

# XÁC ĐỊNH NGƯỜI LÀNH MANG BIẾN THỂ GEN GÂY BỆNH $\beta$ -THALASSEMIA BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN SANGER VÀ KỸ THUẬT MLPA

Vương Vũ Việt Hà<sup>1,2</sup>, Hoàng Thị Hải<sup>2</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

Bệnh Thalassemia là bệnh di truyền phổ biến nhất trên thế giới. Ước tính tỷ lệ mang gen thalassemia trung bình trong cộng đồng tất cả các dân tộc Việt Nam là 13,8%.  $\beta$ -thalassemia thể nặng có biểu hiện thiếu máu tan máu nặng, ảnh hưởng đến khả năng sống, chất lượng sống của người bệnh. Việc sàng lọc, chẩn đoán sớm người bệnh, người mang gen trong cộng đồng đóng vai trò quan trọng giúp hạn chế sinh ra trẻ mắc bệnh  $\beta$ -thalassemia. Nhiều kỹ thuật phân tử đã được phát triển nhằm phát hiện đột biến gây bệnh  $\beta$ -thalassemia trong đó giải trình tự DNA là tiêu chuẩn vàng để xác định các đột biến điểm và MLPA dùng để xác định đột biến mất đoạn/lặp đoạn. Với mục tiêu phát hiện các biến thể gen HBB gây bệnh  $\beta$ -thalassemia ở người lành mang gen bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger và kỹ thuật MLPA, nghiên cứu tiến hành trên 102 trường hợp thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc, điện di huyết sắc tố nghi ngờ mang biến thể gây bệnh trên gen  $\beta$ -globin đã loại trừ thiếu máu thiếu sắt. Kết quả đã xác định được 102 trường hợp đều mang đột biến gây bệnh trên gen HBB, trong đó 97% là đột biến điểm và 3% là đột biến mất đoạn, các loại đột biến thường gặp có CD26 chiếm 39,2%, CD17 chiếm 22,5%, CD41/42 chiếm 21,6%.

**Từ khóa:**  $\beta$ -thalassemia, Sanger, giải trình tự, MLPA, người mang gen bệnh.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Thalassemia (hay còn gọi là bệnh tan máu bẩm sinh) thuộc nhóm bệnh rối loạn tổng hợp huyết sắc tố gây thiếu máu, tan máu, là bệnh di truyền phổ biến nhất trên thế giới. Theo báo cáo của Liên đoàn Thalassemia thế giới năm 2013, có khoảng 7% dân số trên thế giới mang gen bệnh thalassemia. Bệnh Thalassemia có 2 nhóm phổ biến là  $\alpha$ -thalassemia và  $\beta$ -thalassemia tùy theo nguyên nhân gây bệnh do đột biến ở gen  $\alpha$ -globin hay  $\beta$ -globin.<sup>1</sup>

Bệnh  $\beta$ -thalassemia gây ra do giảm số lượng chuỗi  $\beta$ -globin, có nguyên nhân do đột biến ở gen ảnh hưởng đến cấu trúc hoặc

chức năng gen HBB thường gặp ở cộng đồng người gốc Trung Đông, Địa Trung Hải, Ấn Độ và Đông Nam Á, trong đó Việt Nam là nước có tỷ lệ mắc bệnh cao trên bản đồ thalassemia thế giới. Năm 2017, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương đã phối hợp với nhiều đơn vị trên toàn quốc để thực hiện đề tài nghiên cứu đặc điểm dịch tễ gen bệnh thalassemia/huyết sắc tố tại Việt Nam, ước tính tỷ lệ mang gen thalassemia/huyết sắc tố trung bình trong cộng đồng cho tất cả các dân tộc trên toàn quốc là 13,8%. Với thể  $\beta$ -thalassemia, tỷ lệ mang gen trong cộng đồng khoảng 0,7% đối với người dân tộc Kinh, tăng lên đến 9 - 11,5% ở một số dân tộc miền núi.<sup>2</sup> Thể bệnh lâm sàng nặng nhất của bệnh  $\beta$ -thalassemia với kiểu gen bệnh đồng hợp tử đột biến  $\beta^0$  có biểu hiện thiếu máu tan máu nặng dẫn đến nhiều biến chứng như chậm phát triển thể chất, suy tim...

