

PHÁT HIỆN CÁC ĐỘT BIẾN XÓA ĐOẠN CỤM GEN β -GLOBIN BẰNG KỸ THUẬT MLPA

Lê Thị Phương¹, Vương Vũ Việt Hà^{1,2}, Trần Thị Quỳnh Trang
Đinh Thuý Linh^{1,3} và Trần Văn Khánh^{1,✉}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Bưu Điện

³Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

Beta-thalassemia là một trong những bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường phổ biến. Nguyên nhân gây bệnh là do giảm (β^+) hoặc không (β^0) tổng hợp chuỗi β -globin của phân tử hemoglobin (Hb). Trên 350 đột biến trên cụm gen β -globin đã được báo cáo trên ngân hàng dữ liệu ClinVar. Đột biến xóa đoạn lớn chỉ chiếm tỉ lệ nhỏ trong các dạng đột biến gây bệnh nhưng thường bị bỏ sót do chưa được tích hợp sẵn vào các bộ kit thương mại. Kỹ thuật MLPA để xác định đột biến mất đoạn/lặp đoạn có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Với mục tiêu phát hiện các biến xóa đoạn lớn cụm gen β -globin, nghiên cứu tiến hành trên 8 trường hợp nghi ngờ mang gen β -thalassemia ($HbF > 10\%$, $MCH < 27pg$, $MCV < 80fL$) nhưng không phát hiện được đột biến gen HBB bằng phương pháp lai và giải trình tự Sanger. Kết quả đã xác định được 4 người trong một gia đình mang đột biến xóa đoạn exon 1 trên gen HBB, 03 trường hợp mang đột biến đột biến Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)⁰-thalassemia và 01 trường hợp mang đột biến $G\gamma^+(A\gamma\delta\beta)$ ⁰-thal.

Từ khóa: β -thalassemia, xóa đoạn β -globin, MLPA, Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)⁰-thalassemia.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Beta-thalassemia (β -thalassemia) là rối loạn máu di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường phổ biến do đột biến gen β -globin nằm trên nhiễm sắc thể 11. Trên toàn cầu, có khoảng 60.000 trẻ sơ sinh mắc bệnh β -thalassemia thể nặng mỗi năm, tỉ lệ mắc bệnh chiếm khoảng 1,5% tổng dân số thế giới.¹ Phần lớn các bệnh sống ở các nước đang phát triển trong đó có Việt Nam. Những trẻ sinh ra mắc bệnh β -thalassemia thể nặng hoặc trung gian đều phải phụ thuộc truyền máu và thải sắt suốt đời, ảnh hưởng đến sự phát triển thể chất lâu dài, nặng hơn có thể tử vong sớm vì các biến chứng của truyền máu.

Việc điều trị cho các bệnh nhân rất tốn kém, là gánh nặng cho gia đình và xã hội.

Trên 350 đột biến đã được báo cáo là nguyên nhân gây ra bệnh β -thalassemia trên ngân hàng dữ liệu ClinVar.² Hầu hết là các đột biến điểm, bao gồm các đột biến thay thế nucleotid, đột biến chèn hoặc xóa đoạn nhỏ (indel) trong gen HBB hoặc các vùng điều hòa chức năng của gen globin.³ Đột biến xóa đoạn lớn chỉ chiếm tỉ lệ nhỏ trong các dạng đột biến gây bệnh β -thalassemia bao gồm 2 nhóm, nhóm thứ nhất chỉ xóa đoạn trong gen HBB, nhóm thứ hai xóa đoạn toàn bộ cụm gen β -globin, bao gồm 5 gen chức năng (HBE1, HBG2, HBG1, HBD và HBB), và có thể xóa cả vùng kiểm soát biểu hiện (beta-globin locus control region - BLCR), chịu trách nhiệm phiên mã chính xác các gen globin. Ngoài bệnh β -thalassemia, việc xóa đoạn cũng có thể dẫn đến các loại bệnh huyết

Tác giả liên hệ: Trần Văn Khánh

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 25/07/2024

Ngày được chấp nhận: 16/08/2024

sắc tố khác. Tùy thuộc vào việc các gen liên quan bị xóa, bao gồm epsilon-gamma-delta-beta-thalassemia ($\epsilon\gamma\delta\beta$ -thalassemia), gamma-delta-beta-thalassemia ($\gamma\delta\beta$ -thalassemia), delta-beta-thalassemia ($\delta\beta$ -thalassemia), và β -thalassemia, đột biến sẽ gây ra nhiều kiểu hình khác nhau, từ kiểu hình bình thường với chỉ số huyết học giảm nhẹ và nồng độ HbF tăng đến mức độ thiếu máu trầm trọng ảnh hưởng đến quá trình phát triển của phôi thai và thai nhi, việc mang ($\epsilon\gamma\delta\beta$)⁰-thalassemia có thể dẫn đến thiếu máu tán huyết nghiêm trọng và có thể phải truyền máu trong tử cung.⁴

Tại Việt Nam, đột biến xóa đoạn đã được báo cáo trong nghiên cứu của Motum PI và cộng sự từ năm 1993, biến thể xóa đoạn khoảng 30kb được đặt tên là HPFH-6 hoặc SEA-HPFH.⁵ Nghiên cứu của Nipon Chalaow (năm 2013) đã xác định điểm cắt (breakpoint) của đột biến xóa đoạn 12,6kb và đặt tên là Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)⁰-thalassemia, là dạng đột biến thường gặp ở khu vực Đông Nam Á.⁶ Các đột biến xóa đoạn thường làm tăng nồng độ HbF, có kiểu hình β^0 -thalassemia nhưng lại ít được quan tâm do tỉ lệ đột biến thấp và chưa được tích hợp sẵn trong các bộ kit thương mại sử dụng trong các phòng xét nghiệm tại nước ta. Bộ kit lai phân tử β -globin Strip Assay được sử dụng phổ biến cho phép sàng lọc được 22 đột biến điểm trên gen β -globin phổ biến trong khu vực Đông Nam Á. Giải trình tự gen Sanger được xem là tiêu chuẩn vàng trong việc phát hiện các đột biến điểm và đột biến chèn hoặc xóa đoạn nhỏ, nhưng cũng không phát hiện được đột biến xóa đoạn lớn. Kỹ thuật Gap-PCR để phát hiện đột biến xóa đoạn với chi phí thấp và thời gian nhanh chóng, chỉ cho phép xác định các đột biến xóa đoạn biết trước. Sự ra đời của kỹ thuật MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) với độ chính xác cao và kết quả nhanh chóng cho phép xác

định toàn bộ đột biến xóa đoạn/lặp đoạn đã biết cũng như các đột biến xóa/lặp đoạn mới. Xuất phát từ thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu "Xác định các đột biến xóa đoạn cụm gen β -globin bằng kỹ thuật MLPA" với mục tiêu: Phát hiện các đột biến xóa đoạn trên cụm gen β -globin ở những đối tượng có nồng độ HbF tăng nhưng không phát hiện đột biến bằng giải trình tự Sanger và β -globin Strip Assay.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Các trường hợp có xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi thể hiện hồng cầu nhỏ nhược sắc (MCH < 27pg; MCV < 80fL) và xét nghiệm điện di huyết sắc tố nghi ngờ mang đột biến xóa đoạn cụm gen β -globin (HbF >10%, HbA2 > 3,5% hoặc bình thường) nhưng không phát hiện được đột biến gen *HBB* bằng phương pháp lai β -globin Strip Assay và giải trình tự Sanger. Có 8 trường hợp đáp ứng tiêu chuẩn trên bao gồm: một gia đình 4 người (bố mẹ và hai con), và 04 trường hợp không có mối quan hệ huyết thống.

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang.

Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

Kỹ thuật tách chiết DNA: DNA được tách từ mẫu máu toàn phần có chống đông EDTA sử dụng bộ kit QIAamp DNA Mini Kit của Hãng Qiagen, Đức. Quy trình tách chiết tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất, gồm các bước chính: ly giải mẫu, rửa DNA, lọc và rửa rửa DNA trên cột lọc, hoàn nguyên DNA. Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA sau tách chiết bằng phương pháp đo quang phổ trên máy NanoDrop: nồng độ DNA 50 - 200 ng/ μ l, đánh giá độ tinh sạch bằng tỷ lệ A260/A280 = 1,8 - 2,0.

Kỹ thuật MLPA: sử dụng bộ kit SALSA MLPA Probemix P102 HBB của hãng MRC Holland (Hà Lan) để phát hiện đột biến xóa/lặp đoạn trên cụm gen β -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.

