

# XÁC ĐỊNH NGƯỜI LÀNH MANG BIẾN THỂ GEN $\alpha$ -THALASSEMIA BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN

Vương Vũ Việt Hà<sup>1,2</sup>, Trần Thị Huyền Trang<sup>1</sup>, Lê Thị Phương<sup>1</sup>  
Đặng Thị Minh Nguyệt<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Nhã<sup>2</sup> và Trần Văn Khánh<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

<sup>2</sup>Bệnh viện Bưu Điện

Khoảng 5% bệnh  $\alpha$ -thalassemia gây nên do đột biến điểm. Biến thể trên gen HBA1 và HBA2 làm thiếu hụt chuỗi  $\alpha$ -globin cấu thành nên phân tử Hemoglobin. Tùy theo số lượng chuỗi  $\alpha$  bị thiếu hụt mà mức độ biểu hiện lâm sàng của bệnh ở các cấp độ khác nhau. Bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường nên việc xác định người lành mang gen bệnh có ý nghĩa quan trọng trong tư vấn di truyền nhằm giảm tỉ lệ sinh con mắc bệnh trong cộng đồng. Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên mẫu máu của 9 trường hợp nghi ngờ mang gen  $\alpha$ -thalassemia nhưng không phát hiện mất đoạn gen nhằm xác định được người lành mang biến thể gây bệnh trên gen HBA1 và HBA2. Nghiên cứu đã xác định được 4 dạng biến thể trên gen HBA2 ở 9 người mang gen dị hợp trong đó 5/9 người mang biến thể  $-\alpha^{HbCs}$ , 2/9 người mang biến thể  $-\alpha^{HbQs}$ , 1 trường hợp mang biến thể  $c.2delT$  và 1 trường hợp mang biến thể mới  $c.-2C>T$  chưa được báo cáo trên các cơ sở dữ liệu.

**Từ khóa:** người lành mang gen bệnh  $\alpha$ -thalassemia, giải trình tự Sanger, đột biến điểm.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh  $\alpha$ -thalassemia là một trong những bệnh di truyền đơn gen phổ biến nhất hiện nay, là nguyên nhân gây ra thiếu máu hàng đầu ở trẻ em tại Việt Nam, đồng thời Việt Nam cũng là quốc gia có tỷ lệ mắc bệnh cao nhất khu vực Nam Á (51,5%).<sup>1-3</sup>

HBA1 (Hemoglobin subunit  $\alpha 1$ ) và HBA2 (Hemoglobin subunit  $\alpha 2$ ) là 2 gen tổng hợp chuỗi  $\alpha$  globin, mỗi gen gồm 2 alen, nằm trên nhiễm sắc thể số 16. Thông thường, một cá thể sẽ có hai cặp gen  $\alpha$ -globin; hai gen ở mỗi nhiễm sắc thể ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ). Nhưng trong bệnh  $\alpha$ -thalassemia, các biến thể có thể ảnh hưởng một hoặc cả hai gen trong cùng hoặc trên hai nhiễm sắc thể. Hội chứng hemoglobin Bart (Hb Bart) là dạng bệnh  $\alpha$ -thalassemia nặng nhất, gây ra bởi sự mất

hoặc bất hoạt của cả bốn gen  $\alpha$ -globin ( $-\alpha/-\alpha$ ) dẫn đến thiếu máu nghiêm trọng, phù thai, đứa trẻ có thể tử vong trong giai đoạn bào thai (23 - 38 tuần) hoặc ngay sau khi sinh. Dạng thường gặp nhất là bệnh hemoglobin H (HbH), do mất hoặc bất hoạt ba gen  $\alpha$ -globin ( $-\alpha/-\alpha$ ), đứa trẻ bị bệnh do thiếu máu tan máu và có thể phải phụ thuộc truyền máu cả đời. Thông thường, việc sàng lọc, tầm soát bệnh thalassemia trong cộng đồng dựa vào xét nghiệm huyết học và điện di huyết sắc tố. Đặc điểm  $\alpha$ -thalassemia thường biểu hiện mức HbA2 bất thường và/hoặc thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc (MCV < 80fL, MCH < 27pg). Tuy nhiên, mức HbA2 bình thường và các chỉ số máu trong giới hạn không thể loại trừ một người mang bệnh thalassemia vì có những người mang gen không có triệu chứng. Các gen  $\alpha$ -thalassemia được biểu hiện sớm ngay từ khi bào thai phát triển, khác với các gen tổng hợp chuỗi  $\beta$  globin biểu hiện chủ yếu khoảng 6 tháng sau sinh, vì vậy việc sàng lọc, phát hiện sớm người mang gen trong quần

Tác giả liên hệ: Trần Văn Khánh

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 13/10/2022

Ngày được chấp nhận: 03/11/2022

thể dân số đóng vai trò quan trọng trong việc hạn chế sinh ra trẻ mắc bệnh  $\alpha$ -thalassemia.

Cùng với sự phát triển của các phương pháp chẩn đoán ngày càng có nhiều các biến thể mới được phát hiện, hiện nay đã có hơn 800 biến thể  $\alpha$ -thalassemia đã được báo cáo và ghi nhận trên thế giới.<sup>4</sup> Trong đó, hơn 95% nguyên nhân gây ra bệnh  $\alpha$ -thalassemia là do mất đoạn ở các độ dài khác nhau của locus  $\alpha$ -globin, chỉ khoảng 5% còn lại là do đột biến điểm.<sup>1</sup> Nhiều kỹ thuật phân tử đã được phát triển nhằm phát hiện nhanh chóng với độ chính xác các bất thường di truyền gây bệnh  $\alpha$ -thalassemia như Dot blot, Gap-PCR, MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) và giải trình tự DNA.<sup>5</sup> Tuy chỉ chiếm phần nhỏ hiếm gặp, các trường hợp đột biến điểm gây bệnh  $\alpha$ -thalassemia có thể bị bỏ sót khi các phương pháp sàng lọc thông thường không phát hiện được. Giải trình tự DNA được coi là một phương pháp tiêu chuẩn vàng để xác định các đột biến điểm mới, chưa được báo cáo. Đặc biệt, giải trình tự Sanger là phương pháp toàn diện để phát hiện hầu hết các đột biến điểm, biến thể mất đoạn nhỏ hoặc lặp đoạn nhỏ mà không cần thiết kể các kỹ thuật đặc hiệu cho từng biến thể. Xuất phát từ thực tiễn trên, nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục tiêu: “Xác định người lành mang gen  $\alpha$ -thalassemia bằng kỹ thuật giải trình tự gen”.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

- Nhóm chứng: 5 người khỏe mạnh, có công thức máu bình thường, tiền sử gia đình không có người bị thiếu máu.

- Nhóm nghiên cứu:

*Tiêu chuẩn lựa chọn:* 9 trường hợp thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc (MCH < 27pg ; MCV < 80fL), điện di huyết sắc tố nghi ngờ mang gen  $\alpha$  và không phát hiện được bất thường gen bằng các kỹ thuật Gap-PCR hoặc MLPA.

*Tiêu chuẩn loại trừ:* thiếu máu do thiếu sắt.

Mẫu nghiên cứu được thu thập tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Bưu Điện và thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử phân tích biến thể gen tại Trung tâm nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

### 2. Phương pháp

Kỹ thuật tách chiết DNA: DNA được tách từ mẫu máu toàn phần bằng bộ kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit của hãng Promega, Hoa Kỳ. Quy trình tách chiết tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA sau tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp đo quang trên máy NanoDrop: nồng độ DNA 80 - 200 ng/ $\mu$ l, đánh giá độ tinh sạch bằng tỷ lệ A260/A280 = 1,8 - 2,0.

b. Phản ứng PCR mỗi đôi khuếch đại toàn bộ gen *HBA1* và *HBA2*

**Bảng 1. Trình tự mỗi của kỹ thuật giải trình tự gen *HBA1* và *HBA2***

STT	Tên mỗi	Trình tự	Ghi chú
1	$\alpha$ AT - C1F	TGGAGGGTGGAGACGTCCTG	
2	AT2 - C3R	CCATTGTTGGCACATTCCGG	Mỗi PCR
3	$\alpha$ 1AT1 - C9R	CCATGCCTGGCACGTTTGCTGAGG	
4	$\alpha$ AT - C7F	GATGTTCTGTCTTCCCCA	
5	$\alpha$ AT - R4F	AGCCACTGCCTGCTGGTGAC	Mỗi giải trình tự
6	$\alpha$ AT - IP3R	ACCATACTCGCCAGCGTGCGC	

STT	Tên môi	Trình tự	Ghi chú
7	$\alpha$ AT - C5R	CGCGTCGGCCACCTTCTTGC	Môi giải
8	$\alpha$ AT - IP2R	TGTGCGCGTGCAGGTCGCTCA	trình tự

Cặp môi  $\alpha$ AT-C1F và AT2-C3R có kích thước 1078bp khuếch đại gen *HBA2*; cặp môi  $\alpha$ AT-C1F và  $\alpha$ 1AT1-C9R có kích thước 1093bp khuếch đại gen *HBA1*. Sau khi có sản phẩm PCR có thể dùng các môi nằm trong vùng gen *HBA1* và *HBA2* để giải trình tự gen (thứ tự 4 - 8 như bảng 1). Các môi được tham khảo theo nghiên cứu của Annie Chow năm 2013.<sup>6</sup>

c. Thành phần phản ứng PCR có tổng thể tích 20  $\mu$ L gồm: DNA (50 - 100ng), môi F và R (5 $\mu$ M mỗi môi), GoTaq Hot Start Master Mix 2X, DMSO 10% và nước siêu tinh khiết. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/5 phút, [94°C/30 giây, 60°C/30 giây, 72°C/60 giây] x 35 chu kỳ, 72°C/5 phút, giữ sản phẩm PCR ở 15°C.

d. Tinh sạch sản phẩm PCR (ExoSAP-IT PCR product Cleanup Reagent, Thermo, Hoa Kỳ).

e. Giải trình tự sản phẩm bước 4 với máy SeqStudio Genetic Analyzer 3500; BigDye Terminatorv3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher, Hoa Kỳ).

f. Tinh sạch sản phẩm bước bằng ethanol và tái huyền phù với dung dịch Hi-Di™ Formamide. Điện di mao quản bằng SeqStudio Genetic Analyzer 3500.

g. Sử dụng phần mềm CLC Sequencing Analysis Software v6 để phân tích trình tự gen và sử dụng công cụ Mutation taster (<http://www.mutationtaster.org/>) và CAAD (<https://cadd.gs.washington.edu/>) để dự đoán khả năng gây bệnh của biến thể mới. Đối với CAAD, sử dụng điểm số, các giá trị  $\leq 10$  được phân loại là lành tính và những giá trị  $> 10$  được phân loại là gây bệnh.

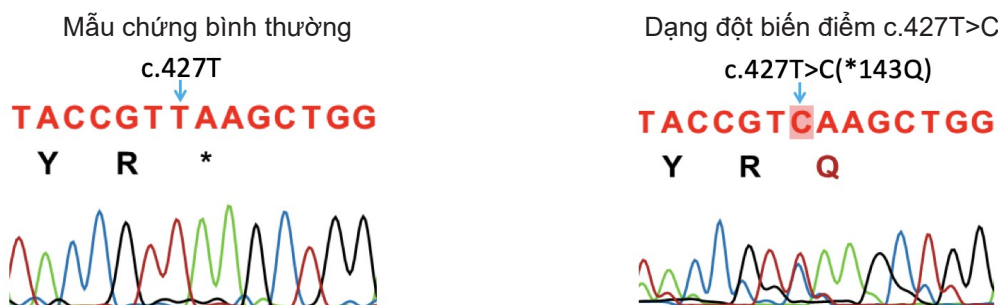
mutaciontaster.org/) và CAAD (<https://cadd.gs.washington.edu/>) để dự đoán khả năng gây bệnh của biến thể mới. Đối với CAAD, sử dụng điểm số, các giá trị  $\leq 10$  được phân loại là lành tính và những giá trị  $> 10$  được phân loại là gây bệnh.

### 3. Đạo đức nghiên cứu

Những người mang biến thể gen bệnh  $\alpha$ -thalassemia tham gia vào nghiên cứu này một cách tự nguyện. Họ được thông báo kết quả xét nghiệm gen và bảo mật thông tin cá nhân. Đề tài nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội, tại quyết định số 470/GCN-HĐĐĐNCYSH-ĐHYHN ngày 15/5/2021.

## III. KẾT QUẢ

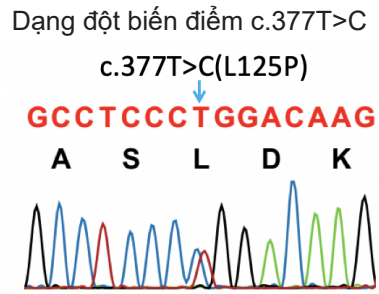
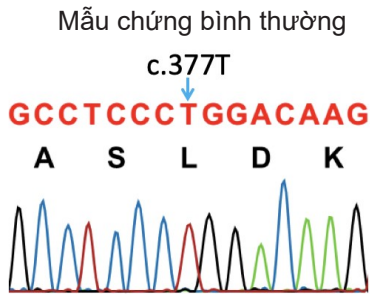
Áp dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger bao gồm các vùng mã hóa trên gen *HBA1*, *HBA2*, vùng ranh giới exon - intron và vùng cận promoter, trên 9 trường hợp thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc, phát hiện 4 dạng đột biến điểm khác nhau đều nằm trên gen *HBA2*, trong đó 5/9 người mang biến thể  $-\alpha^{HbCs}$ , 2/9 người mang biến thể  $-\alpha^{HbQs}$ , 1 trường hợp mang biến thể c.2delT và 1 trường hợp mang biến thể mới c.-2C>T chưa được báo cáo trên các cơ sở dữ liệu. Kết quả phân tích từng biến thể được thể hiện trong hình 1 - 4.



Hình 1. Biến thể *HBA2*:c.427T>C(p.Stop143Gln) (Hb Constant Spring)

4 trường hợp mang biến thể dị hợp tử c.427T>C(p.Stop143Gln) trên gen *HBA2*. Mũi tên chỉ biến thể thay thế T thành C trên exon

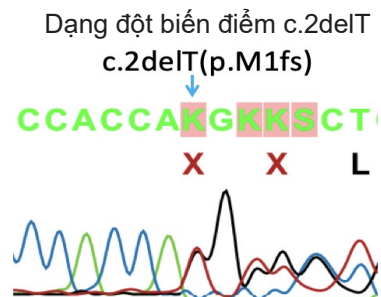
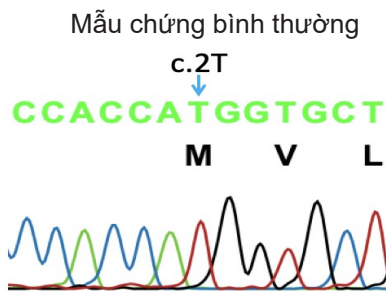
3 của gen *HBA2* làm thay đổi codon kết thúc thành amino acid Glutamin, tạo thành Hb Constant Spring.



**Hình 2. Biến thể sai nghĩa *HBA2*:c.377T>C (p.Leu126Pro)**

2 trường hợp mang biến thể dị hợp tử c.377T>C trên gen *HBA2*. Mũi tên chỉ biến thể thay thế nucleotid T thành C trên exon 3 của

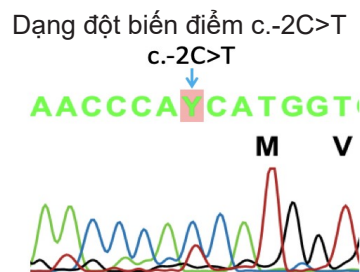
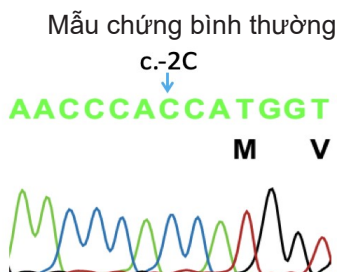
gen *HBA2* làm thay đổi acid amin Lysin thành Prolin, tạo thành Hb Quang Sze (HBQS).



**Hình 3. Biến thể *HBA2*:c.2delT (p.Met1fs)**

1 trường hợp mang biến thể dị hợp tử c.2delT(p.Met1fs) trên gen *HBA2*. Mũi tên chỉ đột biến mất 1 nucleotid T trên gen *HBA2*, gây

ra biến đổi mã mở đầu (AUG) Methionin thành Agrinin (AGG), tạo biến thể dịch khung.



**Hình 4. Biến thể *HBA2*:c.-2C>T**

1 trường hợp mang biến thể dị hợp tử c.-2C>T trên gen *HBA2*, mũi tên chỉ biến thể thay thế nucleotid C thành T ở vùng intron.

**Bảng 2. Đặc điểm công thức máu của người bệnh**

Dạng biến thể	Tần số (n = 9)	Kết quả công thức máu trung bình		Kết quả điện di HST	
		MCV (fL)	MCH (pg)	HbA1 (%)	HbA2 (%)
$-\alpha^{HbCs}$	5	71,5 ± 12,8	24,8 ± 4,9	96,8 ± 1,7	3,2 ± 1,8
$-\alpha^{HbQs}$	2	74,9 ± 4	23,8 ± 1,6	97,2 ± 0,2	2,6 ± 0,07
<i>HBA2:c.2delT</i>	1	75	24,1	97,4	2,6
<i>HBA2:c.-2C&gt;T</i>	1	63,9	15,8	98,3	1,7

9 trường hợp trong nghiên cứu đều có tình trạng thiếu máu nhược sắc hồng cầu nhỏ (MCV < 80fL, MCH < 27pg), không xuất hiện huyết sắc tố (HST) bất thường. Trong đó, 1 người mang biến thể HbCs có chỉ số thấp nhất (MCV = 59,9fL; MCH = 58,8pg), tỷ lệ HbA2 tăng (HbA2 = 5,1%), nhưng không có triệu chứng lâm sàng.

#### IV. BÀN LUẬN

Nhờ sự phát triển vô cùng mạnh mẽ của các kỹ thuật phân tử, đặc biệt là giải trình tự, ngày càng có nhiều các biến thể mới được phát hiện trên gen  $\alpha$  globin, hiện nay đã có 366 biến thể được phát hiện trên gen  $\alpha 1$  và 464 biến thể trên gen  $\alpha 2$ .<sup>7</sup> Kỹ thuật giải trình tự đang được áp dụng rộng rãi hơn để tầm soát bệnh  $\alpha$  thalassemia, đặc biệt đối với các trường hợp mang gen bệnh thể ẩn hiếm gặp có thể bị bỏ sót khi chỉ sử dụng các phương pháp sàng lọc thông thường. Việc xác định chính xác và chẩn đoán phân biệt các biến thể có ý nghĩa lâm sàng đóng vai trò quan trọng trong sàng lọc, tiên lượng cũng như tư vấn di truyền. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 4 dạng đột biến điểm hiếm gặp trên gen *HBA2* đã được phát hiện bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Các biến thể trên gen  $\alpha$  ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp protein, dẫn đến không hoặc suy giảm tổng hợp, hoặc tạo chuỗi  $\alpha$  globin không bền vững.<sup>4</sup> Các biến thể này phân bố với tần suất khác nhau ở các dân tộc và khu vực khác

nhau ở Việt Nam.<sup>8</sup>

Các nghiên cứu trước đây trên thế giới đã chỉ ra rằng hầu hết các đột biến điểm gây bệnh  $\alpha$  thalassemia đều xảy ra trên gen  $\alpha 2$ , và không gây ra sự thay đổi nào với những gen còn lại. Do gen  $\alpha 2$  có vai trò gấp đôi gen  $\alpha 1$  trong quá trình sản xuất chuỗi  $\alpha$  globin, nên các biến thể trên gen  $\alpha 2$  thường dẫn đến các hậu quả nghiêm trọng hơn so với cùng biến thể đó nếu nằm trên gen  $\alpha 1$ .<sup>9</sup>

Hb Constanst Spring (HbCs) là dạng đột biến điểm thường gặp nhất trên gen  $\alpha$ . Đây là loại Hb bất thường do đột biến điểm tại codon kết thúc của gen *HBA2* gây nên, làm thay đổi TAA>CAA, dẫn tới thêm vào trình tự chuỗi  $\alpha$  globin bình thường 31 amino acid. Do đó, mRNA trở nên rất không bền vững, và làm giảm khả năng tổng hợp thành chuỗi  $\alpha$  globin. Phân tử Hb này cũng không bền, nồng độ của chúng trong máu ngoại vi rất nhỏ và khó để có thể phát hiện được nhất là trong trường hợp biến thể dị hợp tử.<sup>1</sup> Người mang biến thể dị hợp tử của loại biến thể này thường có lâm sàng và chỉ số huyết học bình thường. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 5/9 trường hợp đã được phát hiện mang dị hợp biến thể HbCs và không có thiếu máu trên lâm sàng. Tuy nhiên, trong đó 1 trường hợp có chỉ số huyết học giảm rõ rệt (MCV = 59,9fL; MCH = 58,8pg), nhưng tỷ lệ HbA2 tăng (HbA2 = 5,1%). Ngoài ra, khi kết

hợp với biến thể mất đoạn --<sup>SEA</sup> có thể gây ra bệnh HbH, vì vậy, việc xác định các biến thể này đóng vai trò rất quan trọng trong việc tư vấn di truyền trước sinh và sàng lọc, chẩn đoán trước sinh. Ở Việt Nam, một số nghiên cứu gần đây cũng phát hiện tỉ lệ biến thể này hay gặp ở cộng đồng người dân tộc thiểu số như dân tộc Cơ Tu.<sup>10</sup>

Hemoglobin Quang Sze (HbQs) là một dạng biến thể không mất đoạn ít phổ biến hơn trên gen *HBA2*, trong đó acid amin Leucine thay thế Proline (CTG → CCG, codon 125). Người bệnh của tình trạng này cũng bị thiếu máu mức độ nhẹ đến trung bình. Hb Qs là biến thể hemoglobin không ổn định được ghi nhận hầu hết ở miền Nam Trung Quốc và Thái Lan. Đây là một trong những alen chính gây ra HbH ( $\beta_4$ ) không mất đoạn ở dân số Trung Quốc khi kết hợp với biến thể --<sup>SEA</sup>.<sup>11</sup> Ở nghiên cứu này, 2 người bệnh được phát hiện mang dạng biến thể HbQS dị hợp tử và giảm nhẹ chỉ số MCV và MCH (MCV, MCH trung bình lần lượt là  $74,8 \pm 4,03$ fL và  $23,7 \pm 1,6$ pg). 2 trường hợp này có đặc điểm lâm sàng và chỉ số huyết học tương tự như các ca lâm sàng đã được báo cáo trước đây.

Biến thể c.2delT đã được báo cáo là biến thể gây bệnh theo cơ sở dữ liệu Clinvar.<sup>12</sup> Đây là biến thể mất một nucleotid (T) tại codon ATG, là codon đầu tiên ở exon 1 gen  $\alpha 2$  làm thay đổi acid amin mở đầu Methionin.<sup>1</sup> Do vậy, biến thể có thể gây ra sự thiếu hụt protein chức năng tương ứng được tổng hợp. Biến thể này được báo cáo chủ yếu ở các trường hợp mắc bệnh HbH, tuy nhiên hiện nay có rất ít các ca bệnh  $\alpha$ -thalassemia do biến thể này được ghi nhận. Trong nghiên cứu, chúng tôi phát hiện 1 trường hợp người lành mang dị hợp tử biến thể này, không có triệu chứng thiếu máu và chỉ số MCV, MCH giảm nhẹ. Nhiều trường hợp  $\alpha$ -thalassemia do các biến thể hiếm gặp không

phát hiện được bằng các kỹ thuật sàng lọc thông thường dẫn đến rất dễ bỏ sót khi sàng lọc trước sinh. Vì vậy vai trò của kỹ thuật giải trình tự trong sàng lọc, chẩn đoán  $\alpha$ -thalassemia đặc biệt là đối với trường hợp hiếm gặp là rất quan trọng, cần được cân nhắc khi người bệnh có chỉ số huyết học bất thường.

Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện 1 trường hợp dị hợp tử c.-2C>T trên gen *HBA2*, đây là biến thể mới chưa được báo cáo trên các hệ thống cơ sở dữ liệu như Ithasnet, Clinvar, HbVar, HGMD và LOVD. Vị trí biến thể xảy ra tại vùng 5'UTR (5' untranslated region), đây là vùng trình tự để mRNA gắn vào trước khi bắt đầu quá trình dịch mã. 5'UTR bắt đầu từ vị trí khởi đầu phiên mã đến nucleotid đầu tiên của codon mở đầu dịch mã, chính vì vậy đây là vùng trình tự rất quan trọng trong điều hoà quá trình dịch mã ở sinh vật nhân thực. Khi sử dụng công cụ Mutation Taster và CAAD để dự đoán khả năng gây bệnh của biến thể mới này, kết quả đều cho thấy biến thể có thể gây bệnh (disease causing) với điểm CAAD là 11,09 (> 10).<sup>13,14</sup> Trường hợp này có chỉ số MCV, MCH giảm rõ rệt (MCV = 63,9fL, MCH = 15,8pg) nhưng không có triệu chứng lâm sàng, tỷ lệ HbA2 giảm nhẹ (1,7%). Mặc dù chưa thể khẳng định chắc chắn vai trò gây bệnh của biến thể này, tuy nhiên sự phát hiện biến thể mới càng khẳng định vai trò của kỹ thuật giải trình tự trong quá trình sàng lọc biến thể hiếm gặp ở người lành mang gen, đóng góp vào hệ thống cơ sở dữ liệu biến thể gây bệnh  $\alpha$  thalassaemia trên thế giới.

## V. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật giải trình tự, nghiên cứu đã phát hiện 4 dạng biến thể trên gen *HBA2* ở 9 trường hợp là người lành mang gen bệnh  $\alpha$ -thalassemia bao gồm: 5 trường hợp mang biến thể  $-\alpha^{HbCs}$ , 2 trường hợp mang biến thể  $-\alpha^{HbQs}$ , 1 trường hợp mang biến thể *HBA2*:c.2delT và 1 trường hợp mang biến thể mới *HBA2*:c.-2C>T

chưa được báo cáo trên các cơ sở dữ liệu như Ithanel, HbVar, Clinvar, HGMD và LOVD.

## VI. KHUYẾN NGHỊ

Một số trường hợp mang đồng thời biến thể trên gen  $\alpha$  và gen  $\beta$  globin dẫn đến thay đổi chỉ số huyết học nặng nề hơn so với người mang gen  $\alpha$  đơn thuần, vì vậy trong những trường hợp này cần thực hiện thêm các xét nghiệm phát hiện biến thể gen  $\beta$  globin.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kalle Kwaifa I, Lai MI, Md Noor S. Non-deletional alpha thalassaemia: A review. *Orphanet J Rare Dis.* 2020;15(1). doi: 10.1186/S13023-020-01429-1.
2. Ngo DN, Ly TTH, Ngo TTN, et al. AB123. Carrier screening and prenatal diagnosis for  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia in pregnancies at risk in National Hospital of Pediatrics, Vietnam. *Ann Transl Med.* 2015;3(Suppl 2). doi: 10.3978/J.ISSN.2305-5839.2015.AB123.
3. Goh LPW, Chong ETJ, Lee PC. Prevalence of Alpha ( $\alpha$ )-Thalassemia in Southeast Asia (2010-2020): A Meta-Analysis Involving 83,674 Subjects. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(20):1-11. doi: 10.3390/IJERPH17207354.
4. Database statistics. The Globin Gene Server - Leiden Open Variation Database. Accessed September 3, 2022. [https://lovd.bx.psu.edu/variants\\_statistics.php](https://lovd.bx.psu.edu/variants_statistics.php).
5. Vijian D, Wan Ab Rahman WS, Ponnuraj KT, Zulkafli Z, Mohd Noor NH. Molecular Detection of Alpha Thalassemia: A Review of Prevalent Techniques. *Medeni Med J.* 2021;36(3):257-269. doi: 10.5222/MMJ.2021.14603.
6. Chow A, Ghassemifar R, Finlayson J. Alpha thalassaemia due to non-deletional mutations on the -3.7 alpha globin fusion gene: Laboratory diagnosis and clinical importance. *Pathology.* 2013;45(6):591-594. doi: 10.1097/PAT.0b013e32836526d7.
7. A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemia mutations. Summaries of mutation categories. Accessed September 7, 2022. <https://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>.
8. Anh TM, Sanchaisuriya K, Kieu GN, et al. Thalassemia and Hemoglobinopathies in an Ethnic Minority Group in Northern Vietnam. *Hemoglobin.* 2019;43(4-5):249-253. doi: 10.1080/03630269.2019.1669636.
9. Farashi S, Hartevelde CL. Molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2018;70:43-53. doi: 10.1016/J.BCMD.2017.09.004.
10. Nguyen VH, Sanchaisuriya K, Wongprachum K, et al. Hemoglobin Constant Spring is markedly high in women of an ethnic minority group in Vietnam: a community-based survey and hematologic features. *Blood Cells Mol Dis.* 2014;52(4):161-165. doi: 10.1016/J.BCMD.2013.12.002.
11. Yang Y, Lou JW, Liu YH, He Y, Li DZ. Screening and diagnosis of Hb Quong Sze HBA2: c.377T > C (or HBA1) in a prenatal control program for thalassemia. *Hemoglobin.* 2014;38(3):158-160. doi: 10.3109/03630269.2014.910669.
12. Clinvar. The HBA2:c.2delT variant is considered to be pathogenic in Clinvar. Accessed September 5, 2022. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/15692/?new\\_evidence=false](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/15692/?new_evidence=false)
13. Clinvar. The HBA2:c.2delT variant is considered to be pathogenic in Clinvar. Accessed September 5, 2022. <https://www.mutationtaster.org/MT69/MutationTaster69.cgi>
14. CADD - Combined Annotation Dependent Depletion. Accessed September 6, 2022. <https://cadd.gs.washington.edu/snv>.

## Summary

# CARRIER SCREENING OF ALPHA THALASSEMIA USING SEQUENCING METHOD

About 5% of  $\alpha$ -thalassemia is caused by point mutations of *HBA1* and *HBA2* genes, causing a deficiency in the  $\alpha$ -globin chain that makes up the hemoglobin molecule. The clinical manifestations of  $\alpha$ -thalassemia varied depending on the number of missing  $\alpha$  chains. The disease is inherited autosomal recessive disorder, so the identification of healthy people carrying the recessive allele is important for genetic counseling about the disease in the community. By using DNA sequencing, we examined the blood samples of 9 cases suspected of carrying the  $\alpha$ -thalassemia gene. There was no detected deletion variants to identify non-deletional mutations of *HBA1* and *HBA2* genes. 4 types of non-deletional mutations of the *HBA2* gene were identified in 9 heterozygous carriers, of which 5/9 carriers having variant  $-\alpha^{\text{HbCs}}$ , 2/9 carriers having variant  $-\alpha^{\text{HbQs}}$ , 1/9 carrier having variant c.2delT, and 1/9 carrier having a novel variant c.-2C>T that was not in the databases.

**Keywords:**  $\alpha$ -thalassemia carriers, Sanger sequencing, non-deletional mutation.