Tác giả liên hệ: Trần Văn Khánh

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 17/02/2023

Ngày được chấp nhận: 20/03/2023

nếu không được điều trị truyền máu (2 - 5 tuần/lần) và thải sắt tốt thì tiên lượng sống rất xấu. Bệnh  $\beta$ -thalassemia không khởi phát triệu chứng ngay sau sinh nhưng các triệu chứng sẽ xuất hiện ngay trong năm đầu đời. Đột biến HbE là dạng đột biến nhẹ, nên một người mang 2 biến thể gen bệnh HbE ( $\beta^E/\beta^E$ ) không có biểu hiện lâm sàng, hoặc chỉ thiếu máu nhẹ. Tuy nhiên, người bệnh mang biến thể HbE kết hợp với biến thể  $\beta^0$  ( $\beta^0/\beta^E$ ) sẽ có biểu hiện lâm sàng mức độ trung bình đến nặng, sẽ cần phải được khám và điều trị định kỳ tại bệnh viện.<sup>3</sup> Vì vậy, việc sàng lọc, phát hiện sớm người mang đột biến gen gây bệnh  $\beta$ -thalassemia (bao gồm cả gen HbE) trong quần thể dân số đóng vai trò quan trọng giúp hạn chế sinh ra trẻ mắc bệnh  $\beta$ -thalassemia.

Ngày nay, cơ chế di truyền phân tử của bệnh  $\beta$ -thalassemia đã được nghiên cứu kỹ lưỡng. Hơn 95% bệnh nhân  $\beta$  thalassemeia mang các đột biến điểm trên gen *HBB*, chỉ một tỷ lệ nhỏ là có đột biến mất đoạn. Nhiều kỹ thuật phân tử đã được phát triển nhằm phát hiện nhanh chóng với độ chính xác cao các bất thường di truyền gây bệnh  $\beta$ -thalassemia như nhóm kỹ thuật lai phân tử ngược (Reversehybridization) sử dụng màng lai hoặc thanh lai, nhóm kỹ thuật PCR như RFLP-PCR (restriction fragment length polymorphism), ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System), Gap-PCR, kỹ thuật MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) và kỹ thuật giải trình tự DNA. Giải trình tự Sanger được coi là tiêu chuẩn vàng để xác định các đột biến điểm, bao gồm các đột biến điểm, đột biến mất đoạn hoặc lặp đoạn nhỏ đã biết và các đột biến điểm mới, chưa được báo cáo mà không cần thiết kể mỗi đặc hiệu cho từng đột biến. Kỹ thuật MLPA là phương pháp giúp phát hiện các đột biến mất đoạn/lặp đoạn đã biết và đột biến mới.<sup>4</sup> Xuất phát từ thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: “Xác định người lành mang

gen gây bệnh  $\beta$ -thalassemia bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger và kỹ thuật MLPA” với mục tiêu phát hiện các đột biến gen *HBB* trên những đối tượng có nguy cơ cao mang gen gây bệnh  $\beta$ -thalassemia đến khám tại Trung tâm hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Bưu điện năm 2022.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

#### *Tiêu chuẩn lựa chọn*

102 bệnh nhân đến khám tại Trung tâm hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Bưu điện năm 2022 có xét nghiệm công thức máu thể hiện hồng cầu nhỏ nhược sắc (MCH < 27pg; MCV < 80fL) và điện di huyết sắc tố nghi ngờ mang gen  $\beta$ -thalassemia (HBA2 > 3,5%, HbF tăng, hoặc xuất hiện HbE), không phân biệt yếu tố vùng miền và thành phần dân tộc.

#### *Tiêu chuẩn loại trừ*

Thiếu máu do thiếu sắt, người bệnh  $\beta$ -thalassemia.

### 2. Phương pháp

#### *Địa điểm nghiên cứu*

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 đột biến gen tại Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

#### *Phương pháp nghiên cứu*

Mô tả cắt ngang.

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

Phản ứng PCR khuếch đại toàn bộ gen *HBB*, bao gồm vùng 5'UTR (trước mã mở đầu 220bp), toàn bộ exon - intron và vùng 3'UTR (sau mã kết thúc 240bp) sử dụng các cặp mồi đặc hiệu theo nghiên cứu của Supatra Sirichotiyakul (2003).<sup>5</sup>

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

Giải trình gen Sanger: Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng cho bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher, Hoa Kỳ). Sản phẩm PCR giải trình tự sau khi tinh sạch được điện di bằng trên hệ thống điện di mao quản ABI-3500 và được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench 6. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự chuẩn NG\_000007 của gen *HBB* trên GeneBank.

Kỹ thuật MLPA: nghiên cứu sử dụng bộ kit SALSA MLPA Probemix P102 *HBB* của hãng MRC Holland (Hà Lan) để phát hiện đột biến gen  $\beta$ -globin. Thí nghiệm được thực hiện tuân theo quy trình chung của nhà sản xuất. Gồm các

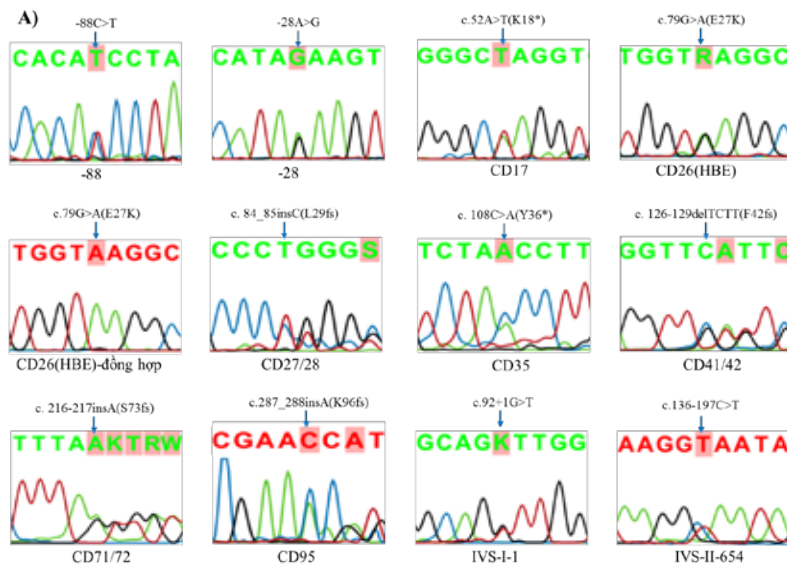
bước cơ bản như sau: Khử RNA, gắn probe, nối các đoạn probe bằng enzym ligase, khuếch đại các probe bằng phản ứng PCR, điện di sản phẩm trên hệ thống điện di mao quản ABI3500.

### 3. Đạo đức nghiên cứu

Những người mang đột biến gen bệnh  $\beta$ -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. Nghiên cứu đã được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức Trường Đại học Y Hà Nội mã số 470/GCN-HĐĐĐNCYSH-ĐHYHN.

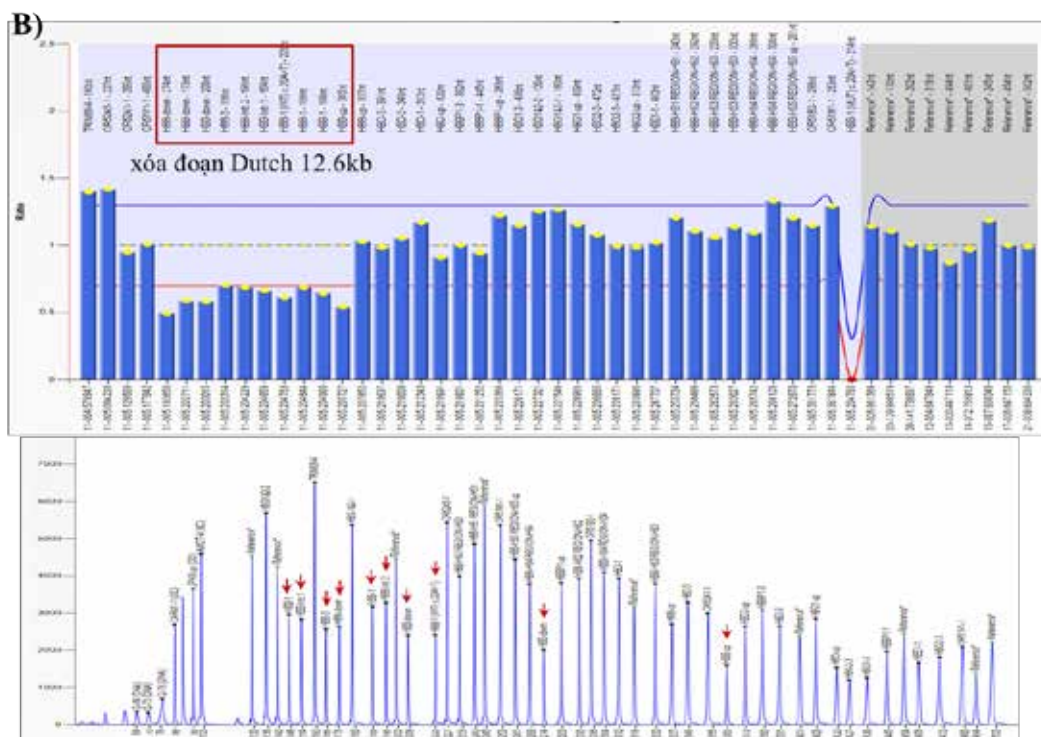
## III. KẾT QUẢ

Áp dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger để giải trình tự toàn bộ gen *HBB* trên 102 trường hợp thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc, chúng tôi phát hiện được 10 dạng đột biến, trong đó có 8 dạng đột biến điểm trên gen *HBB* tìm thấy ở 99/102 người và 2 dạng đột biến mất đoạn lớn trên cụm gen  $\beta$ -globin ở 3/102 người. Kết quả phân tích từng đột biến được thể hiện trong hình:



**Hình 1A. Kết quả đột biến gen *HBB* ở những trường hợp nghiên cứu**

A) Kết quả giải trình tự gen phát hiện một số đột biến điểm.



Hình 1B. Kết quả đột biến gen *HBB* ở những trường hợp nghiên cứu

B) Kết quả MLPA phát hiện đột biến xóa đoạn dị hợp tử Dutch 12,6 kb

Bảng 1. Số lượng và tỉ lệ đột biến trên gen  $\beta$ -globin

Tên đột biến	Kiểu đột biến	Biến đổi c.DNA	Biến đổi protein	Exon/ Intron	Tần số (n)	Tỉ lệ (%)
CD26	HBE	c.79G>A	p.Glu27Lys	Exon 1	40	39,2%
CD17	$\beta^0$	c.52A>T	p.Lys18*	Exon 1	23	22,5%
CD41/42	$\beta^0$	c.126-129delTTCT	p.Phe42fs	Exon 2	22	21,6%
-28A>G	$\beta^+$	c.-78A>G		Promotor	5	4,9%
CD71/72	$\beta^0$	c.216-217insA	p.Ser73fs	Exon 2	4	3,9%
CD95	$\beta^0$	c.287-288insA	p.Lys96fs	Exon 2	3	2,9%
Mất đoạn Dutch 12,6 kb	$\beta^0$			Gen $\delta$ và $\beta$ globin	2	2%
IVS-I-1	$\beta^0$	c.92+1G>T		Intron 1	1	1%
-88C>T	$\beta^+$	c.-138C>T		Promotor	1	1%

Tên đột biến	Kiểu đột biến	Biến đổi c.DNA	Biến đổi protein	Exon/ Intron	Tần số (n)	Tỉ lệ (%)
Mất đoạn dạng $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0\text{-thal}$	$\beta^0$			Gen $\text{A}\gamma$ , $\delta$ và $\beta$ globin	1	1%

Trong 102 trường hợp, có 40 trường hợp mang đột biến CD26 chiếm 39,2%, 23 trường hợp mang đột biến CD17 chiếm 22,5%, 22 trường hợp mang đột biến CD41/42 chiếm 21,6%, 5 trường hợp mang đột biến -28A>G chiếm 4,9%, 4 trường hợp mang đột biến CD71/72 chiếm 3,9%, 3 trường hợp mang đột

biến CD95 chiếm 2,9%, 2 trường hợp mang đột biến mất đoạn del Dutch 12,6kb, 3 dạng đột biến còn lại mỗi dạng chỉ có 1 trường hợp chiếm tỉ lệ 1%. Như vậy, đột biến điểm chiếm tỉ lệ 97%, đột biến mất đoạn chiếm tỉ lệ 3%. Tỉ lệ đột biến HBE là 39,2%,  $\beta^0$ -thalassemia là 54,9%,  $\beta^+$ -thalassemia là 5,9%.

**Bảng 2. Mối liên quan giữa chỉ số MCV, MCH và điện di huyết sắc tố với các dạng đột biến**

Dạng đột biến	MCV (fL) (85 - 95)	MCH (pg) (28 - 32)	Kết quả điện di HST	
			HbA1 (%) (96,5 - 98,5)	HbA2 (%) (2 - 3,5)
CD26 (HbE)	72,3 ± 7,7	23,5 ± 3,4	73,4 ± 4,1	3,0 ± 1,1
CD17	61,7 ± 4,8	19,2 ± 1,9	93,3 ± 1,6	5,4 ± 0,4
CD41/42	61,1 ± 7,4	19,9 ± 3,5	89,5 ± 13,8	5,2 ± 0,7
-28A>G	69,7 ± 2,0	22,4 ± 0,8	93,8 ± 0,2	5,9 ± 0,3
CD71/72	65,3 ± 7,7	20,8 ± 2,9	93,7 ± 0,9	5,6 ± 0,5
CD95	55,2 ± 7,6	18,2 ± 1,7	91,6 ± 2,3	5,3 ± 0,3
Mất đoạn Dutch 12,6 kb	78,9 ± 0,1	25,7 ± 0,1	78 ± 0,4	4,5 ± 0,7
c.92+1G>T IVS I-1 (G>T)	64,6	21,6	94,1	5,4
-88C>T	74,3	24,1	79	5
Mất đoạn dạng $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0\text{-thal}$	72,8	23,1	78,3	2,4

Thể tích trung bình hồng cầu (MCV) giảm nhiều nhất ở những người mang đột biến CD95 (55,2 ± 7,6 fL), tiếp đến đột biến CD41/42 (61,1 ± 7,4 fL) và CD17 (61,7 ± 4,8 fL). Thể tích trung bình hồng cầu (MCV) giảm ít nhất ở những người mang đột biến mất đoạn Dutch 12,6kb (78,9 ± 0,1 fL), tiếp đến là -88C>T (74,3 fL), đột

biến mất đoạn dạng  $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0\text{-thal}$  (72,8 fL) và CD26 (HbE) (72,3 ± 7,7 fL). Nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) giảm nhiều nhất ở những người mang đột biến CD95 (18,2 ± 1,7pg), tiếp đến đột biến CD17 (19,2 ± 1,9pg) và CD41/42 (19,9 ± 3,5pg) và giảm ít nhất ở những người mang đột biến mất đoạn Dutch 12.6kb



( $25,7 \pm 0,1$  pg), tiếp đến là -88C>T ( $24,1$ pg), đột biến mất đoạn dạng  $G\gamma^{+}(A\gamma\delta\beta)^{0}$ -thal ( $23,1$ pg) và CD26 (HbE) ( $23,5 \pm 3,4$ pg). Điện di huyết sắc tố thấy tỉ lệ HbA1 giảm nhất ở những người mang đột biến CD26 (HbE) là  $73,4 \pm 4,1$ , tiếp đến là hai dạng đột biến mất đoạn. Tỷ lệ HbA2 (ngưỡng bình thường là  $< 3,5\%$ ) tăng trong các trường hợp trừ trường hợp đột biến mất đoạn  $G\gamma^{+}(A\gamma\delta\beta)^{0}$ -thal tỷ lệ HbA2 là  $2,4\%$ .

Tất cả các trường hợp mang đột biến gen *HBB* đều có lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) và thể tích trung bình hồng cầu (MCV) giảm đáng kể.

#### IV. BÀN LUẬN

Các kỹ thuật sinh học phân tử phát triển vô cùng mạnh mẽ, đặc biệt là kỹ thuật giải trình tự, ngày càng có nhiều đột biến mới được phát hiện trên cụm gen  $\beta$ -globin. Các đột biến được chia làm 2 nhóm lớn: nhóm đột biến làm mất hoàn toàn tổng hợp chuỗi  $\beta$ -globin ( $\beta^0$ -thalassemia) và nhóm đột biến làm giảm tổng hợp chuỗi  $\beta$ -globin ( $\beta^+$ -thalassemia). Việc xác định chính xác các đột biến đóng vai trò quan trọng trong sàng lọc, tiên lượng cũng như tư vấn di truyền.<sup>3</sup>

Hiện nay, có rất nhiều kỹ thuật sinh học phân tử: nhóm kỹ thuật lai phân tử ngược (Reversehybridization) sử dụng màng lai hoặc thanh lai, nhóm kỹ thuật PCR như RFLP-PCR (restriction fragment length polymorphism), ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System), Gap-PCR, kỹ thuật MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) và nhóm kỹ thuật giải trình tự DNA gồm giải trình tự thế hệ I và giải trình tự thế hệ mới (Next generation sequencing (NGS) cho phép xác định được hầu hết các đột biến gen  $\beta$ -globin. Theo thống kê hiện có hơn 300 đột biến đã được phát hiện trên gen  $\beta$ -globin. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới ra đời cho phép xác định được toàn bộ các đột biến từ mất đoạn,

lặp đoạn, đột biến điểm hay thêm bớt một hay một số nucleotid. Tuy nhiên, giá thành của phương pháp này còn cao và chưa phù hợp với khả năng kinh tế của phần lớn người Việt Nam. Kỹ thuật giải trình tự Sanger được chọn làm kỹ thuật chính để xác định đột biến gen *HBB* trong nghiên cứu vì nó có ưu điểm vượt trội so với các kỹ thuật thông thường khác. Như kỹ thuật ARMS-PCR chỉ có thể xác định các đột biến điểm đã biết và không thể xác định được các đột biến lặp đoạn, mất đoạn hay đột biến điểm mới, còn nhóm kỹ thuật lai phân tử ngược chỉ cho phép xác định một số đột biến đã biết. Giải trình tự Sanger với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, có thể xác định được toàn bộ các đột biến điểm, kể cả các đột biến điểm mới phát sinh và một số đột biến mất đoạn, thêm đoạn nhỏ và cả vùng intron trên gen *HBB*. Một nhược điểm của kỹ thuật giải trình tự gen Sanger là kỹ thuật này không phát hiện được các đột biến mất đoạn, thêm đoạn lớn, do đó cần có một kỹ thuật hỗ trợ trong trường hợp nghi ngờ có đột biến mất đoạn/lặp đoạn lớn, đó là kỹ thuật MLPA.<sup>4,6</sup>

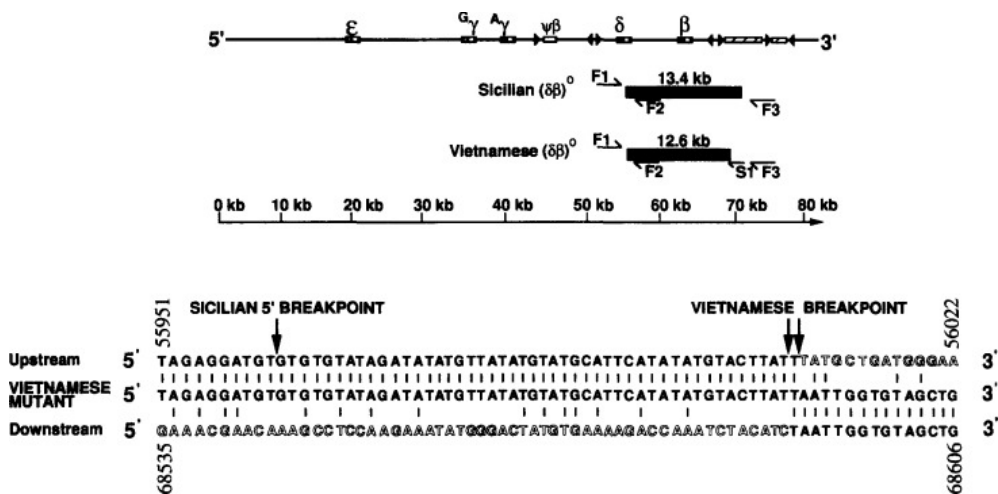
Trong nghiên cứu của chúng tôi, 3 dạng đột biến thường gặp nhất là CD26(HbE), CD17, CD71/72. Chỉ riêng 3 loại đột biến này đã chiếm 87% tổng số đột biến được phát hiện. Khi so sánh kết quả với nhiều nhóm tác giả trong nước, tỷ lệ đột biến hoàn toàn trùng khớp với các kết quả đã công bố, như nghiên cứu của tác giả Bạch Quốc Khánh (2019), Nguyễn Hoàng Nam (2017). Ngoài ra, bằng cách sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger, chúng tôi còn xác định được các đột biến điểm hiếm gặp khác như: CD95, IVS I-1, -88, trong đó đột biến -88 không có trong các bộ kit thương mại ở Việt Nam.<sup>2</sup>

40 trường hợp mang đột biến CD26 (39,2%) là đột biến sai nghĩa (missense) làm thay thế Glutamat bằng Lysin, dẫn đến tổng hợp một chuỗi globin khác với chuỗi  $\beta$  globin, khi kết hợp với chuỗi  $\alpha$  globin tạo nên huyết sắc tố E, đây là

dạng đột biến rất phổ biến ở Đông Nam Á cũng như Việt Nam. 62 trường hợp (60,8%) là đột biến  $\beta^0$ -thalassemia (54,9%) và  $\beta^+$ -thalassemia (5,9%). Đột biến gen  $\beta^0$ -thalassemia chiếm chủ yếu, nhiều hơn hẳn đột biến  $\beta^+$ -thalassemia, kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây ở Việt Nam, khi alen  $\beta^0$  phổ biến hơn  $\beta^+$  và đột biến HbE rất phổ biến đi cùng  $\beta$ -thalassemia.<sup>2</sup>

Phương pháp giải trình tự Sanger ngoài xác định được các đột biến điểm thường gặp, còn giúp xác định các đột biến điểm hiếm gặp, không bỏ sót đột biến điểm nhưng không xác định được đột biến mất/thêm đoạn lớn. Để khắc phục nhược điểm trên chúng tôi sử dụng phương pháp MLPA để xác định đột biến của 3 trường hợp không xác định được đột biến điểm trên gen *HBB*. Kết quả xác định được 2 trường hợp mất đoạn 12,6kb Dutch deletion và 1 trường hợp đột biến mất đoạn Chinese

$\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ . Del Dutch 12,6kb là đột biến mất đoạn có kích thước 12,6 kb nằm trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể số 11, chứa vùng gen mã hóa cho  $\delta$  và  $\beta$  globin. Vì vậy, đột biến này còn được gọi là delta-beta-thalassemia ( $\delta\beta$ )<sup>0</sup>. Theo nghiên cứu của JE.Craig và cộng sự năm 1994, điện di huyết sắc tố của người mang dị hợp tử đột biến này cho thấy sự xuất hiện bền vững của hemoglobin bào thai (HbF) trong giai đoạn trưởng thành với nồng độ từ 5 - 20%, tương ứng với nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận được 2 trường hợp mang đột biến del Dutch 12,6kb có tỷ lệ HbF là 18,3% và 16,7%. Các dạng đột biến delta  $\beta$  thalassemia có tính chất địa lí. JE.Craig (1994) sàng lọc một nhóm gồm 23 cá nhân từ 16 gia đình có nguồn gốc dân tộc khác nhau với các kiểu hình  $\delta\beta$  thalassemia đã bất ngờ xác định được một mất đoạn 12,6kb ở một người Việt Nam mắc bệnh delta-beta thalassemia.<sup>7</sup>



Hình 2. Điểm đứt gãy của đột biến mất đoạn 12,6kb phát hiện ở người Việt Nam<sup>7</sup>

$\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia là dạng đột biến mất đoạn  $\beta$ -globin phổ biến nhất ở Trung Quốc.  $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia có phạm vi mất đoạn khoảng 78,9kb, bao gồm một phần gen tổng hợp  $\text{A}\gamma$  globin, toàn bộ các gen tổng hợp  $\delta$  và  $\beta$ -globin và các trình tự DNA có chức năng điều hòa của gen tổng hợp  $\beta$ -globin. Mất cụm gen

*HBB* hoặc đột biến vùng điều hòa của gen tổng hợp  $\gamma$ -globin dẫn đến sự biểu hiện liên tục của gen tổng hợp  $\gamma$ -globin. Do đó, sự gia tăng đáng kể nồng độ HbF ở người trưởng thành là một dấu hiệu chỉ điểm cho thấy sự vắng mặt của cụm gen  $\text{A}\gamma\delta\beta$ .<sup>8</sup>

Lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) và thể tích trung bình hồng cầu (MCV) đã được sử dụng trong sàng lọc và chẩn đoán bệnh beta thalassemia trong hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh Thalassemia của Bộ Y tế và được áp dụng rộng rãi. Trong nghiên cứu của chúng tôi, quan sát thấy tất cả các trường hợp mang đột biến gen *HBB* đều có lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) và thể tích trung bình hồng cầu (MCV) giảm đáng kể, trong đó giảm nhiều nhất có thể kể đến các đột biến CD95, CD17, CD41/42, đây là các đột biến gây mất tổng hợp chuỗi  $\beta$ -globin, gây mất cân bằng trong số lượng các chuỗi  $\beta$ -globin và  $\alpha$ -globin, tạo các thể vùi trong hồng cầu làm cho hồng cầu dễ vỡ, tăng sinh hồng cầu không hiệu lực. Ngược lại, đột biến CD26, -88C>T và hai dạng đột biến mất đoạn có lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) và thể tích trung bình hồng cầu (MCV) giảm ít nhất, có thể giải thích do đột biến CD26 (HbE) và -88C>T là hai dạng đột biến  $\beta^+$ . Cũng như vậy, tỉ lệ HbA1 giảm nhiều nhất ở các dạng đột biến gây ra các phân tử hemoglobin bất thường (như HbE) hoặc gây giảm chung ở một số gen thuộc cụm  $\beta$ -globin nhưng lại làm tăng hoạt động của gen còn lại (như gen tổng hợp  $\gamma$ -globin trong mất đoạn  $\text{C}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0\text{-thal}$ ).

## V. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger và MLPA nghiên cứu đã xác định được 102/102 trường hợp có mang đột biến gen gây bệnh beta thalassemia, trong đó có 99 trường hợp mang đột biến điểm (97%) và 3 trường hợp mang đột biến mất đoạn (3%). 3 đột biến điểm thường gặp là CD26 chiếm 39,2%, CD17 chiếm 22,5%, CD41/42 chiếm 21,6%. 2 đột biến mất đoạn lớn là Dutch 12,6kb (2/102 trường hợp) và  $\text{C}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0\text{-thal}$  (1/102 trường hợp).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 2013 – Annual Report. TIF. Accessed February 17, 2023. <https://thalassaemia.org.cy/download/2013-annual-report/>.
2. Học T máu h. Kỹ yếu các công trình nghiên cứu khoa học hội thảo khoa học về bệnh thalassemia. *VMJ*. 2021; 502 (Chuyên đề). Accessed February 17, 2023. <https://tapchihocvietnam.vn/index.php/vmj/article/view/961>.
3. Farmakis D, Porter J, Taher A, Domenica Cappellini M, Angastiniotis M, Eleftheriou A. 2021 Thalassaemia International Federation Guidelines for the Management of Transfusion-dependent Thalassemia. *Hemasphere*. 2022; 6(8): e732. doi:10.1097/HS9.0000000000000732.
4. Munkongdee T, Chen P, Winichagoon P, Fucharoen S, Paiboonsukwong K. Update in Laboratory Diagnosis of Thalassemia. *Front Mol Biosci*. 2020; 7:74. doi:10.3389/fmolb.2020.00074.
5. Sirichotiyakul S, Saetung R, Sanguanserm Sri T. Analysis of beta-thalassemia mutations in northern Thailand using an automated fluorescence DNA sequencing technique. *Hemoglobin*. 2003; 27(2): 89-95. doi:10.1081/hem-120021541.
6. Jaing TH, Chang TY, Chen SH, Lin CW, Wen YC, Chiu CC. Molecular genetics of  $\beta$ -thalassemia: A narrative review. *Medicine*. 2021; 100(45): e27522. doi:10.1097/MD.00000000000027522.
7. Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood*. 1994;83(6):1673-1682.



8. Wu Y, Yao Q, Zhong M, et al. Genetic research and clinical analysis of deletional Chinese  $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$  -thalassemia and Southeast Asian HPFH in South China. *Ann Hematol.* 2020; 99(12): 2747-2753. doi:10.1007/s00277-020-04252-7.

## Summary

### CARRIER SCREENING OF BETA THALASSEMIA USING SEQUENCING AND MLPA TECHNIQUES

Thalassemia is the most common genetic disease in the world. The average thalassemia carrier rate of all ethnic groups in Vietnam is estimated at 13.8%.  $\beta$ -thalassemia major patients may express severe hemolytic anemia, affecting their viability and quality of life. Screening and early diagnosis of patients and gene carriers in the community play an important role in limiting the ratio of children born with  $\beta$ -thalassemia. Many molecular techniques have been developed to detect  $\beta$ -thalassemia pathogenic variants, of which DNA sequencing and MLPA are the gold standards for identifying point mutations and identifying deletion/duplication mutations, respectively. With the aim of detecting HBB gene pathogenic variants in healthy carriers by Sanger sequencing and MLPA techniques, the study was conducted on 102 cases of hypochromic microcytic anemia suspected of carrying the pathogenic variants in the  $\beta$ -globin gene and iron deficiency anemia was excluded. The results identified 102 cases have mutations in the HBB gene, of which 97% were point mutations and 3% were deletion mutations. CD26 accounts for 39.2%, CD17 accounts for 22.5% and CD41/42 accounts for 21.6%.

**Keywords:**  $\beta$ -thalassemia, Sanger sequencing, MLPA, carrier.