Kết quả MLPA được phân tích bằng phần mềm COFFALYSER để tính giá trị DQ (Dosage Quotients - thương số giữa diện tích đỉnh của mẫu bệnh nhân và diện tích đỉnh của mẫu đối chứng). Những đỉnh có giá trị DQ trong khoảng 0,8 - 1,2 là bình thường; DQ = 0 tương đương

với đột biến mất đoạn đồng hợp tử; DQ trong khoảng 0,4 - 0,65 được xác định là xóa đoạn dị hợp tử.

3. Đạo đức nghiên cứu

Các bệnh nhân 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 ngày 14 tháng 5 năm 2021.

III. KẾT QUẢ

Một số đặc điểm của đối tượng tham gia nghiên cứu và kết quả đột biến gen được thể hiện như bảng dưới đây:

Bảng 1. Các chỉ số huyết học và đột biến gen của đối tượng nghiên cứu

Mã số	MCV (fL)	MCH (pg)	HbA1 (%)	HbA2 (%)	HbF (%)	Kết quả MLPA
Pt1	68,6	22,2	16,6	3,3	80,1	Đồng hợp xóa đoạn Exon 1 gen <i>HBB</i>
Pt2	69,4	22,6	17,5	3,4	79,1	Đồng hợp xóa đoạn Exon 1 gen <i>HBB</i>
Pt1.b	75,7	24,6	75,6	5,6	18,8	Dị hợp xóa đoạn Exon 1 gen <i>HBB</i>
Pt1.m	74,5	24,2	77,7	6,2	16,1	Dị hợp xóa đoạn Exon 1 gen <i>HBB</i>
Cr1	76,8	25,6	77,7	4	18,3	Dị hợp Thai/Vietnamese ($\delta\beta$) ⁰ -thalassemia
Cr2	76,9	25,7	78,3	5	16,7	Dị hợp Thai/Vietnamese ($\delta\beta$) ⁰ -thalassemia
Cr3	72,9	23,7	74,8	3,6	21,6	Dị hợp Thai/Vietnamese ($\delta\beta$) ⁰ -thalassemia
Cr4	72,8	23,1	78,3	2,4	19,3	Dị hợp G γ ⁺ (A $\gamma\delta\beta$) ⁰ -thal

Tất cả các trường hợp tham gia nghiên cứu đều có lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) và thể tích trung bình hồng cầu (MCV) giảm, nồng độ HbF tăng cao, đặc biệt

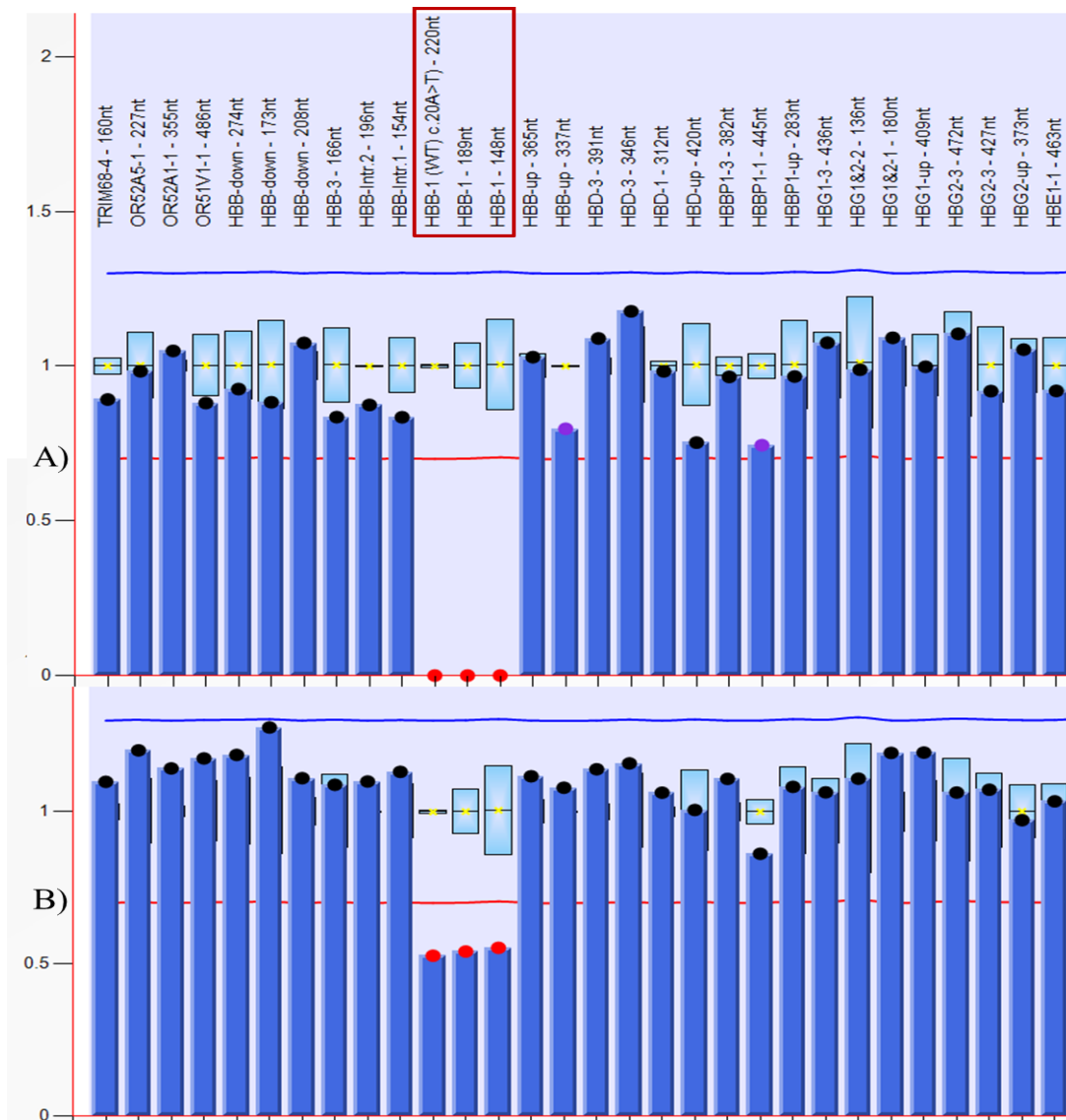
là hai bệnh nhân xóa đoạn đồng hợp exon 1 gen *HBB*; nồng độ HbA2 tăng ở các trường hợp mang đột biến dị hợp xóa đoạn exon 1 và Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)⁰-thalassemia; nồng độ

HbA2 ở ngưỡng bình thường với trường hợp mang đột biến đồng hợp xóa đoạn exon 1 và Gγ⁺(Aγδβ)⁰-thal mang đột biến gen *HBB*.

Kỹ thuật MLPA đã xác định được 2 bệnh nhân là hai chị em ruột mang đột biến xóa đoạn đồng hợp tử exon 1 gen *HBB*, bố mẹ 2 bệnh nhân này mang đột biến dị hợp tử xóa đoạn exon 1. Ba trường hợp mang đột biến xóa đoạn

dị hợp tử Thai/Vietnamese (δβ)⁰-thalassemia và một trường hợp mang đột biến dị hợp tử Gγ⁺(Aγδβ)⁰-thal.

Đột biến xóa đoạn exon 1: Nghiên cứu xác định được một gia đình có 2 người con mang đột biến xóa đoạn đồng hợp tử; bố và mẹ là người lành mang đột biến xóa đoạn dị hợp tử exon 1 gen *HBB*.



