

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีการวัดความยาวเทโลเมียร์แบบจำเพาะโครโมโซม	
ผู้เขียน	นายสุรสิทธิ์ บุพชาติ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ. ดร. วิโรจน์ ดันติเวชอกกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ. ดร. อริยพงษ์ วงษ์นพวิษฐ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. อริสา บอนเนซซ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ได้ชี้ให้เห็นว่าการมีเทโลเมียร์ที่สั้นที่สุดจากเพียงโครโมโซมเดียวอาจเพียงพอสำหรับการกระตุ้นเซลล์ให้เข้าสู่ภาวะชรา ซึ่งคำกล่าวนี้นับสนับสนุนสมมติฐานที่ว่าเทโลเมียร์ที่สั้นที่สุดจากโครโมโซมเดียวสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการมีอายุยืนได้ดีกว่าความยาวเทโลเมียร์เฉลี่ยจากทุกโครโมโซม และแขนข้างสั้นของโครโมโซม 17 (Chr17p) ได้ถูกเชื่อว่ามีเทโลเมียร์ที่สั้นที่สุด ในปัจจุบัน single telomere length analysis (STELA) เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดความยาวเทโลเมียร์จาก Chr17p โดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ต้องอาศัยขั้นตอนที่ยุ่งยากในการติดตัวเชื่อม (linker) เข้ากับปลายเทโลเมียร์และยังต้องใช้ไพรเมอร์ที่ติดฉลากสารรังสีสำหรับตรวจหาผลิตภัณฑ์ การศึกษานี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีที่ข้ามขั้นตอนการติดตัวเชื่อม และเลี่ยงการใช้ไพรเมอร์ที่ติดฉลากสารรังสี วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้อาศัยการทำงานของ extension primer (RPC3g) ในการตัดแปลงปลายเทโลเมียร์ของ Chr17p เพื่อให้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ subtelomeric region ของ Chr17p และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนปลายเทโลเมียร์ที่ถูกตัดแปลงนี้ (ไพรเมอร์ RP) สามารถทำการเพิ่มจำนวนเทโลเมียร์จาก Chr17p ได้ ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ถูกนำไปตรวจหาเทโลเมียร์โดยใช้เทคนิค Southern blotting ที่อาศัยระบบเคมีลูมิเนสเซนซ์เป็นตัวให้แสง วิธีนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการตรวจวัดความยาวเทโลเมียร์ของ Chr17p ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดของมนุษย์ 4 ราย ผลที่ได้คือค่าเฉลี่ยความยาวเทโลเมียร์ของ Chr17p มีค่าสั้นกว่าความยาวเฉลี่ยจากทุกโครโมโซมและยังพบว่าค่าความยาวนี้มีค่าลดลงสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้แล้วยังได้มีการพิสูจน์ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ของตัวอย่างทั้ง 4 รายเป็นเทโลเมียร์ที่มาจาก Chr17p จริงด้วยวิธี nested PCR และ real-time PCR จากผลการทดลองข้างต้น จึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการตรวจวัดความยาวเทโลเมียร์จากแขนข้างสั้นของโครโมโซม 17 ได้โดยไม่ต้องอาศัยขั้นตอนการต่อตัว linker

Thesis Title	Development of a Chromosome-specific Telomere Length Measurement Method	
Author	Mr. Surasit Bupachat	
Degree	Master of Science (Biochemistry)	
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapikul	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Ariyapong Wongnoppavich	Co-advisor
	Dr. Arisa Bonness	Co-advisor

ABSTRACT

There are growing evidences showing that having a single shortest telomere length may be sufficient to trigger cellular senescence. This notion supports the hypothesis that the shortest telomere length is a better biomarker for longevity than the average telomere length. The telomere of chromosome 17p (Chr17p) is believed to be the shortest of all telomeres inside human cells. Currently, single telomere length analysis (STELA) is the only PCR-based method used to measure the telomere length of Chr17p. However, the method requires a cumbersome ligation step and involves radioactive probe for detection. Therefore, the objective of this study is to introduce a novel modification of STELA to detect Chr17p telomere length, by bypassing the ligation step and using non-radioactive detection system. In our method, an extension primer (RPC3g) is added into the PCR reaction mixture in order to use as a template to extend telomeric end with a DNA adapter. The Chr17p-extended telomere is then amplified using primer specific to sub-telomeric region of chromosome 17p and a primer specific to the extended DNA adapter (RP primer). The amplified products were then separated by agarose gel electrophoresis and the telomeric sequences were detected by chemiluminescence-based Southern blot analysis. The system was then used to measure Chr17p telomere length in 4 individual human blood DNA samples. The average lengths of Chr17p telomere of all 4 samples were within the lower range of the average telomere lengths from genomic

DNA, and they show age-related telomere shortening. The PCR products were also confirmed to be of Chr17p by Nested PCR and Real-time PCR. The results here show that our new method can measure Chr17p telomere length without involving ligation step seen in STELA.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved