

<b>Thesis Title</b>	Production of Chromosome 9 and 22 Probes by Micro-FISH Techniques	
<b>Author</b>	Miss Sukanya Horpaophan	
<b>Degree</b>	Master of Science (Anatomy)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Asst. Prof. Dr. Umnat Mevatee	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Daoroong Kangwanpong	Member
	Asst. Prof. Kanokkan Bumroongkit	Member

### ABSTRACT

Cytogenetic technique was used to detect Ph<sup>1</sup> chromosome in 165 CML patients. There were 137 cases (83.03%) in which metaphase chromosomes were available, and there were 28 cases (16.97%) in which the metaphase chromosomes were undetected. The Ph<sup>1</sup> chromosomes were found in 101 cases (73.72%) and there were 36 cases (26.28%) with Ph<sup>1</sup> chromosome negative. Micro-FISH techniques were applied to produce whole chromosome 9 and 22 probes for detection of the Ph<sup>1</sup> chromosome in metaphase chromosomes and interphase nuclei of CML patients. Chromosomes 9 and 22 of normal metaphase spreads prepared from peripheral blood lymphocyte cultures were dissected and amplified by DOP-PCR. PCR products were labeled with DIG-11-dUTP by nick-translation. The labeled probes were hybridized on metaphase spreads and interphase nuclei of CML patients with the Ph<sup>1</sup> chromosome positive. The chromosome 9 derived probes were hybridized on the metaphase chromosomes of two CML patients. There were two strong signals on the whole length of both chromosomes 9, it was missing at the distal end of the long arm of the derivative chromosome 9. The signal on the Ph<sup>1</sup> chromosome was not detected. Most of interphase nuclei displayed two signals. The

chromosome 22 derived probes were hybridized on the metaphase chromosomes of ten CML patients with Ph<sup>1</sup> chromosome positive. There were three distinct signals, the first was on a normal chromosome 22, the second was on the Ph<sup>1</sup> chromosome, and the third was on the distal end of the long arm of derivative chromosome 9. Some metaphases displayed some signals on the short arm of acrocentric chromosomes.

The chromosome 22 probe can be used to detect the Ph<sup>1</sup> chromosome in the metaphase spreads. The signals on the interphase nuclei were not informative because of the cross-hybridization of the probe. The method of identifying the Ph<sup>1</sup> chromosome in interphase nuclei by FISH should be further developed for increasing the signal intensity and specificity of the FISH probes.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การผลิตโครโมโซมตรวจตามสำหรับโครโมโซม 9 และ 22 โดยวิธีไมโครฟิช

## ผู้เขียน

นางสาวสุกัญญา สื้อเผ่าพันธ์

## ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)

## คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. อำนาง มีเวที	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ดาวรุ่ง กังวานพงศ์	กรรมการ
ผศ. กนกกาญจน์ บำรุงกิจ	กรรมการ

## บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ในการตรวจหาโครโมโซมฟีลาเดลเฟียในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว Chronic Myeloid Leukemia (CML) จำนวน 165 ราย มี 137 ราย (83.03%) ที่สามารถตรวจวิเคราะห์โครโมโซมในระยะเมตาเฟส แต่อีก 28 ราย (16.97%) ไม่พบเมตาเฟสที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ในจำนวนที่สามารถตรวจโครโมโซมได้ พบโครโมโซมฟีลาเดลเฟีย 101 ราย (73.72%) ส่วนอีก 36 ราย (26.28%) ไม่พบโครโมโซมฟีลาเดลเฟีย

เทคนิคไมโครฟิชถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตโครโมโซมตรวจตามสำหรับโครโมโซม 9 และ 22 เพื่อตรวจโครโมโซมฟีลาเดลเฟียในเมตาเฟส และอินเตอร์เฟสนิวเคลียสของผู้ป่วย CML ที่พบว่าโครโมโซมฟีลาเดลเฟีย เริ่มจากเลี้ยงเซลล์ลิมโฟซัยท์ และเตรียมโครโมโซมในระยะเมตาเฟสไว้สำหรับตัดโครโมโซม 9 และ 22 นำโครโมโซมที่ตัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี DOP-PCR ดิคคลากดีเอ็นเอด้วย DIG-11-dUTP ได้เป็นดีเอ็นเอสำหรับตรวจตามโครโมโซม 9 และ 22 นำไปไฮบริไดซ์ลงบนเมตาเฟส และอินเตอร์เฟสนิวเคลียสที่เตรียมจากไขกระดูกของผู้ป่วย CML พบว่าดีเอ็นเอตรวจตามสำหรับโครโมโซม 9 แสดงสัญญาณบนโครโมโซม 9 ทั้งสองตัว ยกเว้นตรงส่วนปลายของโครโมโซม 9 ตัวที่แลกเปลี่ยนกับโครโมโซมฟีลาเดลเฟีย แต่ไม่พบว่ามีสัญญาณปรากฏบนโครโมโซมฟีลาเดลเฟีย บนนิวเคลียสระยะอินเตอร์เฟสส่วนมากสามารถนับสัญญาณได้

เพียงสองจุด เมตาเฟสที่ไฮบริดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจตามสำหรับโครโมโซม 22 แสดงสัญญาณสามแห่ง คือบนโครโมโซม 22 ปกติ บนโครโมโซมฟีลาเดลเฟีย และที่ปลายแขนยาวของโครโมโซม 9 ตัวที่แลกเปลี่ยนกับโครโมโซมฟีลาเดลเฟีย นอกจากนี้ ในบางเมตาเฟสสามารถมองเห็นสัญญาณได้มากกว่าสามจุด คือพบได้ที่แขนสั้นของโครโมโซมอะโครเซนตริกซ์ เซลล์ระยะอินเตอร์เฟสที่ไฮบริดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจตามสำหรับโครโมโซม 22 บางเซลล์แสดงสัญญาณเป็นจุดชัดเจน สามารถระบุจำนวนสัญญาณได้แน่นอน แต่ในบางเซลล์ สัญญาณที่ปรากฏมีลักษณะคลุมเครือ ไม่สามารถนับจำนวนสัญญาณได้อย่างชัดเจน

จากผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอตรวจตามสำหรับโครโมโซม 22 สามารถนำมาใช้ตรวจหาโครโมโซมฟีลาเดลเฟียในเซลล์ระยะเมตาเฟสได้ สำหรับสัญญาณบนนิวเคลียสระยะอินเตอร์เฟสนั้นไม่เหมาะที่นำมาวิเคราะห์หาโครโมโซมฟีลาเดลเฟีย เนื่องจากมีการจับของดีเอ็นเอตรวจตามบนโครโมโซมคู่อื่นด้วย จึงควรจะพัฒนาดีเอ็นเอตรวจตามเพื่อให้มีความเข้ม และความจำเพาะมากยิ่งขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved