Thesis Title	A Study of *FMR1* Mutation in Thai Mental Retardation Males using Multiplex PCR in Rajanagarindra Institute of Child Development	
Author	Miss Preechaya Phrommin	
Degree	Master of Science (Anatomy)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Umnat Mevatee	Chairperson
	Asst. Prof. Dr. Pornprot Limprasert	Member

ABSTRACT

Fragile X syndrome, *FRAXA*, is an X-linked mental retardation. It results from a $(CGG)_n$ trinucleotide expansion in the *FMR1* gene. This repeat was unstable in length and showed a polymorphism in each individual. An increase in the length of a repeat leads to disease. To date, *FRAXA* is the most common inherited form of mental retardation. It is located at Xq27.3 and lies 600 kb proximal to the *FRAXE* fragile site at Xq28. Similar to the *FRAXA*, the *FRAXE* mutation is a $(GCC)_n$ expansion. Expansion of a $(GCC)_n$ repeat in the *FMR2* gene is also associated with mental retardation. An unstable $(CGG)_n$ triplet repeat responsible for *FRAXA* exists in the 5' untranslated region of the *FMR1* gene. Normal alleles range from 5-54 repeats, whereas premutation ranges from 55-200 repeats and full mutation expands to over 200 repeats. In cytogenetic analysis, it is very difficult to distinguish between these fragile sites of the *FRAXA* and *FRAXE* . Current methods used for the detection of *FMR1* and *FMR2* mutation are conventional PCR and Southern blot.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

These techniques have replaced cytogenetic techniques. However, these methods have some drawbacks. They are labor intensive, time consuming and relatively expensive. Therefore, the multiplex PCR has become a method of routine molecular screening, because it is rapid and cost effective. Although many laboratories have improved diagnosis techniques, but They target is only one gene, which is mostly *FMR1*. Therefore, this study developed multiplex PCR for testing mutation of the *FMR1* and *FMR2*, simultaneously. Also, this study provided the Southern blot protocol of the *FRAXE* for the first time in Thailand. A total of 206 unrelated Thai boys with mental retardation were examined. Of these, 152 had previously been tested with standard methods for the *FMR1* mutation and were found to be negative for CGG expansion. These samples were usd as controls in our multiplex PCR. The samples were obtained as genomic DNA from the Human Genetics Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkhla University (PSU). The prospective 54 patients were selected from Rajanagarindra Institute of Child Development (RICD), ChiangMai.

The results demonstrated that no *FRAXE* expansion was found in this study, but two full mutations of the *FMR1* were identified in the RICD samples (3.7%). A false positive in this study amounted to 3 in 152 (1.97%) in the control samples, therefore, specificity of this multiplex PCR was about 98 %. The largest CGG repeats could be amplified by this multiplex PCR and there were 44 repeats for the *FMR1*. Therefore, sensitivity of this multiplex PCR could assumed as high. In addition, a false positive in prospective samples was 1 in 54 (1.85%). In this study, the multiplex PCR for fragile X screening for both loci, *FRAXA* and *FRAXE,* was demonstrated for the first in Thailand. These multiplex PCR results correlated with the standard methods. This non-radiactive multiplex PCR analysis offers a reliable, inexpensive, easier, and rapid screening of Fragile X syndrome. Finally, this study provides the Southern blot condition for the first time in detecting *FMR2* mutation in Thailand.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *FMR1* ด้วยวิธี Multiplex PCR ในผู้ป่วยปัญญาอ่อนเพศชายในสถาบันพัฒนาการเด็กราชนครินทร์
ผู้เขียน	นางสาวปรีชญา พรหมมินทร์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. อำนาจ มีเวที ประธานกรรมการ ผศ. ดร. นพ. พรพรต ลิ้มประเสริฐ กรรมการ

