Thesis Title Development of Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Screening Alpha-Thalassemia Carriers

Author Miss Sumontida Sayachak

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee

Lecturer Dr. Sawitree Chiampanichayakul	Chairperson
Associate Professor Dr. Watchara Kasinrerk	Member
Assistant Professor Dr. Thanusak Tatu	Member

ABSTRACT

Thalassemia is a common genetic disorder characterized by reduction or absence of globin chain synthesis. The two main thalassemia syndromes are β-and α-thalassemia. The most defects of β-thalassemia are point mutations leading to the decrease in β-globin chain synthesis while α-thalassemia is usually caused by the deletion of one or more α-globin genes. Reduction rate in synthesis of the α-globin chains in α-thalassemia results in an excess of free γ- or β-globin chains which produce Hb Bart's (γ_4) and Hb H (β_4), respectively. There are two common types of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

α-thalassemia, α-thalassemia 1 and α-thalassemia 2. The α-thalassemia 1 which is deletion of both α1 and α2 globin genes, especially α-thalassemia 1 with the Southeast Asian deletion ($--^{SEA}$), is the most common cause for Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. The α-thalassemia 2 is characterized by the deletion of one α-globin gene. The combination of α-thalassemia 1 (SEA type) with α-thalassemia 2 causes of Hb H disease ($--^{SEA}/-\alpha$). Recently, several methods for screening of α-thalassemia 1 carriers are available. However, the available screening methods are not suitable for screening carriers in large populations.

In this study, a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for detecting Hb Bart's presented in α-thalassemia carriers. To develop this method, the produced monoclonal antibodies (mAbs), named Thal GJA and Thal N/B, were initially purified by affinity chromatography using protein G Sepharose column. By indirect ELISA, mAb Thal GJA was demonstrated to specifically react with hemoglobin Bart's whereas mAb Thal N/B reacted to various types of Hbs. The mAbs Thal GJA and Thal N/B were used to establish a sandwich ELISA for detection of Hb Bart's.

In the sandwich ELISA, anti Hb Bart's mAb Thal GJA was used as a capture antibody. MAb Thal N/B was labeled with horseradish peroxidase (HRP) and used as conjugate. For this ELISA, 100 μg/ml of mAb Thal GJA for coating plate and 1.25 μg/ml of HRP conjugated Thal N/B was found to be the optimal condition. The optimized ELISA has a very high sensitivity which could detect Hb Bart's at less than 10 ng/ml. The developed sandwich ELISA was then applied to detect Hb Bart's in 91 blood samples. These samples were characterized for hematological parameters

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

by an automated blood cell counter, hemoglobin typing by high performance liquid chromatography and α-globin genotyping by Gap-polymerase chain reaction method (PCR). Sixty-four out of 91 subjects were shown to be thalassemia heterozygote which were subsequently classified into several type of thalassemia; 26 α-thalassemia 1 (SEA type), 6 double heterozygotes of α-thalassemia 1 (SEA type) and β-thalassemia, 6 double heterozygotes of α-thalassemia 1 (SEA type) and hemoglobin E, 5 double heterozygotes of α-thalassemia 2 and β-thalassemia, 2 double heterozygotes of α-thalassemia 2 and hemoglobin E, 8 β-thalassemia heterozygote, 7 hemoglobin E heterozygote and 4 α-thalassemia 2 heterozygote. The rest of 27 were found to be hematological normal and thalassemia free. By the sandwich ELISA, it was found that 36 out of 38 with α-thalassemia ($--^{SEA}$) deletion showed positive reactivity with Hb Bart's at concentrations between 4.50 to 156.2 μg/ml, whereas 6 samples carrying α-thalassemia 2 gene presented Hb Bart's at 4.55 to 84.44 μg/ml. In the case of β-thalassemia heterozygote, Hb E heterozygote and normal samples, majority of them showed negative results for the sandwich ELISA. Unexpectedly, Hb Bart's were also detected in 2 samples characterized as normal subjects, 4 samples as β- thalassemia heterozygote and 2 samples as Hb E heterozygote.

