

Hemoglobin Varyant Analiz Yöntemleri

Okan Dikker*, Müberra Vardar*, Murat Usta**, Hüseyin Dağ***

*S.B. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Kliniği, **Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ***S.B. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği

ÖZ

Amaç: Hemoglobin (Hb) bozuklukları, gerek ülkemizde gerekse dünyada rastlanan en önemli kalıtsal hastalıklardandır. Hemoglobinlerin globin zincirlerinin yapılarındaki aminoasit değişikliği ile oluşan hemoglobinlere anormal hemoglobinler veya kısaca "Hb varyantları" denilmektedir. Anormal hemoglobin varlığının, protein düzeyindeki yöntemler ile belirlenmesini takiben kesin tanı işlemi gen düzeyindeki analizlerin yapılması ile gerçekleştirilmektedir. Bu derlemeyi hazırlamaktaki amacımız, hemoglobin varyant analiz yöntemlerinin tümünü içeren bir veri hazırlamaktır.

Anahtar kelimeler: anormal hemoglobin, hemoglobinopati, talasemi

ABSTRACT

Hemoglobin Variant Analysis Methods

Hemoglobin (Hb) disorders are among the most important hereditary diseases both in our country and in the world. Hemoglobins which result from amino acid change in the structure of globin chains are called abnormal hemoglobins or simply "Hb variants". Following the protein level analysis methods for the determination of the presence of abnormal hemoglobins, the diagnosis is carried out by gene-level analysis. Our purpose for this review is to bring together and present all hemoglobin variant analysis methods.

Keywords: abnormal hemoglobin, hemoglobinopathy, thalassemia

GİRİŞ

Hemoglobinopatiler, gerek ülkemizde gerekse dünyada rastlanılan en önemli kalıtsal hastalıklardandır. Hemoglobinopatiler, hemoglobin (Hb) molekülünün polipeptid zincirlerindeki yapısal değişiklikler veya sentez bozukluklarından kaynaklanan kan hastalıkları olup talasemi ve anormal hemoglobinler olmak üzere iki kısımda incelenmektedirler⁽¹⁾. Talasemiler, hemoglobin yapısındaki globin zincirlerinin birisinin ya da daha fazlasının üretimini azlığı veya yokluğu ile karakterizedir⁽²⁾. Anormal hemoglobinler; nokta mutasyonları, nükleotit eklenmesi, nükleotit çıkması gibi gen değişiklikleri sonucu oluşan anormal yapıdaki hemoglobinlerdir.

Talasemilerin ve anormal hemoglobinlerin tanısı ve taramasında hemoglobin varyantlarının değerlendirilmesinin yanında anemi, mikrositoz ve hipokromi'yi değerlendirebilmek için hemogram verileri öncelikle incelenmelidir. Gerekirse demir durumu kontrol edilebilir. Günümüzde öncelikle HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) analizi ile hemoglobin varyant analizi yapılmaktadır. Kapiller elektroforez, selülöz asetat elektroforezi ve izoelektrik fokuslama yöntem-

lerinde rutinde sık kullanılan yöntemler arasındadır⁽³⁾. Bu yöntemlerin hepsinin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları vardır.

HPLC ve elektroforetik yöntemlerin kullanılması anormal hemoglobinlerin kesin tanısından daha çok bir ön tanısı şeklinde olmaktadır. Bu hemoglobinlerin kesin tanısı gen düzeyindeki yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Genetik çalışmalar tam olarak tanımlanamayan varyantlarda, alfa talasemi sessiz taşıyıcılarının ve beta talasemi sessiz taşıyıcılarının belirlenmesinde ve rutin pratikte yeni varyantların tanımlanmasında kullanılmaktadır⁽⁴⁾.

Hemoglobin Varyant Analiz Yöntemleri

Elektroforetik Yöntemler

Anormal hemoglobinlerin varlığının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri elektroforez yöntemidir. Bu yöntemin temeli, farklı pH değerlerinde değişken yüklere sahip olan hemoglobinlerin elektriksel alandaki hareketlerine dayanmaktadır. Hemoglobinler alkali pH ortamında negatif yüke sahip olup anoda, asit ortamda ise pozitif yüke sahip olup, katota doğru hareket etmektedirler. Farklı yükler kazanan he-

Alındığı Tarih: 10.09.2015

Kabul Tarihi: 05.04.2016

Yazışma adresi: Uzm. Dr. Okan Dikker, S.B. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Kliniği, Şişli / İstanbul

e-posta: okandikker@hotmail.com

mogloblin türleri hem asidik hem de alkali ortamda birbirlerinden ayrılabilirler. Selüloz asetat ve agaroz yapılı membranlara hemoglobin elektroforezi uygulanabilmektedir ⁽⁵⁾. Bu sayede birbirlerinden ayrılan hemoglobin varyantları standart solüsyonlardaki bilinen hemoglobin varyantlarıyla karşılaştırılarak tanımlama yapılabilmektedir.

Selüloz Asetat Hemoglobin Elektroforezi

Alkali pH'da (pH 8.2-8.6) hemoglobin molekülü negatif yüklüdür ve elektriksel ortamda anoda doğru göç ederken hemoglobin yapısı farklı olanlar göç hızlarına göre ayrılırlar. Bu yöntem basit uygulama metodundan dolayı tercih edilebilir ⁽⁶⁾. Bu yöntemle Hb A, Hb E, Hb S/Hb G/Hb D, Hb C/Hb E/Hb O-Arab, Hb H ve daha az rastlanan hemoglobin varyantlarından bazıları tespit edilebilir. Hb S bandı tespit edildiğinde oraklaşma testi ile doğrulanmalıdır. Aksi halde elektroforezde aynı bölgeye ilerleyen ve dolayısıyla aynı yerde band veren Hb D ve Hb G ayırımını yapmak gerekir. Hb C/Hb E/Hb O-Arab tespit edildiğinde; sitrat agar veya agaroz jel gibi asit pH'da ki elektroforetik yöntemler kullanılarak ayırım yapılmalıdır. Hb D-Punjab ve Hb O-Arab ayırımını yapmak için DNA analizi gerekir.

Sitrat Agar Hemoglobin Elektroforezi

Asit pH'da hemoglobin molekülleri pozitif yüklü olup elektriksel ortamda katoda doğru göç ederler ve yüklerine göre birbirlerinden ayrı bölgelere göç ederler. Bu hemoglobin elektroforezi ile Hb C, Hb S, Hb F, ve Hb A türü hemoglobinler birbirinden ayrılırken, Hb S ve Hb D elektroforezde aynı yerde band vermektedirler. Bu nedenden dolayı bazı hemoglobin varyantlarının tanımlanabilmesi için ayrıca bazik agaroz elektroforezi de uygulanması gerekebilir. Bu yöntem günümüzde rutin analizlerde tercih edilmemektedir.

Bazik Agaroz Elektroforezi

Bazik agaroz elektroforezi ile Hb S bandı ve Hb D bandı birbirinden ayrılabilirdiğinden, sitrat agar elektroforezi ile tanımlanamayan hemoglobin türlerinin belirlenebilmesi için bazik agaroz elektroforezi kullanılır. Hb D asidik elektroforez de Hb S ile aynı yerde band veriyorken, bazik elektroforez de Hb A ile aynı yerde band verir ⁽⁷⁾. Bu yöntem de günümüzde rutin analizlerde tercih edilmemektedir.

İzoelektrik Fokuslama Elektroforezi

Bu yöntem, bir pH gradiyetinde yapılan elektroforezdir. (+) ve (-) yüklere sahip hemoglobinler gradient

boyunca izoelektrik noktalarına rastlayan pH'ya kadar göç ederler. İzoelektrik nokta, net elektriksel yükün sıfır olduğu pH değeridir. Farklı hemoglobinler kesin sınırlı bantlar şeklinde konsantre olurlar. Hb varyantlarının, globin zincirindeki amino asitlerin yüklerine bağlı olarak izoelektrik noktaları birbirinden farklıdır. Bu yöntem ile izoelektrik noktaları 0.02 pH ünitesi kadar farklılık gösteren Hb varyantları tanımlanabilmektedir ⁽³⁾. Ayrıca, bir ya da iki alfa globin gen delesyonu olan alfa talasemililerin eritrositlerindeki düşük miktardaki Hb F, izoelektrik fokuslama yöntemi ile tespit edilebilir ve bu yöntem alfa talasemi taraması ve tanısı için maliyet etkin bir yöntemdir ⁽⁸⁾.

Kapiller Elektroforez

Kapiller jel elektroforezinin ayırma mekanizması; jelle doldurulmuş kapillerdeki gözeneklerden geçerek göç eden moleküllerin büyüklükleri arasındaki farka dayanır ⁽⁹⁾. Kapiller elektroforez yöntemi, kapiller izoelektrik odaklama ve kapiller zone elektroforezi olarak Hb varyantlarının, Hb A2 ve Hb F miktar tayini için ticari kitleri bulunan otomatize sistemlerde kullanılabilmektedir ⁽¹⁰⁾.

Elektroforetik yöntem anormal Hb'lerin kesin tanısı için belirleyici bir yaklaşım değildir. Çünkü elektroforezde bazı hemoglobinler birbirlerine benzer elektroforetik davranış gösterip aynı yerde band vermektedirler. Bu davranış biçimleri özellikle prenatal taramada olmak üzere pek çok karışıklıklara neden olabilmektedir ⁽¹¹⁾.

Kromatografik Yöntemler

Kromatografi; bir karışımda bulunan bileşiklerin birbirleri ile karışmayan farklı iki faz arasındaki dağılımlarıyla ayrılmalarını sağlayan fiziksel bir ayırma yöntemidir. Bu fazlardan biri gözenekli bir yatak, tabaka ya da film şeklinde ve genellikle hareketsiz olan sabit faz iken, bir diğeri ise sabit faz boyunca bu fazın üzerinden akan hareketli fazdır ⁽¹²⁾.

İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisinde temel ayırma işlemi, yüklü moleküller ile bu moleküllere zıt yüke sahip olan immobilize iyon değiştirici grupların tersinir adsorpsiyona bağlı olarak gerçekleşmektedir ⁽¹³⁾. Negatif ve pozitif yüklere sahip proteinler olan hemoglobinlerin, bu yüklerinden faydalanılarak iyon değişim kromatografisi ile ayırımı sağlanabilmektedir ve böylece anormal hemoglobinlerin varlığı belirlenebilmektedir. Fakat anormal hemoglobinler için kesin veya ayırıcı bir tanı

söz konusu değildir. Örneğin, kromatografik düzeyde yapılan laboratuvar analizlerinde, Hb S, Hb D-Los Angeles, Hb G-Coushatta ve Hb Beograd benzer davranış göstermektedir ⁽¹¹⁾. Bu yöntem günümüzde rutin analizlerde tercih edilmemektedir.

HPLC Yöntemi (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi/High Performance Liquid Chromatography)

HPLC yöntemi, pek çok normal ve anormal Hb varyantlarının belirlenmesinde ve kantite edilmesinde tercih edilen bir yöntemdir ⁽³⁾. HPLC’de sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutlarının küçültülmesi ile hareketli fazla etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. Çok sıkı doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir basınç uygulanması gerekir. Örnek bileşenleri, sabit faz ile bileşiğin kovalent olmayan etkileşimlerine bağlı olarak kolon boyunca göç ederler. Kolon dolgu maddesi olarak silika matrisi üzerinde anyon değiştirici HPLC’de dietilaminoetil, katyon değiştirici HPLC’de ise karboksimetilselüloz kullanılmaktadır ⁽¹⁴⁾. Yöntem, hareketli fazın kolon içine yüksek basınçla pompalanarak durgun faz, hareketli faz ve örnek arasındaki etkileşimin tipine göre ayrışmanın olması esasına dayanır. Özel kolonlar, duyarlı saptayıcılar ve yüksek akış hızı ile üstün ayırma özelliğine sahiptir ⁽¹⁵⁾.

Ters faz HPLC ve katyon değiştirici HPLC sıklıkla kullanılan iki yöntemdir. Ters faz HPLC’de, Hb zincirlerinin hidrofobitesinden yararlanılarak ayırma sağlanır. Katyon değiştirici HPLC’de ise Hb’nin kolon dolgu maddesine olan afinitesinden yararlanılarak ayırma sağlanır ^(16,17).

HPLC yöntemi hemoglobin varyant analizinde yüksek kesinlik ve doğruluk sağlar. Bu yöntemle hızlı sonuçlar alınır. Özellikle talasemilerde düzeyi önemli olan HbA2 için yüksek doğrulukta bir ölçüm sağlar ⁽¹⁸⁾.

Mikrokolon Kromatografisi ile Hb A2 Tayini

Yöntemdeki temel ayırım mekanizması, hemoglobin molekülü üzerindeki yüklü grupların iyon değiştirici reçine üzerindeki yüklü gruplar arasındaki etkileşime dayanır ⁽¹⁹⁾. Bu yöntem günümüzde rutin analizlerde tercih edilmemektedir.

Kütle Spektrometri Yöntemi

Kütle spektrometreleri, manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek

analizleme esasına göre çalışmaktadırlar ⁽²⁰⁾. İyonlaştırma mekanizmalarındaki farklılıklara göre ESI (elektro spray ionization/elektrosprey iyonlaştırma) veya MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization- time of flight/matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon) kütle spektrometri yöntemleri, rutin Hb analizlerinde uygulabilen yardımcı bir yöntemdir. Bu yöntem, yeni globin zinciri mutasyonlarının keşfini sağlamaktadır ^(3,21). Ayrıca, MALDI-TOF kütle spektrometrisi tek bir eritrositten globin zincir analizi sağlayan son derece hassas bir yöntemdir ⁽²²⁾.

Kimyasal Yöntemler

Alkali Denatürasyon Yöntemiyle Hb F Ölçümü

Hemoglobinler içinde alkaliye en dirençli olanı Hb F’dir. Bu özelliğinden faydalanılarak Hb F düzeyi spektrofotometrik olarak ölçülebilir ⁽¹⁷⁾.

Alkali denatürasyon yöntemi, ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Dezavantajları düşük Hb F düzeylerinde (%0-4) yüksek, yüksek Hb F düzeylerinde (>%6) ise düşük değerler vermesi ve ayrıca %1’in altındaki Hb F düzeylerinin bu yöntem ile ölçülememesidir ⁽²³⁾. Bu yöntem günümüzde rutin analizlerde tercih edilmemektedir.

Oraklaşma Testi

Elektroforezde Hb S bulunan örnekler için Hb D ile ayırım sağlanması amacıyla oraklaşma testi yapılır. Hb S varlığı, oksijensiz bir ortamda, sodyum metabisülfidin varlığında eritrositlerin orak şeklini almasıyla tanımlanır ⁽²⁴⁾.

DNA Analiz Yöntemleri (Gen Düzeyindeki Yöntemler/Moleküler Yöntemler)

DNA Dizi Analizi

Anormal hemoglobinlerin gen düzeyindeki kesin tanısında en çok kullanılan yöntem, DNA dizi analizi yöntemidir. DNA molekülünde belirli bir bölgenin nükleotit diziliminin belirlenmesi anlamına gelen bu yöntemin temeli; 3’ ucunda OH grubu bulunmayan dideoksinitükleotid’lerin (ddNTP) kullanılmasına dayanmaktadır. Yöntemde kalıp olarak kullanılacak DNA, DNA primeri, amplifiye edilecek DNA’nın uzamasını sağlayacak nükleotitler (dNTP), zincir uzamasını 3’ ucunda OH grubu bulunmadığı için sonlandıracak işaretli nükleotitler (ddNTP) ve bu nükleotitleri yeni zinciri oluşturmak için bağlayacak olan bir DNA polimeraz kullanılmaktadır. Sentezlenen her

bir yeni kalıp zincir ucuna 3' ucunda OH bulunmayan ddNTP' nin gelmesi ile uzama durmaktadır. Reaksiyon sonucunda elde edilen DNA parçaları elektroforez yöntemi ile yürütülerek, molekül ağırlığına göre dizi analizi sisteminde en küçük moleküler ağırlığa sahip olan DNA parçası en önde olmak üzere uygun görüntüleyici sayesinde değerlendirme yapılır⁽²⁵⁾. Bu yöntem kullanılarak globin geninin DNA dizisinin incelenmesi yapılarak alfa ve beta talasemilere ait mutasyonlar saptanabilmektedir⁽²⁶⁾.

RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi/Restriction Fragment Length Polimorfizm)

RFLP, anormal hemoglobinlerin gen düzeyinde tanımlanmasında kullanılan yöntemlerden biridir. Restriksiyon enzimleri, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyıp DNA'yı belirli bölgelerden kesen proteinlerdir. Restriksiyon enzimlerinin, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle çoğaltılan genomik DNA'daki kendilerine özgü bölgeleri kesip kesmemesine göre anormal hemoglobinler belirlenebilir. Her bir anormal hemoglobin türü için farklı bir restriksiyon enzimi kullanılmaktadır. Restriksiyon enzimi ile kesilen PCR ürünü, elektroforezde yürütüldükten sonra ultraviyole ışık altında görüntülenerek değerlendirme yapılmaktadır. Çoğu restriksiyon enzimi, kendine özgü DNA bölgesini kesemediğinde anormal hemoglobinin türünün varlığına işaret ederken, bazı restriksiyon enzimleri ise kendine özgü DNA bölgesini kestğinde anormal hemoglobinin türünü işaret etmektedir⁽²⁷⁾. Bu yöntem ile pek çok globin gen mutasyon analizi yapılabilir⁽²⁸⁾.

SPR Spektroskopisi (Yüzey Plasmon Rezonans Spektroskopisi/Surface Plasmon Resonance Spectroscopy)

Anormal hemoglobinlerin gen düzeyinde tanımlanmasına olanak sağlayan bir diğer yöntem ise madde ve ışık etkileşimini temel alan SPR spektroskopisi yöntemidir. Herhangi bir işaretleyici kullanmadan ışık-madde etkileşiminin gerçek zamanlı olarak incelenmesini sağlayan bu yöntemde kullanılan biyosensörlerde, altın tabaka üzerindeki biyomoleküler etkileşimler algılanmaktadır. Altın sensör yüzeyine immobilize edilen hedef biyomoleküllerin diğer biyomoleküller ile bağlanabilme ilgisi, yüzeye gönderilen lazer ışınının saniyedeki açısal değişiminin zamana bağlı grafiği, moleküller arası etkileşimin doğası hakkında bilgi verir. Ayrıca farklı sıcaklıklarda, işaretleyici kullanılmadan yapılan bu çalışmalarla etkileşimin termodinamik özellikleri belirlenebilmektedir⁽²⁹⁻³¹⁾.

Anormal hemoglobinlerin ve talasemilerin belirlenmesinde SPR yöntemi kullanılmaktadır. Beta globin geninin 6. kodonunda glutamik asit yerine valin geçmesiyle oluşan Hb S'nin belirlenmesinde ve beta⁰39(C>T), beta⁰IVS-1(G>A), beta+IVS-1-6(T>C), beta+IVS-1-110(G>A) gibi talasemi mutasyonlarının incelenmesinde SPR yöntemi kullanılmıştır^(31,32).

MLPA Yöntemi (Ligasyona Bağımlı Çoklu Prob Amplifikasyonu/Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification)

MLPA, Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification kelimesinin baş harflerinden oluşmuş olup, ligasyona bağımlı çoklu prob amplifikasyonu anlamına gelmektedir. MLPA yöntemi ile birden fazla gen delesyonu ve duplikasyonu tek bir reaksiyonla tanımlanabilmektedir⁽³³⁾.

Üzerinde çalışılan DNA bölgesindeki gen miktarlarının belirlenmesi amacıyla taşıyan MLPA yöntemiyle, gen bölgelerinde tek veya her iki allelde meydana gelebilecek delesyonların ve duplikasyonların yüzünden oluşan gen ekspresyonlarındaki artış ve azalışlar görüntülenebilmekte ve hesaplanabilmektedir. Uygulamanın kolaylığı, yüksek duyarlılığı, güvenilirliği ve göreceli ucuzluğu bu yöntemin gen düzeyindeki tanımlanmalarında hızlı bir şekilde kabul edilmesini sağlamıştır^(34,35). Bu yöntemle globin gen analizi yapılarak alfa talasemi mutasyonları saptanabilir ve prenatal tanıda efektif olarak kullanılabilir⁽³⁶⁾.

ARMS Yöntemi (Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi/Amplification Refractory Mutation System)

Nokta mutasyonları ya da küçük delesyonları tanımlayabilmek için ARMS yöntemi geliştirilmiştir. Klasik PCR'dan farkı, mutasyona özgü amplifikasyon işlemi yapılarak mutant beta globin geni alellerinin saptanmaya çalışılmasıdır. Mutant beta globin aleline özgü olan primer, sadece mutasyonun olduğu bölgeyi tanıyabilirken, mutasyonun olmadığı bölgeye bağlanamayacak ve çoğaltma işlemi sonuçsuz kalacaktır. Dört adet DNA primerinin tek bir reaksiyon tüpünde kullanılmasıyla beta globin geninin bilinen mutasyonları saptanabilir⁽³⁷⁾.

DNA Mikroarray Yöntemi

Sıklıkla kullanılan geleneksel laboratuvar yöntemleri, genellikle tek bir gen veya proteinin araştırılmasına yöneliktir. Ancak hastalıkların çoğunda birçok gen etkilenmekte ve bu durum birçok faktöre bağlı olarak

oluşmaktadır. DNA mikroarray yöntemi yüzlerce genin ekspresyonunu inceleme olanağı sağlamıştır⁽³⁴⁾. Temeli Northern ve Southern blotting tekniğine dayanan mikroarray teknolojisi ile, hibridizasyon tepkimelerine dayalı yöntemle mutasyon taraması, polimorfizm analizleri ve haritalama yapılabilmektedir⁽³⁸⁻⁴²⁾. Mikroarray yöntemlerinin en önemli avantajları, aynı anda birçok genle ilgili olarak bilgi alınması, hızlı şekilde sonuç elde edilmesi, az sayıda deney yapılması, güvenilir olması ve sistem kurulduktan sonra ucuz olmasıdır⁽⁴³⁾. Bu yöntem ile globin genin mutasyon analizi yapılabilmektedir⁽²⁶⁾.

Alel Spesifik Oligonükleotid Hibridizasyonu/Dot-Blot Analizi

Bu yöntemin temeli; hedef dizinin, birisi mutasyonlu diğeri ise normal DNA dizisi için hazırlanmış olan iki oligonükleotid probu ile hibridizasyonuna dayanır. Yöntemde, belirli mutasyonların sık olarak gözleendiği toplumlarda “dot-blot” veya “reverse dot-blot” şeklinde uygulama ile homozigot, heterozigot ve normal genotipe sahip bireyler kolayca saptanabilir. Normal dot-blot hibridizasyonda DNA örnekleri membrana sabitleştirilirken, reverse dot-blot analizinde oligonükleotid problemleri membrana sabitleştirilmiş durumdadır. Ticari olarak üretilen, “reverse dot-blot” yönteminin kullanıldığı kitler ile toplumlarda sık rastlanılan mutasyonların kolayca tanımlanmasını olası hale getirmiştir⁽⁴⁴⁾. Bu yöntemde normal ve mutasyonlu problemler membrana yerleştirilmiştir. Belirli DNA bölgesi ile hibridizasyon sonucunda normal ve mutant bantlar değerlendirilerek hemoglobinopatilerin tanımlaması yapılabilir. Bu yöntem ile alfa ve beta talasemi mutasyonları saptanabilir⁽⁴⁵⁾. Bu yöntemi kullanarak, ülkemizde rastlanılan alfa globin ve beta globin mutasyonlarının büyük kısmını (%90-95 oranında) tanımlayabilen ticari kitler bulunmaktadır⁽⁴⁶⁾.

Gap-PCR Yöntemi

Tam olarak sınırları bilinen delesyon tipindeki mutasyonların tayininde kullanılabilen ideal yöntemlerden birisidir. Delesyonun olduğu DNA bölgesi, uygun primerler kullanılarak çoğaltılır. Çoğaltılan delesyonlu DNA bölgesindeki diziler normal olanlarla kıyaslandığında daha küçük olduğundan dolayı normal ve mutasyonlu gen ayırımı yapılabilmektedir^(47,48). Beta talasemiye neden olabilen ender görülen beta globin genlerindeki delesyonların, alfa globin genlerindeki delesyonların, delta-beta talasemilerin ve Hb Lepore’un tanısında kullanılabilen, uygulaması kolay ve ucuz bir yöntemdir^(27,45,49).

KAYNAKLAR

1. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. The hemoglobinopathies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th edition. U.S.A: International Edition; 2001, 4571-4627.
2. Harteveld Cornelis L, Higgs Douglas R. α -thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:1-21. <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1172-5-13>
3. Wajcman H, Moradkhani K. Abnormal hemoglobins: detection & characterization. *Indian J Med Res* 2011;134:538-46.
4. Pant L, Kalita D, Singh S, et al. Detection of abnormal hemoglobin variants by HPLC method: Common problems with suggested solutions. *Int Sch Res Notices* 2014; 1-10.
5. Hartwell SK, Srisawang B, Kongtawelert P, Chiristian GD, Grudpan G. Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta* 2005;65:1149-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2004.09.013>
6. Wajcman H. Electrophoretic methods for study of haemoglobins. In: Nagel RL (eds). Methods in molecular medicine. Totowa: Humana Press Inc 2003, 93-100.
7. Alaylı Güngör A, Demir Y, Demir N. Anormal hemoglobinler’in farklı hemoglobin elektroforezleri ile belirlenmesi. *SDU Tıp Fak Derg* 2011;6:40-54.
8. Archana M, Agarwal MD, Roberto H, et al. Identification of one or two alfa-globin gene deletions by isoelectric focusing electrophoresis. *Am J Clin Pathol* 2013;140:301-5. <http://dx.doi.org/10.1309/AJCPF4UIJKH3EOBY>
9. Li SFY. Capillary electrophoresis principles, practice and applications. *J Chrom* 1993;52:1-30.
10. Jenkins M, Ratnaik S. Capillary electrophoresis of hemoglobin. *Clin Chem Lab Med* 2003;1:747-54. <http://dx.doi.org/10.1515/ccm.2003.114>
11. Atalay A, Koyuncu H, Kösel A, Özkan A, Atalay EO. Hb Beograd [β 121(GH4)Glu>Val, GAA>GTA] in the Turkish population. *Hemoglobin* 2007;31:491-3. <http://dx.doi.org/10.1080/03630260701590335>
12. Sheng S, Chen D, Van Eyk JE. Multidimensional liquid chromatography separation of intact proteins by chromatographic focusing and reversed phase of the human serum proteome: optimization and protein database. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:26-34. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.T500019-MCP200>
13. Whitford D. Protein expression, purification and characterization. In: Wiley J (eds). Proteins: Structure and function. England: 2005, 313-346.
14. Hartwell SK, Srisawang B, Kongtawelert P, Christian D, Grudpan K. Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta* 2005;65:1149-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2004.09.013>
15. Aksoy K, Kayrın L, Tuli A, Çürük MA, Atilla G. Anormal hemoglobinler ve talasemi tanısında kullanılan yöntemler. 8. Biyokimya yaz okulu, Adana, 2006.
16. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem* 2000;46:1284-90.
17. Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and he-

- moglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clin Chem* 2004;50:1736-47. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2004.034991>
18. David F, Keren MD, Shalhoub R, Gulbranson R, Hedstrom D. Expression of hemoglobin variant migration by capillary electrophoresis relative to hemoglobin A2 improves precision. *Am J Clin Pathol* 2012;137:660-4. <http://dx.doi.org/10.1309/AJCPOF8V0JJOPSVF>
 19. Yüregir GT, Attila G. Hemoglobinopatiler ve tanı yöntemleri. *ÇÜ Tıp Fak Derg* 1997; 1-18.
 20. Kurban S, Mehmetoğlu İ. Proteomik. *Yeni Tıp Derg* 2010;27:70-5.
 21. Rai DK, Landin B, Alvelius G, Griffiths WJ. Haemoglobin Soderthalje (beta118 Phe→Val): a new mutation in human haemoglobin identified by electrospray ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20:3481-2. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.2746>
 22. Whittall RM, Keller BO, Li L. Nanoliter chemistry combined with mass spectrometry for peptide mapping of proteins from single mammalian cell lysates. *Anal Chem* 1998;70:5344-7. <http://dx.doi.org/10.1021/ac980754k>
 23. Berendt HL, Blakney GB, Clarke GM, Hiqqins TN. A case of beta thalassemia major detected using HPLC in a child of Chinese ancestry. *Clin Biochem* 2000;33:311-3. [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-9120\(00\)00066-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-9120(00)00066-7)
 24. Tahiroğlu M. Hatay-Samandağ yöresindeki liseelerde hemoglobinopati tiplendirilmesi ve bilgilendirilmesi çalışması (Uzmanlık Tezi). Adana, Çukurova Üniversitesi, 2010.
 25. Genç A. Hemoglobin varyantlarının DNA dizi analizi ile belirlenmesi (Doktora Tezi). Adana, Çukurova Üniversitesi, 2005.
 26. Wang S, Zhang R, Xiang G, et al. Mutation screening for thalassaemia in the Jino ethnic minority population of Yunnan Province, Southwest China. *BMJ Open* 2015;5:1-8. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010047>
 27. Çağıl C. Anormal hemoglobinlerin tanısında MLPA tasarımı (Yüksek Lisans Tezi). Denizli, Pamukkale Üniversitesi, 2010.
 28. Cherry L, Calo C, Talmaci R, Perrin P, Gavrilă L. b-Thalassemia haplotypes in Romania in the context of genetic mixing in the mediterranean area. *Hemoglobin* 2015;29:1-12.
 29. Van Wiggeren GD, Bynum MA, Ertel JP, et al. A novel optical method providing for high-sensitivity and high-throughput biomolecular interaction analysis. *Sens Actuators B* 2007;127:341-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2007.04.032>
 30. Barnes WL, Dereux A, Ebbesen TW. Surface plasmon subwavelength optics. *Nature* 2003;424:824-30. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01937>
 31. Atalay EÖ, Üstel E, Yıldız S, Atalay A. SPR (Surface plasmon resonance) based molecular detection of Hb S (beta 6, GAG→GTG) at gene level. *Hemoglobin* 2006;30:1-7. <http://dx.doi.org/10.1080/03630260600755807>
 32. Feriotta G, Breveglieri G, Finotti A, Gardenghi S, Gambari R. Real-time multiplex analysis of four beta-thalassemia mutations employing surface plasmon resonance and biosensor technology. *Lab Invest* 2004;84:796-803. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.3700106>
 33. Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* 2008;29:4627-36. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200800126>
 34. Gonzalez JR, Carrasco JL, Armengol L, et al. Probe-specific mixed-model approach to detect copy number differences using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *BMC Bioinformatics* 2008;9:261. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-261>
 35. Gouas L, Goumy C, Veronese L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tool for the identification of chromosome abnormalities. *Pathol Biol Paris* 2008;56:345-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2008.03.010>
 36. Hao Y, Xu X, Xu Z, et al. Application of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in prenatal diagnosis of α -thalassemia. *Chin J Med Genet* 2015;32:683-6.
 37. Altunkılıç S. Anamur yöresinin talasemi mutasyon tiplendirilmesi (Yüksek Lisans Tezi). Adana, Çukurova Üniversitesi, 2004.
 38. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular biology of cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
 39. Bowden JR, Brennan PA. DNA microarray technology: insights for oral and maxillofacial surgeons. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004;42:542-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S0266-4356\(04\)00155-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0266-4356(04)00155-X)
 40. Bryant PA, Venter D, Robins-Browne R, Curtis N. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2004;4:100-1. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00930-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00930-2)
 41. Fadiel A, Naftolin F. Microarray applications and challenges: A vast array of possibilities. *Int Arch Biosci* 2003; 1111-1121.
 42. Schena M, Davis RW. Genes, genomes, and chips. In: Schena M (eds). DNA microarrays a practical approach. New York: Oxford University Press 2001, 1-16.
 43. Amaratunga D, Cabrera J. Exploration and analysis of DNA microarray and protein array data. New Jersey: Wiley-Interscience; 2004; 23-38.
 44. Gold B. Origin and utility of the reverse dot-blot. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:143-52. <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.3.2.143>
 45. Wang WJ, Xie JD, Wang Q, et al. Genotype analysis of hemoglobinopathy in Chinese Jiangsu population. *Exp Hematol* 2015;23:1742-8.
 46. Cremonesi L, Ferrari M, Giordano PC, et al. An overview of current microarray-based human globin gene mutation detection methods. *Hemoglobin* 2007;31:289-311. <http://dx.doi.org/10.1080/03630260701459366>
 47. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of hemoglobin disorders. *Clin Lab Haem* 2004;26:159-76. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2257.2004.00607.x>
 48. Hartevelde CL, Kleantous M, Traeger-Synodinos J. Prenatal diagnosis of hemoglobin disorders: present and future strategies. *Biochem* 2009;42:1767-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.07.001>
 49. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplexpolymerase chain reaction for alpha-thalassemia. *Blood* 2001;98:250-1. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V98.1.250>