Biểu đồ 1. Kết quả MLPA của gia đình bệnh nhân Pt1

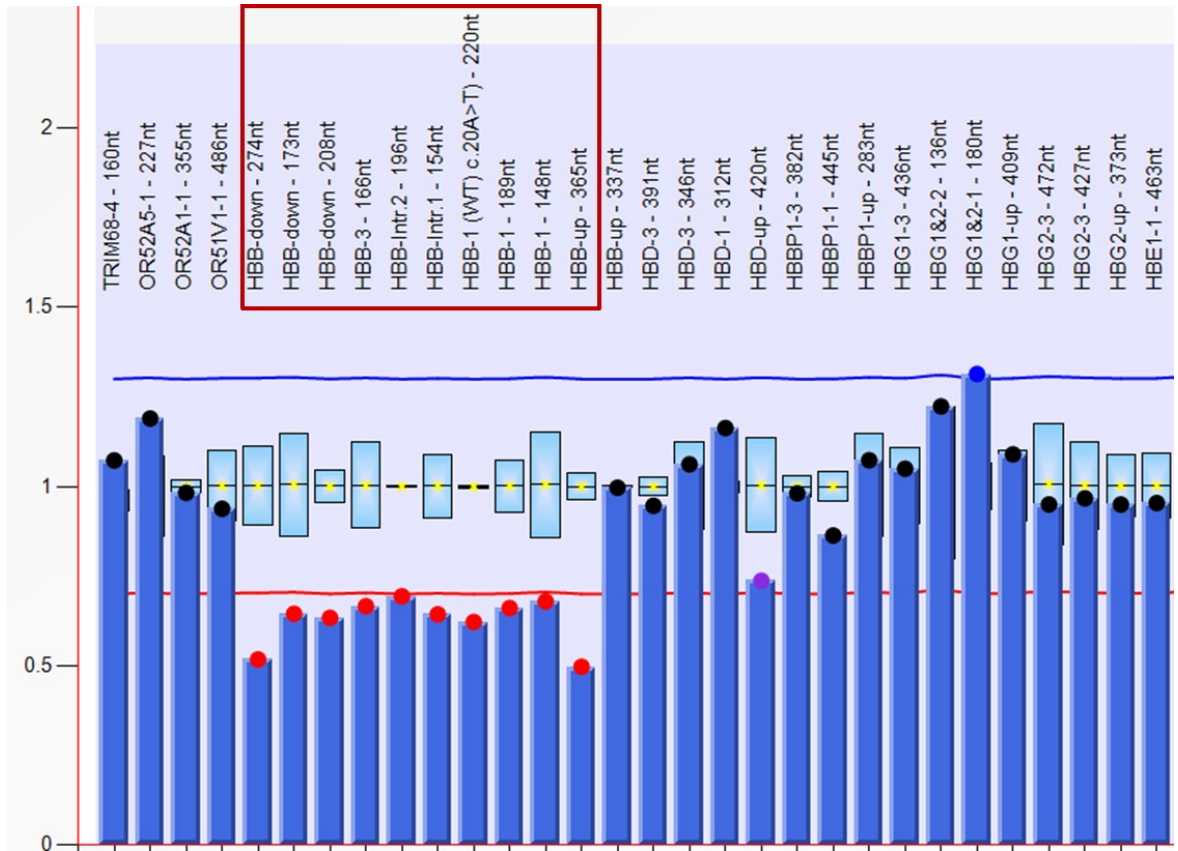
Trục tung biểu thị giá trị DQ của các mẫu, trục hoành biểu thị các đỉnh của đầu dò trong bộ kit SALSA MLPA Probemix P102 *HBB*. Kết

quả MLPA của gia đình bệnh nhân Pt1 cho thấy, hình 1A 3 đầu dò HBB1(WT)c.20A>T – 220nt, HBB1 – 189nt và HBB1 – 184nt (có vị trí từ vùng

promoter đến exon 1 gen *HBB*) không xuất hiện đỉnh (DQ = 0)), còn ở hình 1B 3 đầu dò này có chiều cao chỉ bằng ½ so với người bình thường (giá trị DQ trong khoảng 0,4 - 0,65), các đầu dò còn lại nằm trong giá trị bình thường (DQ = 0,8 - 1,2). Hình 1A tương ứng với kết quả của 2 người con mang đột biến đồng hợp tử xóa đoạn

exon 1, hình 1B tương ứng với kết quả của bố mẹ là người lành mang đột biến dị hợp tử xóa đoạn exon 1.

Đột biến Thai/Vietnamese ($(\delta\beta)^0$ -thalassemia: Có 3 trường hợp được xác định mang đột biến dị hợp tử β Thai/Vietnamese ($(\delta\beta)^0$ -thalassemia.

