

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E47246



MATERNAL PLASMA DNA IN PREGNANCY WITH
HEMOGLOBIN BART'S HYDROPS FETALIS
AND CHARACTERIZATION OF ABNORMAL
HEMOGLOBINS FOUND IN THAILAND

MISS SANTA SINGSANAN

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY

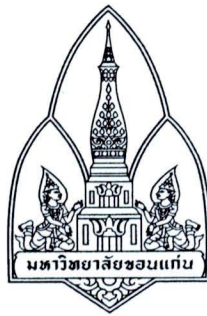
2011

6002511780

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E47246



**MATERNAL PLASMA DNA IN PREGNANCY WITH
HEMOGLOBIN BART'S HYDROPS FETALIS
AND CHARACTERIZATION OF ABNORMAL
HEMOGLOBINS FOUND IN THAILAND**



MISS SANITA SINGSANAN

**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY**

2011

**MATERNAL PLASMA DNA IN PREGNANCY WITH
HEMOGLOBIN BART'S HYDROPS FETALIS
AND CHARACTERIZATION OF ABNORMAL
HEMOGLOBINS FOUND IN THAILAND**

MISS SANITA SINGSANAN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOMEDICAL SCIENCES
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2011



**THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOMEDICAL SCIENCES**

Thesis Title: Maternal plasma DNA in pregnancy with hemoglobin Bart's hydrops fetalis and characterization of abnormal hemoglobins found in Thailand

Author: Miss Sanita Singsanan


Thesis Examination Committee

Assoc. Prof. Dr. Kanokwan Sanchaisuriya	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Kitti Torcharus	Member
Assoc. Prof. Dr. Chanvit Leelayuwat	Member
Assoc. Prof. Goonnapa Fucharoen	Member
Assoc. Prof. Dr. Supan Fucharoen	Member

Thesis Advisors:


..... Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Supan Fucharoen)


..... Co-Advisor
(Assoc. Prof. Goonnapa Fucharoen)


.....
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)
Dean, Graduate School

सानิดา สิงห์สนั่น. 2554. การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในพลาสมาหญิงตั้งครรภ์โรคฮีโมโกลบินบาร์ทส์ไฮดรอปส์ฟีทาลิส และการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ. ดร. สุพรรณ พุ้เจริญ, รศ. กุลนภา พุ้เจริญ

บทคัดย่อ

E47246

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจหาดีเอ็นเอในพลาสมาหญิงตั้งครรภ์กับการทำนายภาวะฮีโมโกลบินบาร์ทส์ไฮดรอปส์ฟีทาลิสของทารก การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการตรวจวัดชิ้นส่วนของยีน GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมจากพลาสมาหญิงตั้งครรภ์ 400 ไมโครลิตร โดยวิธี real time PCR ศึกษาในหญิงตั้งครรภ์จำนวน 76 ราย จำแนกเป็นตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์โรคฮีโมโกลบินบาร์ทส์ไฮดรอปส์ฟีทาลิสจำนวน 21 ราย อายุครรภ์ 12-32 สัปดาห์ และหญิงตั้งครรภ์ที่ทารกในครรภ์ไม่ได้เป็นโรคฮีโมโกลบินบาร์ทส์ไฮดรอปส์ฟีทาลิสจำนวน 55 ราย อายุครรภ์อยู่ระหว่าง 10-26 สัปดาห์ แสดงผลการศึกษาโดยเปรียบเทียบเป็นค่า CT (cycle threshold) ของทั้งสองกลุ่ม พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 28.85-36.07 และ 30.45-38.32 ตามลำดับ เนื่องจากค่า CT ที่ต่ำกว่าแสดงถึงปริมาณดีเอ็นเอมีมากกว่า ดังนั้นกลุ่มตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์โรคฮีโมโกลบินบาร์ทส์ไฮดรอปส์ฟีทาลิสจึงมีแนวโน้มการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอได้ค่อนข้างสูงกว่ากลุ่มตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์ที่ทารกในครรภ์ไม่ได้เป็นโรคฮีโมโกลบินบาร์ทส์ไฮดรอปส์ฟีทาลิส แม้จะไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามเชื่อว่าปริมาณดีเอ็นเอน่าจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเริ่มมีภาวะแทรกซ้อนจากการตั้งครรภ์หรือเมื่อทารกครรภ์เริ่มมีอาการบวมขึ้นมากขึ้น

ในส่วนของการศึกษาฮีโมโกลบินผิดปกตินั้น ได้ทำการรวบรวมตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ เลือกศึกษาในรายละเอียดพื้นฐานการเกิดโรคในระดับโมเลกุล ผลทางโลหิตวิทยา การเกิดปฏิสัมพันธ์กับยีนอื่นๆ ตลอดจนแซฟโพลไทป์ จำนวน 5 ชนิด ประกอบด้วย Hb Q-Thailand [$\alpha^{74}(\text{EF3})\text{Asp}\rightarrow\text{His}$] ตรวจพบร่วมกับความผิดปกติของฮีโมโกลบินอื่นๆ สามารถจำแนกออกได้เป็น 4 กลุ่มที่มีปริมาณ Hb Q-Thailand แตกต่างกันจากจำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 56 ราย เมื่อพบร่วมกับพาหะฮีโมโกลบินอื่นจะสามารถตรวจพบได้ทั้ง Hb E ($\alpha^A_2\beta^E_2$), Hb Q-Thailand ($\alpha^{\text{QT}}_2\beta^A_2$) และ Hb QE ($\alpha^{\text{QT}}_2\beta^E_2$) ได้โดยวิธี HPLC และ capillary electrophoresis สำหรับกลุ่มที่พบร่วมกับพาหะ

E47246

ปีตาธาลัสซีเมีย จะตรวจพบ Hb Q-Thailand ($\alpha^{\text{QT}}_2\beta^{\text{A}}_2$), Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) และ Hb QA₂ ($\alpha^{\text{QT}}_2\delta_2$) ได้ด้วยวิธี capillary electrophoresis ผลการตรวจแอสเฟโพลไทป์ของกลุ่มยีนอัลฟาโกลบินพบว่าทุกรายมีแอสเฟโพลไทป์ชนิดเดียวกัน คือ (+ - S + 0 - -) แสดงถึงการมีแหล่งกำเนิดเดียวกันทั้งหมด

ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดที่สอง คือ Hb Hope [β 136(H14)Gly→Asp] ศึกษาผู้ป่วย 42 รายสามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่มได้เช่นเดียวกัน โดยมีปริมาณฮีโมโกลบินผิดปกติโดยเฉลี่ยแตกต่างกัน โดยเมื่อมีอัลฟาธาลัสซีเมียร่วมด้วยจะพบปริมาณที่ลดลง ผู้ที่เป็นพาหะ Hb Hope ร่วมกับ Hb H-disease จะตรวจพบ Hb Bart's ได้เพียงเล็กน้อย และอาจไม่พบ Hb H เลยก็ได้ ในกลุ่มที่เป็น Hb Hope/ β^0 -thalassemia ยังสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินเอสสองที่มีค่าสูงกว่าปกติได้ จึงไม่รบกวนต่อการวินิจฉัยพาหะปีตาธาลัสซีเมียแต่อย่างใด ผลการตรวจแอสเฟโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินพบว่าทุกรายอยู่บนแอสเฟโพลไทป์ชนิดเดียวกัน คือ (+ - - - - + +) แสดงถึงการมีแหล่งกำเนิดเดียวกันทั้งหมด

ชนิดที่สามเป็นการศึกษาภาวะ secondary erythrocytosis ในหญิงตั้งครรภ์ พบว่าเกิดจาก Hb Tak [β 147 Term→Thr] ร่วมกับ ($\delta\beta$)⁰-thalassemia พบปริมาณ Hb Tak 61.2 % และ Hb F 30.0 % เปรียบเทียบกับผู้ที่เป็นฮีโมไซกัส Hb Tak ร่วมกับ α^+ -thalassemia ที่พบว่ามีผลทางโลหิตวิทยาที่คล้ายกัน คือ พบภาวะ secondary erythrocytosis ผู้ป่วยมีความเข้มข้นฮีโมโกลบินและปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูงมากจากการมีภาวะเร่งสร้างเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็ก แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของ Hb Tak ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่มี high oxygen affinity

