Laboratory Diagnosis of Thalassemia

dr. mehrdad vanaki

consultant of QA & QMS in medical lab

5 ABAN 1390

سخنی زیبا از آنتوان سنت اگزوپری

من به هیچ وجه خدا را لمس نکردم ولی خدائی که قابل لمس باشد که دیگر خدا نیست .

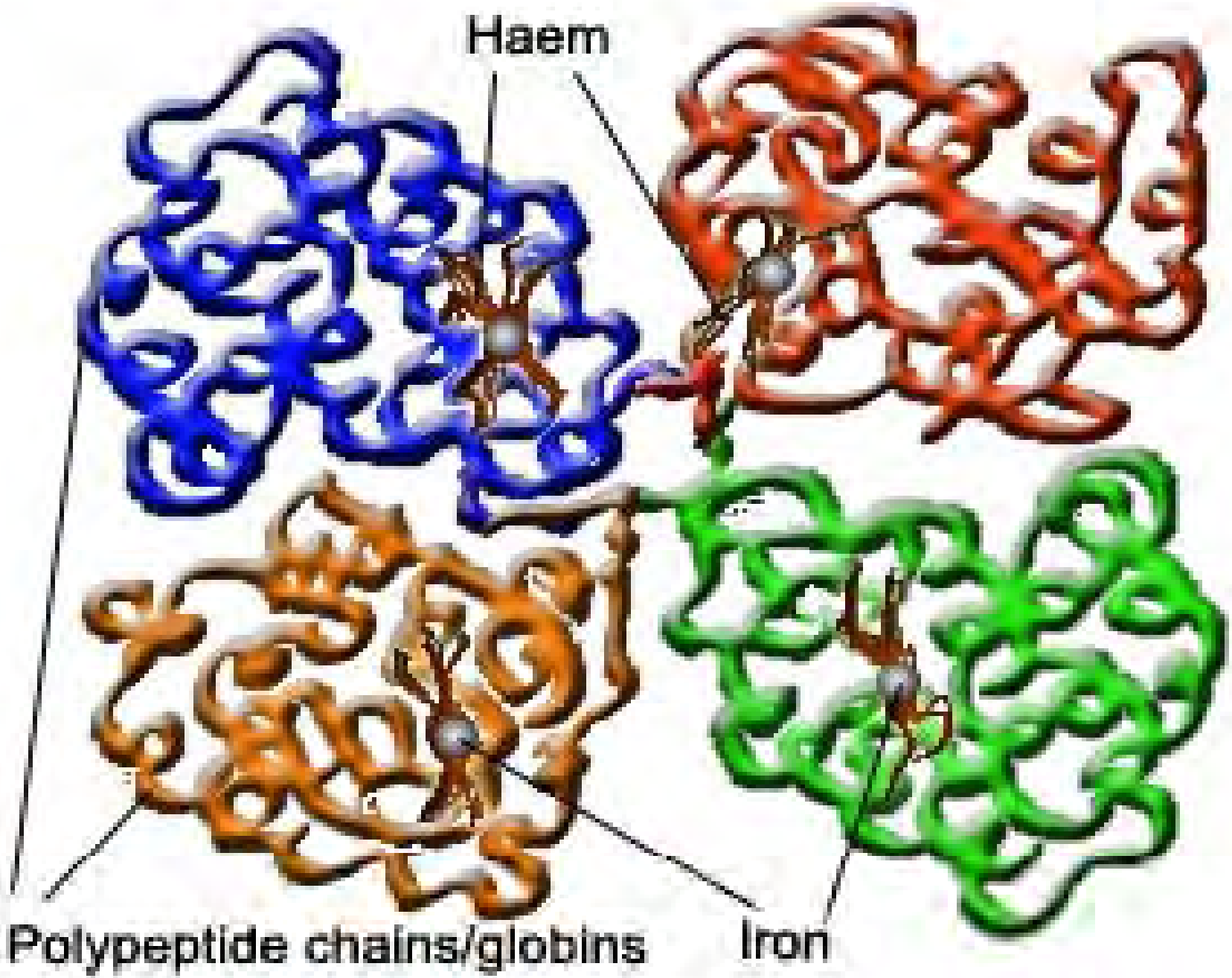
اگر هر دعائی را هم اجابت کند همینطور .

همان جا بود که برای نخستین بار حدس زدم که عظمت دعا بیش از هر چیز در این امر نهفته است که پاسخی به آن داده نمی شود و زشتی سوداگری را به این مبادله راهی نیست .

این را هم دریافتم که **آموختن دعا اموختن سکوت است و عشق فقط از جائی شروع می شود که دیگر هیچ انتظاری برای گرفتن هیچ چیز وجود نداشته باشد .**

عشق تمرین نیایش است و نیایش تمرین سکوت

thalassemia

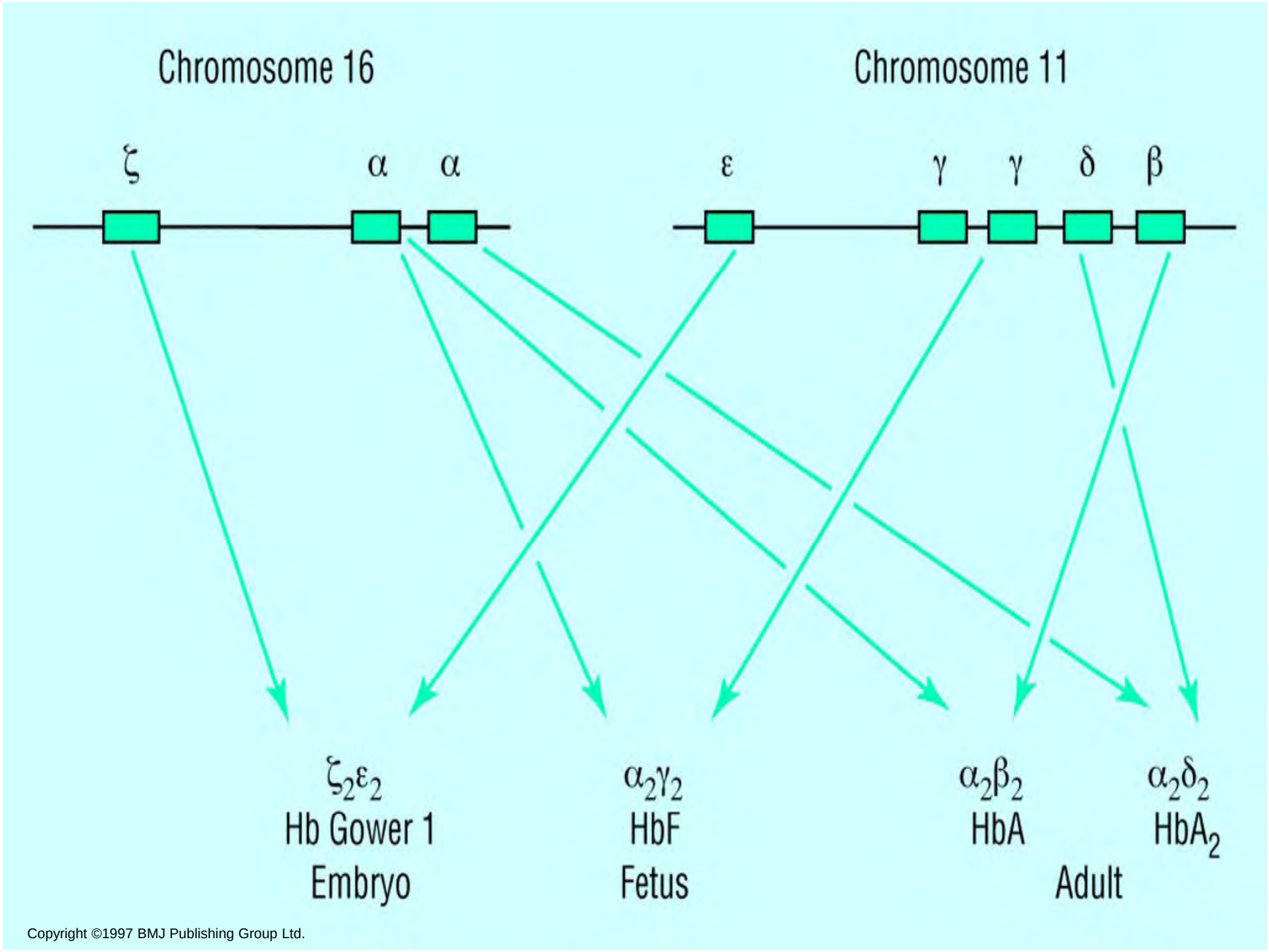

Haem
Polypeptide chains/globins
Iron

Genetics.

- In the first 8 weeks of embryonic life the predominant forms of hemoglobin are:
  - Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$).
  - Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$).
  - Hb Portland 1 ($\zeta_2\gamma_2$).
- **By the 12th week embryonic hemoglobin is replaced by Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) which represents 70 – 100% of hemoglobin in fetal life.**

Genetics (2).

- Adult hemoglobin Hb A ($\alpha_2\beta_2$) detectable from 16/40, replaces Hb F as predominant hemoglobin by 6/12 after birth, up to 30% of Hb in fetal life.
- Hemoglobin HbA2 ($\alpha_2\Delta_2$) is present in utero but only very minor in normal adults.
- **In normal adults 96 – 98% of hemoglobin is HbA, Hb A2 (2 – 3%) and HbF (<1%) constitute a minor component of the total hemoglobin**.



Copyright ©1997 BMJ Publishing Group Ltd.

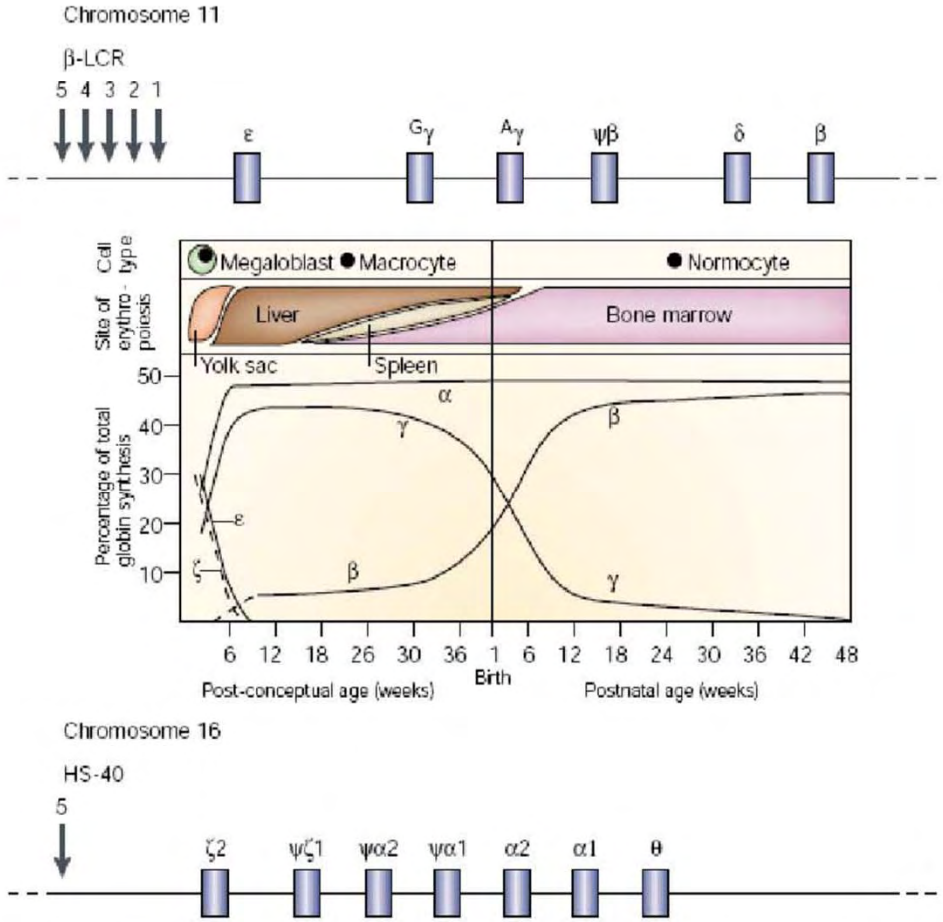
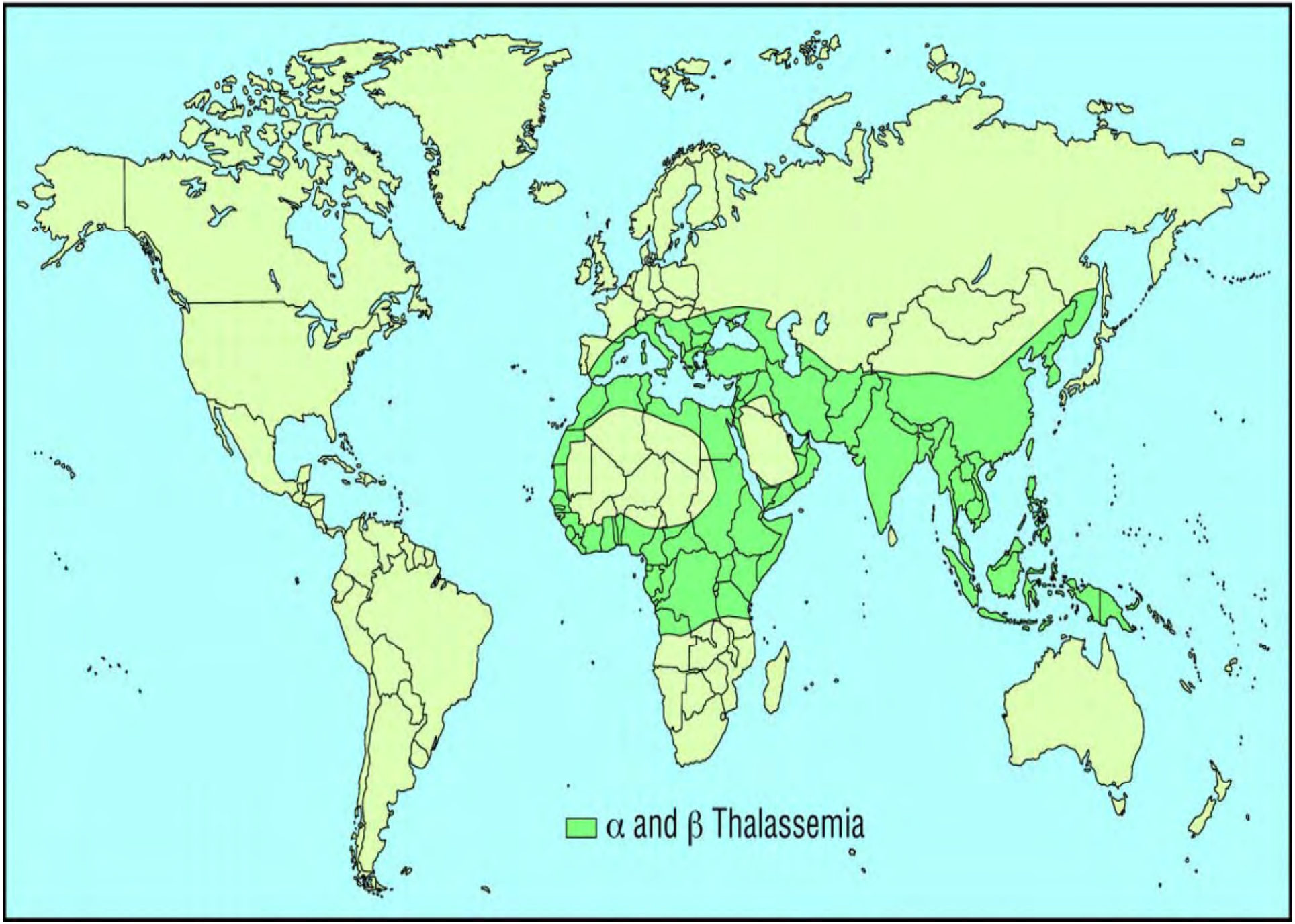


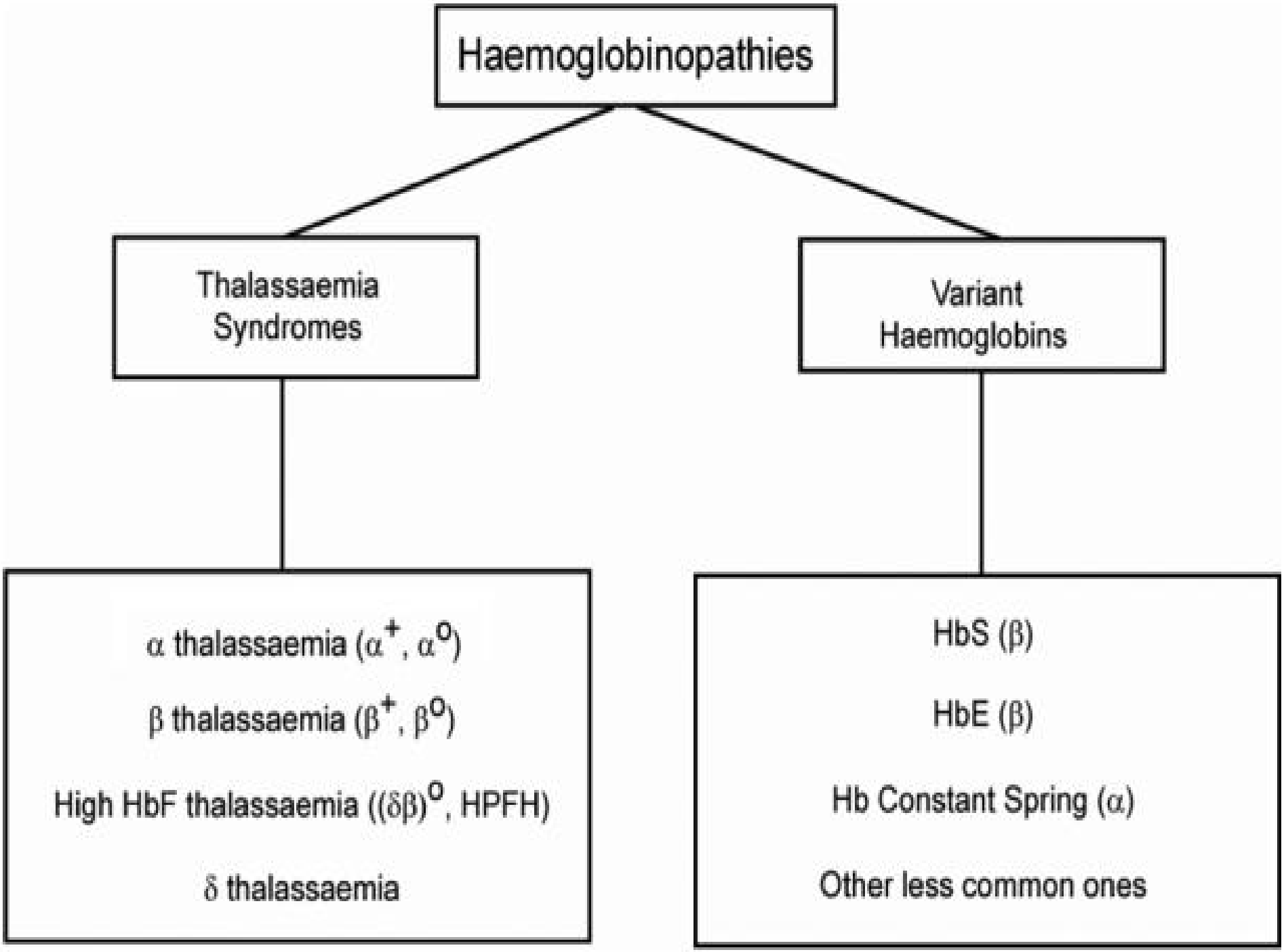
Figure 1 | **The α-globin gene cluster on chromosome 16 and the β-globin gene cluster on chromosome 11.** Vertical arrows indicate the location of DNaseI hypersensitive sites that are thought to be involved in globin gene regulation. The products of the $^{G}\gamma$- and $^{A}\gamma$-genes are γ-chains with either glycine ($^{G}\gamma$) or alanine ($^{A}\gamma$) at position 136. The insert shows the sequential activation of the embryonic, fetal and adult globins. A megaloblast is a large red-cell precursor, a macrocyte is a large red cell and a normocyte is a normal-sized red cell. (LCR, locus control region.)

Weatherall, DJ, Phenotype-Genotype Relationships in Monogeneic Disease: Lessons From the Thalassaemias, Nat. Rev. Gen. 2:245, 2001

Table 2. Types of haemoglobins and globin chains present in normal adult blood and in haemoglobinopathies

Haemoglobin (Hb)	Globin chains	Percentage found in normal adult blood	Clinical state
HbA	$\alpha^2\beta^2$	~97%	Normal
HbA2	α2Δ2	2–3%	Normal
HbF	α2γ2	<1%	Normal
HbH	β^4	0%	α-thalassaemia
HbBarts	γ^4	0%	α-thalassaemia
	α chain aggregates – insoluble	0%	β-thalassaemia
HbS	$\alpha^2\beta s^2$	0%	Sickle cell disease


α and β Thalassemia


Haemoglobinopathies
Thalassaemia Syndromes
Variant Haemoglobins
α thalassaemia (α+, α0)
β thalassaemia (β+, β0)
High HbF thalassaemia ((δβ)0, HPFH)
δ thalassaemia
HbS (β)
HbE (β)
Hb Constant Spring (α)
Other less common ones

What is thalassemia?

- Genetic blood disorder resulting in a mutation or deletion of the genes that control globin production.
- Normal hemoglobin is composed of 2 alpha and 2 beta globins
- Mutations in a given globin gene can cause a decrease in production of that globin, resulting in deficiency
- aggregates become oxidized → damage the cell membrane, leading either to hemolysis, ineffective erythropoiesis, or both.
- 2 types of thalassemia: alpha and beta.

Alpha Thalassemia

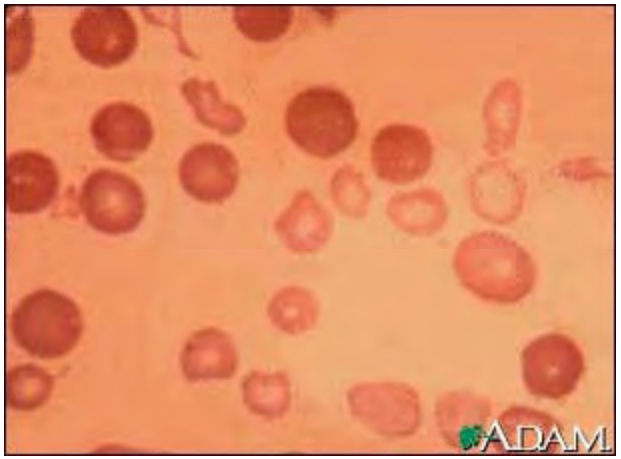
- mutation of 1 or more of the 4 alpha globin genes on chromosome 16
- severity of disease depends on number of genes affected
- results in an *excess of beta globins*

Silent Carriers (heterozygotes +/-)

- **3 functional alpha globin genes**
- No symptoms, but thalassemia could potentially appear in offspring

Alpha Thalassemia Trait

- **2 functional globin genes**
- results in smaller blood cells that are lighter in colour
- no serious symptoms, except slight anemia



Hemoglobin H Disease

- **1 functional globin gene**

- results in very lightly coloured red blood cells and possible **severe anemia**
- hemoglobin H is susceptible to oxidation, therefore oxidant drugs and foods are avoided
- treated with folate to aid blood cell production

Alpha Thalassemia Major

- no functional globin genes
- death before birth (embryonic lethality)

Beta Thalassemia

- **mutations on chromosome 11**
- hundreds of mutations possible in the beta globin gene, therefore beta thalassemia is more diverse
- results in *excess of alpha globins*

Beta Thalassemia Trait

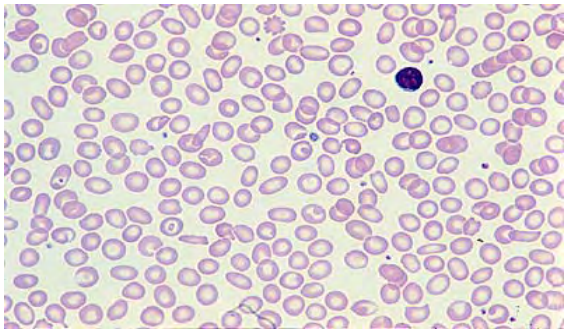
- **slight lack of beta globin**
- smaller red blood cells that are lighter in colour due to lack of hemoglobin
- no major symptoms except slight anemia

Beta Thalassemia Intermedia

- **lack of beta globin is more significant**
- bony deformities due to bone marrow trying to make more blood cells to replace defective ones
- causes late development, exercise intolerance, and high levels of iron in blood due to reabsorption in the GI tract
- if unable to maintain hemoglobin levels between 6 gm/dl – 7 gm/dl, transfusion or splenectomy is recommended

Beta Thalassemia Major

- **complete absence of beta globin**
- enlarged spleen, lightly coloured blood cells
- severe anemia
- chronic transfusions required, in conjunction with chelation therapy to reduce iron (desferoxamine)



Variant Hemoglobin Classification.

- The variant haemoglobins are disorders of globin chain synthesis.
- Normal αβ ratio so most have normal MCV and MCH.
- There are over 1000 mutations associated with the haemoglobinopathies most of which will produce variants.

Variant Hemoglobin Classification.

- Initially recognized forms were classified alphabetically (Hb C, D, E), subsequent naming after the location of discovery.
- **The most common forms in Australia include Hb S, Hb E, Hb Constant Spring and Hb C.**
- Usually caused by point mutations.

Laboratory Diagnosis of Thalassemia

dr. mehrdad vanaki

consultant of QA & QMS in medical lab

5 ABAN 1390

Laboratory Diagnosis of Thalassemia

- Need to start with patient's individual history and family history. Ethnic background important.
- **Perform physical examination:**
  - Pallor indicating anemia.
  - Jaundice indicating hemolysis.
  - Splenomegaly due to pooling of abnormal cells.
  - Skeletal deformity, especially in beta thalassemia major.

CBC with Differential

- See **decrease in hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), and mean corpuscular hemoglobin (MCH). See normal to slightly decreased Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC).**
- Will see **microcytic, hypochromic pattern.**
- Have **normal or elevated RBC count with a normal red cell volume distribution (RDW).**
- **Decrease in MCV very noticeable when compared to decrease in Hb and Hct.**

CBC with Differential

- **Elevated RBC count with markedly decreased MCV differentiates thalassemia from iron deficiency anemia**.
- On differential, see microcytic, hypochromic RBCs (except in carrier states). See mild to moderate poikilocytosis.
- In more severe cases, see marked number of target cells and elliptocytes. Will see polychromasia, basophilic stippling, and NRBCs.

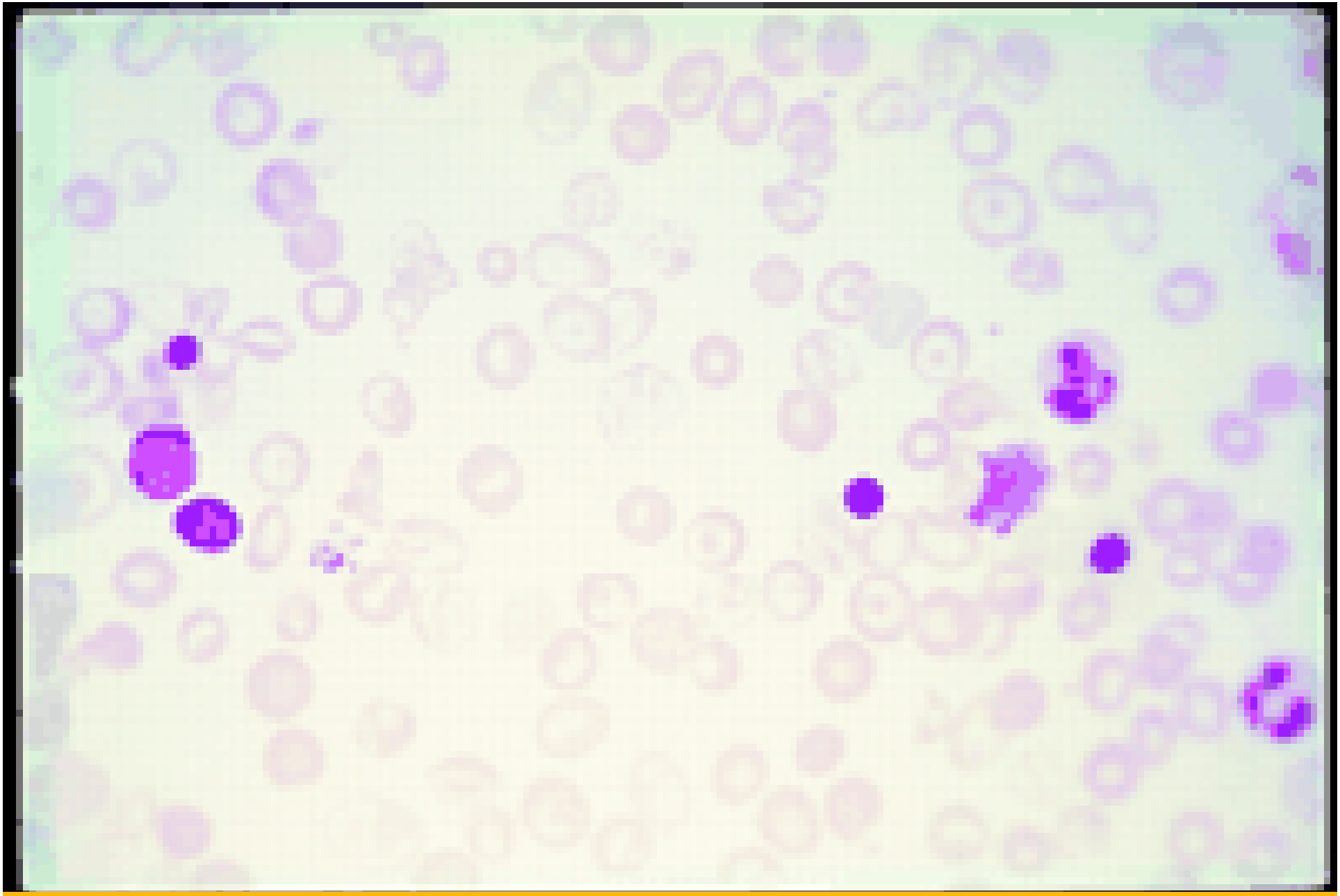
PBS in thalassemia

- Thalassaemias are typically microcytic and hypochromic anemia's.
- **Thalassemia causes a uniform microcytosis without increase in RDW (cf iron deficiency).**

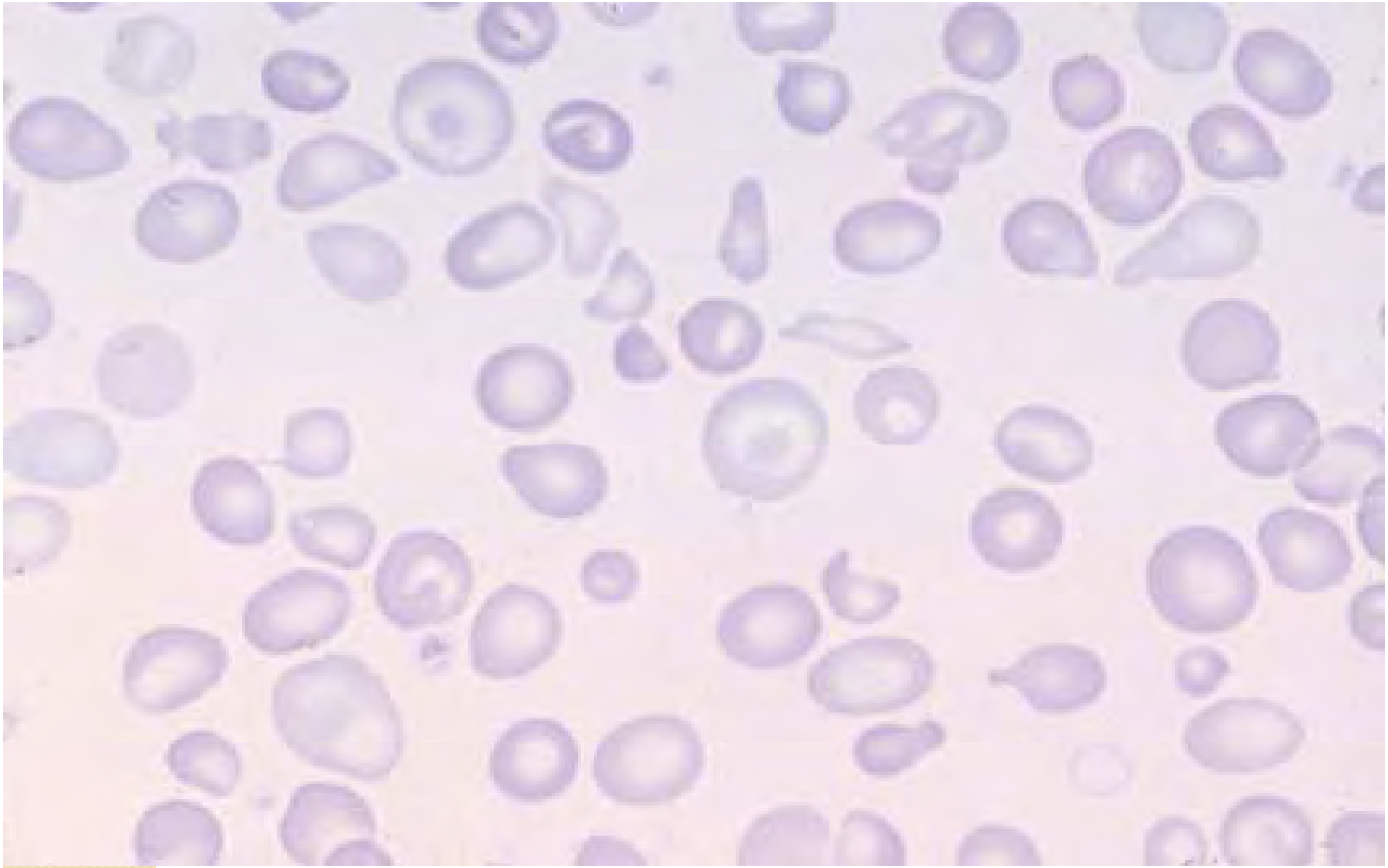
- **Hb H and Δβ thal however can cause an increased RDW.**

PBS

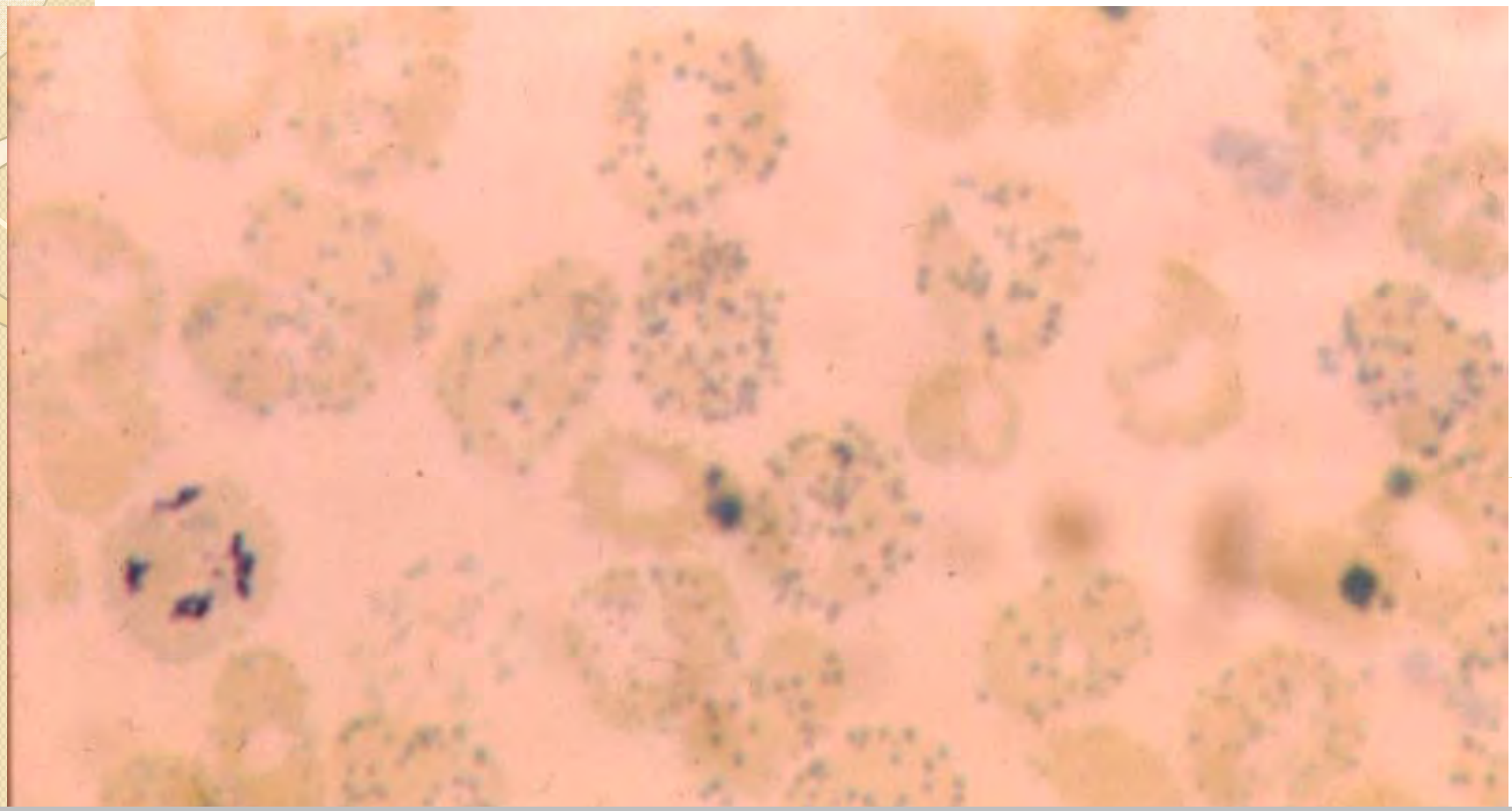
- **RBC often increased in thal but decreased in iron deficiency**
- **Hb typically normal in thal minor but decreased in intermedia and major syndromes.**
- MCV is the most valuable parameter in predicting thal.



Alpha Thalassaemia Major - target cells, microcytosis, hypochromia, NRBCs, poikilocytes, polychromasia, basophilic stipling, tear drops.

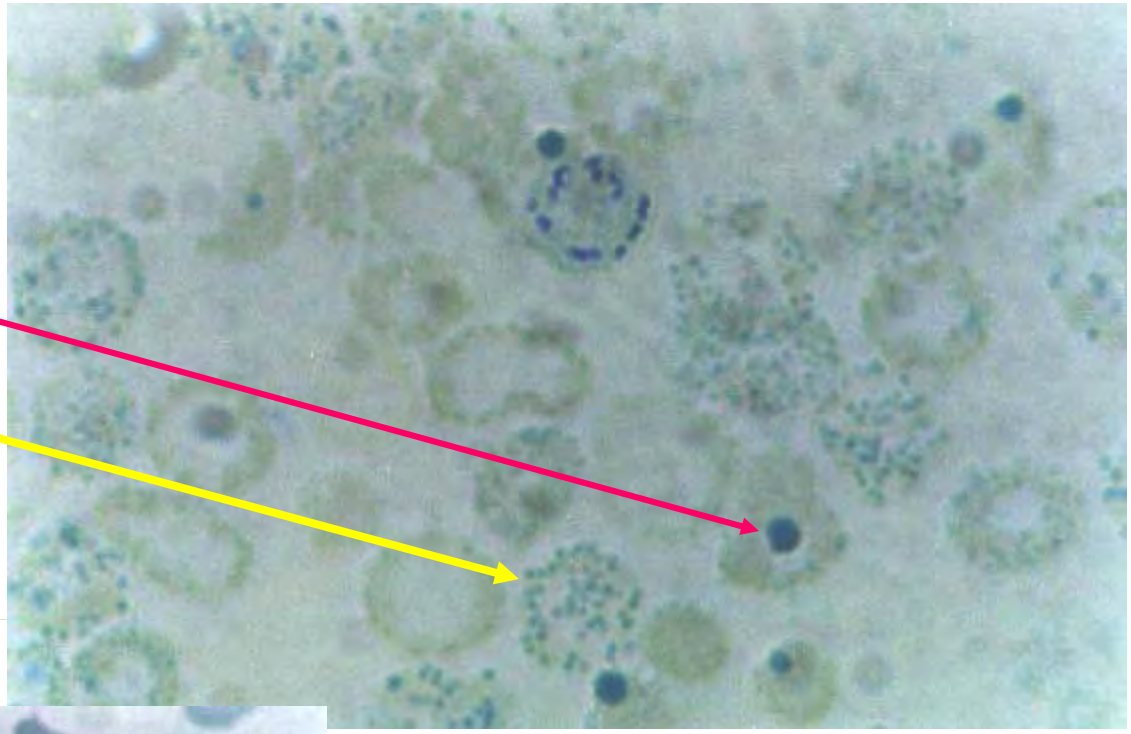


βThal Major **anisocytosis, poikilocytosis, targets, tear drops, fragments, hypochromaia, basophilic stippling.**



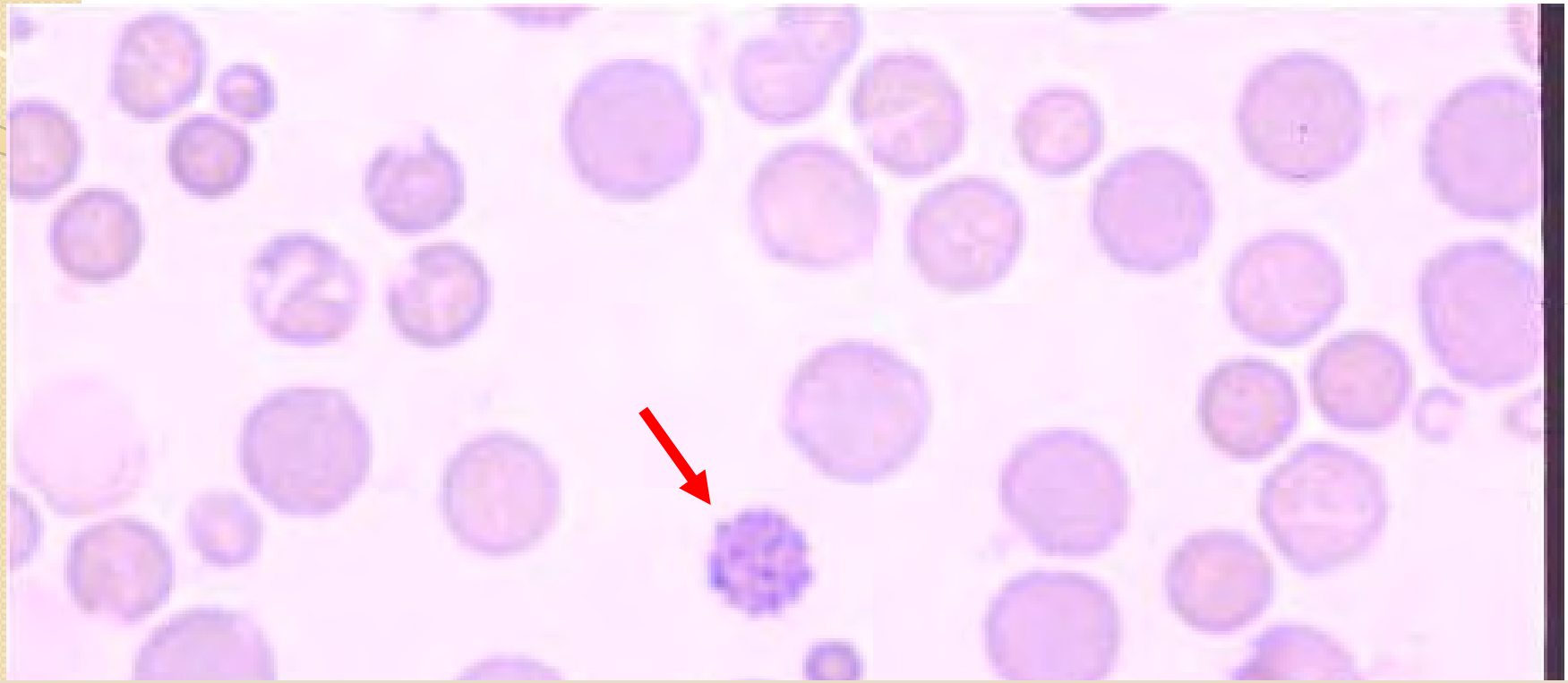
In the setting of Hb H disease, a disorder in which three of four a-globin chain genes are nonexpressed,30–100% of red cells contain typical inclusions.

- HEINZ BODIES
- GOLF BALL APPEARING RBC
- RETICULOCYTE



- HEINZ BODY IN GIEMSA STAIN

GOLF BALL APPEARING RBC



In α-thalassemia minor may be associated with as few as ***1 inclusion-containing cell in 1000–10000 cells .***

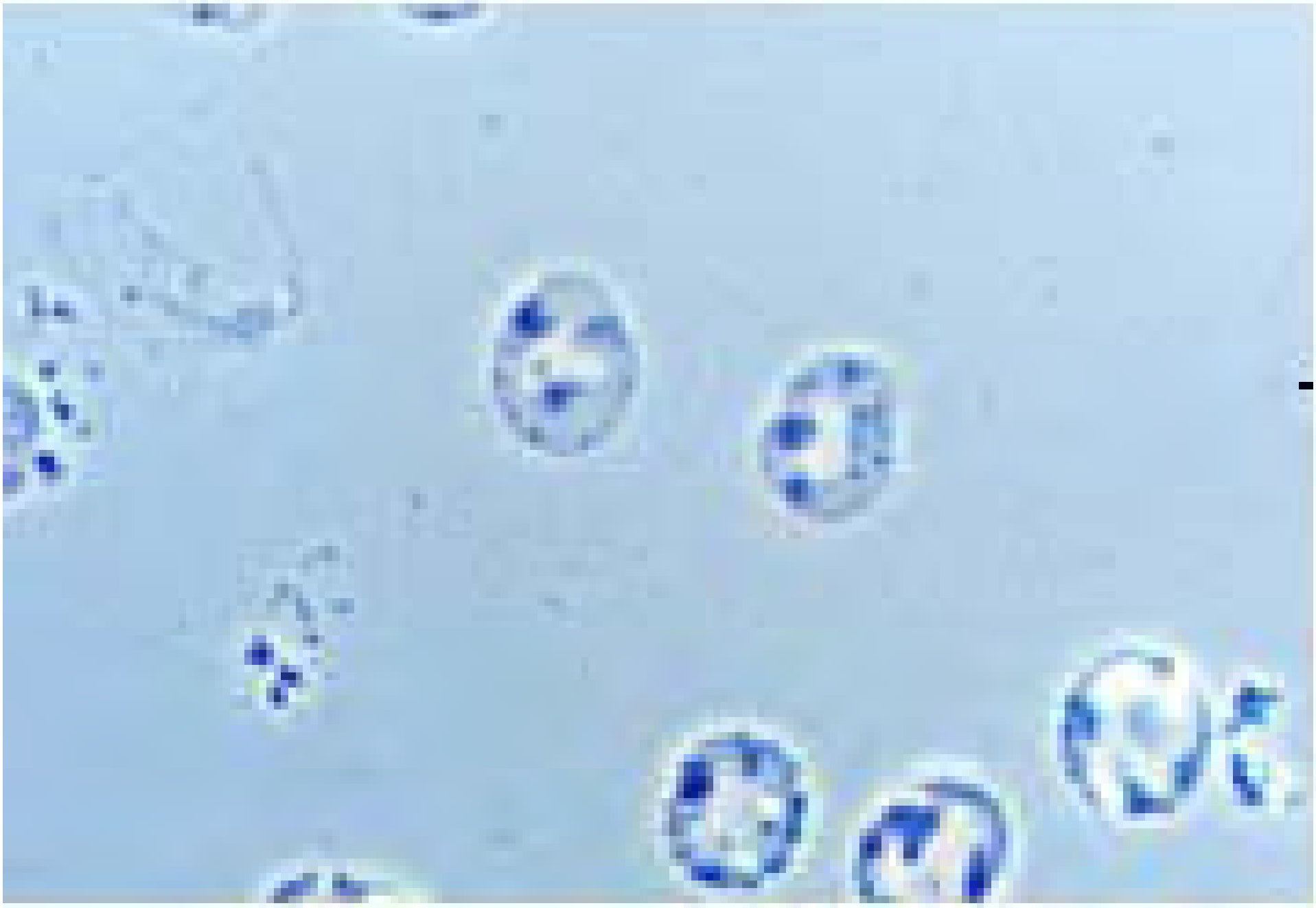
The absence of Hb H inclusions therefore does not exclude thalassemia trait, but the presence of typical inclusions may be helpful in confirming a presumptive diagnosis.

Iron Studies.

- **Except in the urgent situation of pregnancy iron deficiency should always be excluded and treated prior to work up for thal.**
- MCV and MCH are influenced by iron deficiency.
- **Hb A2 can be lowered by iron deficiency → falsely normal results if tested when iron deficient (false negatives).**

Table 1: Laboratory features in different clinical states.

	Iron Deficiency	Chronic Disease	Iron Overload	Thalassemia
Haemoglobin	N or ↓	↓	N	N or ↓
Serum Fe	↓	↓	↑	↑ or N
Transferrin Receptor	↑	↓ or N	↓	N
Transferrin Sat.	↓	↓	↑	N
Ferritin	↓	↑or N	↑	↑ or N
MCV	↓	↓ or N	N	↓
Marrow Fe	↓	↑	↑	↑



Hb H Inclusions.

- **Hb H is an insoluble tetramer consisting of four beta globin chains**, due to a lack of alpha chains in alpha thal major.
- **Oxidation of these tetramers provokes precipitation which can be visualized microscopically as 'golf ball' inclusions.**
- Oxidation can be precipitated by oxidative dyes (although there is significant batch to batch variability making controls essential).

Hb H Inclusions (2).

- **In Hb H disease 30 – 100% of RBCS contain Hb H inclusions.**
- In alpha thal minor there is one cell with Hb H inclusions per 1000 – 10,000 RBCS.
- Other nucleic acid and protein precipitates also stain (without 'golf ball' pattern).

Routine screening tests for diff IDA & minor B-thalassemia

- ✓ RBC count
- ✓ Serum iron & ferritin & Iron store BM
- ✓ TIBC & TS index
- ✓ Hb A2
- ✓ Free erythrocyte protoporphyrin
- ✓ CBC index (simple & rapid)

Differentiative index

- Iron deficiency anemia (IDA) and beta thalassemia minor (BTM) are the most common causes of hypochromic microcytic anemia.
- Many indices have been defined **for rapid differentiation of these diseases via red blood cell indices**

	IDA	T.T.
MCV-(5.Hb)-RBC-3.4 = England formula	>0 99.2%	0< 69.5%
MCV/RBC = Mentzer formula	>13 94.6%	<13 95.5 %
MCH/RBC = Srivastava formula	>3.8 86.5%	<3.8 85.7%
Kawakami formula RBC	<5000000 86.2%	>5000000 98%
MCV.MCH / RBC = Kerman I	301-370 24.6%	250-300 9/7%
MCV.MCH / RBC.MCHC = Kerman I	8.1-13 62%	<10.5 98.7%
MCV-10.RBC = Kermanshahan	>15 90%	<15 95.5%

MINOR β-THALASSEMIA vs. IDA

Discriminant formulas	β-THALASSEMIA	IDA
Mentzer (MCV/RBC)	**<13**	**=>13**
Benington-Srivastava (MCH/RBC)	**<4.4**	**=>4.4**
Green & King **MCV^2 x RDW/Hb x 100**	**<65**	**=>65**
Ratio of micro./hypo.	**>0.9**	**<0.9**

MEAN DENSITY Hb PER LITER, MDHL

MDHL: MCHD x RBC

(Mean Cell Hb Density= MCH/MCV)

SUBJECT	NORMAL	***β-Tm***	IDA
MDHL	M:1.75+/-0.12 F:1.5+/-0.11	↑	↓

Differentiative index

- **1- Kawakami index(RBC count index):**

- <5 possible IDA
- >5 possible BTm
- Specifity +sensitivity =84%

Differentiative index

- **2- mentzer index (MCV /RBC):**

- >13 IDA
- <13 BTm
- Specifity +sensitivity =90%

Differentiative index

- **3- index *Srivastava* (MCH /RBC):**

- >3.8 IDA
- <3.8 BTm
- Specifity +sensitivity =74%

Differentiative index

- **4-index *England* (MCV-(5.Hb)-RBC-3.4):**
- > 0 IDA
- < 0 BTm
- Specifity +sensitivity =68%

راهكار جديد جهت افتراق كم خوني ناشي از فقر آهن و تالاسمي مينور با استفاده از اندكسهاي گويچه سرخ

- آنمي فقر آهن و تالاسمي مينور دو عامل مهم اتيولوژي آنمي هيپوكروم ميكروسيتر مي باشند تا كنون معادلات و نامعادلاتي جهت افتراق اين دو علت با توجه به شمارش كامل سلولهاي خوني (CBC) و اندكسهاي گلبول قرمز عنوان گرديده است كه مهمترين آنها كه حساسيت (Sensitivity) و اختصاصي بودن (Specifity) بالاتري دارد به نام اندكس منتسر (Mentzler formula) عنوان شده است اشكال عمده در فرمول فوق الذكر استفاده از عمل تقسيم است (MCV/RBC) كه گاهي اوقات انجام آن بطور ذهني مقدور نيست با توجه به تجربيات باليني پيشنهاد استفاده از راهكار جديدي توصيه مي گردد كه عبارت است از فرمول (MCV-(10 . RBC همانگونه كه مشاهده مي شود ضرب فرمول فوق الذكر اعشاري است و با جابجايي مميز تعداد گويچه هاي سرخ در گزارش CBC حاصل مي شود و از تفريق حاصل از عدد MCV عددي حاصل مي گردد كه اگر كمتر از ۱۵ باشد به نفع تالاسمي مينور و بالاتر از آن آنمي فقر آهن مي باشد .

Differentiative index

- **5- new index** Kermanshahan
- MCV –(RBC x 10):
- >15 IDA
- <15 BTm
- Specifity +sensitivity =86%

Reticulocyte Count

- Usually elevated.
- Degree of elevation depends upon severity of thalassemia.

Osmotic Fragility

- Have decreased osmotic fragility.
- Is not very useful fact for diagnosing thalassemia.
- Is an inexpensive way of screening for carrier states.

Brilliant Cresyl Blue Stain

- Incubation with brilliant cresyl blue stain causes **Hemoglobin H to precipitate**.
- Results in characteristic appearance of **multiple discrete inclusions -golf ball** appearance of RBCs.
- **H Inclusions smaller than Heinz bodies and are evenly distributed throughout cell.**

Hemoglobin Electrophoresis

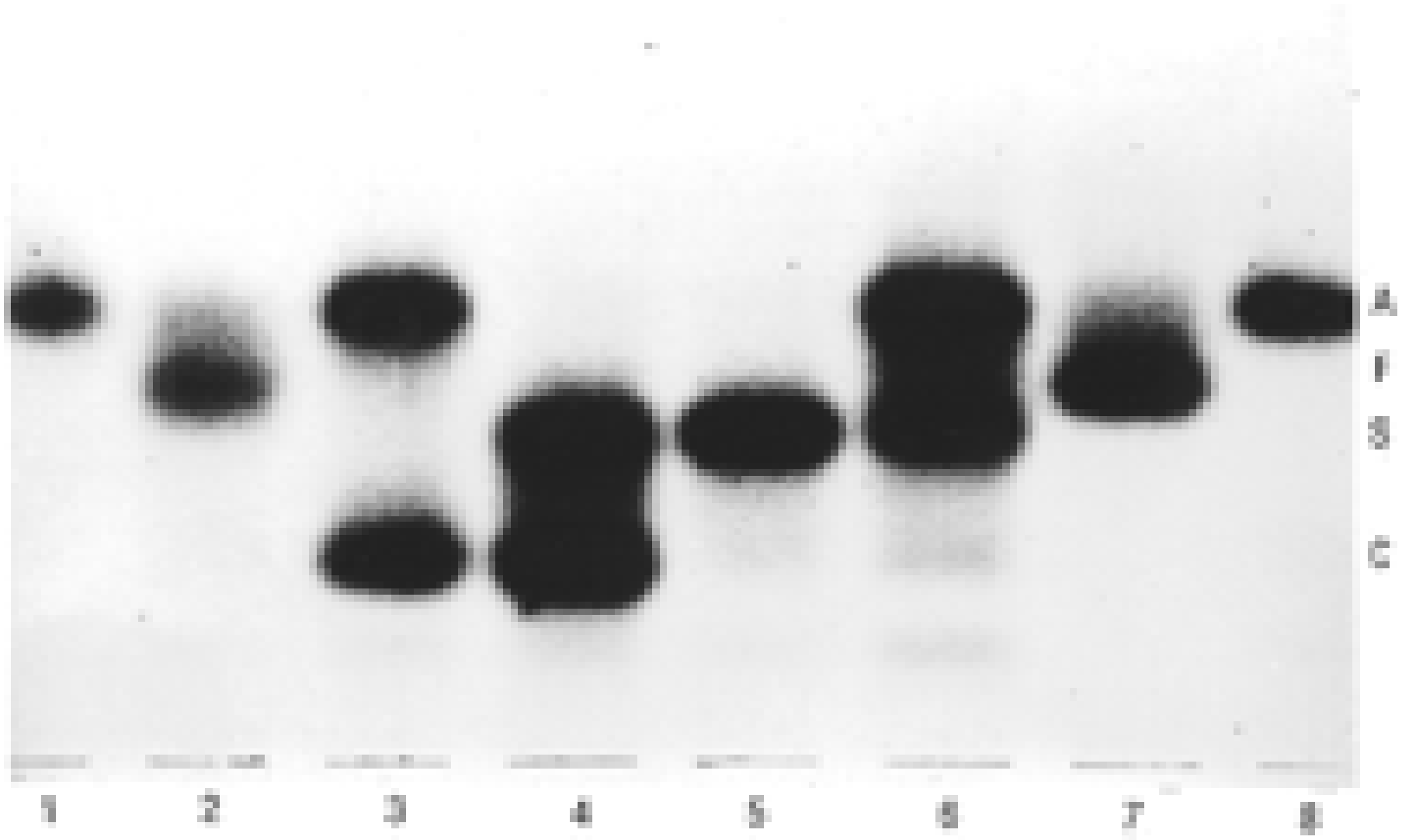
- Important role in diagnosing and differentiating various forms of thalassemias.
- Can differentiate among Hb A, Hb A_2, and Hb F, as well as detect presence of abnormal hemoglobins such as Hemoglobin Lepore, hemoglobin Bart's, or Hemoglobin Constant Spring.
- Also aids in detecting combinations of thalassemia and hemoglobinopathies.

Electrophoresis Principle.

- Separation of haemoglobins with electrophoresis at pH 8.4 (alkaline) and pH 6.2 (acid).
- Scanning allows quantification of the hemoglobin present, bands are seen by staining.
- **At alkaline pH Hb C, E, A2 and O migrate together to form a single band, Hb S, D and G also co migrate.**

Electrophoresis Principle (2).

- At acid pH Hb C separates from E and O and Hb S separates from D and G.
-
- Hb E and O cannot be separated by electrophoresis neither can Hb D and G.



(1) Normal (2) New born (3) Hb C trait [A-C] (4) Hb SC disease [S-C] (5) Sickle cell disease [S-S], (6) Sickle cell trait [A – S] (7) New born (8) Normal.

Electrophoresis Interpretation.

HbA2 range	Interpretation
> 7.0 %	**Rare, repeat to verify test.** Exclude a structural variant. Can be due to rare β thal mutations.
3.8 – 7.0 %	**Beta thal trait** or unstable Haemoglobin.
3.4 – 3.7 %	Fe deficiency in β thal trait; Δ chain variant with β thal trait. Interaction of α and β thal traits; rare β thal mutations. HbS making measurement inaccurate; interaction of α - Hb S.
2.0 – 3.3 %	**Normal.** Δ and β thal (but HbF should be elevated); alpha thal trait. Rare cases of β thal trait coexisting with either Δ or α thal trait.
< 2.0 %	Δ β thal (but HbF should be elevated). Alpha thal trait; Hb H disease; Δ variant or delta Thalassemia. Iron deficiency.

Electrophoresis Strengths.

- Commercial, widely available, rapid methods used for many years.
- **Gives an estimate of HbA2 level.**
- Identifies some variant haemoglobins which are well characterized.

Electrophoresis Disadvantages.

- Labor-intensive.
- Inaccurate in quantification of low-concentration variants (HbA2) and in detection of fast variants (HbH, Hb Barts).
- The precision and accuracy for Hb A2 using scanning of electrophoretic gels is poor (in comparison to HPLC).

Electrophoresis Disadvantages (2).

- Coefficient of variation (CV) 33.6% for gel electrophoresis (mean HbA2 concentration 2.41%).
- **Column chromatography has CV 14.6% (mean HbA2 3.21%) and HPLC has CV 4.3% (mean HbA2 3.47%).**
- ➔ An imprecise test in comparison to other tests now available.

Preparation of Haemolysate for the Quantiflcation of Haemoglobins

- Lyse 2 volumes of washed packed cells in 1 volume of distilled water, and then add 1 volume of carbon tetrachloride (CCI4).Alternatively, lyse by freezing and thawing, then add 2 volumes of CCI4.
- Shake the tubes vigorously for approximately 1 min, then centrifuge at 1200 g (3000 rev/min) for 30 min at 4° Transfer the supernatant to a clean sample container and adjust the Hb to 10 g/dl with water.
- If an unstable Hb is suspected, organic solvents should be avoided.

- Whole blood samples are best stored as washed, packed cells frozen as droplets in liquid nitrogen and subsequently stored at -20°C, -70° or over liquid nitrogen. Alternatively, haemolysates may also be frozen at -20° -70° or over liquid nitrogen.

Cellulose Acetate Electrophoresis at Alkaline pH

- 1. Centrifuge samples at 1200 g for 5 min. Dilute 20 landa of the packed red cells with 150 landa of the haemolyzing reagent. Mix gently and leave for at least 5 min. If purifled haemolysates are used, dilute 40 landa of 10 g/dl haemolysate with 150 landa of lysing reagent.
- *2. With the pOwer supply disconected, prepare* the electrophoresis tank by placing equal amounts of TEB buffer in each of the outer buffer compartments. Wet two chamber wicks in the buffer, and place one along each divider/ bridge support ensuring that they make good contact with the buffer.

Cellulose Acetate Electrophoresis at Alkaline pH

- 3. Soak the cellulose acetate by lowering it slowly into a reservoir of buffer. Leave the cellulose acetate to **soak for at least 5 min before use.**
- 4. Fill the sample well plate with 5 landa of each diluted sample or control and cover with a 50-mm overslip or a "short" glass slide to prevent evaporation. Load a second sample well plate with Zip-prep solution.

Cellulose Acetate Electrophoresis at Alkaline pH

- 5. **Clean the applicator tips immediately prior to use by loading with Zip-prep solution** and then applying them to a blotter.
- 6. Remove the cellulose acetate strip from the buffer and blot twice between two layers of clean blotting paper. Do not allow the cellulose acetate to dry.
- 7. Load the applicator by depressing the tips into the sample wells twice, and apply this flrst loading onto some clean blotting paper.
- **Reload the applicator and apply the samples to the cellulose acetate**.

Cellulose Acetate Electrophoresis at Alkaline pH

- 8.Place the cellulose acetate plates across the bridges, with the plastic side uppermost. Place two glass slides across the strip to maintain good contact. **Electrophorese at 350 V for 25 min.**
- 9. After 25 min electrophoresis, immediately transfer the cellulose acetate to Ponceau S and flx and stain for 5 min.
- 10. Remove excess stain by washing for 5 min in the flrSt acetic acid reservoir and for 10 min in each of the remaining two. Blot once, using clean blotting paper, and leave to dry.
- 11. Label the membranes and store in a protective
- plastic envelope.

منابع خطاالکتروفورز هموگلوبین

با توجه به اهمیت الکتروفورز هموگلوبین منابع خطا بیان میشود زیرا هرکدام از این خطاها عامل تفسیر نادرست الکتروفورز می گردد

- کدورت و آلودگي بافر، بافر با PH یا قدرت يوني نامناسب .
- آلودگي چاهكهاي نمونه گذاري، اپليكاتور، blotter ها (كاغذهاي جاذب رطوبت)، يا آلودگي پليت استات سلولز با گرد و خاك، خون يا ساير پروتئين ها .
- کدورت یا مستهلك شدن همولیزات
- کهنه بودن همولیزات (تشکیل مت هموگلوبین)

منابع خطاالکتروفورز هموگلوبین

- آلودگي همولیزات، داشتن استروماي سلولي، عدم تفکیک مناسب باندها
- مکش نامناسب بافر درنوار استات سلولز، سبب حبس شدن هوا یا پوسته پوسته شدن ورقه مي شود.
- blotting نامناسب نوارهای استات سلولز ، سبب خشک شدن استات سلولز یا باقي ماندن رطوبت روي آن مي شود.
- تأخیر در : الف) نمونه گذاري روي نوارهاي blot شده ، ب) در برقراري جریان الکتریسته، ج) در بیرون آوردن نوارها از چمبر، د) در رنگ آمیزي نوارها بعد از الکتروفورز سبب ایجاد خطا مي شود.

منابع خطاالکتروفورز هموگلوبین

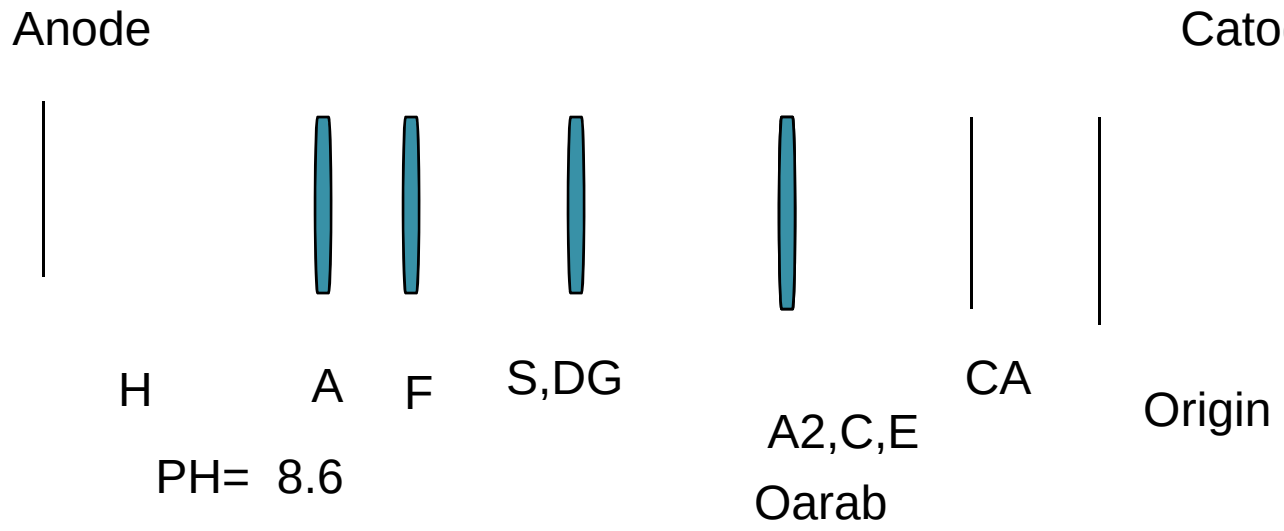
- مقدار نمونه گذاري نامناسب باشد. (خيلي زياد يا كم)
- افزایش زمان دهیدراتاسیون و شفاف سازی که سبب کمرنگ شدن باند ها می شود.
- نگهداری بیش از حد CBC که عامل ایجاد مت هموگلوبین در نمونه می باشد و طی الکتروفورز با هموگلوبین F ممکن است اشتباه شود.
- خوب خیسانده نشدن نوار استات که سبب ایجاد حباب های هوا و پوسته پوسته شدن ورق و در نتیجه عدم حرکت مناسب باندهای هموگلوبین می شود.

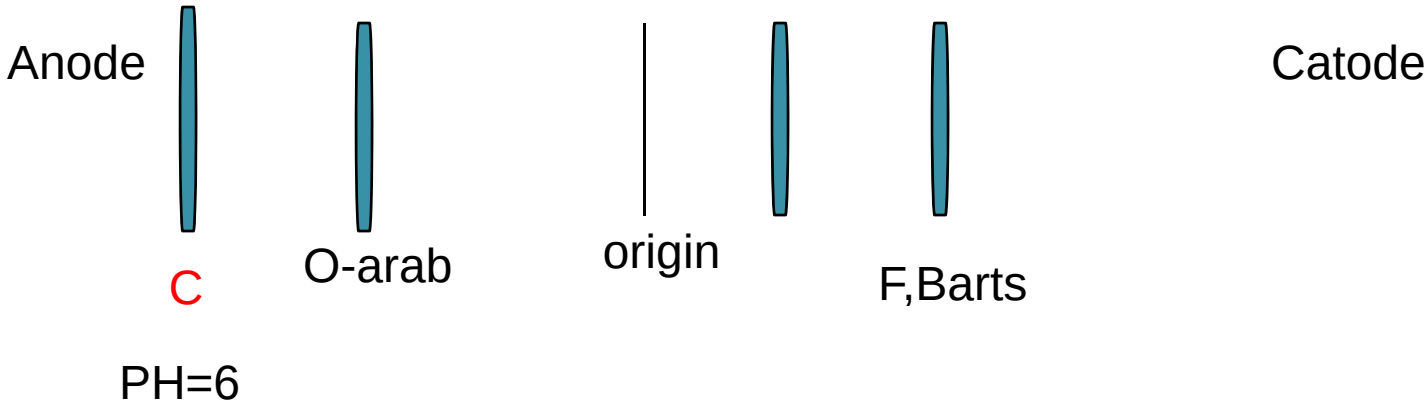
منابع خطاالکتروفورز هموگلوبین

- بهتر است در هر ردیف کاری الکتروفورز یک نمونه همولیزات کنترل (مخلوط خون بند ناف و خون بالغ و بیمار حاوی هموگلوبین اس و سی) قرار داده شود که تمام باند های مزبور را داشته باشد .
- پائین بودن قدرت یونی بافر و بالا بودن ولتاژ در فرآیند الکتروفورز روی استات سلولزروند مهاجرت هموگلوبین ها را سریعتر نموده ولی اشکال بزرگ ان این است که ولتاژ بالا با تولید حرارت منجر به منعقد شدن ملکول های پروتئینی هموگلوبین می گردد.

منابع خطاالکتروفورز هموگلوبین

- کدر بودن همولیزات به دلیل کهنه بودن همولیزات باند های اضافی و مزاحم تولید می نماید .
- آلودگی چاهک های نمونه گذار و اپلیکاتور ها


Anode
Catode
H
A
F
S,DG
A2,C,E
Oarab
CA
Origin
PH= 8.6


Anode
Catode
C
O-arab
origin
F,Barts
PH=6

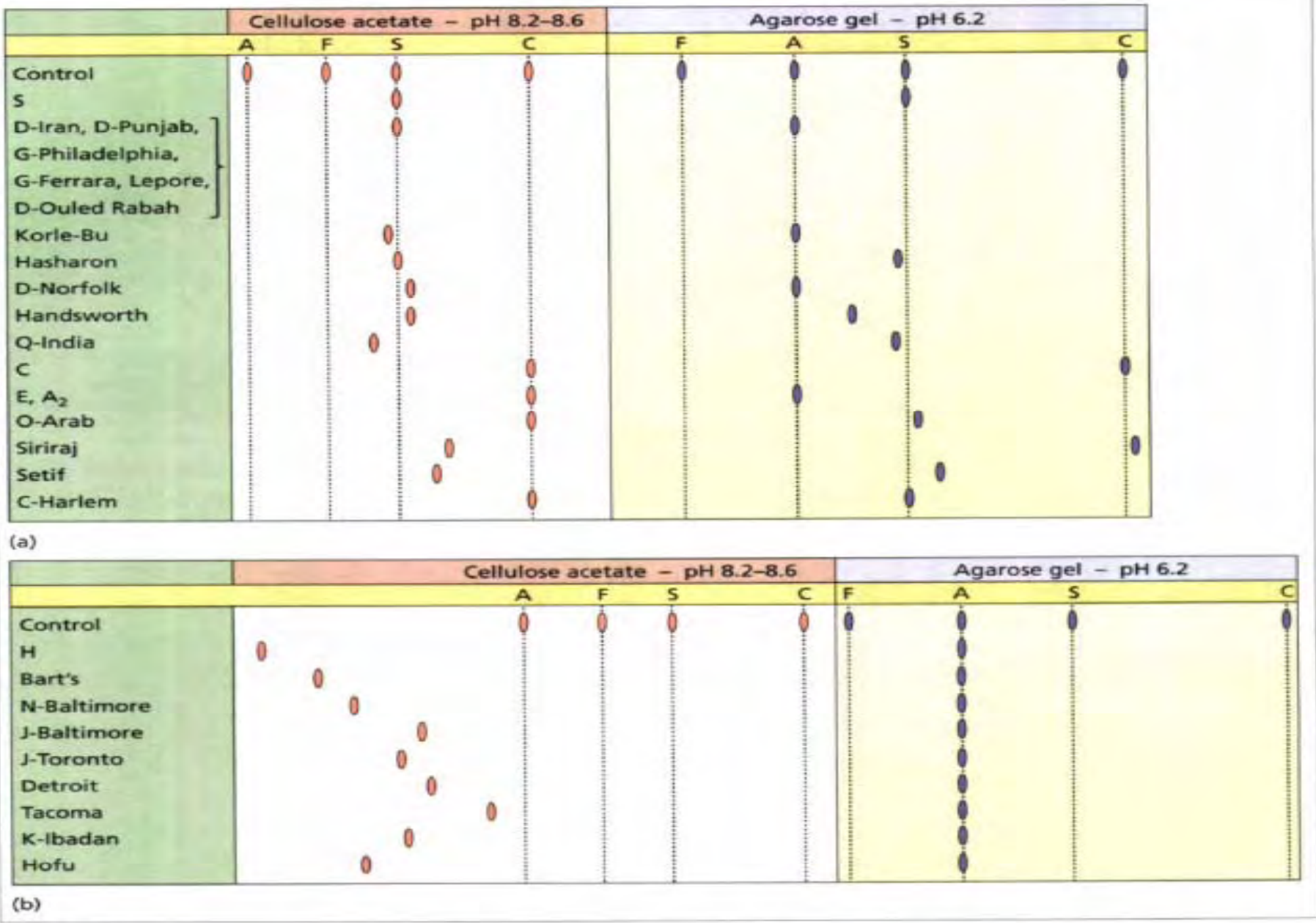
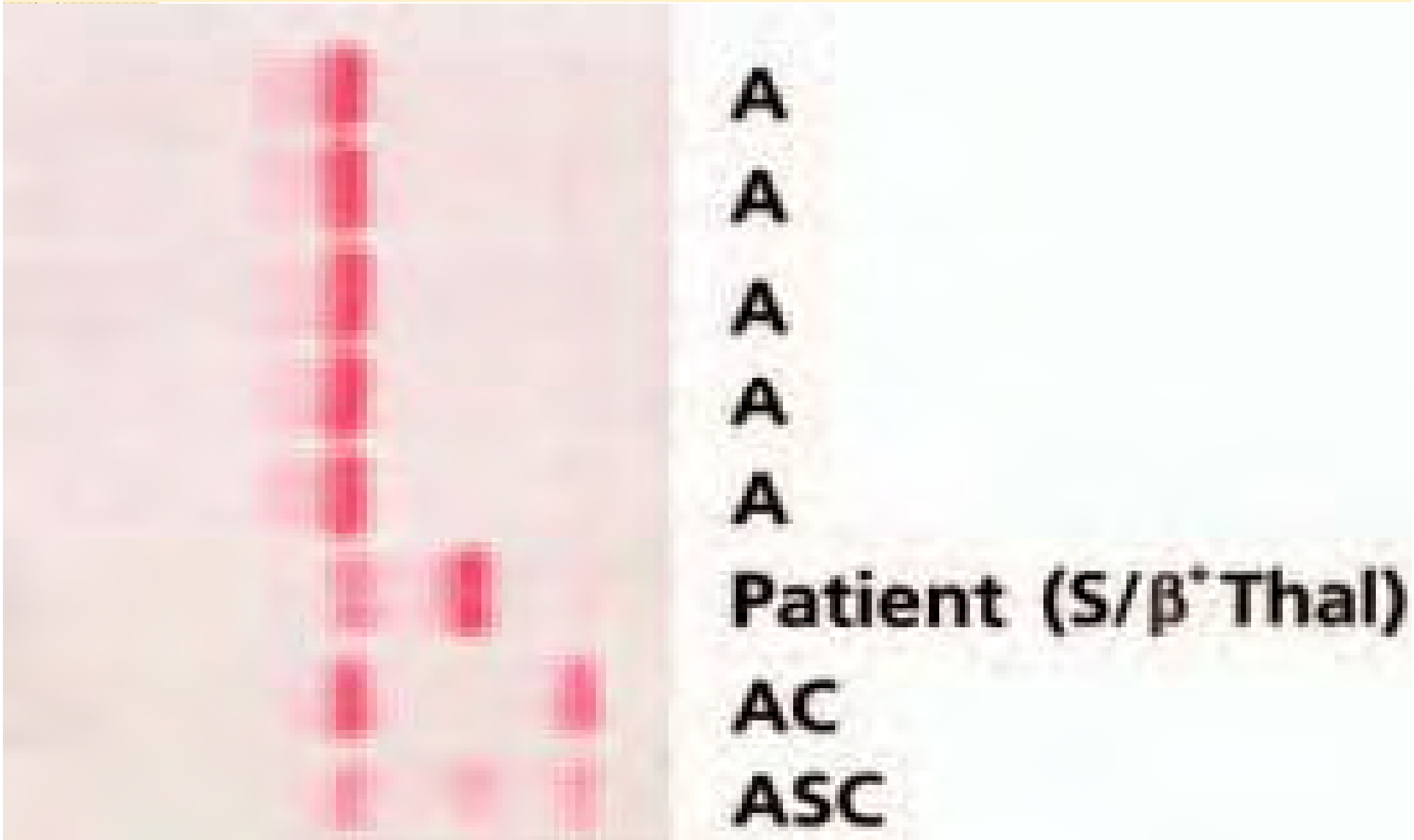
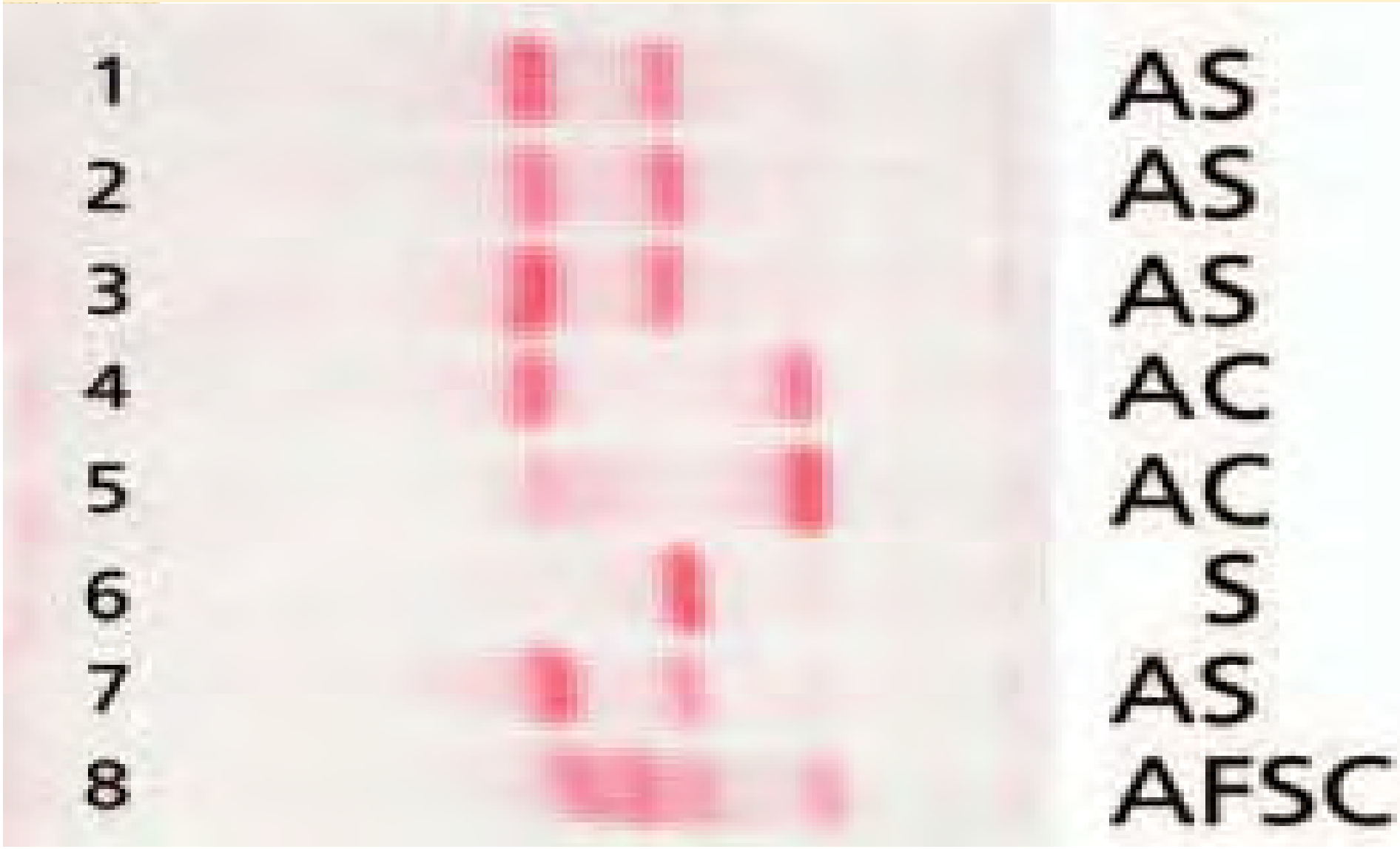


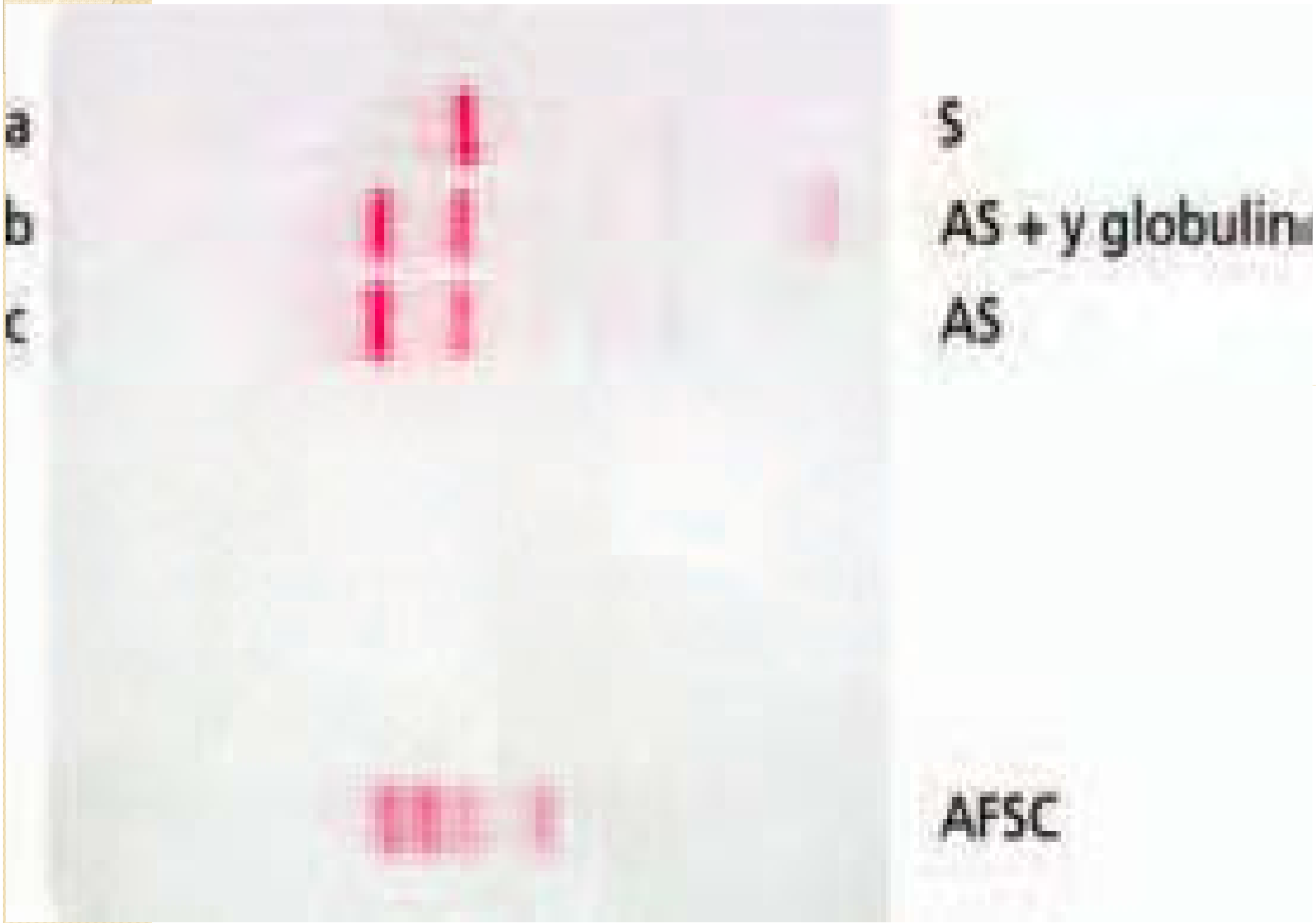
Fig. 2.6 Diagram showing the mobility of normal and variant haemoglobins on cellulose acetate at pH 8.2–8.6 in comparison with the mobility on agarose gel at pH 6.0–6.2: (a) haemoglobins with mobility close to A, S or C; (b) fast haemoglobins.

acetate at alkaline pH in a patient with sickle cell/b+ thalassaemia compound heterozygosity; ASC, control sample containing haemoglobins A, S and C.



Haemoglobin electrophoresis on cellulose acetate
at alkaline pH showing haemoglobin C trait (lane 4) and
haemoglobin C/b+ thalassaemia compoundheterozygosity (lane 5); AFSC, control
sample containinghaemoglobins A, F, S and C




a
S
b
AS + γ globulin
c
AS
AFSC

قسمت bتصویری بسیار کمیاب و جالب مربوط به خصیصه HbAS میباشد که یک باند پارا پروتئینی نیز آنرا همراهی میکند. که ممکن است با واریانتهای Hb اشتباه شود . علت این اتفاق استفاده از خون کامل جهت تهیه همولیزات برای الکتروفورز میباشد.
بهتر است جهت جلوگیری از بروز خطا از خون شسته شده که پلاسمای آن جدا شده استفاده کنیم

(a) haemoglobins A and S (sickle celltrait);
(b) haemoglobins Aand H (haemoglobin H disease);
(c) haemoglobins Aand H (haemoglobin H disease);
(d)haemoglobins Aand S (sickle cell trait);
(e) haemoglobins A, F and S (sickle cell trait in a baby);
(f) haemoglobins A and F (normal baby);
AFSC, control sample containing haemoglobins A, F, S and C.

مبانی الکتروفورز

الکتروفورز روشي است که در آن نمونه هايي که بار الکتريکي دارند، تحت تأثير يك ميدان الکتريکي از ميان شبکه اي متخلخل حرکت مي کنند. سرعت حرکت مولکولها در اين شرايط نه تنهاتحت تاثير بار الکتريکي شان است بلکه عواملي ديگري نظير اندازه و شکل مولکول نيز در اين امر دخيل هستند. به همين دليل الکتروفورز روشي مناسب و کارآمد در جداسازي مولکول مورد استفاده قرار مي گيرد.

معمولا" الکتروفورز براي جداسازي مولکولهاي بزرگي چون پروتئين ها و اسيدهاي نوکلئيک به کار برده مي شود, اما در مواردي نيز براي جداسازي مولکولهاي باردار کوچکتري نظير قندها, اسيدهاي آمينه, پپتيدها و حتي يونهاي ساده مورد استفاده قرار مي گيرد.

معمولا" براي الكتروفورز يک مخلوط مولكولي, لايه نازكي از آن, بر روي شبكه اي متخلخل كه محلولي را درون خود محبوس كرده است, قرار داده مي شود. پس از برقراي ميدان الكتريكي با اِعمال اختلاف پتانسيل در دو سوي اين شبكه, مولكولهاي موجود در نمونه با سرعت هاي متفاوتي درون شبكه متخلخل شروع به حركت مي كنند. اين اختلاف سرعت مبناي جداسازي در الكتروفورز است. در پايان, مولكولهاي پروتئيني مختلف به صورت باند هايي مجزا در قسمت هاي مختلف شبكه آشكار مي شوند. شبكه متخلخل در ممانعت از انتشار مولكولها در اثر گرماي ايجاد شده به خاطر جريان الكتريكي نقش مهمي دارد. علاوه بر اين در مواردي كه از ژل هاي آگاروز و پلي آكريل آميد استفاده مي شود, شبكه متخلخل نقش يک الک غربال كننده بر اساس اندازه مولكولها را نيز ايفا مي كند. در اغلب دستگا ه هاي الكتروفورز, ژل مابين دو محفظه ي بافري قرار مي گيرد به طوريكه ژل تنها واسطه در عبور جريان الكتريسيته بين اين دو محفظه باشد

- جداسازي توسط الكتروفورز تحت تاثير عوامل متعددي قرار دارد. ماهيت مولكولهاي نمونه نظير بار الكتريكي و اندازه آنها و شدت جريان و ميدان الكتريكي و بالاخره اثرات محيطي نظير نوع و نحوه ي استفاده از بافرها و حرارت ايجاد شده در حين كار عواملي هستند كه بر نحوه ي جداسازي مولكولهاي نمونه اثر مي گذارند.
- **اثر عوامل الكتريكي**
- در الكتروفورز سرعت حركت مولكول ها تناسب مستقيم با اختلاف پتانسيل اِعمال شده دارد. قانون اُهم Ohmدر الكتروفورز از اهميت زيادي برخوردار است
- V=IR
- معادله قانون اهم؛ Vولتاژ يا اختلاف پتانسيل برحسب ولت, Iشدت جريان بر حسب آمپر و Rمقاومت بر حسب اُهم است
- معادله فيزيكي ديگر كه از آهميت برخوردار است, معادله توان است. اين معادله مقدار حرارت ايجاد شده در حين الكتروفورز را مشخص مي كند.
- $P=V^2/R$ يا $P=I^2R$ يا $P=VI$
- معادله معادله توان كه در آن Pتوان بر حسب وات است.
- اين حرارت ايجاد شده بر اثر مقاومتي است كه الكترودها, بافر مورد استفاده, و ژل دارند و به گرماي ژول Joule heatموسوم است. منابع الكتريكي Power supplyمورد استفاده در الكتروفورز ايجاد جريان مستقيم مي كنند و معمولا" يكي از پارامترهاي الكتريكي,يعني ياجريان يا اختلاف پتانسيل يا توان را ثابت نگاه مي دارند. بايد توجه داشت كه مقاومت مدار مورد استفاده در الكتروفورز را به هر حال نمي توان ثابت نگاه داشت. براي مثال در حين الكتروفورز, مقاومت بافر بر اثر گرماي ژول, كاهش مي يابد. بنا بر نوع بافر بكار رفته و پارامتر الكتريكي كه ثابت نگاه داشته مي شود, گرماي ژول در حين انجام الكتروفورز ممكن است كاهش يا افزايش يابد (جدول ۱-۵). براي مثال در " "SDS-PAGEناپيوسته ثابت نگاه داشتن شدت جريان منجر به افزايش دما مي شود كه نياز به سيستم خنك كننده را در چنين وضعيتي الزامي مي كند.
-

- تاثير ثابت نگاه داشتن پارامترهاي الكتريكي در سيستم هاي بافري مختلف
- انتخاب نوع پارامتر ثابت در منبع الكتريكي در حين الكتروفورز, با در نظر گرفتن متغير هاي مختلفي صورت مي پذيرد. براي مثال مدت زمان مورد نظر براي انجام الكتروفورز, الزام به حداقل رساندن انتشار نمونه و مقدار از دست دادن فعاليت نمونه كه بر اثر حرارت و در طول زمان رخ مي دهد, و نياز به حفظ دماي خاص براي انجام الكتروفورز. معمولا" پروتئين ها با جريان ثابت الكتروفورز مي شوند, در حاليكه الكتروفورز اسيد هاي نوكلئيک با ولتاژ ثابت انجام مي شود.
- اثر سيستم هاي بافري و pH
- پروتئين ها به علت خصوصيت آمفوتري خود تحت تاثير pHمحيطي كه در آن قرار داشته باشند بارالكتريكي خاص خود را نشان مي دهند. بدين ترتيب در جداسازي توسط الكتروفورز بايد pHمحلول هاي مورد استفاده ثابت باقي بماند از آنجا كه الكتروليز آب در آنود يونهاي " "H^+و در كاتود يونهاي " "OH^-ايجاد مي كند, براي ثابت نگاه داشتن pHمحلولهاي مورد استفاده, آنها بايد بافر شوند.

اثر حرارت

- براي حفظ تكرار پذيري, ثابت نگاه داشتن حرارت در تمام مراحل الكتروفورز بسيار مهم است. براي مثال پلي مريزه شدن آكريل آميد يک واكنش گرمازا است, از اينرو گرماي ايجاد شده در حين پلي مريزاسيون, به خصوص در مورد ژل هاي غليظ تر, ممكن است با انتقال گرما باعث بروز بي نظمي در اندازه ي منافذ ژل گردد.
- انتقال گرما معمولا" مشكلي در ژل هايي با غلظت كمتر از ۱۵% نمي كند. به هر حال گرماي زياد در حين الكتروفورز مشكلات ديگري را نيز پديد مي آورد؛ شكستن شيشه هاي الكتروفورز, آسيب به دستگاه. وقتيكه حرارت بصورت يک دست در تمام نقاط ژل نباشد شكل باندهاي جدا شده نامنظم می شود و در اصطلاح باندها خندان مي شوند چون نمونه ها در رديف هاي وسط سريع تر از رديف هاي كناري حركت خواهند كرد.

Hemoglobin Quantitation

- Elevation of Hb A_2 excellent way to detect heterozygote carrier of beta thalassemia.
- Variations in gene expression in thalassemias results in different amounts of Hb A_2 being produced.
- Can also quantitate levels of Hb F.

Range Hb A2

- **Ranges may differ slightly between methods and between laboratories.**
- For example, in one of our laboratoriesthe range determined for microcolumn chromatography was 2.2-3.3%, whereas in the other it was 2.3-3.5%.

Hb A2 levels

- We recommend that Hb A2 levels of 3.4-3.7% be regarded as borderline and that the assay should be **repeated both on the same sample and on a fresh sample**
- Results obtained by HPLC analysis may be 0.1-0.2% higher than the results obtained by electrophoresis with elution.
- **There is also evidence that Hb A2 is elevated in patients with HIV**
- **>45.0 level HbF: B .thalassaemia major Some cases of B.thalassaemia intermedia Neonates**
- **15.0-45.0% Hb F: heterozygous HPFH African type (usually more than *20%)*Some cases of Pthalassaemia intermedia**

اندازه گیری به روش کروماتوگرافی تعویض یونی
ion exchange chromatography Hb A2

- اساس روش کروماتوگرافی جامد مایع است که بر اساس اتصال و قابلیت پیوند دو یون غیر همنام به وسیله نیروی الکترو استاتیک می باشد .
- اگر یک ستون رزین را با گروه های عمل کننده منفی پر کنیم و محلول همولیزات را عبور دهیم کاتیون ها ی موجود در محلول به سمت رزین تمایل یافته و باند شده در حالی که آنیون ها (هم بار) به علت دافعه موجود به سرعت ستون را ترک نموده و الوت (محلول جداشده) نهائی حضور می یابند .
- از آنجائی که در یک پ هاش خاص مواد مختلف موجود در همولیزات بار های مختلفی پیدا می کنند تنظیم این پ هاش در جداسازی صحیح هموگلوبین بسیار حائز اهمیت می باشد

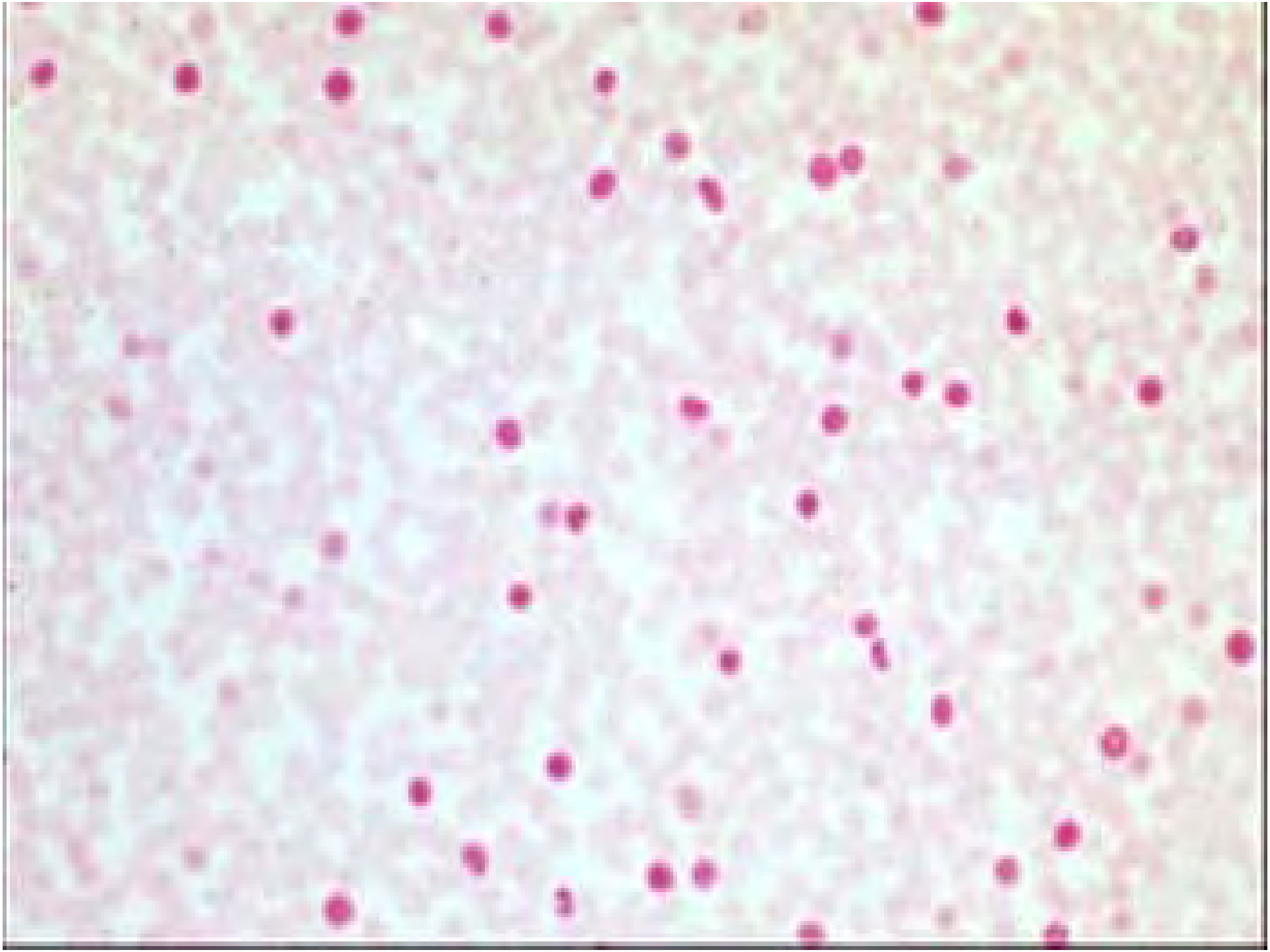
مراحل اندازه گیری به روش کروماتوگرافی تعویض یونی
ion exchange chromatography Hb A2

۱- خیس نمدن رزین ستون(سلولز) با بافر مخصوص(بافر گلایسین با پ هاش ۵ـ۷) و به حالت تعادل در آوردن رزین مصرفی (رزین در این حالت دارای شارژ می شود

۲-اضافه نمودن همولیزات اماده بیمار(۵۰ لاندا خون با ۲۰۰ لاندا همولیز کننده سپس ۵ دقیقه در حرارت محیط می گذاریم) سه بار شستشو خون قبل از همولیز پروتئین های مزاحم پلاسما را حذف می نماید.

- ۳- به محض جذب کامل همولیزات یک لوله مدرج زیر ستون گذاشته و قطره قطره بافراول(گلایسین . بدون نمک طعام) را اضافه می نماییم . بهتر است سرعت اضافه نمودن بافر با سرعت خروج مایع الوت شده برابر باشد تا نه رزین خشک شود و نه لبریز شود
- ۴-با رمنفی انواع هموگلوبین متفاوت بوده و در این بین بارمنفی هموگلوبین مورد اندازه گیری از سایر هموگلوبین ها کمتر است لذا این باند سریعتر از سایر هموگلوبین ها جدا شده و با سرعت بیشتری تخلیه می گردد . (معمولا در حجم کمتر از سه سی سی تخلیه می گردد)

۵- قبل از خشک شدن رزین مرحله جداسازی سایر هموگلوبین ها را با افزودن بافر دوم (بافر گلایسین حاوی نمک طعام با قدرت یونی بالاتر) انجام می دهیم



Acid Elution Stain

- **Based on Kleihauer-Betke procedure.**
- Acid pH will dissolve Hemoglobin A from red cells.
- Hemoglobin F is resistant to denaturation and remains in cell. Stain slide with eosin.
- **Normal adult cells appear as "ghost" cells while cells with Hb F stain varying shades of pink**.
- Useful way to differentiate between pancellular HPFH and heterocellular HPFH.

Kliehauer Test For Hb F.

- Used to detect the presence of Hb F (fetal hemoglobin).
- RBCS on a slide are stained to detect the presence of Hb F.
- Can distinguish hetrocellular HbF from pancellular HbF seen in HPFH.

تداوم ارثی هموگلوبین F
HPFH

- بعد از دوران شیر خوارگی سطح هموگلوبین جنینی کاهش نمی یابد .
- در نوع هتروزیگوت ۲۰ – ۳۰% Hb F
- در نوع هموزیگوت ۱۰۰ – ۹۸% Hb F
- در نوع هموزیگوت تداوم ارثی هموگلوبین اف هموگلوبینA / A2وجودندارد
- در لام خون محیطی میکرو و ماکرو خفیف وجود دارد ولی کم خونی وجود ندارد و هموگلوبین اف به طور یکنواخت در در داخل هر اریتروسیت پخش شده است
- روش تشخیصی قطعی : اسید الوشن

Modified Betke Method for the Estimation of **Hb F** Principle

- **To measure the percentage of Hb F in a mixture of haemoglobins & sodium hydroxide is added to a lysate and, after a set time**, denaturation is stopped by adding saturated ammonium sulphate. The ammonium sulphate lowers the pH and precipitates the denatured haemoglobin.
- After flltration, the quantity of undenatured (unprecipitated) haemoglobin is measured. **The proportion of alkali-resistant (fetal) haemoglobin is then calculated as a percentage of the total amount of haemoglobin present.**

Hb F control & range

- A normal and a raised Hb F control should be tested with every batch of samples.
- **The raised Hb F control should ideally contain between 5 and 15% Hb F, and this can be prepared from a mixture of cord and adult blood.**
- Each laboratory must verify its own normal range, which should not differ signiflcantly from published values;
- **for adults the range is 0.2-1.0%.**
- **minor thal (2-10%)**
- **beta major thal (40- 90%)**

Hb S

- به جز الکتروفورز که یک تست غربالگری و اولیه (کیفی) جهت تعیین همگلوبین اس می باشد تقریبا اکثر روش های تشخیصی هوگلوبین اس بر اساس کاهش حلالیت هموگلوبین در شرایط هیپوکسی ایجاد شده می باشد.

sickling test تست داسی شکل شدن

- (معرف احیا کننده متا بی سولفیت سدیم یا دی تیونات سدیم ۲% تازه تهیه شده قبل از آزمایش)
- مخلوط کردن یک قطره خون با ۵ قطره محلول آماده مصرف متا بی سولفیت و هم زدن این قطرات روی سطح لام بدون تشکیل حباب / قرار دادن لامل بزرگ و پوشاندن اطراف ان با پارافین مذاب یا لاک ناخن به
- طور دقیق به شکلی که هوا راه نفوذ نداشته باشد
- در موارد هموزیگوت حالت داسی شکل گلبول های قرمز کمتر از یک ساعت در گلبول های قرمز(در شرایط هیپوکسی) حاصل می گردد و در موارد هتروزیگوت زمان بیشتر حدود ۱ الی ۱.۵ ساعت مورد نیاز است .

تست حلالیت هموگلوبین

- ۱-تهیه محلول کار دی تیونات سدیم (متابی سولفیت سدیم) ۰.۱ گرم پودر این ماده را با ۱۰ سی سی بافر فسفات (۷.۱) مخلوط نموده
- ۲- ۲ سی سی محلول کار فوق را داخل لوله آزمایش تمیز با ۴ قطره خون کامل بیمار مخلوط نموده و ۵ دقیقه دور ۲۵۰۰ سانتریفوژ نموده و سپس به آزامی لوله را از سانتریفوژ خارج نموده (بدون کاربرد ترمز سانتریفوژ)
- ۳-بررسی محلول روئی و زیرین: اکثر هموگلوبین ها در این معرف حل شده و در لایه محلول زیرین قرار می گیرند ولی هموگلوبین اس که نامحلول است به دلیل تشکیل شبکه پلی مریزه به صورت یک نوار یا باند قرمز رنگ در محلول روئی لوله قابل مشاهده خواهد بود و رسوب نخواهد کرد

Routine Chemistry Tests

- **Indirect bilirubin elevated in thalassemia major and intermedia.**
-
- Assessment of iron status, total iron binding capacity, and ferritin level important in differentiating thalassemia from iron deficiency anemia.

Other Special Procedures

- Globin Chain Testing - determines ratio of globin chains being produced.
-
- **DNA Analysis - Determine specific defect at molecular DNA level.**

Differential Diagnosis of Microcytic, Hypochromic Anemias

	RDW	Serum Iron	TIBC	Serum Ferritin	FEP
Iron Deficiency	Inc	Dec	Inc	Dec	Inc
Alpha Thal	Norm	Norm	Norm	Norm	Norm
Beta Thal	Norm	Norm	Norm	Norm	Norm
Hb E Disease	Norm	Norm	Norm	Norm	Norm
Anemia of Chronic Disease	Norm	Dec	Dec	Inc	Inc
Sideroblastic Anemia	Inc	Inc	Norm	Inc	Dec
Lead Poisoning	Norm	Norm	Norm	Norm	Inc

Automated cation-exchange HPLC

Automated cation-exchange HPLC is being used increasingly as the initial diagnostic method in haemoglobinopathy laboratories with a high workload. Both capital and consumable costs are higher than with haemoglobin electrophoresis. But labour costs are less; overall costs may he similar.

In comparison with haemoglobin electrophoresis, HPLC has four advantages:

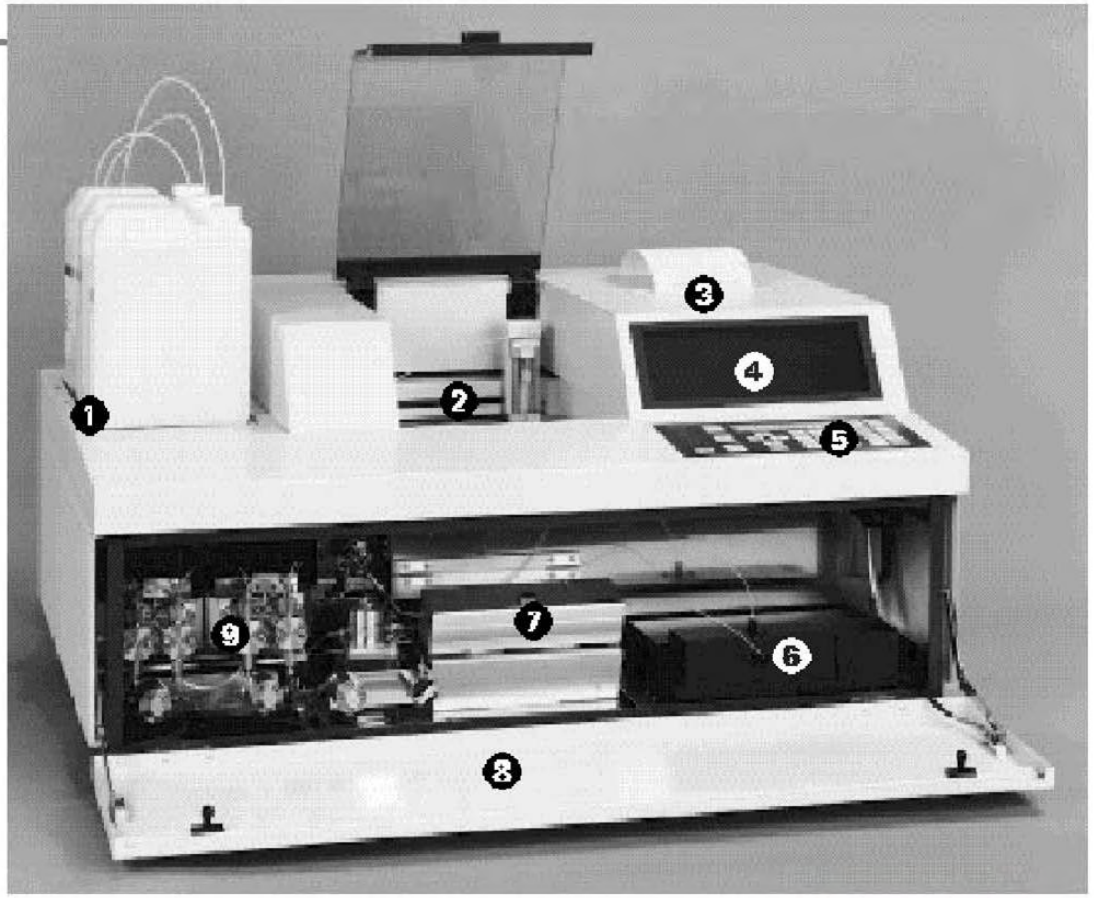
1. The analysers are automated and thus utilise less staff time and permit processing of large hatches.
2. Very small samples (5 landa) are suffIcient for analysis; this is especially useful in paediatric work.
3. Quantification of normal and variant haemoglobins is available on every sample.
4. A provisional identifIcation of a larger proportion of variant haemoglobins can be made.

HPLC Principle.

- Cation-exchange HPLC can be preformed on an automated instrument that can quantify Hb A2, Hb F, Hb A, Hb S, and Hb C.
- Studies show equivalence or superiority over electrophoresis in terms of identification of variant haemoglobins and quantification of HbA2 level.
- Negatively charged carboxyl molecules bound to silica make up the cartridge matrix.

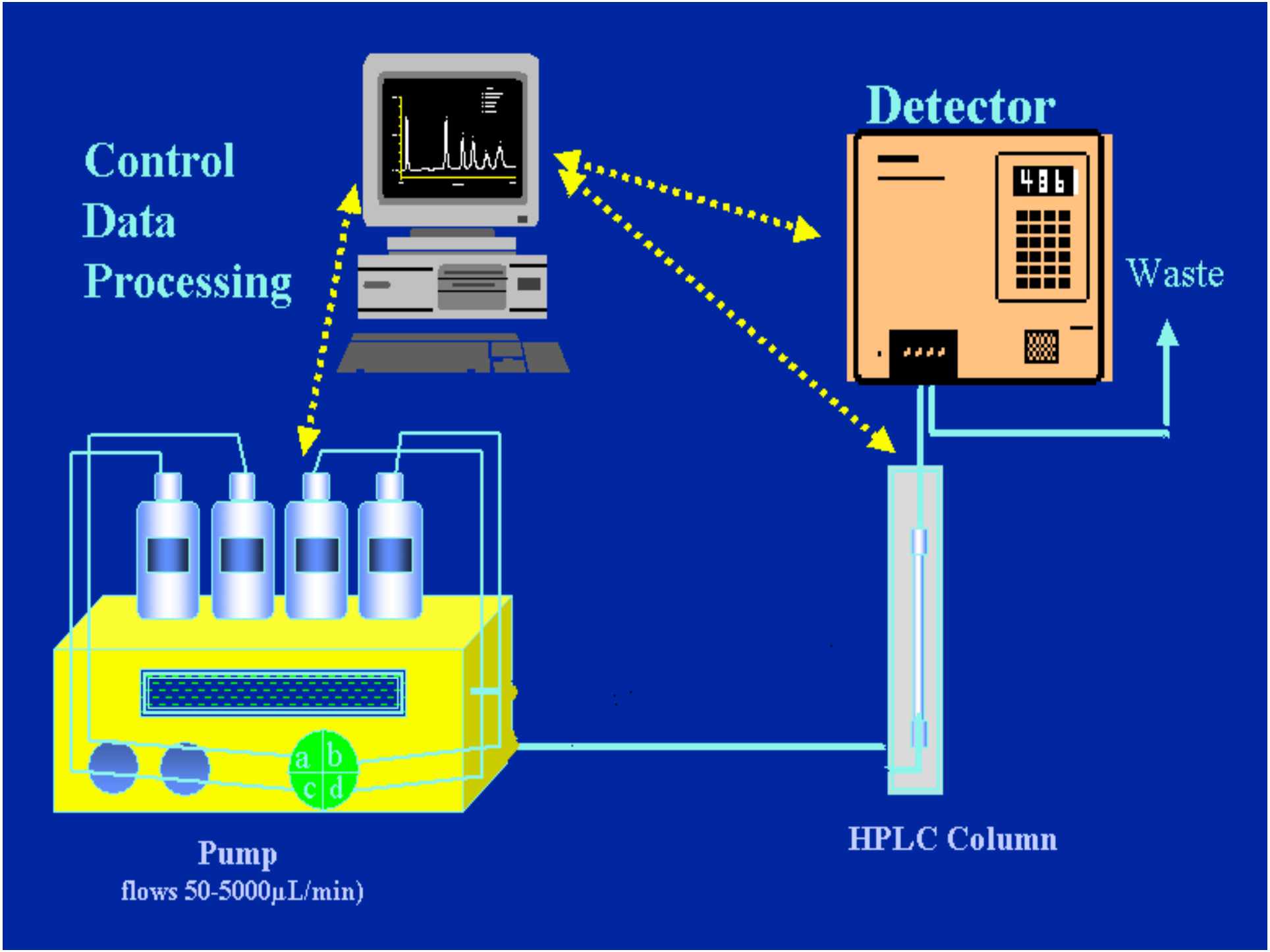
Biorad Variant HPLC

1. Reagent Bottles
2. Autosampler
3. Printer
4. LCD
5. Control Panel
6. Detector
7. Cartridge Thermomodule
8. Front Panel
9. Pump Module

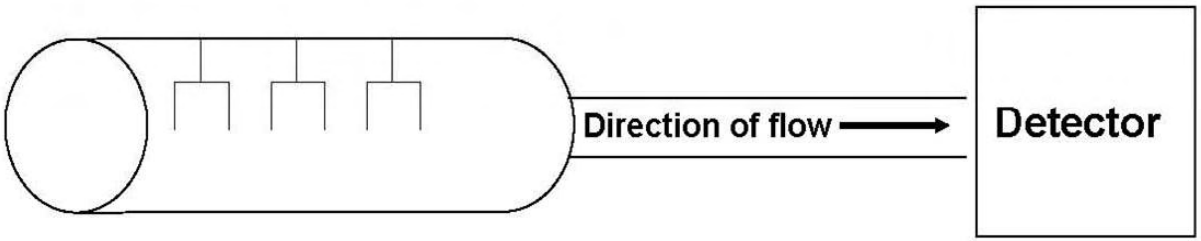


A Gilbert

BIO-RAD

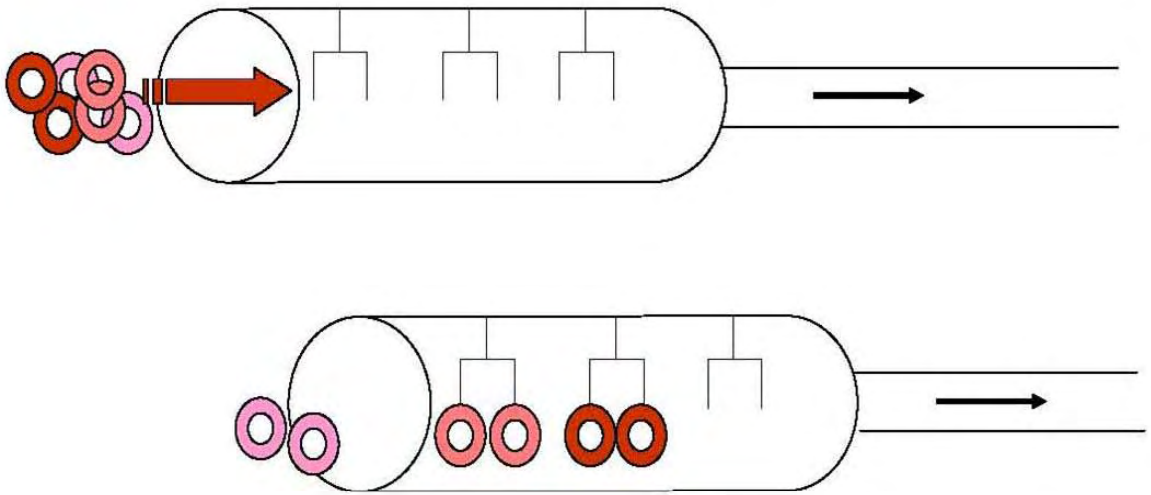

Control
Data
Processing
Detector
Waste
a b
c d
Pump
flows 50-5000µL/min)
HPLC Column

HPLC CARTRIDGE FOR HEMOGLOBIN SEPARATION



- Carboxyl groups attached to silica base ( )

INTRODUCTION OF HAEMOGLOBIN



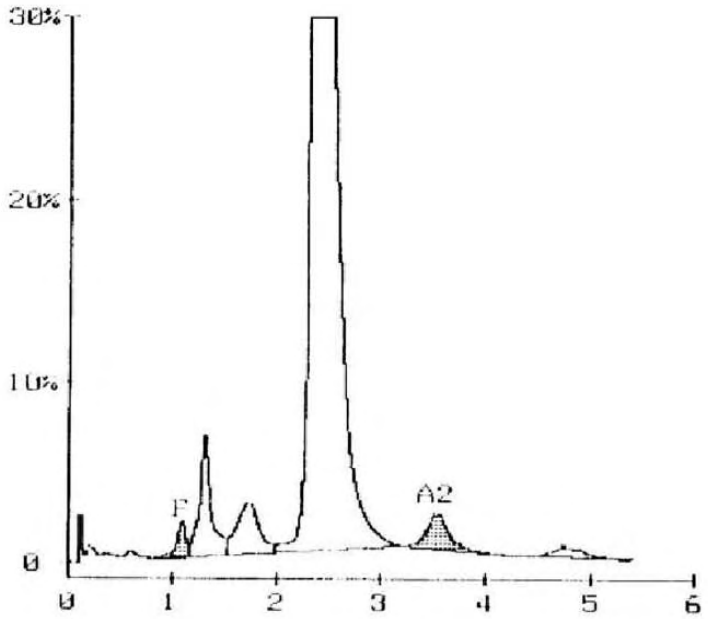
- Positively charged haemoglobins attach to the carboxyl groups at varying strengths

BIO-RAD

Hb A

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	1.2	1.09	22966
P2	5.0	1.30	98779
P3	4.1	1.73	81235
Ao	85.8	2.37	1708029
A2	2.9	3.53	57396
S-WINDOW	1.2	4.73	22962
	TOTAL AREA		1991367

F 1.2% A2 2.9%



BIO-RAD

HPLC Disadvantages.

- Hbs may co-elute or may elute before instrument peak integration.
- HbE, HbOsu Christianbourg, and HbG Copenhagen co-elute with Hb A2, making quantification impossible when these variants present.
- **The measurement of Hb A2 is complicated in individuals with Hb S because the Hb A2 is falsely increased by the presence of Hb S adducts.**

HPLC Disadvantages (2).

- Capillary zone Electrophoretic method can be used to quantify Hb A2 in the presence of Hb S by eliminating interference from these adducts.
- Interference can also be eliminated by the use of micro anion-exchange column methodology.
- **Integration errors** can result in false decreases in the values obtained, although this can be minimized by applying known corrections.

HPLC Disadvantages (3).

- **Haemoglobinopathies cause inappropriately high HbA1c** (HbNiigata, HbSherwood Forest, HbRambam, HbRaleigh).

- **The presence of a structural Hb variant may adversely affect the measurement of HbA1C.**

HPLC Strengths.

- **Method of choice for screening for Hb variants; for quantification of HbA2 + HbF concentrations and mandatory in neonatal screening.**
- Quicker and more sensitive than standard techniques for **detecting HbF** (in diagnosis of HPFH and monitoring sickle cell anemia).
- **Indeed alkaline gel electrophoresis cannot detect HbF in healthy adults or those with marginally increased Hb F.**

HPLC Strengths (2).

- Can be used to characterize rare haemoglobinopathies not well detected with other methods (HbRambam).
-
- **Established role in the diagnosis of thalassaemia and haemoglobinopathies, including with cord blood samples.**

HPLC Strengths (3).

- HPLC should be the primary method for detecting variant hemoglobin's and simultaneous quantitation of HbA2 and HbF.
- This replaces three separate methods:
  - Haemoglobin electrophoresis.
  - Quantitation of HbA2.
  - Quantification of HbF).

Sickle Solubility Tests.

- Works on principle that HbS is insoluble in deoxygenated state forming crystals that refract light and cause the solution to be turbid.
- **Detects HbS at conc. ≥ 20% and differentiates HbD and G which migrate with Hb S on cellulose acetate electrophoresis at alkaline pH.**
- **Positive results are also obtained on samples containing both HbS and beta globulin mutations.**

Sickle Solubility Tests (2).

- **False positives can occur in leukocytosis, hyperprotienemia and unstable hemoglobin states.**
- **False negatives** can occur in patients with anemia or if outdated buffer is used and in infants less than 6 months.
- **All results must be confirmed by the more accurate HbEP or HPLC.**

Immunoassay For Variant Hemoglobin.

- **Kits are available for the immunoassay of HbS, C, E and A.**
- Detect the appropriate hemoglobin down to 5 – 10%.

- These cards however can be unreliable with intermittent failure of the method.

Table 4. Interpretation of haemoglobinopathy carrier testing results

MCH (pg)	Ferritin	Haemoglobin electrophoresis	Interpretation
≥27	Normal	Normal	Thalassaemia unlikely but one gene deletion α-thalassaemia not excluded
	Normal	HbS present	Carrier for sickle cell disease
	Low	Normal	Reduced iron stores or iron deficiency, thalassaemia unlikely but one gene deletion α-thalassaemia not excluded
<27	Normal	HbA_2 increased HbF increased	Carrier for β-thalassaemia
		HbA_2 normal HbH present	Carrier for α-thalassaemia
		HbS present	Carrier for sickle cell disease Possible co-existent thalassaemia carrier state
		Normal	Possible carrier for α-thalassaemia DNA testing indicated
<27	Low	Normal	Iron deficiency Thalassaemia may coexist If woman is pregnant, seek advice about DNA testing; test partner for full haemoglobinopathy screen

DNA Analysis.

- Indicated when the hemoglobinopathy not confirmed by other methods or when the underlying mutation important to management.
- **Other techniques lead to a presumptive identification of the hemoglobinopathy only**.
- For genetic counseling defining the particular mutation or deletion is often required – this is achieved by a variety of molecular techniques.

DNA Analysis (2).

- DNA from WBCs, amniocytes, or chorionic tissue may be utilized for diagnosis of various α and β globin chain abnormalities.
- Southern blot hybridization using restriction enzymes digesting labeled complementary probes define deletional mutations in α and rare β thal.
- PCR amplifies globin genes and utilizes allele specific primers to detect known globin chain mutations eg HbS, E, D, O + several β thal.

DNA Analysis (3).

- PCR can be used to detect unknown mutations.
- Aims to separate amplified DNA on gels or with HPLC on the principle that different amino acids migrate differently.
- **3 primary methods**
- **1-mutation analysis,**
- **2-DNA scanning**
- **3- DNA sequencing.**

Mutation Analysis (2).

- In HK there are 15 common non deletional alpha gene defects and 23 common beta thal mutations.
- HK mutations involve single base mutations and can be simultaneously tested for by printing relevant oligonucleoties onto slides.
- This allows for mass screening.

DNA Scanning.

- Useful when screening large DNA segments or exons for nucleotide changes is necessary due to the possibility of many different mutations.
- Can dissect a gene into discrete fragments eg 500 bp in size allowing mutations to be found in large genes.
- Uses techniques such as SSCP (single stranded conformation polymorphism) and DGGE (denaturing gradient electrophoresis).

DNA Scanning (2).

- Denaturing HPLC is most common and based on different melting temps of hetroduplexes and homoduplexes which can be separated by EP.
- Any putative mutations must be confirmed by DNA sequencing to distinguish mutations from neutral polymorphisms.
- Hemoglobin genes are relatively small (1.6 kb with 3 exons) and DNA sequencing is increasingly accessible hence scanning is less frequently used.

DNA Sequencing.

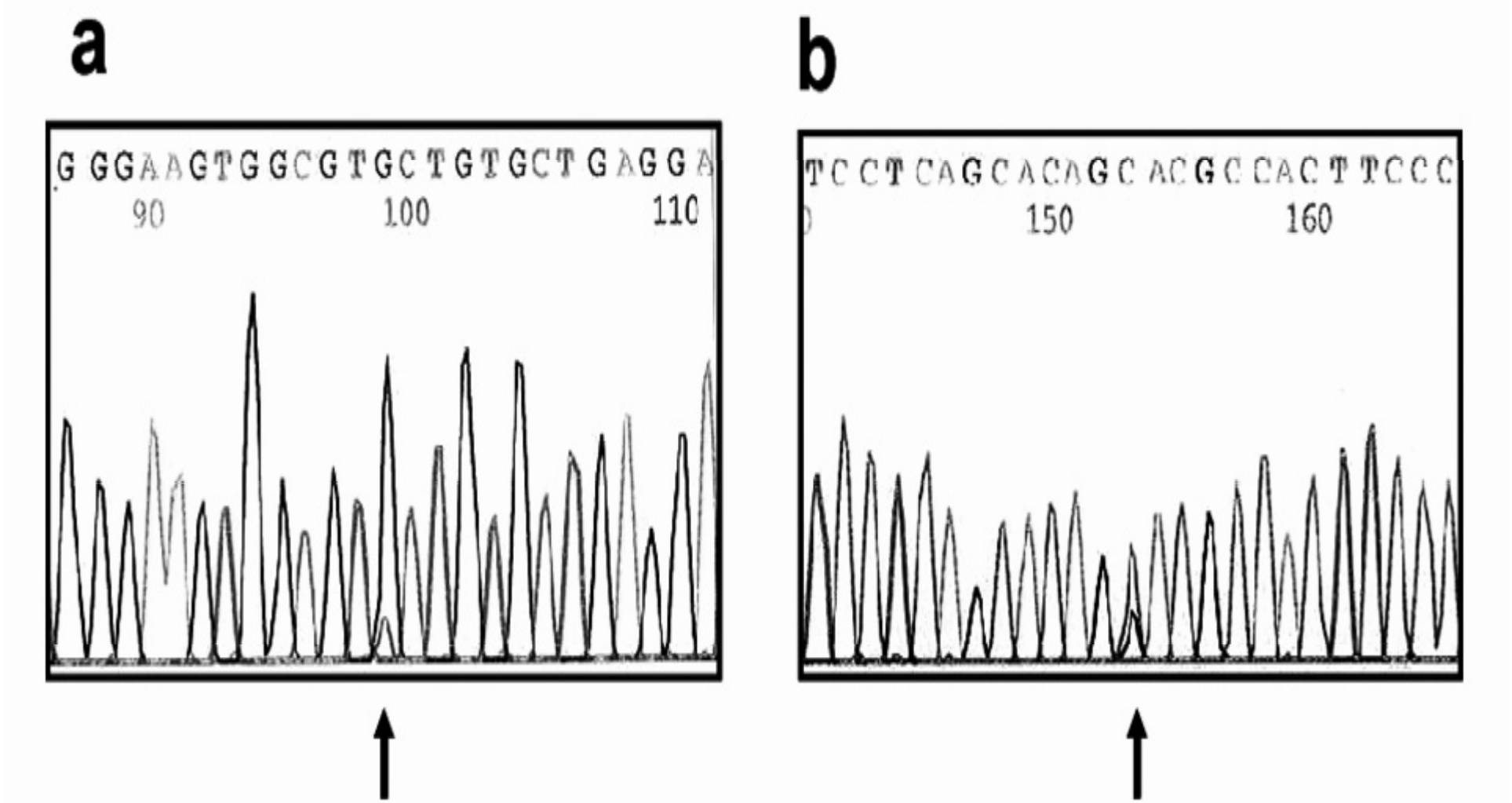
- DNA sequencing is now standard practice for looking for mutations in the beta and alpha globin genes.
- Indicated if mutations are not detectable with the preliminary screening and in difficult cases eg N HbA2 beta thal or silent beta thalassaemia.
- Difficult cases best delineated by direct gene sequencing because a number of causative mutations result in the observed phenotype.

DNA Sequencing (2).

- In beta thalassaemia there can be normal HbA2 so if the mutation absolutely needs to be excluded, DNA sequencing is preferred.
- **Entire sequence of both α genes and most of the β globin gene can be sequenced with four primer sets.**
- **Dye primers or fluorescently labeled M13 primers are used to initiate elongation.**

DNA Sequencing (3).

- In heterozygous thal DNA sequence will show a mutated gene and normal nucleotide base → easy to miss the mutated gene.
- Overcome by sequencing forward and reverse strands but still necessary to visually inspect the sequence → tedious and source of error.
- Becoming cheaper and more accessible, as software is developed to assist in sequence analysis.



DNA sequencing trace (a) forward primer, (b) reverse primer. In the reverse primer it is clear on visual inspection that there is a point mutation with both G and C being present. The forward sequence, when it has been magnified, shows a small “blip” representing the mutant C base under the normal G sequence.

References:

Haemoglobinopathy
Diagnosis
Barbara J. Bain MBBS FRACP FRCPath

منابع فارسی:
سندرمهای تالاسمی و کنترل کیفی در خون شناسی مولف دکتر حبیب الله گل افشان
هموگلوبین در سلامتی و بیماری مولف : دکترلادن حسینی