LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

b10869517

DNA FINGERPRINTING IN PATERNITY TESTING

PRAMOTE SRIWANITCHARAK

With compliments
of
นิณทิศาวิทยาลัย ม.มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (CLINICAL PATHOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1998

ISBN 974-589-249-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P298 D
1998

Copyright by Mahidol University

3536138 RACP/M: MAJOR: CLINICAL PATHOLOGY; M.Sc. (CLINICAL PATHOLOGY)
KEY WORD : DNA FINGERPRINTING / MINISATELLITES/ PATERNITY TESTING / POLYMERASE CHAIN REACTION

PRAMOTE SRIWANITCHARAK: DNA FINGERPRINTING IN PATERNITY TESTING. THESIS ADVISOR: PIMOL CHIEWSILP, M.D., VICHAI BOONSAENG, Ph.D., TASANEE MONGKOLSUK, M.Sc., KANCHANA SUJIRACHATO, Ph.D., GALAYANEE DOUNGCHAWEE, M.Sc., 85 p. ISBN 974-589-249-1

Paternity is usually determined by using blood group systems ,red cell enzymes, serum proteins, and human leukocyte antigens (HLA). Recently, DNA fingerprint technique has been used for paternity test. **Objectives**: First, comparison the results from DNA fingerprinting by using polymerase chain reaction of variable numbers of tandem repeat (PCR-VNTR) loci and HLA typing in paternity test. Second, developing digoxigenin labeled M13 probe for multilocus DNA fingerprinting using PCR incorporation technique. **Materials & Methods**: PCR-VNTR, amplification of minisatellite repeated sequence was the selected method. The four VNTR loci, D1S80, D4S43, D17S30, APO B, were used. The product of PCR-VNTR gave a characteristic pattern for each individual. The 8 paternity cases with family size 3-4 subjects were tested. The subject identification was done before collection of blood samples. All paternity cases were tested by PCR-VNTR and HLA typing. For digoxigenin labeled M13 probe by using PCR, the specific primer for M13 probe was used . **Results**: Both methods gave the same interpretation with K=1. In 3 of the 8 paternity cases, the alleged fathers can be excluded. Based on Mandel law indicated that half of a child's DNA come from the mother and the other half must therefore come from the father. For digoxignin labeled M13 probe by using PCR, the amount of template M13 DNA used for labeling reaction was 10 ng and yeilded appproximately 100 ng of probe. The digoxigenin labeled M13 probe gave clear determination fingerprint pattern. **Discussion & Conclusion**: The PCR-VNTR method is suitable for paternity testing. Using this method, the plausibility of paternity in nonexcluded men is 3.38×10^{-4} which means that it would expect to find 3 in 10,000 unrelated individuals who have the same DNA fingerprint patterns when 4 loci were tested. The 100 ng of PCR digoxigenin labeling M13 probe can be used for 20 tests. This method is simplicity, rapidity and reproducibility.

Copyright by Mahidol University

3536138 RACP/M : สาขาวิชา : พยาธิวิทยาคลินิก ; วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)
ปราโมทย์ ศรีวาณิชรักษ์ : การนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ใน การพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก (DNA fingerprinting in paternity testing) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พิมล เชี่ยวศิลป์, พบ.,วิชัย บุญแสง, Ph.D.,ทัศนีย์ มงคลสุข,วท.ม.,กาญจนา สุจิรชาโต, Ph.D., กัลลยานี ดวงฉวี, วท.ม. 85 หน้า ISBN 974-589-249-1

การตรวจพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก โดยทั่วไปมักตรวจดูจากหมู่เลือดระบบต่างๆ ชนิดเอ็นไซม์ของเม็ดเลือดแดง ชนิดโปรตีนในซีรั่ม และชนิดของเนื้อเยื่อเป็นหลัก ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาช่วยในการตรวจยืนยัน **วัตถุประสงค์** ในการศึกษาคือเปรียบเทียบการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR-VNTR ซึ่งอาศัยหลักการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับการตรวจชนิดของเนื้อเยื่อในการตรวจพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูกและพัฒนาการสร้าง probe โดยทำการติดฉลาก M13 ด้วย digoxigenin โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค multilocus DNA fingerprinting **วัสดุและวิธีการ** เทคนิค PCR-VNTR ไพรเมอร์ที่ใช้จะจำเพาะกับ locus ที่ศึกษา ได้แก่ D1S80 locus, D4S43 locus, D17S30 locus และ APO B locus ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จะมีความจำเพาะในแต่ละบุคคล โดยศึกษาใน 8 ครอบครัวแต่ละครอบครัวมีจำนวนสมาชิก 3-4 คน ซึ่งได้ผ่านการตรวจสอบ subject identification ก่อนเจาะตัวอย่างเลือด ในการสร้าง probe ไพรเมอร์ที่ใช้จะจำเพาะกับบริเวณที่จะทำ probe พร้อมกับการติดฉลาก probe ด้วย digoxigenin ในขณะที่สร้าง probe โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส **ผลการศึกษา** พบว่าเทคนิค PCR-VNTR กับการตรวจชนิดของเนื้อเยื่อ ในการตรวจพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก ทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกันทั้งหมด โดยมีค่าทางสถิติ K=1 3 ใน 8 ครอบครัวสามารถปฏิเสธความเป็นพ่อได้ โดยอาศัยกฎของเมนเดลที่ว่าลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของลูกจะมีแถบดีเอ็นเอครึ่งหนึ่งที่เหมือนแม่ ครึ่งที่เหลือจะต้องเหมือนพ่อ สำหรับการพัฒนาการสร้าง probe โดยการติดฉลาก M13 ด้วย digoxigenin โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ปริมาณใช้ M13 DNA เพียง 10 ng สามารถสร้าง probe ได้ถึง 100 ng ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถบอกความแตกต่างแต่ละบุคคลได้ชัดเจน จากการศึกษานี้เทคนิค PCR-VNTR มีความเหมาะสมในการตรวจพิสูจน์พ่อแม่ลูก ถ้าผลที่ได้จากเทคนิคนี้ไม่สามารถปฏิเสธความเป็นพ่อของเด็กได้ โอกาสที่ชายนี้ไม่ใช่พ่อก็เป็นไปได้ แต่น้อยมากเท่ากับ 3.38×10^{-4} หรือ 3:10,000 ซึ่งหมายความว่าเมื่อทดสอบคนทั่วไปที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกัน 10,000 คนจะมีโอกาสพบว่ามี 3 คนที่ได้ผลของแถบดีเอ็นเอปรากฏเหมือนกันทั้ง 4 loci สำหรับการสร้าง probe ด้วยเทคนิคการติดฉลาก M13 DNA probe ด้วย digoxigenin โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนี้ จะได้ปริมาณ probe ที่สามารถใช้ได้ 20 การทดสอบ การสร้าง probe ด้วยวิธีนี้พบว่า ง่าย รวดเร็ว และได้ปริมาณและคุณภาพของ probe สม่ำเสมอในแต่ละครั้งที่ผลิต เหมาะสำหรับการใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Copyright by Mahidol University