ชนิดที่สี่ คือ Hb Korle-Bu [β 73(E 17)Asp→Asn] ที่พบในหญิงตั้งครรภ์โดยพบเป็นพาหะ Hb Korle-Bu ร่วมกับพาหะฮีโมโกลบินอีและ α -thalassemia 1 ซึ่งมีภาวะซิดและเม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็ก ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดฮีโมโกลบิน พบฮีโมโกลบินผิดปกติที่ตำแหน่ง D-window แบบฮีโมไซกัสด้วยวิธี HPLC แต่พบเป็นฮีโมโกลบินอีร่วมกับฮีโมโกลบินผิดปกติบน capillary electrophoresis เมื่อตรวจวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอจึงพบว่าหญิงตั้งครรภ์เป็นพาหะ Hb Korle-Bu จากการศึกษาในครอบครัวผู้ป่วยพบว่าบิดาและน้องสาวเป็นพาหะ Hb Korle-Bu ร่วมกับ α -thalassemia 1 และมารดาเป็นพาหะฮีโมโกลบินอีร่วมกับ Hb Constant Spring จึงสามารถศึกษาเปรียบเทียบลักษณะความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ได้อย่างชัดเจนในครอบครัวผู้ป่วย

ชนิดสุดท้ายเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดใหม่ คือ Hb Phimai [β 72(E16)Ser→Thr] ที่ตรวจพบในตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์จากอำเภอยะลา จังหวัดนราธิวาส โดยพบร่วมกับ Hb Constant Spring ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดนี้มีลักษณะการแยกคล้ายกับ Hb Hope แต่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบินที่โคดอน 72 (AGT→ACT) ทำให้ serine ถูกแทนที่ด้วย threonine ในตำแหน่งที่มี

E47246

ความสำคัญต่อการเกิด heme pocket พบว่ามีภาวะเร่งสร้างเม็ดเลือดแดงเล็กน้อย ในผู้ที่ป่วยเป็นพาหะของ Hb Phimai เพื่อให้สามารถตรวจวินิจฉัยแยกออกจาก Hb Hope ที่พบในคนไทยด้วย จึงได้พัฒนาวิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ขึ้น แนวทางที่ใช้และผลการศึกษาที่ได้จากฮีโมโกลบินผิดปกติทั้ง 5 ชนิด สามารถสรุปเป็นไดอะแกรมอย่างง่ายเพื่อการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาและวินิจฉัยฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นได้ต่อไป

Sanita Singsanan. 2011. **Maternal Plasma DNA in Pregnancy with Hemoglobin Bart's Hydrops Fetalis and Characterization of Abnormal Hemoglobins Found in Thailand.** Doctor of Philosophy Thesis in Biomedical Sciences, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Supan Fucharoen,
Assoc. Prof. Goonnapa Fucharoen

ABSTRACT

E 47246

To determine the possibility of maternal plasma DNA assay in non-invasive prediction of pregnancy with Hb Bart's hydrops fetalis, a real-time quantitative PCR was developed to detect the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene in maternal plasma DNA. Analysis was performed using DNA extracted from 400 μ l plasma samples. Study was done on 76 pregnant women including from 21 pregnancies with Hb Bart's hydrop fetalis and 55 pregnancies with un-affected fetuses during 12-32 and 10-26 weeks of gestation, respectively. Data was presented as the C_T (cycle threshold) value which is correlated with the amount of DNA in plasma sample i.e. lower C_T indicates higher amount of DNA. It was found that the ranges of C_T values were 28.85-36.07 and 30.45-38.32 for pregnancies with and without Hb Bart's hydrop fetalis, respectively. Although not completely difference, pregnancies with affected fetus trend to have higher amount of plasma DNA. It is expected that further elevation of maternal plasma DNA should be noted clearly at the time when maternal complication or hydropic change occurs.

For the study on hemoglobin (Hb) variants, samples with several abnormal Hbs encountered at the Centre for Research & Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University were accumulated. Complete molecular and hematological characterizations were selectively performed on 5 Hb variants. **Hb Q-Thailand (Hb QT) [$\alpha 74(\text{EF3})\text{Asp} \rightarrow \text{His}$]**, found in association with various hemoglobinopathies in 56 subjects were classified into 4 groups with variable levels of abnormal Hb. In double heterozygous for Hb QT and Hb E, in addition to the Hb E ($\alpha^A_2\beta^E_2$) and Hb QT ($\alpha^{\text{QT}}_2\beta^A_2$) fractions, a small peak with slower retention time was clearly observed,

E47246

most likely the Hb QE resulted from the ($\alpha^{\text{QT}}_2\beta^{\text{E}}_2$) tetrameric assembly. In the association of Hb QT with β -thalassemia, the levels of Hb QT, Hb A2 ($\alpha^{\text{A}}_2\delta_2$), and Hb QA2 ($\alpha^{\text{QT}}_2\delta_2$) were 13.8-16.6 %, 4.9-5.3 % and 1.0-2.6%, respectively. Haplotype analysis demonstrated that all these Thai α^{QT} genes were associated with a single haplotype; (+ - S + 0 - -), indicating likely a single origin of this variant in Thai population.

The second variant studied was **Hb Hope** [$\beta 136(\text{H14})\text{Gly}\rightarrow\text{Asp}$] which was also found in association various hemoglobinopathies in 42 subjects and could be grouped into 4 categories. Groups 1 and 2 included heterozygous Hb Hope with and without α -thalassemia including α -thalassemia 2 ($-\alpha^{3.7}$), Hb Constant Spring, α -thalassemia 1 and Hb H disease. The average levels of Hb Hope were 42.2 %, 48.5 %, 43.1 %, 14.3-29.6 % and 18.7-21.6 %, respectively. Minute amounts of Hb Bart's but not Hb H was observed in a patient with Hb Hope/Hb H-disease. Subjects with compound Hb Hope/ β^0 -thalassemia were associated with the levels of 73.1 – 90.1 % Hb Hope and increased Hb A₂, diagnosis of β -thalassemia carrier was not altered. Haplotype analysis demonstrated that all these Thai β^{Hope} genes were associated with the same haplotype, (+ - - - + +), indicating likely a single origin of this variant in Thai population.

The third Hb variant studied was from an adult subject with secondary erythrocytosis phenotype. Molecular and hematological analysis revealed a previously un-described condition of **Hb Tak** [$\beta 147 \text{Term}\rightarrow\text{Thr}$] and ($\delta\beta$)⁰-thalassemia. Hb analyses showed Hb Tak 61.2 % and Hb F 30.0 % without Hb A. Hematological parameters were compared with those of a homozygous Hb Tak with α^+ -thalassemia found in another subject. Both of them had mark erythrocytosis and microcytosis with increased Hb and Hct values due to the increased oxygen affinity of the Hb Tak molecule.

Hb Korle-Bu [$\beta 73(\text{E17})\text{Asp}\rightarrow\text{Asn}$], was identified as a compound heterozygous state for Hb Korle-Bu/Hb E and α^0 -thalassemia in a pregnant Thai woman with mild hypochromic microcytic anemia. HPLC analysis revealed homozygosity for an unknown variant at the D window but capillary electrophoresis identified that the proband was in fact a compound heterozygous Hb E and another β

E47246

chain variant. DNA analysis demonstrated that she carried the Hb Korle-Bu mutation *in trans* to the Hb E and an α -thalassemia-1 ($--^{SEA}$). Family studies identified that her father and sister were double heterozygotes for Hb Korle-Bu and α -thal-1, whereas her mother was a double heterozygote for Hb E/Hb Constant Spring. The genotype-phenotype interaction were compared.

The last Hb variant identified was the **Hb Phimai** [$\beta 72(\text{E16})\text{Ser} \rightarrow \text{Thr}$], a novel Hb variant detected in a pregnant woman living in Phimai, Nakon Ratchasrima province who also carried Hb Constant Spring. Initial Hb analysis revealed an unknown variant quite similar to the Hb Hope [$\beta 136(\text{H4})\text{Gly} \rightarrow \text{Asp}$] but DNA analysis of the β^{Hope} mutation yielded a negative result. Further DNA sequence analysis demonstrated that she was heterozygous for the $\text{AGT} \rightarrow \text{ACT}$ transversion at codon 72 of β -globin gene, leading to a substitution of Thr for Ser at this position which involves in the formation of heme pocket of the Hb molecule. It is speculated that this Hb Phimai is unstable and might have high oxygen affinity. Hematological and Hb characteristics of the proband with double heterozygosity for Hb Phimai and Hb Constant Spring were compared with heterozygous Hb Phimai found in her sister who had secondary erythrocytosis phenotype. β -globin gene haplotype linked to this novel variant and a simple DNA assay for differential diagnosis of Hb Phimai and Hb Hope are also presented.

The characterization methods used and the data obtained in this study should prove useful for laboratory diagnostics and the study of hemoglobinopathies in Thailand as well as facilitating the prevention and control program.

