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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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) *DFFRY* 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 *RBM1* 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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ ขึ้นใช้เองเพื่อตรวจการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมวาย ในชายไทยที่มีภาวะตัวอสุจิน้อยหรือไม่มีตัวอสุจิในน้ำเชื้อ

ผู้เขียน นางสาววราภรณ์ ภิรมย์เลิศอมร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. วาสนา ศิริรังษี ประธานกรรมการ
รศ. นพ. ธีระพร วุฒยวนิช กรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ พัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ที่ทำได้ง่าย ราคาถูก เพื่อใช้ตรวจคัดกรองการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมวายในบริเวณ Azoospermia factor (AZF) และหาความชุกของการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมวาย ความผิดปกติทางเซลล์พันธุศาสตร์ และฮอร์โมนเพศในชายไทยที่มีภาวะมีบุตรยากเนื่องจากมีจำนวนตัวอสุจิน้อยหรือไม่มีตัวอสุจิในน้ำเชื้อ วิธีการศึกษา ออกแบบ primer 11 คู่ ที่มีความจำเพาะต่อยีนในส่วน 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 ด้วยการทำพีซีอาร์แต่ละคู่ ก่อนนำมารวมเป็นมัลติเพล็กพีซีอาร์ จำนวน 4 ชุด ทำการควบคุมคุณภาพภายในของปฏิกิริยาด้วยการเพิ่มขยายส่วนของยีน *SRY* และทำการตรวจดีเอนเอจากชายปกติ ผู้หญิงและน้ำกลั่น ควบคู่ไปกับการตรวจผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ทำการปรับสภาวะของปฏิกิริยาแต่ละชุดให้เหมาะสม ตัวอย่างตรวจที่ไม่พบ PCR product ของยีนเมื่อตรวจซ้ำ 3 ครั้ง แสดงถึงการขาดหายไปของชิ้นส่วนยีนนั้น ศึกษาในชายไทยที่มีภาวะมีบุตรยากที่มีอสุจิน้อย 80 ราย ไม่มีตัวอสุจิในน้ำเชื้อ 40 ราย และชายไทยปกติ 50 ราย ชายที่มีภาวะมีบุตรยากจะได้รับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมโดยวิธี Q- และ G-banding และตรวจวัดระดับ follicle

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), โพรแลกทิน และเทสโทสเทอโรน ด้วยวิธี electrochemiluminescence immunoassay

ผลการศึกษา สามารถนำ primer 11 คู่ มารวมเป็นมัลติเพล็กพีซีอาร์ได้ จำนวน 4 ชุดคือ: ชุดที่ 1) *SMCY, RBM1*, และ *EIF1AY*; ชุดที่ 2) *DBY, DAZ (sY283)* และ *PRY*; ชุดที่ 3) *DFFRY* และ *CDY1*; ชุดที่ 4) *DAZ (sY 277), TTY2*, และ *BPY2* หลังจากปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับมัลติเพล็กพีซีอาร์แต่ละชุดแล้วได้นำไปตรวจสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยชายไทยปกติและกลุ่มควบคุม ผลการตรวจได้พบการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมวายในผู้ป่วยที่ไม่มีตัวอสุจิในน้ำเชื้อ 5 ราย จาก 40 ราย (12.5 %) และในผู้มีตัวอสุจิน้อย 1 ราย จาก 80 ราย (1.25%) พบว่า 3 ราย มีการขาดหายยีนในส่วน AZFc, 2 ราย ในส่วน AZFb และ 1 ราย ทั้งใน AZFb และ AZFc ไม่พบการขาดหายยีนในส่วน AZFa เลย พบการขาดหายของยีน *PRY* เพียงตำแหน่งเดียวในผู้ป่วย 1 ราย ที่มีจำนวนตัวอสุจิน้อยมาก ผู้ป่วยอื่น พบการขาดหายชิ้นส่วนในยีนมากกว่า 2 ยีนขึ้นไป โดยพบบ่อยที่สุดที่ยีน *DAZ (sY277, sY283)* และ *BPY2* (4 ราย) รองลงมาคือยีน *PRY* (3 ราย) พบผู้ป่วย 2 ราย มีการขาดหายชิ้นส่วนของยีนที่กว้างใน AZFb โดยพบในยีน *SMCY, RBM1* และ *EIF1AY* ไม่พบการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมวายในชาย 50 รายที่มีอสุจิปกติ เทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์นี้ มีต้นทุนถูกกว่าชุดตรวจสำเร็จรูป ประมาณ 5 เท่า ผลการตรวจทางเซลล์พันธุศาสตร์พบภาวะโครโมโซมผิดปกติ 6 ราย จาก 120 ราย (5%) ไม่พบความแตกต่างของระดับฮอร์โมน FSH, LH โพรแลกทิน และเทสโทสเทอโรนในผู้ป่วยภาวะมีบุตรยาก ที่มีหรือไม่มีการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมวาย

สรุป เทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ราคาประหยัด และทำได้ง่าย พบความชุกของการขาดหายชิ้นส่วนขนาดเล็กของโครโมโซมวาย ในชายไทยกลุ่มที่ไม่มีตัวอสุจิในน้ำเชื้อสูงกว่ากลุ่มที่มีตัวอสุจิน้อยถึง 10 เท่า ซึ่งค่าใกล้เคียงกับรายงาน จากประเทศในเอเชียและยุโรป เทคนิคการตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาเชิงลึกในอนาคตและสามารถเป็นส่วนหนึ่งในการตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับชายที่มีบุตรยากโดยไม่ทราบสาเหตุ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved