



SIMPLE DETERMINATION OF HEMOGLOBIN A₂ FOR DETECTION OF BETA-THALASSEMIA HETEROZYGOUS

ปราโมทย์ เทียวศิริ B.Sc. (Med. Tech)*
พรณี เชาว์เหนือ B.Sc. (Med. Tech)*
สุรพร มาตระกูล B.Sc. (Med. Tech)*

ยุพา จิวิริยะวัฒน์ M.S. (Clin. Path)**
ลักษณะ ชัยกัมมันต์กุล B.Sc. (Chem.)***
ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี M.D.****

Hemoglobin (Hb) A₂ พบแยกได้ครั้ง
แรกโดยวิธี Starch block electrophoresis⁽¹⁾
ปริมาณที่พบครั้งแรกในคนปกติเท่ากับ $2.54 \pm$
 0.70 เปอร์เซ็นต์⁽²⁾ และพบว่าปริมาณ
จะสูงขึ้นในรายที่เป็น beta-Thalassemia
heterozygous ฉะนั้นการทราบค่าที่แน่นอนของ
Hb-A₂ จึงเป็นเครื่องบ่งชี้ที่สำคัญในการ
วินิจฉัยโรคนี้

หลักใหญ่ในการวัดหาปริมาณของ Hb-A₂
มี 2 วิธีคือ ใช้หลักการของ Electrophoresis
และหลักการของ chromatography ในการ
ศึกษาหาปริมาณของ Hb-A₂ นี้ ใช้หลักการ
ของ chromatography โดยดัดแปลงวิธีของ

Huisman⁽³⁾ ซึ่งเป็นการหาปริมาณของ
Hemoglobins ชนิดต่าง ๆ มาใช้สำหรับการหา
Hb-A₂ โดยเฉพาะ โดยพยายามหาวิธีที่สะดวก
ใช้วัสดุที่ประหยัด และให้ได้ค่าของ Hb-A₂
ที่ถูกต้อง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสม ในการ
หาปริมาณ Hb-A₂ โดยการใช้ Microcolumn
chromatography.
2. หาปริมาณของ Hb-A₂ ในคนปกติ
และคนเป็น beta-Thalassemia heterozygous
โดยวิธีการที่ทำได้

*ภาควิชาคลินิกไมโครสโคปี

**ภาควิชาพยาธิวิทยา

***ภาควิชาชีวเคมี

****ภาควิชากุมารเวชศาสตร์

คณะเทคนิคการแพทย์

คณะแพทยศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์

วัสดุและอุปกรณ์

- Column ขนาด 4.5×30 ซม. สำหรับ Equilibrate Sephadex

- Glass Micro Column หรือ pasteur capillary pipettes ขนาด 10×0.7 ซม.

- KCN

- CCl_4

- 4 M HCl

- Stock Tris-HCl buffer 1 Molar

ชั่ง Tris (hydroxy methyl amino methane) 121.14 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 ml ปรับ pH. ให้เท่ากับ 9.0 ด้วย 4.0 M HCl เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร Working Tris - HCl - KCN buffer (0.05 M) เจือจาง Stock Tris-HCl buffer 1 Molar ด้วยน้ำกลั่น 20 เท่า โดยใช้ KCN 100 mg ต่อ working Tris - HCl KCN buffer 1 ลิตร ปรับ pH ตามต้องการด้วย 4.0 M HCl

วิธีการ

I. Preparation of DEAE-Sephadex Suspension

1. แช่ DEAE Sephadex A-50 ประมาณ 5 gm. ใน 0.05 M. Tris-HCl-KCN buffer pH 8.5 ในตู้เย็น 4°C 24 ชั่วโมง

2. Pack DEAE Sephadex A-50 ใน column ขนาด 4.5×30 ซม. ด้วย Atmospheric pressure ให้ Sephadex ใน Column สูงประมาณ 10-15 เท่า ของเส้นผ่าศูนย์กลางของ Column.

3. Equilibrate Sephadex ใน Column ด้วย 0.05 M. Tris-HCl-KCN buffer pH 8.4 ใช้ buffer ปริมาณเท่ากับ 10 เท่าของ DEAE Sephadex.