**Goodness portion of the present thesis is dedicated
to my parents, my thesis advisory committee
and entire teaching staffs**

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude to Associate Professor Goonnapa Fucharoen, my advisor and Associate Professor Dr. Supan Fucharoen, my co-advisor, who have willingly given to me motivation, encouragement, guidance and cooperative interpretation of the results which have inspired me to carry through my study successfully.

I am also very grateful to the members of the supervisor committee, Associate Professor Dr. Kanokwan Sanchaisuriya and Associate Professor Dr. Chanvit Leelayuwat as well as the chairman of examination committee ; Associate Professor Dr. Kitti Torcharus for their helpful comments, guidance and suggestion about the work of this thesis.

I would like to give my special thanks to my family and all AMS graduate students for their friendliness and cheerfulness.

Most of all, I am deeply indebted to all subjects who have donated blood specimens for this investigation.

I would also like to thank the Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, the Graduate School of Khon Kaen University and the CHE-PhD Scholarship program of the Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand for providing scholarship of my study.

This work was supported in part by grants from Khon Kaen University and the Graduate School, Khon Kaen University.

Sanita Singsanan

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iv
DEDICATION	vii
ACKNOWLEDGEMENT	viii
TABLE OF CONTENTS	ix
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS	xv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1. Rationale and Background	1
2. Problem and Research Rationale	5
3. Objectives of the study	7
4. Anticipated outcomes	8
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS	9
1. Thalassemia	9
2. Circulating DNA in maternal peripheral blood	15
3. Real-time PCR	17
4. Abnormal hemoglobins	20
5. Hemoglobin analysis	31
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY	35
1. Subjects and specimens	35
2. Development of multiplex ASPCR for detection of Hb Hope and Hb Phimai	43
3. Haplotype analysis	43
4. Oligonucleotide primers	45

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
CHAPTER IV RESULTS	55
1. The amounts of circulating DNA in maternal plasma samples	55
2. Identification of known Hb variants	60
3. Identification of a novel β -globin chain variant, the Hb Phimai	81
CHAPTER V DISCUSSION	87
1. Maternal plasma DNA and Hb Bart's hydrops fetalis	87
2. Characterization of abnormal Hbs	88
3. Identification of a novel β -globin chain variant, the Hb Phimai	97
CHAPTER VI CONCLUSION	99
REFERENCES	102
APPENDICES	121
APPENDIX A Research presentations	122
APPENDIX B Research publications	132
VITAE	155

LIST OF TABLES

	Page
Table 1	Diseases resulting from structural abnormal hemoglobin 23
Table 2	Abnormal hemoglobins found in Thailand 32
Table 3	The different migration zones of hemoglobin variants (called Z1 to Z15) 34
Table 4	Sequences of oligonucleotide primers and their calculated melting temperatures 45
Table 5	Sequences of oligonucleotide primers used for analysis of α -globin gene haplotypes 46
Table 6	Sequences of oligonucleotide primers used for analysis of β -globin gene haplotypes 47
Table 7	Summary of the detection of GAPDH specific sequence by TaqMan real time PCR from maternal plasma specimens of 55 pregnancies with non-Hb Bart's hydrop fetalis fetuses 56
Table 8	Summary of the detection of GAPDH specific sequence by TaqMan real time PCR from maternal plasma specimens of 21 pregnancies with Hb Bart's hydrop fetalis fetuses 58
Table 9	Number of subjects with known Hb variants encountered at the thalassemia service unit, CMDL, Khon Kaen University during Jan 2003- May 2010 61
Table 10	Hematological parameters and globin genotypes of the Hb Q-Thailand related disorders. Percentage of Hbs A ₂ /E, F, QT and QE were based on HPLC analyzer 64
Table 11	α -Globin gene haplotypes associated with $\alpha^{\text{Q-Thailand}}$, α^+ -thalassemia (4.2 kb deletion) and normal α -globin genes in Thai population 66
Table 12	Hematological parameters and globin genotypes of the Hb Hope related disorders 69

LIST OF TABLES (Cont.)

	Page
Table 13 Hematological parameters and globin genotypes of the Hb Tak Disorders	73
Table 14 Hematological Data and Genotypes of the Proband, Her Family and the Previous Case	78
Table 15 Hematological data and genotypes of the proband, her husband and her sister. M; male , F; female, α^{CS} ; Hb Constant Spring gene	83

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	Mutations causing α^0 -thalassemia	10
Figure 2	Mutations causing α^+ -thalassemia	10
Figure 3	Normal fetal erythropoiesis	12
Figure 4	Retention times of Hb variants found in Thailand using cation exchange HPLC (VARIANT TM with the β -thalassemia Short Program System; Bio-Rad Laboratories)	33
Figure 5	A simultaneous multiplex allele-specific PCR for differentiation of Hb S, Hb D-Punjab and Hb Tak	48
Figure 6	An allele specific PCR for detection of Hb Korle-Bu	49
Figure 7	A simultaneous multiplex allele-specific PCR for differentiation of the $-\alpha^{4.2}$ and the $\alpha^{Q\text{-Thailand}}$ mutation in <i>cis</i>	50
Figure 8	An allele specific PCR for detection of Hb Hope	51
Figure 9	A simultaneous multiplex allele-specific PCR for differentiation of Hb Hope and Hb Phimai	52
Figure 10	The α -globin gene cluster with the positions of six polymorphic sites used in this study	53
Figure 11	The β -globin gene cluster with the positions of seven polymorphic sites used in the construction of β -globin gene haplotype	54
Figure 12	The TaqMan real time PCR for detection of GAPDH gene	59
Figure 13	Scatter diagram indicating values of threshold cycle (C_T) of total DNA in maternal plasma from pregnancies with and without Hb Bart's hydrops fetalis fetuses	59

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 14 Representative Hb analysis demonstrating Hb Q-Thailand variant using automated HPLC (A, B and C) and capillary electrophoresis system (D and E). A and D, Hb Q-Thailand heterozygote. B and E, double heterozygote for Hb Q-Thailand and Hb E. C, double Hb Q-Thailand/ β^0 -thalassemia. Hb A, Hb Q-Thailand, Hb QE and Hb QA ₂ are indicated by arrows	65
Figure 15 Representative Hb analysis demonstrating Hb Hope variant using automated HPLC (A) and capillary electrophoresis (B, C and D)	70
Figure 16 A representative agarose gel electrophoresis of the multiplex allele specific PCR analysis	74
Figure 17 Representative Hb analysis demonstrating Hb Tak variant using LPLC in which it co-migrates with Hb A ₂ and capillary electrophoresis in which it co-separated with Hb F	75
Figure 18 Hemoglobin analyses of the proband and her father using automated HPLC and capillary zone electrophoresis (CZE)	79
Figure 19 An allele specific PCR for detection of Hb Korle-Bu mutation	80
Figure 20 Hb analyses of the proband (A & C) and her sister (B & D) using automated HPLC (A & B) and capillary zone electrophoresis (C & D)	84
Figure 21 Direct DNA sequencing of β -globin gene demonstrating the heterozygosity for the G \rightarrow C transversion at the codon 72 identified in the proband	85
Figure 22 A multiplex allele specific PCR for identification of Hb Phimai and Hb Hope mutations	86
Figure 23 A schematic diagram for characterization of Hb Hope, Hb Phimai, Hb Korle-Bu, Hb Tak and Hb Q-Thailand	101

LIST OF ABBREVIATIONS

α	Alpha
A	Adenine
ASPCR	Allele specific polymerase chain reaction
AF	Amniotic fluid
β	Beta
bp	Base pair
C	Cytocine
CVS	Chorionic villus sampling
$^{\circ}\text{C}$	Degree Celsius
δ	Delta
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ϵ	Epsilon
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
FB	Fetal blood
γ	Gamma
G	Guanine
g	Gram
Hb	Hemoglobin
HVR	Hypervariable region
h	Hour
IZHVR	Interzeta hypervariable region
Kb	Kilobase pair
KCl	Potassium chloride
MgCl_2	Magnesium chloride
μg	Microgram
μl	Microliter
mRNA	Messenger ribonucleic acid
M	Molar

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

MgCl ₂	Magnesium chloride
mg	Milligram
min	Minute
mM	Millimolar
ml	Milliliter
NaCl	Sodium chloride
PCR	Polymerase chain reaction
RFLPs	Restriction fragment length polymorphisms
$\psi\alpha$	Pseudoalpha
$\psi\zeta$	Pseudozeta
%	Percent
rpm	Round per minute
SDS	Sodium dodecyl sulphate
Sec	Second (s)
T	Thymine
TAE	Tris acetate EDTA
TBE	Tris borate EDTA
T _m	Melting temperature
Tris	Tris-(hydroxymethyl) amino methane
θ	Theta
UV	Ultraviolet
ζ	Zeta