LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

3 1 AUG 1992

NONRADIOACTIVE DNA PROBE FOR SPECIFIC DETECTION OF HUMAN MALARIA

DUONGRUITAI NICOMRAT

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

ยืมนันทนาการ
จาก

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

1992

19299

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาการตรวจสอบสำเร็จรูปโดยใช้สารเคมี เพื่อช่วยการวินิจฉัยโรคมาลาเรีย

ผู้วิจัย ดวงฤทัย นิคมรัฐ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D.

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 22 พฤษภาคม พ.ศ 2535

บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาที่สำคัญโรคหนึ่งที่ก่ออันตรายถึงแก่ชีวิต พบว่าโรคนี้มีการระบาดทั่วไปใน ประเทศเขตร้อน ซึ่งในที่นี้รวมถึงประเทศไทยด้วยการตรวจสอบด้วยสารไม่ใช้รังสี เป็นวิธีหนึ่งซึ่ง สามารถตรวจสอบเชื้อมาลาเรียในเลือดของผู้ป่วยนอกเหนือจากวิธีของการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในปัจจุบัน วิธีนี้เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยเชื้อของเลือดของผู้ป่วยได้คราวละมากๆ หรือในกรณีที่มีการระบาดของโรค เทคนิคการตรวจสอบด้วยสารไม่ใช้รังสีนี้ใช้หลักการ hybridization ของเบสคู่สมของเชื้อมาลาเรียกับดีเอ็นเอตรวจตาม (DNA probe) ซึ่งที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันในตลาดมี 3 ระบบใหญ่ๆ ได้แก่ The Genius™ The Photogene และ The Enhanced Chemiluminescent Detection System ชุดการตรวจสอบของ The Genius™ (Digoxigenin method) ได้ถูกเลือกขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสม โดยมีขั้นตอนเริ่มจาก หยดเลือดที่ปราศจากสารป้องกันเลือดแข็งตัวของ heparin จำนวน 5 ul ลงบนแผ่นไนลอนชนิด GeneScreen membrane หลังจากเลือดแห้ง 1-6 ชั่วโมง สีของเลือดจะถูกกำจัดด้วย 10 mM Tris 1 mM EDTA นาน 10 นาที และตามด้วย การ fix DNA ใน 0.1 N NaOH นาน 20 นาที และ 1 M Tris-HCl pH 7.4 นาน 10 นาที และกำจัดสีของเลือดที่หลงเหลืออยู่ ด้วยการ แช่ใน 0.25% SDS นาน 30 นาที ก่อนที่จะทำการ hybridization

Copyright by Mahidol University

ด้วยดีเอ็นเอตรวจตาม (Rep 20) ที่ติดฉลากด้วย สาร Digoxigenin ตำแหน่งที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ จะสามารถถูกตรวจสอบต่อด้วยการแสดงสัญญาณของสีม่วงเข้มบนแผ่นไนลอน หรือ ให้สัญญาณของแสงที่แสดงสีดำบนแผ่น X-ray และจากผลการทดลองที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจสอบเชื้อมาลาเรีย ในเลือดได้ในเวลา 12-14 ชั่วโมง ด้วยประสิทธิภาพ 0.004% parasitemia ของเชื้อที่ถูกเพาะเลี้ยง (parasites cultured in vitro)

ชุดพัฒนาตรวจสอบที่ปรับปรุงจากวิธีการของdigoxigenin โดยการดูสีนั้น ได้ถูกนำมาทดสอบใช้ในภาคสนามกับผู้ป่วย 1316 คน ของ 4 จังหวัด ในประเทศไทย ได้แก่ ตราด กาญจนบุรี แม่ฮ่องสอน และ ยะลา พบว่าผลการทดลองด้วยวิธีนี้สามารถตรวจผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียได้ประมาณ 100 คน ต่อ 1 ไมโครกรัม ของ Digoxigenin DNA ซึ่งพบว่าเมื่อเปรียบเทียบวิธีนี้ กับวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเจ้าหน้าที่จากมาลาเรียคลินิค พบ 11.7% ผลขัดแย้ง ซึ่งประกอบด้วย 3% ของผลบวกเทียม และ 8.7% ของผลลบเทียม แต่อย่างไรก็ตาม วิธีนี้สามารถตรวจสอบเชื้อมาลาเรียในเลือดของผู้ป่วยด้วยความเชื่อมั่นได้ตั้งแต่ 0.01% parasitemia ขึ้นไปหรือเทียบเท่ากับอย่างน้อย 2,500 parasites

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Nonradioactive DNA Probe for Specific Detection of Human Malaria

Name Duongruitai Nicomrat

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Mathurose Ponglikitmongkol, Ph.D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Date of Graduation 22 May B.E. 2535 (1992)

ABSTRACT

Malaria is still one of the deadliest and wide spread diseases in tropical countries including Thailand. Nonradioactive detection system is an alternative approach for detection of specific malaria parasite in blood samples other than microscopic examination. This technique is suitable for processing a number of samples simultaneously. A simple nonradioactive DNA hybridization assay for detection of Plasmodium falciparum in blood samples was developed. Among three commercial nonradioactive hybridization kits tested (the Genius™, the Photogene, and the Enhanced Chemiluminescent Detection System), the Genius™ System (digoxigenin method) was selected for optimization. The procedure involved spotting, five ul of blood collected in non-heparinized tubes onto GeneScreen Plus membrane. After drying for 1-6 hr, the dotted membrane was treated with 10 mM Tris 1 mM EDTA solution for 10 min, 0.5 N NaOH for 20 min, 1 M Tris-HCl pH 7.4 for 10 min, and 0.25% SDS solution for 30 min. These treatments were necessary for removing blood color background before further hybridization.

Copyright by Mahidol University

The probe was prepared from 1 ug of HindIII-digested Rep20 DNA (Rep20-H) using digoxigenin-dUTP labelling by random primed method. After 4 hr hybridization at 42°C, the probe was detected by using antidigoxigenin-alkaline phosphatase conjugate. Positive signals were shown up as blue precipitates on membrane or as dark spots on X-ray film when chromogenic or chemiluminescent substrates were added respectively. The processing time for detction of parasites was 12-14 hr. This modified digoxigenin method showed detection sensitivity of approximately 0.004% parasitemia determined by using parasites cultured in vitro.

In field application, 1316 blood samples collected from four different endemic areas in Thailand, i.e. Trad, Kanjanaburi, Mae Hongson, and Yala were examined by this modified digoxigenin method. One hundred blood samples (5 ul each) can be probed using with 1 ug of digoxigenin-Rep20-H DNA. The results revealed 11.7% disagreement when compared with clinic microscopy comprising 3 % false positives and 8.7% false negatives. However, the digoxigenin method had a reliable sensitivity of approximately greater than 0.01% parasitemia (25,000 parasites) when used to detect parasites in blood samples.

Copyright by Mahidol University