Taken together, the results demonstrate that the developed sandwich ELISA has high sensitivity for identifying adult heterozygote of the ($--^{SEA}$) α-thalassemia 1 deletion and it may be an alternative affordable method for screening the thalassemia carriers in several populations.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีเอ็นไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบ้นต์เพื่อตรวจคัดกรองพาหะแอลฟ่าธาลัสซีเมีย

ผู้เขียน นางสาว สุมนชิดา สายาจักร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ. ดร. สาวิตรี เจียมพานิชยกุล	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	กรรมการ
ผศ. ดร. ธนูศักดิ์ ตาตุ	กรรมการ

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมียเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรม ที่มีการสร้างสายโกลบินลดลงหรือสร้างไม่ได้เลย ธาลัสซีเมียที่สำคัญมีสองชนิดคือ เบต้า และ แอลฟ่า ธาลัสซีเมีย เบต้าธาลัสซีเมีย ส่วนใหญ่ เกิดจากความผิดปกติของเบต้าโกลบินยีนที่มีเบสเปลี่ยนไปเฉพาะจุด ทำให้การสร้างสายเบต้าโกลบินลดลง สำหรับแอลฟ่าธาลัสซีเมียนั้นเกิดจากการขาดหายของแอลฟ่าโกลบินยีนตั้งแต่ 1 ยีนขึ้นไป การสร้างสายแอลฟ่าโกลบินลดลงในแอลฟ่าธาลัสซีเมีย ทำให้เกิดความไม่สมดุลของการสร้างสายโกลบิน ส่งผลให้เกิดสายแกมม่าและสายเบต้าเหลือมากเกินและจับกันเองเกิดเป็นฮีโมโกลบินบาร์ต (γ_4) และฮีโมโกลบินเอช (β_4) ตามลำดับ แอลฟ่าธาลัสซีเมียยังแบ่งออกได้เป็นสองชนิดคือ แอลฟ่าธาลัสซีเมียหนึ่งและแอลฟ่าธาลัสซีเมียสอง แอลฟ่าธาลัสซีเมียหนึ่งนั้นเกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟ่าหนึ่งและยีนแอลฟ่าสองบนแขนข้างเดียวกันของโครโมโซม พบว่าแอลฟ่าธาลัสซีเมียหนึ่ง ชนิด Southeast Asian type (SEA type) เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดทารกบวมน้ำชนิดมีฮีโมโกลบินบาร์ต ส่วนแอลฟ่าธาลัสซีเมียสองนั้นเกิดจากการขาดหายของยีนแอลฟ่าโกลบินยีนหนึ่งยีน การรวมกันของแอลฟ่าธาลัสซีเมียหนึ่ง ชนิด SEA type และแอลฟ่าธาลัสซีเมียสอง สามารถทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเอช ($--^{SEA}/-\alpha$) ซึ่งเป็นพาหะของโรคทารกบวมน้ำชนิดมีฮีโมโกลบินบาร์ตเช่นกัน ในปัจจุบันมีวิธีตรวจหลายวิธีที่ใช้ตรวจคัดกรองพาหะแอลฟ่าธาลัสซีเมีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หนึ่ง แต่อย่างไรก็ตาม วิธีตรวจเหล่านั้นยังไม่มีความเหมาะสมเพื่อตรวจคัดกรองพาหะแอลฟ่าธาลัสซีเมียหนึ่ง ในประชากรจำนวนมากได้

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธี sandwich ELISA เพื่อใช้ตรวจหาฮีโมโกลบินบาร์ตในผู้ที่เป็นพาหะแอลฟ่าธาลัสซีเมีย ในการพัฒนาวิธี sandwich ELISA นั้น ผู้วิจัยได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี ชนิด Thal GJA และ Thal N/B มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography โดยใช้ protein G Sepharose column และพิสูจน์ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA จากผลการพิสูจน์พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี Thal GJA มีความจำเพาะกับฮีโมโกลบินบาร์ต ในขณะที่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี Thal N/B ทำปฏิกิริยาได้กับทุกฮีโมโกลบิน ดังนั้น จึงได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี Thal GJA และ Thal N/B มาพัฒนาเป็นวิธี sandwich ELISA เพื่อตรวจหาฮีโมโกลบินบาร์ต

ในวิธี Sandwich ELISA ที่พัฒนาขึ้นมานั้น ได้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Thal GJA ซึ่งมีความจำเพาะกับฮีโมโกลบินบาร์ตเป็นตัวจับฮีโมโกลบินบาร์ตในตัวอย่างตรวจและนำ Thal N/B มาติดฉลากกับเอนไซม์ Horseradish peroxidase เพื่อใช้เป็นคอนจูเกต ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อตรวจหาฮีโมโกลบินบาร์ตนั้น พบว่าปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดี Thal GJA ที่เหมาะสมในการเคลือบเพลท คือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและปริมาณที่เหมาะสมของ Thal N/B ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase คือ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจหาฮีโมโกลบินบาร์ตได้ต่ำถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงได้นำวิธี Sandwich ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นมาใช้ตรวจหาฮีโมโกลบินบาร์ตในตัวอย่างเลือดจำนวน 91 ราย ซึ่งเลือดทั้ง 91 ราย นี้ได้ผ่านการตรวจทางโลหิตวิทยาด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ การตรวจวัดชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินโดยวิธีเอชพีแอลซี และตรวจยืนยันผลด้วยวิธี PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ผลจากการตรวจพบว่า 64 รายจาก 93 ราย เป็นพาหะของแอลฟ่าธาลัสซีเมีย ซึ่งจำแนกชนิดของ ธาลัสซีเมียได้ดังนี้ เป็นแอลฟ่าธาลัสซีเมียหนึ่ง ชนิด SEA type 26 ราย แอลฟ่าธาลัสซีเมียหนึ่ง ชนิด SEA type ร่วมกับพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย 6 ราย แอลฟ่าธาลัสซีเมียหนึ่ง ชนิด SEA type ร่วมกับพาหะฮีโมโกลบินอี 6 ราย แอลฟ่าธาลัสซีเมียสองร่วมกับพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย 5 ราย แอลฟ่าธาลัสซีเมียสองร่วมกับพาหะฮีโมโกลบินอี 2 ราย พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย 8 ราย พาหะฮีโมโกลบินอี 7 ราย แอลฟ่าธาลัสซีเมียสอง 4 ราย ที่เหลือ 27 รายเป็นคนปกติ เมื่อนำเลือดทั้ง 91 รายมาตรวจหาฮีโมโกลบินบาร์ต ด้วยวิธี Sandwich ELISA พบว่า 36 จาก 38 รายที่เป็นพาหะแอลฟ่าธาลัสซีเมียหนึ่งชนิด SEA type ให้ผลบวกโดยมีความเข้มข้นของฮีโมโกลบินบาร์ตอยู่ระหว่าง 4.50 ถึง 156.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในรายที่เป็นแอลฟ่าธาลัสซีเมียสองจำนวน 6 รายจาก 11 ราย มีความเข้มข้นของฮีโมโกลบินบาร์ต ระหว่าง 4.55 ถึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

84.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนใหญ่ของพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะฮีโมโกลบินอี และคนปกติ พบว่าให้ผลลบกับวิธีที่พัฒนาขึ้น ที่เกินความคาดหมายคือ พบว่า คนปกติ 2 ราย พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย 4 ราย พาหะฮีโมโกลบินอี 2 ราย ก็สามารถตรวจพบ Hb Bart's ได้

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า วิธี sandwich ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีความไวสูงพอที่จะตรวจหาพาหะแอลฟ่าธาลัสซีเมียหนึ่งชนิด SEA type ได้ และอาจจะเป็นการตรวจอีกวิธีหนึ่งเพื่อใช้ตรวจคัดกรองพาหะธาลัสซีเมียในประชากรกลุ่มต่างๆ ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved