Thesis Title : Determination of Hemoglobin Bart's by Solid Phase Two-Site Immunoradiometric Assay

Author : Miss Siriwan Yaemniyome

Master of Science : Biochemistry

Examining Committee:

Associate Professor Dr.Tor-Pong Sanguansermsri..Chairman

Associate Professor Dr.Panja Kulapongs.....Member

Professor Dr. Boriboon Phornphibul.....Member

Assistant Professor Dr. Vichai Wongchai.....Member

Assistant Professor Luksana Makonkawkeyoon..Member

ABSTRACT

In the present study, the technique of solid phase two-site immunoradiometric assay was developed to measure level of Hb Bart's in alpha thalassemia traits. The procession of developing of method was carried out in detail. Blood was obtained from baby with Hb Bart's hydrops fetalis syndrome and Hb Bart's was isolated by preparative CM-Sephadex chromatography with 0.01 M. phosphate buffer pH 6.0 - 6.8 as a linear gradient system, Hb Bart's was eluted from column at pH 6.4. It was sterilized by passage through Millipore filter. Ten milligram of Hb Bart's was mixed with the same volume of Freund's complete

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

adjuvant. The mixture was divided to inject into footpads and subcutaneously into the backs of rabbits. At the second and the third week later, the animals were injected subcutaneously with the mixture of 0.5 ml Hb Bart's and 0.5 ml of mineral oil. One week later, the animals then received a booster of 5 mg. of Hb Bart's intravenously, blood was collected one week following the last injection. A cross-reactivity of antiserum was removed by affinity chromatography technique. The immunoadsorbent was prepared by coupling Hb Bart's to CNBr-activated Sepharose 4B and the antiserum was passed through immunoadsorbent column. The specific anti-Hb Bart's antibody could be separated by acetate buffer pH 4.0. The antibody was labelled with I-125 by using chloramine-T as oxidizing agent. The assay was carried out by coating microtiter plate with specific anti-Hb Bart's antibody and kept at 4°C for 24 hrs, it was triple washed with PBS. Standard Hb Bart's was made by a series of 9 concentrations from 0.016 to 10 µg/ml and hemolysate of each were diluted to 30-40 µg/ml, 200 µl aliquot of these standard hemoglobin or hemolysate specimen was poured into the wells of microtiter plate and stored at 4°C for 24 hrs. The wells were triple washed with PBS and 200 µl of labelled antibody was placed in the wells and again kept for 24 hrs. After the wells had been washed, the radioactivity in each well was measured by gamma spectrometer.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The results showed an increase of radioactive bound to solid phase which based on increasing of the concentration of Hb Bart's at range between 0.1 to 10 μg/ml, as a linear relationship. By the technique of SPT-IRMA, it could measure Hb Bart's in α thal-1 trait (10 cases) which were parents of patients with Hb Bart's hydrops fetalis ranged between 0.73 to 1.1% (mean ± SD.= 0.86 ± 0.12%). In the second group which were parents of Hb H disease (α thal-1 trait or α thal-2 trait), the percentage of Hb Bart's could be separated to high level (0.73 to 1.2%, mean ± SD = 0.88 ± 0.14) and low level (0.39 to 0.45%, mean ± SD. = 0.42 ± 0.02%). Either father or mother of Hb H disease had high level and the other had low level of Hb Bart's but it did not overlap between these two ranges ($p<0.001$) the results showed the same range of Hb Bart's in the first group as in the second group with high level. In the last group, 2 from 10 cases of blood dornor had Hb Bart's at 0.46% and 0.43% and the others had a little which could be estimated between 0.17% to 0.26% (mean ± SD. = 0.22 ± 0.04%).

From these results, showing the different level of Hb Bart's in α thal-1 trait, α thal-2 trait and normal which had been determined by solid phase two-site immunoradiometric assay of Hb Bart's. Accordingly, it is possible to develop this method for definition of the different form of α thalassemia trait, but it is necessary to confirm this study by method of gene mapping in the future.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การวัดระดับฮีโมโกลบินบาร์ทโดยวิธีโซลิดเฟสทู-ไซท์อิมมูโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์

ชื่อผู้เขียน นางสาวศิริวรรณ แย้มนิยม

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์:

รศ. นพ. ต่อพงศ์	สงวนเสริมศรี....ประธานกรรมการ
รศ. นพ. ปัญจะ	กุลพงษ์.....กรรมการ
ศ. นพ. บริบูรณ์	พรพิบูลย์.....กรรมการ
ผศ. ดร. วิชัย	วงค์ไชย.....กรรมการ
ผศ. ลักษณา	มกรแก้วเกยูร....กรรมการ

บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายของการค้นคว้าวิจัยในครั้งนี้ เพื่อที่จะประยุกต์วิธีการของโซลิดเฟสทู-ไซท์อิมมูโนเรดิโอเมตริกแอสเสย์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบระดับฮีโมโกลบินบาร์ทในผู้สืบสายพันธุ์ของโรคอัลฟาธาลาสซีเมีย (อัลฟาธาลาสซีเมียเทรท) ดังนั้นจึงได้ทำการแยกฮีโมโกลบินบาร์ทจากเลือดของทารกที่เป็นฮีโมโกลบินบาร์ทไฮดรอพฟีทาลิสซีนโดรม โดยใช้ซีเอ็ม-เซฟาเด็คซ์โครมาโตกราฟีและกราเดียนท์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.0-6.8 ฮีโมโกลบินบาร์ทจะถูกชะออกจากคอลัมน์ที่พีเอช 6.4 นำไปกรองผ่านมีลลิพอร์ฟิลเทอร์ จากนั้นจึงผสมฮีโมโกลบินบาร์ท 10 มิลลิกรัมกับคอมพลีทฟรอยด์แอดจิวแวนท์อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เพื่อฉีดอุ้งเท้าและใต้ผิวหนังของกระต่ายในสัปดาห์แรก หลังจากนั้น ฉีดซ้ำในสัปดาห์ที่สองและสามด้วยส่วนผสมของฮีโมโกลบินบาร์ทกับมิเนอ-รัลออยล์ สัปดาห์ต่อมา ฉีดฮีโมโกลบินบาร์ทปริมาณ 5 มิลลิกรัมเข้าเส้นเลือดดำที่ใบหู หลังจากนั้นอีกหนึ่งสัปดาห์ จึงเก็บเลือดมาแยกซีรัมแล้วนำไปเตรียมให้ได้เฉพาะแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อฮีโมโกลบินบาร์ทเพียงอย่างเดียวโดยวิธีแอฟ-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พินีตีโครมาโตกราฟีด้วยการติดฮีโมโกลบินบาร์ทกับเซฟาโรสสี่บี ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยไซยาโนเจนโบรไมด์แล้ว จากนั้นจึงนำอิมมูโนแอดซอร์เบนท์นี้บรรจุในคอลัมน์แล้วผ่านแอนตีซีรัมลงไป แอนตีบอดีที่มีความจำเพาะกับฮีโมโกลบินบาร์ทจะเกาะติดคอลัมน์และสามารถชะออกได้ด้วยอาซีเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4.0 จากนั้นจึงแบ่งส่วนของแอนตีบอดีนี้ไปติดฉลากด้วยสารรังสีไอโอดีน-125 โดยใช้คลอรามีน-ที เป็นตัวเร่งปฏิกริยา นำแอนตีบอดีที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของฮีโมโกลบินบาร์ทโดยการเคลือบแอนตีฮีโมโกลบินบาร์ทแอนตีบอดีลงในไมโครไตเตอร์เพลท อบไว้ในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมงจึงนำมาล้างด้วยฟอสเฟทบัฟเฟอร์ซาไลน์สามครั้ง ใส่สารละลายมาตรฐานของฮีโมโกลบินบาร์ทขนาดความเข้มข้นตั้งแต่ 0.016 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อลบ.ซม.หรือฮีโมลัยเสทของผู้รับการทดลองที่มีความเข้มข้น 30-40 ไมโครกรัมต่อลบ.ซม.อบไว้ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นล้างด้วยฟอสเฟทบัฟเฟอร์ซาไลน์ แล้วจึงเติมแอนตีฮีโมโกลบินส่วนที่ติดฉลากด้วยไอโอดีนลงไปทุกหลุม อบไว้ 24ชั่วโมง ล้างอีกสามครั้งด้วยฟอสเฟทบัฟเฟอร์ซาไลน์ ตัดแต่ละหลุมใส่หลอดแก้ว นำไปวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมา

ผลการศึกษา พบปริมาณสารรังสีที่ติดค้างในหลุมเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฮีโมโกลบินบาร์ท และมีความสัมพันธ์กันอย่างเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของฮีโมโกลบินบาร์ท 0.1-10 ไมโครกรัมต่อลบ.ซม. ด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถตรวจวัดฮีโมโกลบินบาร์ทในกลุ่มของพ่อแม่เด็กที่เป็นฮีโมโกลบินบาร์ทไฮดรอพพีทาลิสซีนโดรมทั้งหมด 10 รายได้ 0.73 ถึง 1.1% (ค่าเฉลี่ย = 0.86 ± 0.12 %) ส่วนกลุ่มที่สอง ซึ่งเป็นพ่อแม่ของผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอชดีซีส 20 รายพบเปอร์เซนต์บาร์ทในแต่ละคู่ไม่เท่ากันคือ ฝ่ายหนึ่งมีฮีโมโกลบินบาร์ท 0.73 ถึง 1.2% (ค่าเฉลี่ย= 0.88 ± 0.14%) ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับผู้รับการทดลองกลุ่มแรก อีกฝ่ายหนึ่งซึ่งเป็นคู่กันจะมีฮีโมโกลบินบาร์ทต่ำกว่าวัดได้ 0.39 ถึง 0.45% (ค่าเฉลี่ย = 0.42 ± 0.02 %) นอกจากนี้ ระดับของฮีโมโกลบินบาร์ททั้งสองฝ่ายยังแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และไม่มีคู่ใดที่มีเปอร์เซนต์ฮีโมโกลบินบาร์ท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซ้อนทับกัน ส่วนเลือดของผู้บริจาคที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม 10 รายพบ 2 รายมีฮีโม-โกลบินบาร์ท 0.46% และ 0.43 % ตามลำดับ ส่วนอีก 8 รายที่เหลือ มีฮีโม-โกลบินบาร์ทในระดับต่ำกว่าสองกลุ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญ ค่าที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.17 ถึง 0.26% (ค่าเฉลี่ย = 0.21± 0.04%)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถวัดและแสดงระดับฮีโมโกลบินบาร์ทในเลือดของอัลฟาธาลาสซีเมีย-1 เทรท, อัลฟาธาลาสซีเมีย-2 เทรท และคนปกติได้แตกต่างกันอย่างชัดเจน ฉะนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์วิธีนี้ เพื่อใช้ในการตรวจสอบภาวะอัลฟาธาลาซีเมียเทรท ทั้งนี้ควรจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยวิธีการหาแผนที่ยีน เพื่อสนับสนุนผลการทดลองครั้งนี้ในโอกาสต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is greatly indebted to Associated Professor Dr.Tor-Pong Sanguansermsri and Assistant Professor Luksana Makonkawkeyoon for invaluable guidance and kindest encouragement.

She wishes to pay her thanks to the Human Genetics Laboratory where the financial and instrumention grants were supported by the Stiffung Volkswagentwerk, Hannover Federal Republic of Germany through Professor Gebhart Flatz.

The sincere gratitude is expressed to Assistant Professor Dr.Vichai Wongchai, Chairman of Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University for his encouragement, criticism and valuable suggestion.

It is genuine pleasure to express thanks to Professor Dr.Boriboon Pornphibul and Associate Professor Dr.Panja Kulapongs for many helpful discussion and for kindly revising the manuscript.

