

การพัฒนาการตรวจสอบโครโมโซมเพศของมนุษย์ด้วยเทคนิค Fluorescent *in situ* Hybridization และ Real time PCR

Development of Human Sex Chromosome Detection for Fluorescent *in situ* Hybridization and Real Time PCR Techniques

สุพัตรา พรวิลลาสสิริ^{1,2}, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา² และ สมศักดิ์ อภิสิตวานิช^{2*}

Suphadtra Phornwilardsiri^{1,2}, Saowanee Suputtitada² and Somsak Apisitwanich^{2*}

¹หน่วยผู้มีบุตรยาก ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700;

²ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹Division of Infertility, Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700; ²Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

*Corresponding author: fscissa@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการเทคนิค fluorescent *in situ* hybridization (FISH) และ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) มีบทบาทต่อการตรวจสอบสารพันธุกรรม ไม่ว่าจะเป็นตรวจบ่งชี้จีโนไทป์ การตรวจสอบการกลายของยีน หรือการวินิจฉัยความผิดปกติทางพันธุกรรม เป็นต้น เทคนิค PCR โดยเฉพาะ real time PCR (RT PCR) และ FISH เป็นเทคนิคที่ให้ผลการตรวจที่รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง งานวิจัยนี้ได้พัฒนา การตรวจสอบยีน DXZ และยีน SRY ด้วยเทคนิค FISH และ RT PCR โพรบสำหรับเทคนิค FISH นั้นยีน DXZ มีขนาด 580 คู่เบสและ ยีน SRY มีขนาด 470 คู่เบส เมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของเพศชายพบว่านิวเคลียสที่ติดโพรบทั้งสอง คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเทคนิค real time PCR นั้น ชิ้นส่วนยีน DXZ และยีน SRY ที่เพิ่มปริมาณมีขนาด 184 คู่เบส และ 214 คู่เบส ตามลำดับ การตรวจสอบนั้นใช้ SYBR green และใช้ยีน human actin ขนาด 147 คู่เบสเป็นยีนควบคุม โพรบสำหรับยีน DXZ, SRY และ human actin มีค่าประสิทธิภาพเป็น 89.2, 52 และ 68 ตามลำดับ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มีค่า 0.994, 0.949 และ 0.935 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเทคนิคทั้งสองที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมเพศมนุษย์ และกรณีการเกิด crossing over ระหว่างโครโมโซมเอ็กซ์และวาย การตรวจสอบทั้งสองเทคนิคกำลังพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นสำหรับตรวจสอบเซลล์เดี่ยว อีกทั้งยังจะเป็นประโยชน์ต่อการลดการซื้อชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ

ABSTRACT

Nowadays fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and polymerase chain reaction (PCR) techniques play role in genetic material identification, genotyping, gene mutation detection and genetic disorder diagnosis etc. PCR technique, especially, real time PCR (RT PCR) is a technique which gives rapid and high precisely results. This research, we develop the detection of DXZ and SRY for FISH and RT PCR. DXZ and SRY probes for FISH have the size of 580 bp and 470 bp, respectively. Both probes are hybridized on human male lymphocytes and found 80% of lymphocytes showing both probe signals. For RT PCR, the amplified fragment of DXZ and SRY are 184 bp and 214 bp, respectively. The detection is used SYBR green dye and 147 bp of human actin is used as the control. The effectiveness of DXZ, SRY and human actin are 89.2, 52 and 68, while the correlation coefficient are 0.994, 0.949 and 0.935, respectively. These results show the efficiency of both developed techniques for human sex chromosome diagnosis and crossing over between X and Y chromosome detection. We are still improving both methods to get more efficiency for single cell detection. This will be fruitful for decreasing import of detection kit from abroad.

คำสำคัญ: ฟลูออเรสเซนต์อินไซตูไฮบริไดเซชัน, พีซีอาร์ ณ เวลาจริง, โครโมโซมเพศ

Keywords: fluorescent *in situ* hybridization, real time PCR, sex chromosome

บทนำ

การตรวจโครโมโซมเป็นเทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ที่นิยมใช้ศึกษาสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นศึกษาเพื่อบ่งชี้ชนิด หรือศึกษาความผิดปกติของโครงสร้าง หรือจำนวนโครโมโซม ในมนุษย์ก็เช่นเดียวกัน ศึกษาเพื่อหาสาเหตุของความผิดปกติอันเนื่องมาจากโรคพันธุกรรม เทคนิคที่ใช้เช่น karyotyping, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) นอกจากนี้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction, PCR) ยังเป็นเทคนิคพันธุศาสตร์โมเลกุลอีกเทคนิคหนึ่งที่มีบทบาทมากที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมได้หลายตำแหน่งในปฏิกิริยาหลอดเดียวกัน ผลที่ได้รวดเร็ว แม่นยำ และขั้นตอนปฏิบัติงานไม่ยุ่งยาก หรือซับซ้อน ซึ่งแตกต่างจากเทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ FISH ที่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน แต่สามารถทราบตำแหน่งของโครโมโซมที่ผิดปกติหรือเปลี่ยนไปได้ จากเหตุผลดังกล่าวจึงมีผู้ใช้เทคนิค FISH และ PCR ควบคู่กัน Egozcue *et al.*, (2000) ใช้เทคนิค FISH และ PCR ติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศบนโครโมโซม X และโครโมโซม Y นอกจากนี้ Martinhago *et al.*, (2010) ศึกษาการเปรียบเทียบเทคนิค FISH และ RT PCR เพื่อตรวจโครโมโซมเพศพบว่าเทคนิค RT PCR มีประสิทธิภาพเท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์และเทคนิค FISH มีประสิทธิภาพเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ เทคนิค RT PCR นั้นมีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่า แต่ก็ให้ผลที่รวดเร็วกว่า ราคาถูกกว่า ส่วนเทคนิค FISH ก็ยังมีความแม่นยำสูงกว่า งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาการตรวจสอบโครโมโซมเพศของมนุษย์ด้วยเทคนิค FISH และ RT PCR โดยคาดว่าจะสามารถผลิตเป็นชุดตรวจสอบได้ในอนาคต

