ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะโดยวิธี Multiplex Methylation Specific PCR

ผู้เขียน นางสาวฉริยาวรรณ จรัลสวัสดิ์

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์

ปีการศึกษา 2547

บทคัดย่อ

กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ (Fragile X syndrome) เป็นโรคปัญญาอ่อนแบบเอกซ์-ลิงค์ (X-linked mental retradation) ที่พบบ่อยที่สุด เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ทำให้มีจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว (CGG) ที่อยู่บนยีนเอฟเอ็มอาร์ 1 (*FMR*1 gene) เพิ่มขึ้น คนปกติมีจำนวนซ้ำ 6-54 ซ้ำ คนที่เป็นพาหะ (premutation) มีจำนวนซ้ำ 55-200 ซ้ำผู้ป่วย (full mutation) มีจำนวนซ้ำมากกว่า 200 ซ้ำซึ่งทำให้เกิดภาวะเมธิวเลชั่น (methylation) ของยีนเอฟเอ็มอาร์ 1 ทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีนและขาดโปรตีนเอฟเอ็มอาร์พี (FMRP) การตรวจวินิจฉัยโรคนี้สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจโครโมโซม (Cytogenetics) การตววจโดยวิธีเซาเทิร์น บลอท (Southern blot analysis) การตรวจโดยวิธีพีซีอาร์ (PCR) และการตรวจระดับโปรตีนเอฟเอ็มอาร์พี (immunohistochemical analysis of FMRP) วิธีพีซีอาร์และวิธีเซาเทิร์น บลอท เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน วิธีพีซีอาร์ใช้บอกจำนวนซ้ำ แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถบอกจำนวนซ้ำของผู้ป่วยและพาหะที่มีจำนวนซ้ำมากๆ ได้ วิธีเซาเทิร์นบลอท เป็นวิธีมาตรฐานที่สามารถตรวจการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยได้ทั้งเพศชายและเพศหญิง แต่มีข้อเสียคือใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และมีราคาแพงดังนั้นจึง

เกิดวิธีเมธิวเลชั่น สเปซิฟิค พีซีอาร์ (Methylation specific PCR) ขึ้น เพื่อใช้ตรวจหาภาวะเมธิวเลชั่นของยีน วิธีนี้ใช้ดีเอ็นเอปริมาณ น้อย ใช้เวลาไม่นาน และราคาประหยัด

เมื่อใช้วิธีนี้ในการตรวจแบบย้อนหลังในคนปรกติ 15 ราย คนที่เป็นพาหะ 2 ราย และผู้ป่วย 18 ราย และตรวจในผู้ป่วยปัญญาอ่อนเพศชายที่สงสัยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ โดยที่ไม่ทราบผลการตรวจมาก่อน 60 ราย พบว่าเป็นผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ 7 ราย ผลที่ได้ทั้งหมดสอดคล้องกับผลการตรวจยืนยันโดยวิธีมาตรฐานเดิม นอกจากนี้ได้นำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด 2 ราย ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ ดังนั้นวิธีเมธิวเลชั่น สเปซิฟิค พีซีอาร์ จึงเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจภาวะเมธิวเลชั่นในผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะได้อย่างแม่นยำ ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังอาจนำมาใช้แทนวิธีเซาเทิร์นบลอท ในบางกรณี เช่น การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดและหลังคลอดในผู้ป่วยที่มีประวัติกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในครอบครัว

Thesis Title	Multiplex Methylation Specific PCR Analysis of Fragile X Syndrome
Author	Miss Chariyawan Charalsawadi
Major Program	Biomedical Science
Academic Year	2004

Abstract

Fragile X syndrome (FXS) is the most common X-linked mental retardation. It is caused by the expansion of CGG repeats within the Fragile X Mental Retardation 1 (*FMR1*) gene. Affected individuals (full mutation) have over 200 CGG repeats, while normal individuals and premutation carriers have 6-54 and 55-200 repeats, respectively. Only full mutations are correlated with methylation of the *FMR1* promoter, resulting in gene inactivation and lack of Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP). Numerous diagnostic methods have been developed, including cytogenetics, Southern blot analysis, polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription PCR (RT-PCR), and immunohistochemical analysis of FMRP. Of these, PCR and Southern blot are used as standard methods. PCR is applied to determine the number of CGG repeats; however it may fail to detect the high repeats in premutation and full mutation individuals. Southern blot analysis is the current gold standard for diagnosing a full mutation in both males and females, but it requires a large amount of DNA, a long and tedious analysis, and is also quite expensive. Methylation specific PCR (MS-PCR) has been developed as a PCR-based method for detection of methylation. This method requires a small amount of DNA, can be performed in

relatively short time, and is inexpensive. We tested the procedure on 35 known DNA samples (15 normal cases, 2 premutation cases and 18 full mutation cases), on 60 DNA samples that referred for FXS screening in our hospital and on 2 prenatal cases. All results were corresponded to PCR and/ or Southern blot analysis. MS-PCR is valuable new procedure, as it is both cost and time efficient method for diagnosis of FXS, which may replace the Southern blot analysis in some circumstances, for instance post and prenatal cases in known FXS families.