

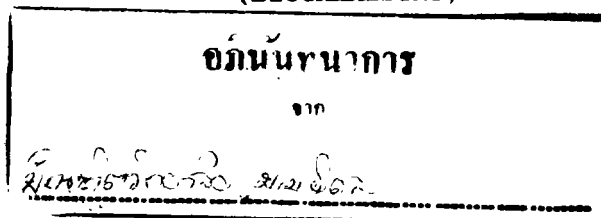


3 1 AUG 1992

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)



IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1992

19299

ด้วยดีเอ็นเอตรวจตาม (Rep 20) ที่ติดฉลากด้วย สาร Digoxigenin ตำแหน่งที่มีเชื้อ มาลาเรียอยู่ จะสามารถถูกตรวจสอบต่อด้วยการแสดงสัญญาณของสีม่วงเข้มบนแผ่น ไนลอน หรือ ให้สัญญาณของแสงที่แสดงสีดำนบนแผ่น X-ray และจากผลการทดลองที่พัฒนาขึ้น สามารถ ตรวจสอบเชื้อมาลาเรีย ในเลือดได้ในเวลา 12-14 ชั่วโมง ด้วยประสิทธิภาพ 0.004% parasitemia ของเชื้อที่ถูกเพาะเลี้ยง (parasites cultured *in vitro*)

ชุดพัฒนาตรวจสอบที่ปรับปรุงจากวิธีการของ digoxigenin โดยการดูลิ้น ได้ถูกนำมาทดสอบใช้ในภาคสนามกับผู้ป่วย 1316 คน ของ 4 จังหวัด ในประเทศไทย ได้แก่ ตราด กาญจนบุรี แม่ฮ่องสอน และ ยะลา พบว่าผลการทดลองด้วยวิธีนี้สามารถตรวจผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียได้ประมาณ 100 คน ต่อ 1 ไมโครกรัม ของ Digoxigenin DNA ซึ่งพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีนี้ กับวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเจ้าหน้าที่จากมาลาเรีย คลินิก พบ 11.7% ผลขัดแย้ง ซึ่งประกอบด้วย 3% ของผลบวกเทียม และ 8.7% ของผลลบ เทียม แต่อย่างไรก็ตาม วิธีนี้สามารถตรวจสอบเชื้อมาลาเรียในเลือดของผู้ป่วยด้วยความเข้มข้น ได้ตั้งแต่ 0.01% parasitemia ขึ้นไปหรือเทียบเท่ากับอย่างน้อย 2,500 parasites

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 detection 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.