LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

SOME APPROACHES FOR THE MOLECULAR CLONING OF *PLASMODIUM VIVAX* DNA IN *ESCHERICHIA COLI*

17 มี.ค. 2532

MANEE POOKANJANATAVIP

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

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล
IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1988

Copyright by Mahidol University

12064

ชื่อวิทยานิพนธ์ วิธีการโคลนนิ่ง (cloning) ของดีเอ็นเอของเชื้อมาเลเรีย ชนิด Plasmodium vivax เข้าไปในแบคทีเรีย Escherichia coli

ผู้วิจัย นางสาวมณี ผู้กาญจนทวีป

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์

รองศาสตราจารย์ ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม

ศาสตราจารย์ ดร. ยงยุทธ ยุทธวงศ์

วันที่สำเร็จการศึกษา 29 เมษายน 2531

บทคัดย่อ

ตัวอย่างเลือดที่มีการติดเชื้อมาลาเรียชนิด P. vivax (20-50 มล. ต่อคน) ได้รับจากคนไข้ที่มารับการตรวจที่หน่วยมาลาเรีย กระทรวงสาธารณสุขโดย มีเปอร์เซนต์ปาราสิตและเม็ดเลือดขาวในเลือดเฉลี่ยเท่ากับ 0.17% และ 0.13% ตามลำดับ พบว่าการนำเลือดมาผ่านคอลัมน์ แบบ CF-11 cellulose ไม่สามารถกำจัดเม็ดเลือดขาว แล้วยังมีผลทำให้มาตรของเม็ดเลือดแดงหายไปครึ่งหนึ่ง

การสร้างธนาคารดีเอ็นเอของ P. vivax สามารถทำได้ 3 วิธี ดังนี้ คือ วิธีแรก ดีเอ็นเอของ P. vivax ที่มีความหมายแน่นต่ำ ซึ่งได้จากการปั่นตัวอย่างดีเอ็นเอของ P. vivax ด้วยความเร็วสูงในภาวะที่มี Hoechst dye 33258 และซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) จะถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ Sau3AI และนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC12 ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ BamHI วิธีที่สอง ดีเอ็นเอของ

Copyright by Mahidol University

P. vivax ซึ่งถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ Sau3AI จะถูกนำมารวมเป็นสายคู่ (reannealed) กับดีเอ็นเอของคนที่ผ่านการทำให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยวิธี sonication แล้วนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUC12 ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ BamH I วิธีที่สาม คือ ดีเอ็นเอของ P. vivax ซึ่งถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ EcoRI* จะถูกนำมารวมเป็นสายคู่ (reannealed) กับดีเอ็นเอของคนที่ผ่านการ sonica - tion แล้วนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pUN121 ที่ถูกตัดด้วย EcoRI สายผสมที่เกิดขึ้นจะถูกใช้เพื่อเปลี่ยนแปลงเซลล์ของแบคทีเรีย ชนิด E. coli JM 107 โดยวิธี DMSO ตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมจำนวน 5,000 โคลน (clones) โดยวิธี colony hybridization เลือกโคลนที่มีแนวโน้มว่าจะจำเพาะต่อ P. vivax แล้วนำมาตรวจสอบอีกครั้งโดยวิธี Southern หรือ dot-blot hybridization

อย่างไรก็ตาม ด้วยความพยายามอย่างมากแล้ว การสร้างตัวตรวจจับที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของ P. vivax ก็ยังไม่บรรลุผลสำเร็จ เหตุเหล่านี้อาจเป็นเพราะการมีดีเอ็นเอของ P. vivax ในตัวอย่างดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อยเกินไป หรือมีความเหมือนกันระหว่างลำดับเบสของดีเอ็นเอแบบซ้ำๆ กัน (repetitive DNA sequences) ของ P. vivax กับ จีโนม (genome) ของคน

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Some Approaches For the Molecular Cloning of *Plasmodium vivax* DNA in *Escherichia coli*

Name Miss Manee Pookanjanatavip

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Associate Professor Prapon Wilairat, Ph.D.

Associate Professor Sakol Panyim, Ph.D.

Professor Yongyuth Yuthavong, D.Phil.

Date of Graduation April 29, 1988

ABSTRACT

P. vivax-infected blood samples (20-50 ml per case) were made available from patients who visited the outpatient clinic of the Malaria Eradication Center of the Ministry of Public Health. The average parasitemia and white cell count was 0.17% and 0.13% respectively. Passage of the blood samples through a CF-11 cellulose column failed to remove white cells, and only resulted in loss of half of packed red cell volume.

Three approaches were taken for the construction of *P. vivax* DNA library. Firstly, the less dense band of *P.*

Copyright by Mahidol University

vivax DNA, obtained by Hoechst dye 33258-cesium chloride density centrifugation, was digested with Sau3AI and ligated with BamHI-digested pUC12 vector. Secondly, Sau3AI-digested P. vivax DNA reannealed to sonicated human DNA was ligated with BamHI-digested pUC12 vector. Thirdly, EcoRI*-digested P. vivax DNA reannealed to sonicated human DNA was ligated with EcoRI-digested pUN121 vector. These ligated products were used to transform E. coli JM 107 cells by the DMSO method. 5,000 clones that were obtained from all libraries were first screened by colony hybridization, and potential P. vivax specific clones were then selected. The specificity of these clones were confirmed by Southern or dot-blot hybridization.

However, despite a great deal of effort, generation of P. vivax-specific DNA probes was unsuccessful. This may suggest that there was too little P. vivax DNA material present in the starting preparation, or that there were considerable homology between repetitive DNA sequences of P. vivax and the human genome.

Copyright by Mahidol University