II. Hemolysate preparation

1. ใช้เลือดจากคนปกติที่มีผลของ Hemoglobin electrophoresis เท่ากับ AA. โดยใช้วิธีของ Wehinger H.⁽⁴⁾ มีปริมาณของ Fetal hemoglobin น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์โดยใช้วิธีของ Singer K.⁽⁵⁾ ผลของ Fetal cells และ Inclusion body ให้ผล Negative โดยวิธีของ Sanguansermisri T.⁽⁶⁾ และ⁽⁷⁾ ตามลำดับ

2. ล้างเลือดของคนปกติที่มี Anticoagulant 3 ครั้งด้วย Normal Saline โดยใช้ปริมาณ 10 เท่าของเลือด

3. เติมน้ำกลั่นปริมาณเท่ากับเม็ดเลือดที่ล้างแล้ว เพื่อให้เม็ดเลือดแตก

4. เติม CCl_4 อีกประมาณครึ่งหนึ่งของ Hemolysate บิดจุกให้แน่น แล้วเขย่าแรง ๆ ประมาณ 5 นาที

5. บีบที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

6. แยก Hemolysate ชั้นบน

7. วัดความเข้มข้นของ Hemolysate เป็น กรัมเปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Cyanmethemoglobin

III. Quantitation of Hb-A₂a) เตรียม DEAE Sephadex A-50 Micro-column

1. Pack DEAE Sephadex A-50 Suspension ใน Microcolumn ที่เป็น Pasteur Capillary pipettes ขนาด 10 x 0.7 ซม. ให้สูงประมาณ 8-9 ซม.

2. Equilibrate DEAE Sephadex A-50 ด้วย 10 ml. ของ 0.05 M. Tris-HCl KCN buffer pH 8.4

3. ใส่ Hemolysate ลงบนผิวของ DEAE Sephadex A-50 ประมาณ 15 mg ต่อ column (ใช้ปริมาณของ Hemolysate เท่ากับ 50-100 ไมโครลิตร)

4. Equilibrate DEAE Sephadex A-50 ต่อด้วย 10 ml. ของ 0.05 M. Tris-HCl KCN buffer 8.4

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของ Hb A} = \frac{V_1 \times OD_1 \times 100}{V_1 \times OD_1 + V_2 \times OD_2}$$

c. หาปริมาณที่เหมาะสมโดยให้ pH คงที่เท่ากับ pH ที่เหมาะสมที่หาได้จาก บี.

1. เตรียม pH ของ 0.05 M. Tris HCl-KCN buffer เท่ากับ pH ที่เหมาะสมจาก บ) ผ่าน 0.05 M. Tris-HCl-KCN buffer นี้ ลงใน Microcolumn ที่เตรียมจาก a) โดยใช้

b) หา pH ที่เหมาะสม โดยให้ปริมาณคงที่ที่ 40 ml.

1. ปรับ pH ของ 0.05 M. Tris-HCl-KCN buffer ตามที่ต้องการเท่ากับ 7.85, 7.90, 7.95, 8.00, 8.05, 8.10, 8.15 และ 8.20 ตามลำดับ ผ่าน 0.05 M. Tris-HCl-KCN buffer pH ต่าง ๆ เท่ากับ 40 ml. ใน DEAE Sephadex A-50 Microcolumn ที่เตรียมจากข้อ เอ.

2. เก็บ Solution ที่ถูก Eluted วัด ปริมาตรเป็น Volume (V₁) และวัด Optical densities (OD) เป็น OD₁ ที่ 415 nm.

3. ผ่าน 0.05 M. Tris-HCl-KCN Buffer pH 6.5 ปริมาตรเท่ากับ 15 ml. เก็บ Solution ที่ถูก Eluted วัดปริมาตรเป็น Volume (V₂) และวัด Optical densities (OD) เป็น OD₂ ที่ 415 nm.

4. คำนวณหาปริมาณของ Hb-A₂ โดยใช้สูตร

ปริมาตรเท่า 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ml ตามลำดับ

2. เก็บ solution ที่ถูก Eluted วัด ปริมาตรเป็น volume (V₁) optical densities (OD) เป็น OD₁ ที่ 415 nm.

3. ผ่าน 0.05 M. Tris-HCl-KCN buffer pH 6.5 ปริมาตรเท่ากับ 15 ml เก็บ

solution ที่ถูก Eluted วัดปริมาตรเป็น Volume (V_2) วัด Optical densities (OD) เป็น OD₂ ที่ 415 nm.

4. คำนวณหาปริมาณ Hb-A₂ โดยใช้สูตรเกี่ยวกับ III. b(4)

IV. หาค่าปกติของ Hb-A₂

ได้เลือดจากผู้มาบริจาคที่ โรงพยาบาล นครเชียงใหม่ ในจำนวน 245 ราย ซึ่งทุกรายได้ตรวจสอบแล้วว่า มีผลของ Hemoglobin electrophoresis เท่ากับ AA⁽⁴⁾ มีปริมาณของ Fetal hemoglobin น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์⁽⁵⁾ และผลของ Fetal cells⁽⁶⁾ และ Inclusion body⁽⁷⁾ ให้ผล negative ตามลำดับ

จากเลือดที่ได้นี้ นำมาหาค่า ปริมาณ ของ Hb-A₂ โดยใช้ Microcolumn Chromatography ของวิธีการที่เหมาะสมที่ทำได้ตั้งแต่ I - III.

V. หาปริมาณของ Hb-A₂ ในคนที่ เป็น beta - Thalassemia heterozygous.

ได้เลือดจากพ่อแม่ของคนที่ เป็น beta-Thalassemia homozygous ของ ภาควิชา

กุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ จำนวน 67 คน ที่ไม่มีความผิดปกติของ hemoglobin E จากเลือดที่ได้นี้ นำมาหาค่า ปริมาณของ Hb-A₂ โดยใช้ Microcolumn chromatography ของวิธีการที่เหมาะสมที่ทำได้ตั้งแต่ I - III

ผลการทดลอง

1. วิธีการที่เหมาะสม ในการหาปริมาณ Hb-A₂ โดยการใช้ Microcolumn chromatography คือ (จากตารางที่ I และ II)

PH ที่เหมาะสมในการ Eluted Hb-A₂ โดยใช้ Tris-HCl-KCN buffer เท่ากับ 8.05 ปริมาตร (Volume) ที่เหมาะสม เท่ากับ 35 ml. 2:1 ค่าปกติของ Hb-A₂ จากเลือดผู้มาบริจาค จำนวน 245 คน เท่ากับ $3.00\% \pm 0.57(\text{S.D.})$ (1.38 - 4.85)

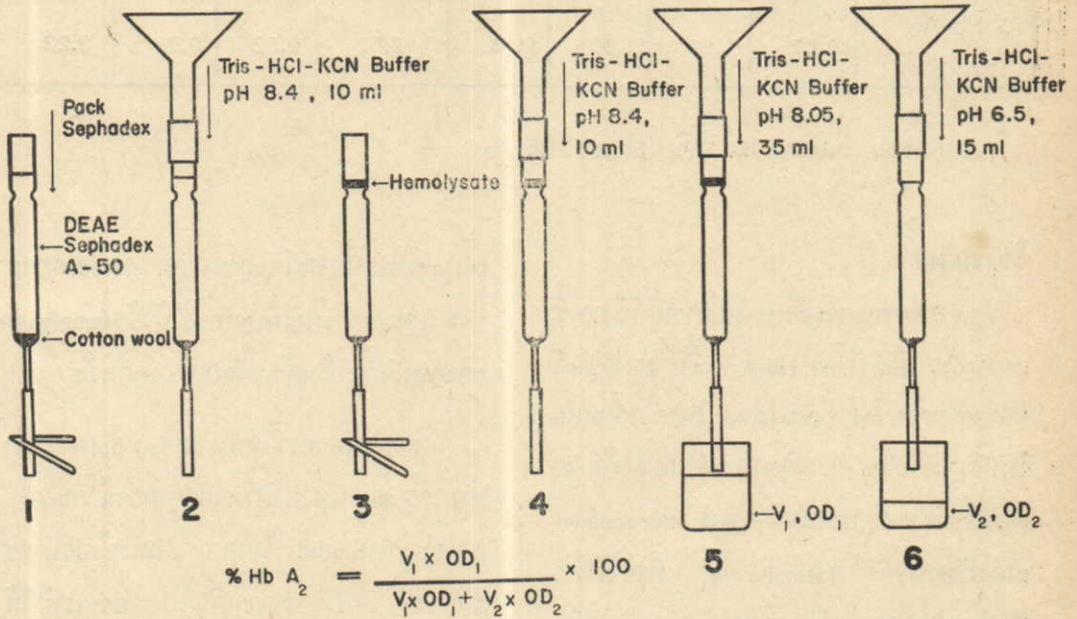
II ค่าของ Hb-A₂ จาก พ่อแม่ของคนที่ เป็น beta-Thalassemia homozygous จำนวน 67 ราย เท่ากับ $6.25\% \pm 0.36 (\text{S.D.})$ (5.09 - 9.77%)

