

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญในปัจจุบันอันเนื่องมาจากสาเหตุหนึ่งคือไม่มีวัคซีนรักษาหรือป้องกันโรค การที่จะผลิตวัคซีนนั้นความรู้พื้นฐานที่สำคัญคือวิวัฒนาการของเชื้อและความหลากหลายของยีนในธรรมชาติ เพื่อที่จะเข้าใจกลไกของเชื้อและช่วยในการหาสารพันธุกรรมหรือยีนที่มีแนวโน้มสำหรับพัฒนาเป็นวัคซีน ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน การศึกษาแอนติเจนของเชื้อมักจะศึกษาในมาลาเรียฟาลซิพารัมซึ่งเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรง ในขณะที่มาลาเรียไวแวกซ์ที่พบบ่อยกลับมีข้อมูลน้อยมาก โปรตีน rhoptry (RhopH complex) เป็นโปรตีนหนึ่งที่มีการศึกษาในฟาลซิพารัมแล้วพบว่าโปรตีนนี้มีความสำคัญในการชักนำภูมิคุ้มกันของผู้ถูกอาศัยให้ต่อต้านการติดเชื้อ ดังนั้น RhopH complex เป็นโปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้พัฒนาวัคซีน ในปัจจุบันข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน RhopH มีน้อยมากในมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมจึงได้ทำการหาลำดับเบสของยีน 3 ชนิดของยีน rhoptry ชนิดที่ 1 ของมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ คือ PvRhopH1_1047, _3844 และ _3944 โดยใช้เลือดจากผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อสายพันธุ์เดียว 4 ตัวอย่าง ทำการเพิ่มจำนวนยีนโดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงของแต่ละยีนและทำพีซีอาร์ เรียงและเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งสายของยีนทั้งสามโดยเทียบกับยีน rhoptry ชนิดที่ 1 ของ เชื้อมาลาเรีย *P. knowlesi* สายพันธุ์ Sa-I และ EI Salvador จาก genome data base โดยใช้โปรแกรม Clustal W คำนวณความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์โดยใช้ซอฟต์แวร์ MEGA 3.1 จากการทดลองพบความหลากหลายของยีน PvRhopH1_3944 มากที่สุดจากทั้งหมดสามยีนและในตลอดความยาวของสายยีนนั้นพบความหลากหลายมากที่สุดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 1000-1200 (last exon) จากความหลากหลายที่พบนี้ จึงสรุปได้ว่า PvRhopH1_3944 น่าจะเป็นยีนที่มีแนวโน้มสำหรับเป็นแอนติเจนในการผลิตวัคซีน ดังนั้นจึงนำยีน PvRhopH1_3944 ทั้งสายแบ่งเป็น 5 ส่วนแล้วทำการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant proteins) โดยใช้วิธีใหม่คือวิธี Gateway System เพื่อไว้สำหรับทดสอบหาการแสดงออกของยีนในการศึกษา immunogenicity ในซีรัมของผู้ป่วย เริ่มด้วยทำการเพิ่มจำนวนยีนในแต่ละส่วนด้วยวิธีพีซีอาร์ หลังจากนั้นนำยีนใส่ในพลาสมิด pB12 แล้วทำ BP-LR reaction โดยใช้พลาสมิด pB12 ที่มียีนแต่ส่วนที่ insert เรียบร้อยแล้วเข้าสู่พลาสมิด pDONR 221โดยใช้เอ็นไซม์ BP clonase และหลังจากนั้นนำผลผลิตที่ได้เข้าสู่พลาสมิด pBAD-DEST49 โดยใช้เอ็นไซม์ LR clonase ท้ายสุดของปฏิกิริยาจะได้ expression clone ที่เป็น final construct ของทั้ง 5 ส่วนของยีน นำ final construct ของแต่ละส่วนทั้ง 5 นั้นเข้าไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย Rosetta-gami2 และทำการพิสูจน์ลำดับเบสของยีนแต่ละส่วนว่าถูกต้อง จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าเป็นการรายงานครั้งแรกที่สามารถหาความหลากหลายของยีน RhopH ชนิดที่ 1 ในมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วยในประเทศไทย และยังเป็นรายงานแรกที่ประสบความสำเร็จในการสร้าง construct ของยีน RhopH ชนิดที่ 1 ของเชื้อมาลาเรียไวแวกซ์โดยวิธี Gateway system

Malaria is now severe the world because there is no vaccine available. In order to produce vaccine, decoding evolutionary and genetic variation information is critical for understanding mechanism of parasite and identifying potential vaccine antigens. So far, most of antigens are studied in *P. falciparum*, the fatal species but not *P. vivax*, the species most commonly seen. Among the antigens, RhopH complex is rhoptry proteins in *P. falciparum* that were found to induce host immunity against infection. To date, little is known about RhopH complex in *P. vivax* genetic information. Thus we sequenced 3 *PvRhopH* genes; *PvRhopH1_1047*, *_3844* and *_3944* by using 4-singly Thai isolates. All 3 genes in all 4 samples were amplified by PCR using specific oligonucleotide primers. Open reading frame (ORF) of all genes were aligned and compared with genome data base of *P. knowlesi* (Sal I and El Salvador strains) by using Clustal W. Nucleotide diversity was computed by using MEGA 3.1 software. The results showed the most polymorphic occurred in *PvRhopH1_3944* around amino acid position 1000 -1200 and potentially be the vaccine candidate antigen. Consequently, *PvRhopH1_3944* was taken to construct recombinant protein by using Gateway System for future testing of the human sera in nature. *PvRhopH1_3944* was divided into 5 blocks, PCR amplified each block and inserted into pB12 plasmid. Later, BP-LR reaction had been performed by inserting pB12 plasmid carrying gene of each block into the donor plasmid, pDONR 221, by the help of BP clonase. Further, these entry clones were inserted into pBAD-DEST49 plasmid by the help of LR clonase to get the expression clones, the final constructs. Transforming the final constructs of each block of *PvRhopH1_3944* gene into Rosetta-gami2 competent cells was performed. Colony PCR and gene sequences had been checked for confirming the right insertion and sequences. In the conclusion, our study is the first report to study diversity of RhopH1 gene of *P. vivax* in Thai isolates. Moreover, our finding is also the first succeed report using Gateway system to help constructing the *PvrhopH1* gene.