ข้อมูลพื้นฐานของตำแหน่งช็อทแทนเดมรีพีท เพื่อประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์บุคคลและความเป็นพ่อลูก

นางสาว อัญชลี ก่องศรีสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-643-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 15417626S

POPULATION DATA ON SHORT TANDEM REPEAT LOCI FOR PERSON IDENTIFICATION AND PATERNITY TEST

Miss Unchalee Kongsrisook

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Science

Programme of Medical Science

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-639-643-9

Thesis Title	POPULATION DATA ON SHORT TANDEM REPEAT LOCI FOR PERSON IDENTIFICATION AND PATERNITY TEST
By	Miss Unchalee Kongsrisook
Programme	Medical Science
Thesis Advisor	Associate Professor Tada Sueblinvong, M.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.

Accepted by Graduate School, Chulalongkorn University in Partial of Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Assistant Professor Nantana Sirisup, M.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Tada Sueblinvong, M.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Wilai Anomasiri, M. Sc., Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อัญชลี ก่องศรีสุข : ข้อมูลพื้นฐานของตำแหน่งช็อทแทนเดมรีพีท เพื่อประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์บุคคลและความเป็นพ่อลูก (POPULATION DATA ON SHORT TANDEM REPEAT LOCI FOR PERSON IDENTIFICATION AND PATERNITY TEST) อ. ที่ปรึกษา : รศ.พญ. ธาดา สืบหลินวงศ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ; 98 หน้า ISBN 974-639-643-9

ช็อทแทนเดมรีพีท (short tandem repeat, STR) คือส่วนของดีเอนเอ (DNA) ที่มีการเรียงกันซ้ำ ๆ โดยใน 1 หน่วยซ้ำ มีขนาด 1 -6 เบส ช็อทแทนเดมรีพีท มีความหลากหลายรูปแบบสูงสามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่ ไปสู่ลูกได้ และสามารถศึกษาโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) การใช้ช็อทแทนเดมรีพีทเพื่อจำแนกดีเอนเอ กำลังจะเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญในทางนิติเวช แต่ก่อนที่จะนำช็อทแทนเคมรีพีทตำแหน่งใด ๆ ไปใช้ ควรที่จะทำการศึกษาข้อมูลในกลุ่มประชากรนั้น เพื่อการเลือกใช้ ช็อทแทนเดมรีพีทตำแหน่งที่เหมาะสม

การศึกษากระทำโดย แยกสกัดดีเอนเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ของกลุ่มตัวอย่างซึ่งเป็นบุคคลที่ไม่ใช่เครือญาติกัน จำนวน 200 ตัวอย่าง โดยวิธี salting-out และวัดปริมาณของดีเอนเอที่สกัดได้โดยทดสอบการดูดแสงที่ 260 นาโนเมตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอนเอบริเวณตำแหน่ง STR ที่ต้องการศึกษา โดยเทคนิค PCR ดังตำแหน่งต่อไปนี้ CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS, F13B, LPL และ vWA นำ PCR product ที่ได้มาแยกขนาดโดย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมด้วย silver stain

จากการศึกษาพบว่า STR ตำแหน่ง F13A01 และ vWA พบจำนวนอัลลีล (allele) ถึง 10 อัลลีล, CSF1PO พบ 8 อัลลีล, FESFPS พบ 7 อัลลีล, TH01 และ LPL พบ 6 อัลลีล, TPOX และ F13B พบ 5 อัลลีล พิสัยของค่า heterozygosity มีค่าระหว่าง 42 เปอร์เซ็นต์ ถึง 86 เปอร์เซ็นต์ STR ทุกตำแหน่งเป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg STR ในตำแหน่ง F13B, LPL และ TPOX ไม่มีความหลากหลายรูปแบบสูงมากดังในประชากรอื่น ส่วน STR อีก 6 ตำแหน่ง เมื่อนำมาใช้ร่วมกันจะทำให้ Power of exclusion (PE) มีค่า 0.9834 และค่า Discrimination power (DP) มีค่าสูงถึง 0.999995 ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นชุดของ STR สำหรับการพิสูจน์บุคคลและความเป็นพ่อลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต อัญชลี ก่องศรีสุข

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ธาดา สืบหลินวงศ์

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C845076 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS: SHORT TANDEM REPEAT / PERSON IDENTIFICATION / PATERNITY TEST

UNCHALEE KONGSRISOOK : POPULATION DATA ON SHORT TANDEM REPEAT LOCI FOR PERSON IDENTIFICATION AND PATERNITY TEST. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. TADA SUEBLINVONG, M.D. THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D., Ph.D. 98 pp. ISBN 974-639-643-9

Short tandem repeat (STR) loci are highly polymorphic markers composed of short, repetitive sequence elements of 1 to 6 base pairs in length and display Mendelian inheritance characteristics. STR loci are amenable to analysis by polymerase chain reaction. STR has become a powerful technique in forensic DNA typing. Prior to introduction of a new DNA profiling method, a statistical analysis of the population needs to be undertaken. The aim of this study was to establishe population data of STR loci in the Thai population.

Whole blood samples of 200 unrelated individuals were collected. DNA was extracted by the salting-out method and quantitated by measuring the optical density at 260 nm. The tetrameric STR loci for amplification were CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS, F13B, LPL and vWA. The PCR products were separated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and detected by silver staining.

A total of 10 alleles for F13A01 and vWA, 8 alleles for CSF1PO, 7 alleles for FESFPS, 6 alleles for TH01 and LPL, and 5 alleles for TPOX and F13B can be observed. The range of observed heterozygosity is between 42% and 86%. No significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium ($p > .05$) between observed and expected genotype frequencies has been found in any one system. Three of the eight loci examined (F13B, LPL and TPOX) do not appear as highly polymorphic as observed in other populations. For the other six loci, the combined average power of exclusion (PE_{inc}) is 0.9834 and the combined discrimination power (DP) is 0.999995. Hence, the combination of these useful systems results in a more powerful DNA typing and can be used as a battery for person identification and paternity test.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา ๒๕๔๑ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

Acknowledgement

This thesis has been successful due to the valuable help, advice, suggestions and interest of my advisor, Associate Professor Dr. Tada Sueblinvong, Department of Biochemistry, and my coadvisor, Assistant Professor Dr. Apiwat Mutirangura, Department of Anatomy to whom I would like to express my deep gratitude.

I am also deeply grateful to Assistant Professor Wilai Anomasiri, Department of Biochemistry for the valuable help, discussions and suggestions. I am grateful to Associate Professor Sukanya Werawatgoompa, Department of Biochemistry, for her interest and encouragement.

I would like to give my special thanks to Mr. Wichai Pornthanakasem, Miss Sairoong Sukdikul, Miss Rattana Chatsantikul, scientist and technician for their help and cheerful. In addition, I would like to express my special thanks to the competent officials of the Department of Biochemistry and the Department of Physiology for providing me the conveniences.

Furthermore, this study was supported by the Molecular Biology Department of Research Affairs, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Graduate School, Chulalongkorn University.

Finally, I would like to express my deep gratitude to my parents and friends for the unconditionally and continuing support throughout my work.

List of Contents

Page

Abstract (Thai)..... iv

Abstract (English)..... v

Acknowledgement..... vi

List of Contents..... vii

List of Tables..... ix

List of Figures..... x

List of Abbreviations..... xi

Chapter

1 Introduction..... 1

2 Literature review..... 10

3 Materials and Methods..... 16

Specimens..... 16

Materials..... 16

Equipment..... 17

Reagents..... 18

Methods..... 20

4 Results and Discussion..... 41

DNA extraction..... 41

PCR amplification..... 41

Electrophoresis..... 43

Silver staining..... 44

Allele determination..... 45

Statistical analysis..... 46

5 Conclusion and Suggestion..... 67

Page

References..... 68

Appendix..... 76

Appendix A..... 77

Appendix B..... 81

Biography..... 86

List of Tables

Table Page

1. Locus-Specific Information.....25
2. Additional Locus-Specific Information..... 26
3. Locus-Specific Primer Sequences..... 27
4. CSF1PO genotypes and allele frequencies.....57
5. TPOX genotypes and allele frequencies..... 58
6. TH01 genotypes and allele frequencies..... 59
7. F13A01 genotypes and allele frequencies..... 60
8. FESFPS genotypes and allele frequencies..... 61
9. F13B genotypes and allele frequencies..... 62
10. LPL genotypes and allele frequencies..... 63
11. vWA genotypes and allele frequencies..... 64
12. Statistics for forensic identification and parentage analysis..... 65
13. Difference of allele distributions between populations..... 66

List of Figures

Figure Page

1. From genes to proteins..... 3
2. Two types of RFLP..... 4
3. Schematic diagram illustrating different types of polymorphic markers.....7
4. Organisation and internal structure of short tandem repeats.....10
5. Sequi-Gen GT casting parts..... 30
6. Sequi-Gen GT nucleic acid electrophoresis cell..... 33
7. Agarose gel electrophoresis.....50
8. Analysis of a multiplex PCR reaction at CSF1PO-TPOX-TH01 loci.....51
9. STR profile of the vWA locus..... 52
10. F13A01 genotypes obtained from polyacrylamide gel electrophoresis...53
11. FESFPS genotypes obtained from polyacrylamide gel electrophoresis...54
12. Analysis of F13B and LPL amplicons obtained from separate single PCR and loaded simultaneously on polyacrylamide sequencing gel.....55
13. The heterozygosity of each STR loci of the Thai population compared with other populations..... 56

List of Abbreviations

DNA	Deoxyribonucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
VNTR	Variation number of tandem repeat
STR	Short tandem repeat
PI	Paternity Index
PE	Power of exclusion
Pm	Probability of matching
DP	Discrimination power
PIC	Polymorphism Information Content
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
rpm	Revolution per minute
kb	Kilobases
bp	Basepair
g	Gram
mg	Milligram
µg	Microgram
ng	Nanogram
pg	Picogram
ml	Millilitre
µl	Microlitre
M	Molar
mM	Millimolar
µM	Micromolar

UV	Ultraviolet
OD	Optical density
nm	Nanometre
mm	Millimetre
cm	Centimetre
^{o}C	Degree Celsius
w/v	Weight per volume
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
W	Watt
V	Volt
Fig.	Figure