แสดงในรูปกราฟที่ 1

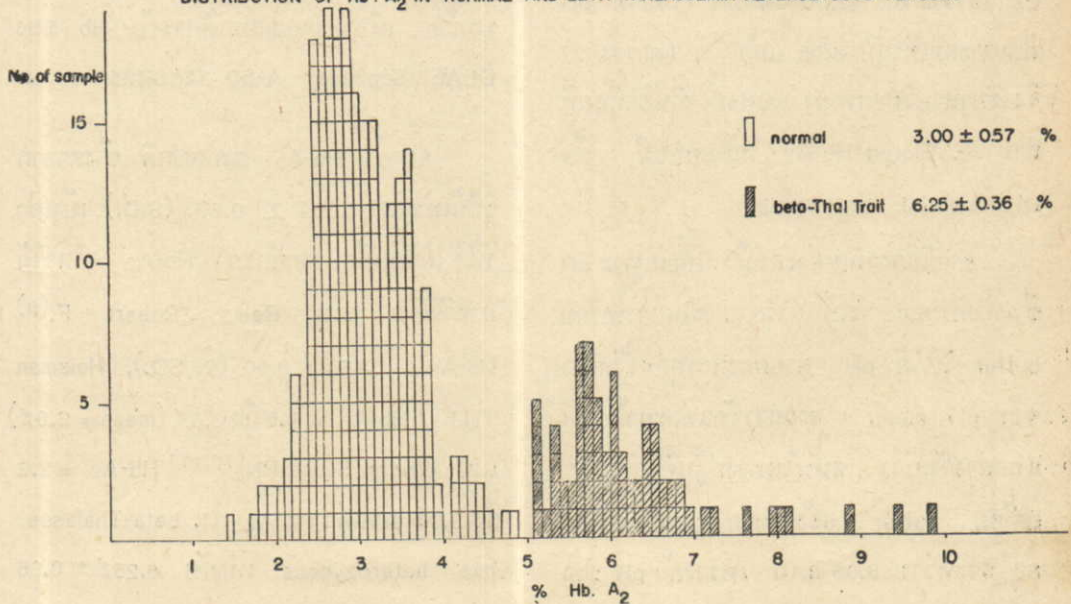
ตารางที่ I แสดงผลการเปลี่ยน pH ของ 0.05 M Tris-HCl-KCN buffer

pH	7.85	7.90	7.95	8.0	8.05*	8.10	8.15	8.20
%Hb A ₂ ในคนปกติ	44.48	12.34	6.09	3.16	2.59	1.78	0.98	0

แผนภาพแสดง การหาปริมาณ ของ — Hb A₂



DISTRIBUTION OF Hb. A₂ IN NORMAL AND BETA THALASSEMIA HETEROZYGOUS PERSONS



ตารางที่ 2 แสดงผลการเปลี่ยน Volume ของ 0.05 M Tris-HCl-KCN buffer pH 8.05

Volume	15	20	25	30	35	40	45	50
% Hb A ₂ ในคนปกติ	0.67	1.53	1.80	2.18	2.52	2.52	2.78	3.23

* Condition ที่เหมาะสมสำหรับ Eluted Hb A₂

วิจารณ์ผล

จากผลของการศึกษาในการหาวิธีการที่เหมาะสม สำหรับหา Hb-A₂ นั้น จากตอนที่ 1 ในการหา pH ที่เหมาะสม โดยการกำหนดให้ปริมาณ 0.05 M Tris-HCl-KCN คงที่ที่ 40 ml. เนื่องจากเทียบจากขนาดของ Microcolumn และปริมาณของ Hemolysate ที่ใช้ในการทดลองประมาณว่าปริมาณของ buffer ที่ใช้คงที่ที่ 40 ml. นี้มีปริมาณมากเพียงพอในการ Eluted Hb A₂ ออกมาได้หมด เมื่อได้ pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 8.05 แล้ว (ตาราง 1) จึงจะหาปริมาณของ buffer ที่น้อยที่สุดที่สามารถ Eluted Hb-A₂ ได้หมดพอดี ซึ่งเท่ากับ 35 ml. (ตารางที่ 2)

จากวิธีการที่เหมาะสมนี้ โดยเฉพาะ pH ซึ่งเท่ากับ 8.05 จะเป็นการลำบากในการเตรียม buffer ให้ได้ pH ตามต้องการทุกครั้งเนื่องจาก pH meter จากการวัดแต่ละครั้งย่อมแตกต่างกันบ้าง ฉะนั้นในทางปฏิบัติได้ทำการเตรียม buffer ครั้งละมาก ๆ และให้ pH อยู่ในช่วง 8.05-8.10 เพราะถ้า pH ของ

buffer ต่ำกว่านี้ Hb อื่น อาจจะถูก eluted ออกมาด้วย และในการปฏิบัติทุกครั้งได้ใช้ Hemolysate ของคนปกติ เป็นค่าเปรียบเทียบทุกครั้ง

ส่วนปริมาตรที่เหมาะสมของ buffer เท่ากับ 35 ml. นี้ ถ้าปริมาตรต่ำกว่านี้ Hb-A₂ อาจจะถูก Eluted ไม่หมด และถ้าปริมาตรมากกว่านี้ในปริมาณมากเกินไป อาจจะทำให้ column ทรุดเพราะเป็น Microcolumn และปริมาณของ Hb อื่นอาจจะถูก Eluted ออกมาด้วย เนื่องจากคุณสมบัติการจับ Hb ของ DEAE Sephadex A-50 จะอ่อนลง

จากค่า Hb-A₂ ในคนปกติ ซึ่งหาจากวิธีนี้เท่ากับ $3.00\% \pm 0.57$ (S.D.) เป็นค่าที่ใช้ได้เมื่อเทียบจากค่าของ Hb-A₂ ที่หาได้จากวิธีอื่น เช่น Reiss Robert F.⁽⁸⁾ Hb-A₂ = $2.55\% \pm 0.60$ (2. SD.), Huisman THJ⁽⁹⁾ Hb-A₂ = 1.6 ถึง 3.5% (mean = 2.6%) และ Wright Stone RN^(10,11) Hb-A₂ = 2.2 ถึง 3.0% ส่วนค่า Hb-A₂ ใน beta-Thalassemia heterozygous เท่ากับ $6.25\% \pm 0.36$

(S.D.) นั้น เมื่อเทียบกับที่มีผู้ศึกษามา เช่น Bernini LF⁽¹²⁾ Hb-A₂ = 5.13 ± 1.38 (2 S.D.) Huisman THJ⁽⁹⁾ Hb-A₂ = $5.6\% \pm 0.42$ (S.D.) จะเห็นว่าเป็นค่าที่ใช้ได้ และจากกราฟ 1 จะเห็นว่าค่าของ Hb-A₂ ในคนที่ เป็น beta-Thalassemia heterozygous แยกออกจากคนปกติได้อย่างชัดเจน (P น้อยกว่า 0.001)

ผลจากการศึกษาจะพบว่า การหาปริมาณของ Hb-A₂ โดยวิธีนี้ ให้ผลที่เชื่อถือได้ และสามารถทำได้ครั้งละมากมาย เป็นผลทำให้การวินิจฉัย beta-Thalassemia heterozygous ได้แน่นอน สดวกและรวดเร็ว

ทุนสนับสนุน โดยมูลนิธิโรงงานผลิตรถยนต์โฟล์คswagen ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมันตะวันตก

Abstract

It is found that nearly all cases of heterozygous beta-Thalassemia have elevated hemoglobin A₂. The present work describe a modified microchromatographic Techniques and their condition using DEAE-Sephadex A-50 as an absorbent and a pasture pipette as a column to quantitative the Hb-A₂.