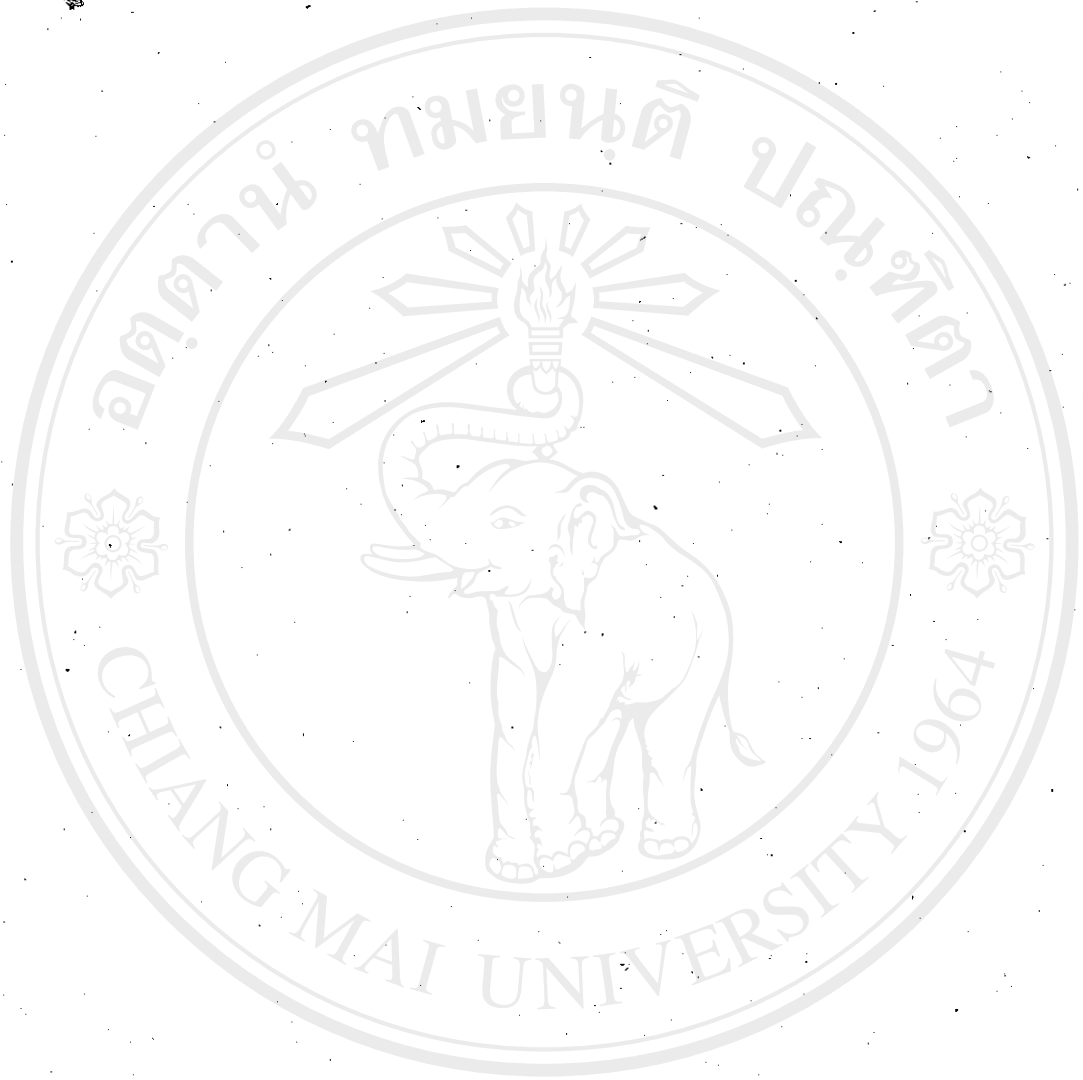
The acknowledgement is also due to Department of Radiology and Nuclear Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University for providing the measurement of radioactivity throughout the experiments.

Finally, thanks are expressed for the suggestion, enthusiastic coorperation and enjoying her colleagues in

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

the Human Genetics Laboratory.

This work was supported in part by China Medical Board Grant from Chiang Mai Medical School.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved