp with 47.5% G+C content, with several short internal repeating sequences, runs of 5-7 consecutive A and T and no significant peptide and splice site sequences.

Five primer pairs for amplification of *P.vivax* infected blood were designed based upon the above *P.vivax* specific sequence. The amplification condition was optimized for sensitivity of the detection. One of these primer pairs which allowed amplification of 183 bp sequence of *P.vivax* DNA exhibited *P.vivax* specificity. Moreover, the sensitivity of 183 bp detection in *P.vivax*-infected blood was at 10^{-6} % parasitemia, which is equivalent to 1 parasite in 20 ul blood.

For the field validity, 233 field samples were tested and evaluated. The specificity and sensitivity of PCR method comparing to microscopic examination were 70.8 and 75.6%, respectively, with 25.3% disagreement.