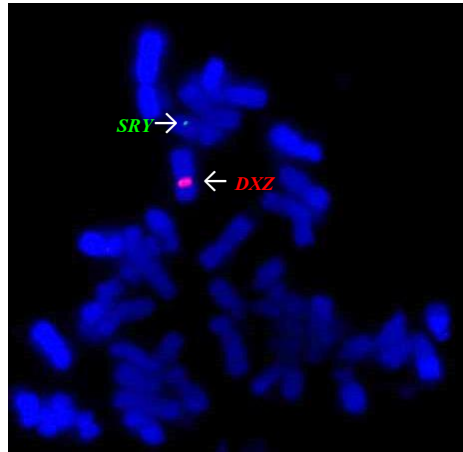
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การพัฒนาการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ทำโดยการพัฒนาโพรบ 2 ชนิด คือ โพรบของยีน *DXZ* จากโครโมโซม X และโพรบของยีน *SRY* จากโครโมโซม Y ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ของยีนทั้งสองเพื่อเพิ่มปริมาณให้ได้ขนาด 580 คู่เบสสำหรับยีน *DXZ* ขนาด และ 470 คู่เบสสำหรับยีน *SRY* แล้วเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจีโนม (genomic DNA, gDNA) ของเพศชายปกติเป็นดีเอ็นเอต้นแบบโคลนเพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดแล้วตัดฉลากโดยวิธี nick's translation ด้วยสาร fluorescein isothiocyanate (FITC) และ texas red หลังจากนั้นทดสอบด้วยการไฮบริไดซ์ลงบนเซลล์เม็ดเลือดขาวของชายปกติ และตรวจนับผลจำนวน 200 เซลล์ สำหรับเทคนิค RT PCR ทำโดยออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ยีน *DXZ* ขนาด 184 คู่เบส และยีน *SRY* ขนาด 214 คู่เบส แล้วนำไปตรวจสอบกับ gDNA ของเพศชายปกติจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยมีชิ้นส่วนของยีน *human actin* ขนาด 147 คู่เบส เป็นยีนควบคุม และติดตามผลการเพิ่มปริมาณ RT PCR ด้วยสี SYBR green ในเครื่อง Real time PCR ด้วยโปรแกรม 98 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ 98 องศาเซลเซียส 5 วินาที 60 องศาเซลเซียส 5 วินาที จำนวน 40 รอบ 95 องศาเซลเซียส 5 วินาที 1 รอบ และ Melt curve ที่ 65 องศาเซลเซียส ถึง 95 องศาเซลเซียส ลดลง 0.5 องศาเซลเซียสทุก 5 วินาที

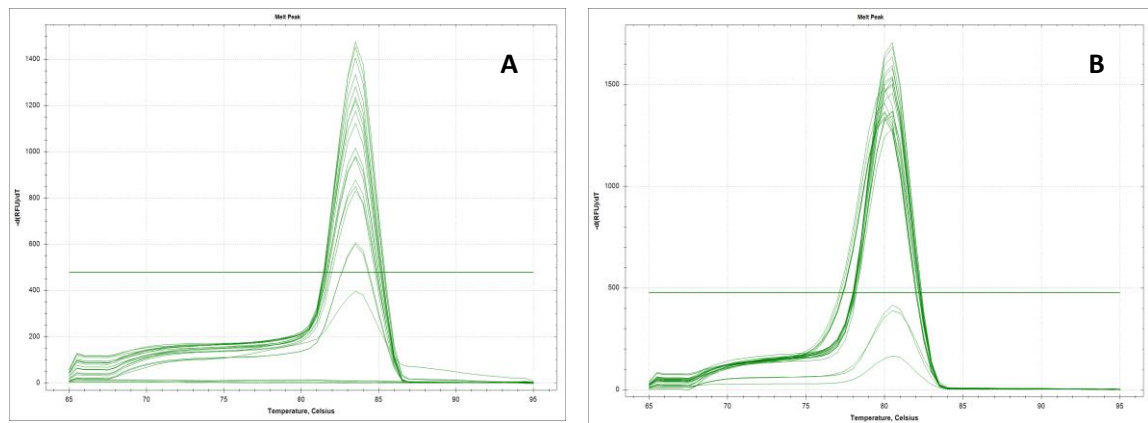
ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบผลเทคนิค FISH ด้วยโพรบ *DXZ* และ *SRY* ด้วยการไฮบริไดซ์บนเซลล์เม็ดเลือดขาวของเพศชายปกติจำนวน 200 เซลล์ พบว่ามีนิวเคลียสที่ติดโพรบจากการปรากฏสัญญาณของสารเรืองแสงทั้ง 2 สี จำนวน 160 เซลล์ คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 1)

สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT PCR พบว่ายีน *DXZ* มีประสิทธิภาพ (efficiency) เป็น 89.2 และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation, R^2) เท่ากับ 0.994 ยีน *SRY* มีประสิทธิภาพเป็น 52 และ R^2 เท่ากับ 0.949 และยีน *Actin* มีประสิทธิภาพเป็น 68 และ R^2 เท่ากับ 0.935 ตามลำดับ melting temperature ของยีน *SRY* (รูปที่ 2A) และยีน *DXZ* (รูปที่ 2B) มีค่าเท่ากับ 84 และ 81 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากอุณหภูมิดังกล่าวทำให้ตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณยีน *DXZ* และ *SRY* ด้วยการใช้สี SYBR green เพียงสีเดียว เมื่อทำการตรวจสอบกับ gDNA ของชายปกติจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่ามีประสิทธิภาพเป็น 70 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 1 ผลของการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพศชายปกติระยะเมทาเฟส พบสัญญาณสีแดง 1 ตำแหน่งและสีเขียว 1 ตำแหน่ง



รูปที่ 2 ค่า melting temperature จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR ด้วย SYBR green ของยีน SRY (A) และยีน DXZ (B) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพศชายปกติ

จากผลการทดลองนี้เห็นได้ว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Martinhago *et al.*, (2010) ที่รายงานว่าเทคนิค FISH มีความไวที่สูงกว่าเทคนิค RT PCR แต่ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องมีทักษะที่สูงกว่า RT PCR จึงทำให้การวินิจฉัยความผิดปกติทางพันธุกรรมจึงมักใช้เทคนิค FISH ร่วมกับเทคนิค PCR (Egozcue *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าเทคนิค FISH มีความไวสูง แต่ก็ยังไม่มี ความไวในการตรวจในระดับเซลล์เดียว และถ้าบุคคลดังกล่าวมีสภาพเป็น mosaic ก็จะทำให้เกิดการตรวจสอบที่ผิดพลาด (Kuo *et al.*, 1998) เมื่อพิจารณาข้อดีของเทคนิค RT PCR นั้นพบว่ามีความรวดเร็วและแม่นยำสูง ลดการปนเปื้อนจากการทำ PCR แบบเดิม แต่จำเป็นต้องระวังความผิดพลาดที่เกิดจากการปนเปื้อนในดีเอ็นเอต้นแบบ (Blaszczuk *et al.*, 1998) จากสาเหตุดังกล่าว การตรวจสอบโครโมโซมเพศด้วยเทคนิค FISH และ RT PCR ที่ได้นี้จึงต้องมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้มีประสิทธิภาพและความไวที่เพิ่มขึ้น

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาการตรวจสอบโครโมโซมเพศของมนุษย์ด้วยเทคนิค FISH ทำโดยการสร้างโพรบของยีน *DXZ* และ *SRY* ให้มีขนาด 580 คู่เบสและ 470 คู่เบสตามลำดับ ส่วน RT PCR สามารถสร้างไพรเมอร์ของยีนทั้งสองให้มีขนาด 184 และ 214 คู่เบสตามลำดับ และติดตามผลด้วย SYBR green จากการตรวจสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวและ gDNA ของชายปกติ พบว่า FISH ให้ประสิทธิภาพ 80 เปอร์เซ็นต์ซึ่งสูงกว่า RT PCR ที่ให้ประสิทธิภาพ 70 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

- Blaszczyk, A., Y.X. Tang, H.C. Dietz, A. Adler, A.S. Berkeley, L.C. Krey and J.A. Grifo. Preimplantation Genetic of human Embryos for Marfan's Syndrome. J. Assist. Reprod. Genet. 1998. 15(5): 281-284.
- Egozcue, J., J. Santalo, C. Gimenez, N. Perez and F. Vidal. Preimplantation genetic diagnosis. Mol. Cell. Endocrinol. 2000. 77: 21-25.
- Kuo, H., C.M. Ogilvie and A.H. Handyside. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos and the accuracy of single-cell genetic analysis. J. Assist. Reprod. Genet. 1998. 15: 276-280.
- Martinhago, C.D., L.D. Vagnini, C.G. Petersen, A.L. Mauri, R.L. Baruffi, R.M. Oliveira, J.G. Franco. Development of a real-time PCR method for rapid sexing of human preimplantation embryos. Reprod. BioMed. Online. 2010. 20: 75– 82.