Thesis Title: Development of In-house Multiplex PCR to Detect Microdeletions in the Y Chromosome of Thai Males with Oligospermia or Azoospermia

Author: Miss Waraporn Piromlertamorn

Degree: Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee: Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Teraporn Vutyavanich Member

ABSTRACT

Objectives: To develop a multiplex PCR protocol for screening of Y chromosome microdeletions within the three azoospermia factor (AZF) regions and to evaluate the prevalence of Y chromosome microdeletions, cytogenetic and hormonal abnormalities in Thai infertile males with oligospermia and azoospermia.

Methods: Eleven gene-based primer pairs specific for the AZFa (DFFRY and DBY), AZFb (SMCY, EIF1AY, RBM1 and PRY) and AZFc [TTY2, DAZ (sY283), DAZ (sY277), CDY1 and BPY2] regions of the Y chromosome were analyzed for their specificity using the web-based BLAST program. All primers were first tested in singleplex PCR and thereafter combined into 4 multiplex PCR sets. Amplification of SRY (sY14) gene was used as an internal quality control in every multiplex PCR sets. Fertile male DNA, female DNA and distilled water were tested along with patients and controls. Optimization of each multiplex PCR conditions was performed. A sample was considered ‘deletion’ if a PCR product of the expected size was disappeared after three repeated successful PCR reactions. Eighty infertile Thai males with oligospermia, 40 males with azoospermia and 50 fertile males were studied. Evaluation of chromosome abnormalities by using G- and Q-banding method and
electrochemiluminescence immunoassays of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), prolactin and testosterone were performed in all infertile samples.

**Results:** Eleven primer pairs were constructed to 4 multiplex PCR as following: set 1) *SMCY, RBM1*, and *EIF1AY*; set 2) *DBY, DAZ (sY283)* and *PRY*; set 3) *DIFF1 and CDY1*; set 4) *DAZ (sY 277), TTY2, and BPY2*. The PCR optimal condition for each multiplex PCR set was achieved and used to test samples from infertile patients, fertile males and positive/negative controls. Five of 40 azoospermic patients (12.5%), and 1 of 80 oligospermic patients (1.25%) had Y chromosome microdeletions. Three of them had microdeletions in AZFc, two in AZFb, and one had a large microdeletion involving both AZFb and AZFc. None had microdeletion in AZFa region. One patient with severe oligospermia, had a single microdeletion at *PRY* gene. The other five had deletion involving more than two genes. Microdeletions of *DAZ (sY277, sY283)* and *BPY2* genes were the most common found in this study (4 patients), followed by region covering the microdeletion of *PRY* gene (3 patients). Two patients had wide range of microdeletion in AZFb (*SMCY, EIF1AY* and *RBMI* genes). No Y chromosome microdeletion was detected in 50 controls. The cost of this in-house multiplex PCR assay is approximately 5 times cheaper than the commercial kit. Cytogenetic abnormalities were found in 6 of 120 patients (5%). The levels of FSH, LH, prolactin and testosterone were undistinguishable in infertile males, with or without Y chromosome microdeletions.

**Conclusions:** An efficient, inexpensive and simple multiplex PCR method was developed in this study. The prevalence of the Y chromosome microdeletions in Thai males with azoospermia is 10 times higher than those with oligospermia and this finding is similar to reports from other Asian and Western countries. This technique will be useful for future in-depth studies and could be included in a panel of routine laboratory diagnosis of idiopathic infertility.
ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ขึ้นใช้งานเพื่อตรวจการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมวายในชายไทยที่มีภาวะตัวอสุจิน้อยหรือนิ่งไม่ตัวอสุจิในน้ำเชื้อ

ผู้เขียน นางสาววราภรณ์ภิรมย์เลิศอมร

ปริญญา ปริญญาตรี วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.วาสนาศิริรังษี ประธานกรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ พัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ที่ทำได้ง่าย ราคาถูก เพื่อใช้ตรวจคัดกรองการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมวายในชายไทย Azoospermia factor (AZF) และหาความสูดของอาการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมวาย ความผิดปกติทางเซลล์พันธุศาสตร์และฮอร์โมนเพศชายไทยที่มีภาวะมีบุตรยากเนื่องจากมีจำนวนตัวอสุจิน้อยหรือไม่ตัวอสุจิในน้ำเชื้อ วิธีการศึกษา ออกแบบ primer 11 คู่ที่มีความจำเพาะต่ออีนในบริเวณ AZF คือ DFFRY และ DBY ในบริเวณ AZFa; SMCY, EIF1AY, RBM1 และ PRY ในบริเวณ AZFb; TTY2, DAZ (sY283), DAZ (sY277), CDY1 และ BPY2 ในบริเวณ AZFc โดยใช้โปรแกรม BLAST ทดสอบความจำเพาะของ primer ด้วยการทำพีซีอาร์แล้วสุ่มเก็บน้ำมาร่อมเป็นมัลติเพล็กพีซีอาร์ จำนวน 4 ชุด ทำการควบคุมคุณภาพภายในของปฏิกิริยาด้วยการเพิ่มขยายส่วนของยีน SRY และทำการควบคุมค่าเอ็นโอซิคจากชายปกติ ผู้หญิงและนักกีฬา ควบคู่ไปกับการตรวจผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ทำการปรับสภาพของปฏิกิริยาแล้วชุดให้เหมาะสม ตัวอย่างตรวจที่ไม่พบ PCR product ของยีนเพื่อตรวจชั้น 3 ครั้งแสดงถึงการขาดหายไปของชิ้นส่วนยีน SRY ศักยภาพในการมีบุตรยากของชายไทยที่มีจำนวนตัวอสุจิน้อยสูง 80 ราย ไม่ตัวอสุจิในน้ำเชื้อ 40 ราย และชายไทยปกติ 50 ราย ซึ่งจะมีการแสดงให้เห็นได้จากการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมโดยวิธี Q- และ G-banding และตรวจวัตถุระดับ follicle
stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), โพรแลกทิน และเทสโทสเทอโรน
d้วยวิธี electrochemiluminescence immunoassay

ผลการศึกษา สามารถทราบ primer 11 คู่ มีรูปแบบเป็นมัลติเพล็กซี่ชัวร์ได้ จำนวน 4 ชุดคือ: ชุดที่ 1) SMCY, RBM1, และ EIF1AY; ชุดที่ 2) DBY, DAZ (sY283) และ PRY; ชุดที่ 3) DFFRY และ CDY1; ชุดที่ 4) DAZ (sY277), TTY2, และ BPY2 หลังจากปรับชุดแล้วได้รับการสังเคราะห์จากผู้ป่วยชายไทยปกติ และกลุ่มควบคุม
ผลการตรวจได้พบการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมภายในผู้ป่วยที่ไม่มีตัวสูบู่ในน้ำเชื้อ 5 ราย จาก 40 ราย (12.5 %) และในผู้มีตัวสูบู่ 1 ราย จาก 80 ราย (1.25%) พบว่า 3 ราย มีการขาดหายชิ้นส่วน AZFc 2 ราย ในชุด AZFb และ 1 ราย ทั้งใน AZFb และ AZFc ไม่พบการขาดหายชิ้นส่วน AZFa เลย พบการขาดหายของยีน PRY เพียงต่ำแห่งเดียวในผู้ป่วย 1 ราย ที่มีจำนวนตัวสูบู่น้อยมาก ผู้ป่วยอื่นๆ พบการขาดหายชิ้นส่วนในยีนมากกว่า 2 ยีนขึ้นไป โดยพบปุ่มที่สุทธิที่ยีน DAZ (sY277, sY283) และ BPY2 (4 ราย) รองลงมาคือยีน PRY (3 ราย) พบ
ผู้ป่วย 2 ราย มีการขาดหายชิ้นส่วนของยีนที่กร้างใน AZFb โดยพบในยีน SMCY, RBM1 และ EIF1AYไม่พบการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมภายใน 50 รายที่มีตัวสูบู่ปกติ เทคนิค
มัลติเพล็กซี่ชัวร์นี้ มีอัตราอุบัติการสูงกว่าชุดตรวจเลือดชัวร์ ประมาณ 5 เท่า ผลการตรวจทางเซลล์พันธุ์
ศาสตร์พบมีโครโมโซมเปรียบเท่ากับ 6 ราย จาก 120 ราย (5%) ไม่พบความแตกต่างของการระดับ
อยู่ร่วมกับ FSH, LH โพรแลกทิน และเทสโทสเทอโรนในผู้ป่วยภาวะมีบุตรยาก ที่มีหรือไม่มีการขาด
หายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซม

สรุป เทคนิคมัลติเพล็กซี่ชัวร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ราคาประหยัด และทำได้ง่าย
พบความแตกต่างของการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมในชายไทยกลุ่มที่ไม่มีตัวสูบู่ใน
น้ำเชื้อสูงกว่ากลุ่มนี้มีตัวสูบู่น้อยยิ่ง 10 เท่า ซึ่งคำว่าสูบู่คงเกิดจากงาน ที่ประเทศไทยและ
ยุโรป เทคนิคการตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาเสื้อกษัตริย์ในการและสามารถเป็น
ส่วนหนึ่งในการตรวจหาภาวะปฏิกิริยาสูบู่ชายที่มีบุตรยากโดยไม่ทำลายเสียตุ