LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

9 AUG 1996

DNA PROFILING IN MAN

BY

POLYMERASE CHAIN REACTION

NUSRA SITIDILOKRATANA

With compliments
of
ปณิธานวิทยาลัย ม.มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright by Mahidol University

TH
N975D
1996

35895 c2

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในคนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ผู้วิจัย นุสรา สิทธิดิลกรัตน์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

วิชัย บุญแสง, Ph.D.

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

อัญชลี กมลนาวิน, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 5 เมษายน พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และดีเอ็นเอตรวจตามชนิด M13 ต้องการดีเอ็นเอปริมาณมากและมีคุณภาพดี แต่เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้จากสิ่งส่งตรวจในคดีต่างๆ มีปริมาณน้อย คุณภาพต่ำ และมีแบคทีเรียปนเปื้อนซึ่งไม่สามารถนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ ดังนั้นจึงพัฒนาการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างบุคคลได้ ไพรเมอร์ที่นำมาศึกษาได้มาจาก M13 core sequence, 400 RAPD primers และไพรเมอร์ที่คร่อมส่วนของ variable number of tandem repeat (VNTR) ในหลาย locus ได้แก่ D1S80 locus ตำแหน่ง 1p36 - p35 ของโครโมโซมที่ 1, D4S43 locus ตำแหน่ง 4p1.63 ของโครโมโซมที่ 4,

Copyright by Mahidol University

D17S30 locus ตำแหน่ง 17p13.3 ของโครโมโซมที่ 17 และ APO B locus ตำแหน่งปลาย 3' ของยีน apolipoprotein B

ผลการทดลองพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่คร่อมส่วนของ VNTR locus 4 locus และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอีเลคโตรโฟรีซิสสามารถให้ความแตกต่างระหว่างบุคคลได้ จากการศึกษาในคนไทย 70 คน พบจำนวน allele ในแต่ละ locus คือ 22, 11, 14 และ 13 สำหรับ D1S80 , D4S43, D17S30 และ APO B loci ตามลำดับ ความถี่ของประชากรที่มี heterozygous genotype ในแต่ละ locus คือ 0.81, 0.53, 0.85 และ 0.66 สำหรับ D1S80 , D4S43, D17S30 และ APO B loci ตามลำดับ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับ การตรวจสอบบุคคล, การตรวจสอบความเป็นพ่อ แม่ ลูก และใช้ในการติดตามการรักษาการปลูกถ่ายไขกระดูกในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาว นอกจากนี้ได้ทำการปรับปรุงวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยสามารถสกัดดีเอ็นเอจากเลือด คราบเลือด อสุจิ และคราบอสุจิปริมาณน้อยๆที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และตู้เย็นด้วย Chelex 100 ดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อประยุกต์ใช้ในงานทางนิติเวชวิทยา เนื่องจากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมีความไวสูง, ง่าย, รวดเร็ว และสามารถทำได้สำเร็จภายใน 1 วัน ดังนั้นจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title DNA Profiling in Man by Polymerase Chain Reaction

Name Nusra Sitidilokratana

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Vichai Boonsaeng, Ph.D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Anchalee Kamolnavin, Ph.D.

Date of Graduation 5 April B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

The disadvantages associated with DNA fingerprinting by RFLP and Southern blot analysis of forensic biological samples such as insufficient DNA, degraded DNA can be resolved in part by the polymerase chain reaction (PCR) technique. Various primers including M13 core sequence, 400 RAPD primers as well as primers which amplified 4 variable number of tandem repeat (VNTR) loci were tested for human polymorphisms. Different DNA banding patterns between individuals were observed from amplification of 4 VNTR loci. Four VNTR loci used for amplification of human genomic DNA were : D1S80 located on chromosome 1p36-p35; D4S43 located on chromosome 4p1.63; D17S30 located on chromosome 17p13.3 and APO B located in the 3' flanking region of the apolipoprotein B gene. DNA profiling of each individual was obtained by amplification of these hypervariable loci and subsequent analysis with agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. More than 70 unrelated Thai individuals were studied. The number of alleles detected in the population were

Copyright by Mahidol University

22, 11, 14 and 13 for D1S80, D4S43, D17S30 and APO B VNTR loci, respectively. The observed heterozygote frequencies of the loci were 0.81, 0.53, 0.85 and 0.66, for D1S80, D4S43, D17S30 and APO B loci respectively. DNA profiling obtained from amplification of these 4 VNTR loci were used in human population studies, individual identification, paternity and maternity determinations. Moreover, the DNA profiling also provided a powerful method for monitoring bone marrow transplantation in patient with chronic myeloblastic leukemia. Chelex based-DNA extraction of a minute amount of whole blood, blood stain, semen and semen stain which were left at room temperature or refrigerated at 4 °C up to a period of 4 weeks could be used to generate individual specific DNA profiling. Thus, this technique can also be applied for forensic medicine. DNA profiling by PCR-based method was simple, highly sensitive and rapid. The analysis could be performed within one day compared to approximately 1 week for the conventional Southern blot analysis. Therefore, it can be used for routine analysis in many laboratories.

Copyright by Mahidol University