บทคัดย่อ

กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะชนิด *FRAXA* คือ สมาชิกในกลุ่มของโครโมโซมแตกเปราะชนิด folate sensitive ที่สัมพันธ์กับอาการปัญญาอ่อนถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบเอกซ์ลิงค์ (X-linked mental retardation) ซึ่งการกลายพันธุ์เกิดจากลำดับนิวคลิโอไทด์ (CGG)n ซ้ำในยีน *FMR1* ไม่คงตัวและมีการขยายขนาดขึ้น แสดงลักษณะ polymorphism คือ กลุ่มของลำดับซ้ำแตกต่างกันในระหว่างบุคคล ถ้ามีการขยายขึ้นมากกว่าปกติจะก่อโรคได้ ความผิดปกติชนิด *FRAXA* มีตำแหน่งบนแขนยาวของโครโมโซมเอกซ์บริเวณ Xq27.3 บริเวณ 5' untranslated region ของยีน *FMR1* ห่างจากตำแหน่งจุดเปราะจุดที่สอง คือ *FRAXE* ประมาณ 600 กิโลเบสซึ่งอยู่บริเวณ Xq28 โดยการกลายพันธุ์ของยีน *FMR2* คล้ายกับ *FMR1* คือมีการเพิ่มลำดับเบส (GCC)n ในยีน *FMR2* และก่อให้เกิดอาการปัญญาอ่อนเช่นกัน สำหรับลำดับนิวคลิโอไทด์ CGG ซ้ำใน *FRAXA* ปกติมีลำดับซ้ำ 6 ถึง 54 premutation (PM) ช่วงของลำดับซ้ำ คือ 55-200 และถ้ามากกว่า 200 ครั้ง คือ full mutation (FM) วิธีมาตรฐานที่ใช้ค้นหาหรือตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *FMR1* และ *FMR2* คือ Southern blot และ conventional PCR ซึ่งเป็นการตรวจแทนการตรวจด้วยวิธีเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) เพราะการตรวจดีเอ็นเอน่าเชื่อถือและถูกต้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มากกว่า ปัจจุบันแม้ว่าจะเป็นโรคที่เป็นสาเหตุของความบกพร่องทางสติปัญญาซึ่งถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่มีความสำคัญแต่วิธีการในการใช้ตรวจคัดกรองในประเทศไทยยังไม่แพร่หลายเพราะมีความยุ่งยากซับซ้อนของกระบวนการ ใช้เวลามาก และมีค่าใช้จ่ายสูง Multiplex PCR จึงเป็นวิธีที่มีบทบาทในงานประจำวันในการตรวจกรองโดยจะก่อประโยชน์มากหากสามารถตรวจกรองการกลายพันธุ์ของทั้งสองยีนพร้อมกัน ดังนั้นหากมีวิธีการทดสอบที่สามารถตรวจวินิจฉัยได้เร็ว มีความจำเพาะและใช้คัดกรองได้ การค้นหาโรคได้ตั้งแต่ระยะแรกจึงมีความสำคัญมากในการส่งเสริมโอกาสให้เด็กและครอบครัวได้รับการรักษาที่ดีไม่ว่าการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมและการรักษาฟื้นฟู ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค Multiplex PCR เพื่อตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *FMR1* และ *FMR2* ทั้งสองตำแหน่งในหลอดทดลองเดียวกันและการศึกษาครั้งนี้ยังศึกษา วิธีการตรวจ Southern blot สำหรับ *FRAXE* ซึ่งเป็นการศึกษาครั้งแรกในประเทศไทย ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 206 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างกลุ่มแรกจำนวน 152 ตัวอย่างได้รับจากหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ผลการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง *FRAXA* เป็นลบ โดยตัวอย่างกลุ่มแรกเป็นตัวอย่างควบคุมเทคนิค Multiplex PCR และตัวอย่างศึกษาจำนวน 54 ตัวอย่างได้รับจากสถาบันพัฒนาการเด็กราชนครินทร์ จังหวัดเชียงใหม่ โดยตัวอย่างกลุ่มที่สองนี้ยังไม่เคยผ่านการตรวจกรองการกลายพันธุ์ ของยีนทั้งสองมาก่อน

ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างทั้งสองกลุ่มไม่พบการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง *FRAXE* แต่ในตัวอย่างจากสถาบันพัฒนาการเด็กราชนครินทร์พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง *FRAXA* ร้อยละ 3.7 วิธี Multiplex PCR ที่ได้พัฒนานั้นมีความจำเพาะร้อยละ 98 ให้ผลบวกปลอมในตัวอย่างควบคุมร้อยละ 1.97 และ ในตัวอย่าง prospective ร้อยละ 1.85 เทคนิคนี้สามารถศึกษาลำดับ CGG ซ้ำในยีน *FMR1* ได้สูงสุด คือ 44 ดังนั้นทำให้ความไวของเทคนิคมีค่าสูง การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในประเทศไทยที่ตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสองโดยวิธี multiplex PCR และได้พัฒนาเทคนิคการตรวจ Southern blot ตำแหน่ง *FRAXE* โดยผลการตรวจกรองด้วย multiplex PCR นี้ให้ผลที่สอดคล้องกับผลที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐานของ การกลายพันธุ์ในยีน *FMR1* และ *FMR2* ซึ่งเทคนิคนี้มีความน่าเชื่อถือก่อประโยชน์ต่อการนำไปตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีนที่สามารถปฏิบัติได้ง่ายไม่ยุ่งยากและ ราคาไม่แพง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved