Thesis Title Identification of Marker Chromosomes by Micro-FISH Techniques

Author Miss Nathaporn Pangjaidee

Degree Master of Science (Anatomy)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Umnat	Mevatee	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Wirawit	Piyamongkol	Member

ABSTRACT

The objectives of this study are to apply the method of microdissection, DOP-PCR and fluorescence in situ hybridization (FISH) to identify chromosome abnormalities that cannot be defined by G- and Q-banding techniques, and to correlate the abnormalities of specific chromosome bands to the clinical features of the patients.

In this study, micro-FISH was used to elucidate the chromosomal origin of six different structural chromosome abnormalities. Case 1: An abnormal chromosome 9 was observed in a 5 year-old boy with short stature, delayed bone age, microcephaly, low set ears, and clinodactyly. His chromosome 9 revealed an additional chromosome material on the distal short arm with 46,XY,add(9)(p21) karyotype. Case 2: An abnormal chromosome X was found in a 17 year-old woman with primary amenorrhea, infantile genitalia, and delayed puberty. The abnormal X chromosome was more than one time longer than the normal ones. Case 3: An additional chromosome material on the distal long arm of a chromosome 17 with 46,XY,add(17)(q25) karyotype was found in prenatal diagnosis. Case 4: An abnormal X chromosome was found in a 14 year-old female with a short stature and absence mammary development. The abnormal X chromosome looked like an i(Xp). Case 5: A ring chromosome was observed in a 3 year-old girl with delayed development, micrognathia, dextrocardia, simian crease and deafness. Case 6: A

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

small ring chromosome was found in prenatal cordocentesis with 45,X/46,X,r(X)? chromosome complements.

The marker chromosomes in each case were dissected under an inverted microscope with a microglassneedle equipped with a micromanipulator. Ten to twenty marker chromosomes were collected and amplified by degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction (DOP-PCR). The PCR products were labeled by nick-translation with digoxigenin-11-dUTP or biotin-16-dUTP. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with marker chromosome derived probes were performed on the normal metaphases to determine the origin of the markers, and on the aberrant metaphases to confirm the specificity of the probes and the hybridized signals observed under fluorescent microscope.

With G-banding and micro-FISH techniques, we determined the origins of all six marker chromosomes. In the first case, the additional band on the distal short arm of a chromosome 9 was derived from the duplication of the distal band of that chromosome 9(p21-pter). The abnormal X chromosome in case 2 was derived from isodicentric X(q28). The abnormal band on the distal long arm of chromosome 17 in case 3 was derived from the distal long arm of chromosome 4(q28-qter). An abnormal X chromosome in case 4 was derived from a deletion of the long arm at band Xq23. The ring marker chromosome in case 5 was originated from the chromosome 18(p11.3-q23). The small ring chromosome in case 6 was derived from pericentromeric region of a chromosome X(p11-q12).

This study emphasized the value of the micro-FISH as a powerful method to determine the origin of the marker chromosomes that cannot be identified by conventional cytogenetics. The micro-FISH technique can characterize most of the marker chromosomes that would occur in our routine prenatal and postnatal diagnosis without buying a chromosome specific probe from abroad.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจวิเคราะห์มาร์คเดอะโครโมโซม โดยการใช้เทคนิคไมโครฟิช

ผู้เขียน นางสาวณัฐพร แป่งใจดี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)

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

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อประยุกต์เทคนิค microdissection, DOP-PCR และ fluorescence in situ hybridization (FISH) ในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซม ที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยวิธี G- และ Q-banding และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครโมโซมที่ผิดปกติ กับลักษณะความผิดปกติของผู้ป่วย

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำวิธี micro-FISH มาตรวจวิเคราะห์ที่มาของโครโมโซมที่ผิดปกติทางโครงสร้างที่แตกต่างกัน จำนวนทั้งหมด 6 ราย ผู้ป่วยรายที่ 1 เป็นเด็กชายอายุ 5 ขวบ ความผิดปกติที่พบ คือ short stature, delayed bone age, microcephaly, low set ears, และ clinodactyly เมื่อตรวจวิเคราะห์โครโมโซมโดยวิธี G-banding พบว่า โครโมโซม 9 มีส่วนของเนื้อโครโมโซมเกินมาในส่วนปลายของแขนสั้น โดยมีคาริโอไทป์ 46,XY,add(9)(p21) ในผู้ป่วยรายที่ 2 พบความผิดปกติของโครโมโซม X ในเด็กหญิง อายุ 17 ปี โดยมีความผิดปกติเกี่ยวกับ primary amenorrhea, infantile genitalia และ delayed puberty พบว่าโครโมโซม X ที่ผิดปกติ มีขนาดยาวกว่าตัวที่ปกติถึงเท่าตัว ผู้ป่วยรายที่ 3 เป็นการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด โดยพบว่าโครโมโซมตัวที่ 17 มีส่วนของเนื้อโครโมโซมเกินมา ที่บริเวณปลายแขนยาว โดยมีคาริโอไทป์ 46,XY,add(17)(q25) รายที่ 4 เป็นผู้ป่วยหญิงอายุ 14 ปี มีลักษณะ short stature ไม่มี mammary development และผลการตรวจโครโมโซมพบว่า มีการขาดหายไปของบางส่วนแขนยาวของโครโมโซม X ซึ่งความผิดปกติที่พบมีลักษณะคล้ายความผิดปกติแบบ i(Xp) รายที่ 5 เป็นเด็กหญิงอายุ 3 ขวบ มี delayed development,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

micrognathia, dextrocardia, simian crease และ deafness พบความผิดปกติของโครโมโซมเป็นแบบโครโมโซมรูปร่างเหมือนวงแหวน ในรายสุดท้าย เป็นการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด พบความผิดปกติเป็นแบบ โครโมโซมรูปร่างวงแหวนขนาดเล็กมาก โดยมีคาริโอไทป์เป็น 45,X/46,X,r(X)?

มาร์คเคอะโครโมโซมในแต่ละราย จะถูกเก็บรวบรวมโดยใช้เข็มแก้วขนาดเล็ก ที่ถูกควบคุมทิศทางโดย micromanipulator ที่ติดอยู่กับกล้อง inverted microscope โดยในแต่ละรายจะทำการเก็บรวบรวมจำนวน 10-20 ตัว แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction (DOP-PCR) แล้วนำ PCR product ที่ได้ไปติดฉลากด้วยสารเรืองแสง โดยใช้ digoxigenin-11-dUTP หรือ biotin-16-dUTP ด้วยวิธี nick-translation เพื่อนำไปทำเป็นดีเอ็นเอตรวจตาม หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอตรวจตามที่ได้มา hybridized ลงบนเมทาเฟสโครโมโซมที่ปกติและเมทาเฟสโครโมโซมที่ผิดปกติในผู้ป่วย และตรวจดูสัญญาณด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

ด้วยเทคนิค G-banding และ micro-FISH เราสามารถที่จะตรวจหาที่มาของมาร์คเคอะโครโมโซม ได้ทั้ง 6 ตัว โดยในรายแรก พบว่า ส่วนที่เกินมาของโครโมโซม 9 ตรงบริเวณแขนสั้นนั้นมาจากการ duplication ของโครโมโซม 9 ตำแหน่ง p21-pter ในรายที่ 2 เป็นความผิดปกติแบบ isodicentric X(q28) ความผิดปกติของโครโมโซม 17 ในรายที่ 3 นั้น ส่วนที่เกินมาตรงบริเวณปลายแขนยาวนั้นได้มาจากปลายแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 4 ตรงตำแหน่ง q28-qter ในผู้ป่วยรายที่ 4 ความผิดปกติของโครโมโซม X ที่พบเป็นแบบ terminal deletion ตรงตำแหน่ง q23 ส่วนโครโมโซมรูปร่างวงแหวน ที่พบในผู้ป่วยรายที่ 5 นั้นเป็นส่วนของโครโมโซม 18 ตั้งแต่ p11.3-q23 ในรายสุดท้ายโครโมโซมรูปร่างวงแหวนนั้นมาจากบริเวณรอบๆเซนโทรเมียร์ของโครโมโซม X ตำแหน่ง p11-q12

เทคนิค micro-FISH เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ในการตรวจหาที่มาของมาร์คเคอะโครโมโซมที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยวิธีทางเซลล์พันธุศาสตร์ปกติ การนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ ทำให้สามารถตรวจหาที่มาของมาร์คเคอะโครโมโซมได้เกือบทั้งหมดที่เราอาจตรวจพบในการตรวจวิเคราะห์โครโมโซมก่อนคลอดและหลังคลอด โดยไม่จำเป็นต้องสั่งซื้อดีเอ็นเอตรวจตามสำหรับแต่ละโครโมโซมจากต่างประเทศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved