Thesis Title	Polymerase Chain Reaction Technique for Diagnosis of Homozygous α-Thalassemia in Preimplantation Embryo
Author	Miss Nonglak Phumyu
M.S.	Biology

Examining Committee	Dr. Wilaiwan Suphabphant	Chairman
	Prof. Torpong Sanguansermsri	Member
	Assoc. Prof. Hattaya Kawewong	Member

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ABSTRACT

In this study, the feasibility of preimplantation diagnosis of homozygous α-thalassemia from embryo was investigated. Since embryos were in short supply, amniocytes counted under a microscope were used for optimization of cell lysis conditions and amplification. Deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted by digestion of previously frozen cells with proteinase K and amplified with primer-extension-preamplification (PEP) using 15-mer random primers. The PEP product was analyzed the α-thalassemia-1 of Southeast Asian haplotype by using polymerase chain reaction (PCR). With three primers in one reaction, the 314 basepairs

fragment was amplified on normal alleles with primers A and B. Whereas primers A and C detected the α-thalassemia-1 deletion, the 188 basepairs fragment was obtained. The success of amplification was checked by agarose gel electrophoresis. Negative control that were absence of cells resulted in no PCR signals, indicating that the extraction amplification system was free of contaminating DNA. The problem in this study was failure amplification because PCR results disagreed to the positive control. In the further experiment, adjustment of the condition for diagnosis of homozygous α-thalassemia in preimplantation embryo should be done.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การใช้เทคนิคโพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน วินิจฉัยโรคโฮโมไซกัส อัลฟา-ธาลัสซีเมีย จากเซลล์ตัวอ่อนก่อนการฝังตัวในโพรงมดลูก

ชื่อผู้เขียน นางสาวนงลักษณ์ พุ่มอยู่

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
อ. ดร. วิไลวรรณ สุภาพพันธุ์ ประธานกรรมการ
ศ. นพ. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี กรรมการ
ผศ. หัทยา กาวีวงศ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

ในการหาความผิดปกติ อัลฟา-ธาลัสซีเมีย ชนิดที่พบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากเซลล์ของตัวอ่อนก่อนการฝังตัวในโพรงมดลูกนั้น เนื่องด้วยปริมาณเซลล์ของตัวอ่อนมีจำนวนจำกัด จึงศึกษาหาสภาพที่เหมาะสมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเซลล์ตัวอ่อน โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม 2 ขั้นตอน ซึ่งขั้นตอนที่ 1 เป็นการเพิ่มสารพันธุกรรมทั้งหมดแบบสุ่ม โดยใช้ตัวตั้งต้นการสร้างสารพันธุกรรมที่มีความยาวของเบส 15 ตัว และขั้นตอนที่ 2 เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบเจาะจง โดยใช้ตัวตั้งต้นการสร้างสารพันธุกรรม 3 ชนิด และมีการหาความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เหมาะสมกับเทคนิคการสกัดสารพันธุกรรมจากเซลล์ก่อนที่จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในขั้นตอนที่ 1 ผลิตผลที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายจะนำไปแยกขนาดของสารพันธุกรรมโดยการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า สารพันธุกรรมที่ปกติและผิดปกติจะให้แถบที่จำเพาะตำแหน่งและมีคู่เบสเป็น 314 และ 188 ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์จากน้ำคร่ำมาทำการทดลอง พบว่าผลการทดลองไม่สอดคล้องกับชุดควบคุม