Preparation of DEAE-Sephadex was carried out as a usual way. The absorbent was then filled in a pasture

pipette of about of 10 cm. in height and equilibrated with 5 ml of 0.05 M. Tris HCl-KCN buffer pH 8.5. Elution of Hb A₂ was carried out with 35 ml of 0.05 M. Tris-HCl-KCN buffer pH 8.05, while the remaining hemoglobin was eluted with 15 ml of Tris HCl-KCN buffer of the same concentration but pH of 6.5. The proportion of Hb eluted were measured at 415 nm.

From the study the means Hb-A₂ of 25 normal adults was 3.00% while S.D. of ± 0.57 . In the 67 case of obligatory beta-Thalassemia heterozygous Hb A₂ was 6.23 and S.D. of ± 0.36 . The results were comparable to that of other methods.

From these results the method can be used as a screening test for beta Thalassemia, heterozygous.

REFERENCES:

1. Kunkel HG Ceppellini R, Muller-Eberhard U, et al: Observations on the minor basic hemoglobin component in the blood of normal individuals and patients with thalassemia. J. Clin Invest 36:1615-1625, 1957.

2. Mnsri MS, Josephon AM, Singer K:
Starch block electrophoretic Studies
of human hemoglobin Solutions. I.
Technic and results in the normal
adult. Blood 13: 533-542, 1958.
3. Huisman T.H.J. & Dozy A.M. (1966)
Studies on the heterogeneity of
hemoglobin IX. The use of Tris
(hydroxymethyl) aminomethane-HCL
buffers in the anion exchange
chromatography of hemoglobin. J.
of chromatog. 19, 160-169.
4. Wehinger H, Alchovych. M, Densi-
tometrisch-quantitative Bestimmung von
Hemoglobin A₂ anch Mikrozonon-
Elektrophorese auf cellulose Acetat.
Folic, Jan. 1970.
5. Singer K., Chernoff A.I. & Singer L.
(1951). Studies on abnormal hemoglo-
bins I. Their demonstration in
sickle cell anemia and other
hematologic disorders by means of
alkali denaturation. Blood 6, 413-428
6. Sanguanserm Sri T. et all; Simple
acid Elution procedure for the
Staining of F-cells on Blood Smear.,
in preparation.
7. Laboratory manual of Clinical
Microscopy 431 Fac. of AMS.
Chiang Mai University P. 61-62.
8. Reiss. Robert F., Morse, Edward
E., and Michini, Louis J.: An
improved method for the quautita-
tion of A₂ hemoglobin utilizing
cellulose acetate electrophoresis
and densitometry. Am. J. clin. Pathol
63:841-846, 1975.
9. Efromov, G.D., Huigman, T.H.J.,
Bowman, K., Wrightstone, R.N.,
and Schroeder, W.A., Microchrom-
atography of hemoglobins. II. A
rapid method for the determination
of hemoglobin A₂, J. Lab. Clin.
Med., Vol. 83, No. 4, P. 657-664
April, 1974
10. Wrightstone RN, Huisman T.H.J.,
and Vander Sar A: Qualitative and
Quantitative Studies on sickle cell
hemoglobin in homozygous and
heterozygotes. Clin Chim Acta
22:593-601, 1968.
11. Wright stone RN and Huisman
T.H.J.: On the levels of hemoglo-
bins A₂ and F in sickle cell anemia
and some related disorders. Am J
clin Pathol In press.
12. Bernini LF: Rapid estimation of
hemoglobin A₂ by DEAE chroma-
tography. Biochem Genet 2:305-310,
1969.