Thesis Title Production of Chromosome 21 Specific Probes Using Micro-FISH Technique for Prenatal Diagnosis

Author Miss Piyanan Mevatee

Degree Master of Science (Anatomy)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Umnat Mevatee Chairperson
Asst. Prof. Dr. Wirawit Piyamongkol Member

ABSTRACT

Nowadays, prenatal chromosome analysis especially for detection of Down syndrome takes about two to three weeks to obtain results. Interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using DNA probes allow rapidly detection of chromosome abnormalities and improves time required. Many genetic laboratories in Thailand cannot use commercial DNA specific probe because of high cost for direct FISH. The chromosome 21 specific probes were produced by the micro-FISH technique that included microdissection, DOP-PCR, and FISH for internal use.

The metaphase chromosomes were prepared from lymphocyte cultures of persons with normal karyotype and patients with t(21;21) chromosome. 5-10 copies of t(21;21) or 21q of normal 21 on G-banding metaphase chromosome were cut by a microglassneedle attached to micromanipulator. The dissected chromosomal materials were amplified by DOP-PCR, and the PCR products were reamplified. The final products were labeled with fluorochrome digoxigenin-11-dUTP or biotin-16-dUTP by nick translation. The labeled DNAs were proved for specificity on metaphase chromosomes. The FISH signals from t(21;21) and 21q derived-probes

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

were not distinctly different. No hybridization occurred on the p arms of all acrocentric chromosomes (13, 14, 15, 21, and 22) but cross-hybridization appeared on the centromeric region between 21 and 13 chromosomes. The 21q derived-probes were hybridized on uncultured amniocytes. The amnion cell samples were six cases with normal karyotypes and another six cases with trisomy 21.

The hybridized signals on uncultured amniocytes of each case were evaluated in 40-50 nuclei using a Zeiss fluorescence microscope. The diagnostic results were obtained using the highest frequency of the hybridized signals per cell. The diagnostic results by FISH were compared to conventional karyotyping. In karyotypically normal samples, an average of 55.14% (range 52%-65.31%) of the scored nuclei showed two signals. In samples trisomic chromosome 21 karyotypically, an average of 46.33% (range 32%-56%) of the scored nuclei had three signals. There was one case of trisomy 21 sample with false negative results by FISH with account for 16.66% but no false-positive result. For all detectable trisomy 21, the sensitivity was 83.33%, the specificity for normal samples was 100% and overall accuracy was 91.67%.

Although the micro-FISH technique is able to generate chromosomal specific probes for prenatal diagnosis, the informative FISH results should be improved for the reliability. In the future, these micro-FISH probes may also serve as an alternative test to provide a rapid result for screening prenatal identification of chromosome aneuploidies.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตดีเอ็นเอตรวจตามสำหรับโครโมโซม 21 โดยวิธีไมโครฟีชเพื่อการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด

ผู้เขียน นางสาวปิยนันท์ มีเวที

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. อำนาจ มีเวที ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. นพ. วีรวิทย์ ปิยะมงคล กรรมการ

บทคัดย่อ

ปัจจุบันนี้การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมก่อนคลอดโดยเฉพาะการตรวจหากลุ่มอาการดาวน์ใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์จึงจะทราบผล การตรวจเซลล์ในระยะอินเทอร์เฟสด้วยวิธี Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจตามทำให้สามารถตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมได้โดยตรงและรวดเร็วขึ้น ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์หลายแห่งในประเทศไทยไม่สามารถใช้ดีเอ็นเอตรวจตามสำเร็จรูปได้เนื่องจากมีราคาแพง ดังนั้นจึงได้ผลิตดีเอ็นเอตรวจตามสำหรับโครโมโซม 21 ขึ้นใช้เองด้วยเทคนิค micro-FISH ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน microdissection, DOP-PCR และ FISH

ทำการเตรียมเมทาเฟสโครโมโซมจากการเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซท์ของผู้ที่โครโมโซมปกติและผู้ป่วยที่มีโครโมโซม t(21;21) นำเมทาเฟสโครโมโซมที่ย้อมด้วยวิธี G-banding มาตัดโครโมโซมที่มี t(21;21) หรือ ตัดเฉพาะส่วนแขนยาวของโครโมโซม 21 ปกติ โดยใช้เข็มแก้วที่ควบคุมด้วย micromanipulator จำนวน 5-10 โครโมโซม นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี DOP-PCR หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ในรอบแรกมาเพิ่มปริมาณอีกครั้ง แล้วจึงนำผลที่ได้ไปติดฉลากด้วยสารเรืองแสง digoxigenin-11-dUTP หรือ biotin-16-dUTP ด้วยวิธี nick-translation ซึ่งจะนำไปตรวจหาความจำเพาะของดีเอ็นเอที่ผลิตขึ้นด้วยเทคนิค FISH บนเมทาเฟสโครโมโซม พบว่าสัญญาณเรืองแสงของดีเอ็นเอตรวจตามที่เตรียมจาก t(21;21) และส่วนแขนยาวของโครโมโซม 21 ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก โดยไม่พบการไฮบริไดซ์เกิดขึ้นบนส่วนแขนสั้นของกลุ่มโครโมโซมแบบ acrocentric (13, 14, 15, 21 และ 22) แต่ปรากฏว่ามี cross-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โครโมโซม พบว่าสัญญาณเรืองแสงของดีเอ็นเอตรวจตามที่เตรียมจาก t(21;21) และส่วนแขนยาวของโครโมโซม 21 ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก โดยไม่พบการไฮบริไดซ์เกิดขึ้นบนส่วนแขนสั้นของกลุ่มโครโมโซมแบบ acrocentric (13, 14, 15, 21 และ 22) แต่ปรากฏว่ามี cross-hybridization ตรงเซ็นโทรเมียร์ระหว่างโครโมโซม 21 และ 13 จึงนำดีเอ็นเอตรวจตามจากโครโมโซม 21q มาไฮบริไดซ์กับเซลล์แอมเนี่ยนที่ไม่ได้เลี้ยง (interphase nuclei) โดยทดสอบกับเซลล์แอมเนี่ยนที่มีคาริโอไทป์ปกติ 6 ราย และเซลล์แอมเนี่ยนที่มี trisomy 21 จำนวน 6 ราย

จากการตรวจวิเคราะห์สัญญาณในอินเทอร์เฟสนิวเคลียสของเซลล์แอมเนี่ยนอย่างน้อยร้อยละ 40-50 เซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ สามารถสรุปผลว่าปกติ (disomy 21) หรือผิดปกติ (trisomy 21) โดยจะพิจารณาจากความถี่สูงที่สุดของสัญญาณที่ตรวจพบต่อเซลล์ แล้วนำผลการตรวจด้วย FISH เปรียบเทียบกับวิธีเซลล์พันธุศาสตร์ ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าในรายที่ปกติตรวจพบ 2 สัญญาณบนอินเทอร์เฟสนิวเคลียสโดยเฉลี่ย 55.14% (52%-65.31%) และในรายที่เป็น trisomy 21 พบ 3 สัญญาณเฉลี่ย 46.33% (32%-56%) ในตัวอย่างที่มี trisomy 21 มี 1 ราย (16.66%) ที่สรุปผลว่าปกติด้วย FISH (false negative) แต่ในรายที่ปกติไม่ตรวจพบ false positive ดังนั้นผลการตรวจสอบ trisomy 21 ครั้งนี้สรุปได้ว่ามีความไวในการตรวจพบ trisomy 21 (sensitivity) 83.33% มีความแม่นยำในการตรวจตัวอย่างที่ปกติ (specificity) 100% และความถูกต้องในการตรวจมี 91.67%

แม้เทคนิคไมโครฟิชจะสามารถนำไปใช้ผลิตดีเอ็นเอตรวจตามสำหรับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดได้ก็ตาม ผลการตรวจจาก FISH นี้ควรต้องปรับปรุงเพื่อให้มีความน่าเชื่อถือเพิ่มขึ้น ในอนาคตดีเอ็นเอตรวจตามจากวิธีไมโครฟิชนี้อาจจะเป็นทางเลือกหนึ่งซึ่งใช้ตรวจก่อนคลอดเพื่อหาความผิดปกติเชิงจำนวนของโครโมโซมที่ให้ผลได้อย่างรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved