

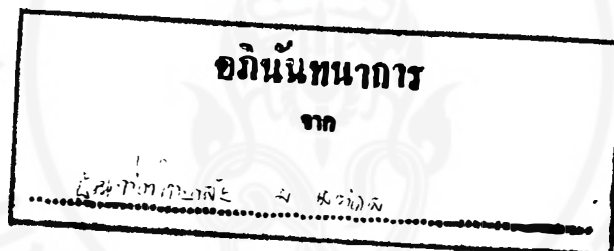


11 MAY 1992

**DEVELOPMENT OF A SIMPLE NONRADIOACTIVE METHOD
FOR DNA FINGERPRINTING WITH M13 PHAGE**

PORNPUN PUMICHOTI

๔



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

**IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1991

18856

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาการพิมพ์ลายมือดีเอ็นเอ โดยอาศัย ไวรัส และวิธีที่ไม่พึ่ง
 กัมมันตภาพรังสี

ผู้วิจัย พรพรรณ ภูมิโชติ

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

วิชัย บุญแสง, Ph.D.

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

อัญชลี ทศนาขจร, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

DNA "fingerprint" ได้มาจากการนำดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ แล้ว
 ทำ Southern blot และ hybridize ด้วยดีเอ็นเอตรวจตาม (probe) ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอ
 ของคนในส่วน variable number of tandem repeat (VNTR) แต่เนื่องจากต้องใช้สาร
 กัมมันตภาพรังสี ^{32}P ในการติดฉลากกับดีเอ็นเอตรวจตาม (probe) ประกอบกับจำเป็นต้อง
 ใช้ดีเอ็นเอตรวจตามที่ใช้จับกับ VNTR ซึ่งหาได้ยากไม่มีจำหน่ายทั่วไปจึงไม่สะดวกที่จะนำ
 มาใช้ในงานด้านนิติเวชหรือห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ จึงพัฒนาการทำ "ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
 ด้วยวิธีที่ไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี" โดยเลือกใช้ไวรัส M13 ซึ่งสามารถเตรียมขึ้นใช้เองได้
 แล้วติดฉลากด้วย biotin หรือ digoxigenin แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี ^{32}P ตามด้วย
 การใช้วิธีแสดงสัญญาณแบบสี (chromogenic detection) และวิธีแสดงสัญญาณแบบแสง
 (chemiluminescent detection)

ผลการทดลองพบว่า บุคคลที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดมีแบบแผนของลาย
 พิมพ์ดีเอ็นเอต่างกัน โดยแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความจำเพาะในแต่ละบุคคล แลปลสัญญาณที่
 ได้จากการทดลองโดยวิธีนี้ มีความเข้ม และความคมชัดอยู่ในช่วงขนาด 4 - 23 kb วิธีนี้ยัง

ให้ resolution ที่ดีกว่าวิธีที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี และเมื่อใช้ดีเอ็นเอตรวจตามที่มีประสิทธิภาพสูง (efficient probe) สามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนแม้ดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) มีปริมาณเพียง 1 μ g เมื่อใช้วิธีแสดงสัญญาณแบบสี และ 1 μ g เมื่อใช้วิธีแสดงสัญญาณแบบแสง เทคนิคนี้ยังใช้ประโยชน์ในการพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูกได้ โดยแถบสัญญาณของลูกครึ่งหนึ่งได้รับจากพ่อ อีกครึ่งหนึ่งมาจากแม่ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า ฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกันมีแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันทุกประการ รวมทั้งเลือดและอสุจิของชายคนเดียวกันก็มีแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน การทำ “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี” สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ ความเปลี่ยนแปลงของระบบการสร้างเม็ดโลหิตแดงในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคที่ไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี สามารถขจัดปัญหาที่สืบเนื่องมาจากการใช้สารกัมมันตภาพรังสีได้ อีกทั้งสะดวกปลอดภัย และรวดเร็วกว่า ยิ่งกว่านั้นดีเอ็นเอตรวจตาม (probe) ที่ติดฉลากด้วยสารที่ไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้งอีกด้วย

Thesis Title Development of a Simple Nonradioactive Method
for DNA Fingerprinting with M13 Phage.

Name Pornpun Pumichoti

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

 Vichai Boonseang, Ph.D.
 Sakol Panyim, Ph.D
 Anchalee Tassanakajon, Ph.D.

Date of Graduation 1 November B.E. 2534 (1991)

Abstract

DNA 'fingerprints' result when Southern blots are hybridized to probes against a variable number of tandem repeat (VNTR). This procedure is not readily applicable in forensic or medical laboratories because of the use of dangerous ^{32}P radioactive probes and the unavailability of probes that bind VNTR. This thesis describes nonradioactive methods for DNA fingerprinting with use of the widely available M13 bacteriophage as a probe, labeled with biotin and digoxigenin moieties instead of ^{32}P , and detection using chromogenic or chemiluminescent method. These nonradioactive methods for DNA fingerprinting with M13 phage yielded highly individual-specific DNA fingerprints. Clear, intense banding patterns especially in the 4 to 23 kilobase range were obtained. The methods have better resolution than regular radioactive procedures. Chromogenic detection of the same DNA fingerprint showed readable patterns down to 1 μg . Chemiluminescent detection of the same DNA fingerprint also showed readable patterns down to 1 μg . The technique also provided a

powerful method for establishing family relationships as each parents passed on an essentially random selection of about half of the DNA fingerprint bands to each child. The DNA fingerprints of monozygotic twins showed similar banding patterns. The DNA fingerprint of semen was identical to that of the blood from the same person. The data obtained also demonstrated a potential role of M13 DNA application as a probe for DNA fingerprinting analysis in bone marrow transplant cases. These nonradioactive techniques may allow laboratories to routinely perform DNA fingerprinting analysis without the problem inherent in the use of radioisotopes. Moreover, they have the advantages of being safer, quicker, and the labeled probes can be stored for a long time and be reused many times.