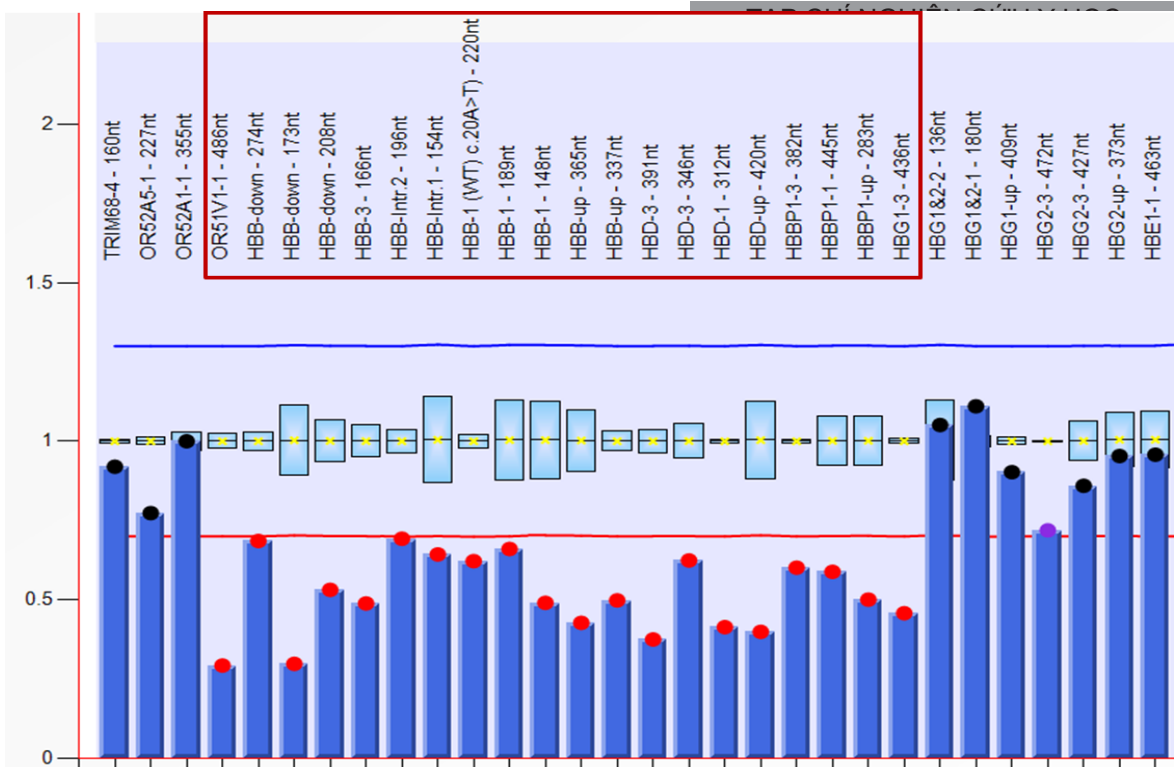


Biểu đồ 2. Kết quả MLPA bệnh nhân Cr1

Kết quả MLPA của bệnh nhân Cr1 cho thấy, 10 đầu dò trên cụm gen *HBB* từ HBB-down-274nt đến HBB-up-365nt có chiều cao chỉ bằng khoảng ½ so với người bình thường (giá trị DQ nằm trong khoảng từ 0,4-0,65). Đây là dạng đột biến xóa đoạn 12,6kb hay còn gọi là Thai/Vietnamese ($(\delta\beta)^0$ -thalassemia. Bệnh nhân Cr2

và Cr3 cho kết quả tương tự Cr1. Các trường hợp Cr1, Cr2, Cr3 được xác định là những người lành mang đột biến xóa đoạn dị hợp tử Thai/Vietnamese ($(\delta\beta)^0$ -thalassemia

Đột biến Chinese $G\gamma^+(A\gamma\delta\beta)^0$ -thal: nghiên cứu phát hiện một trường hợp mang đột biến Chinese $G\gamma^+(A\gamma\delta\beta)^0$ -thal.



Biểu đồ 3. Kết quả MLPA bệnh nhân Cr4

Kết quả MLPA của bệnh nhân Cr4 cho thấy, 20 đầu dò nằm trên gen cụm gen β -globin từ OR51V1-1-486nt đến HBG1-3-436nt có chiều cao chỉ bằng khoảng $\frac{1}{2}$ so với người bình thường (giá trị DQ trong khoảng từ 0,4-0,65). Bệnh nhân Cr4 được xác định là người lành mang đột biến xóa đoạn dị hợp tử $G\gamma^+(A\gamma\delta\beta)^0$ -thal.

IV. BÀN LUẬN

Việt Nam có số dân khoảng 96,2 triệu người, trong đó 13,8% là người mang gen bệnh thalassemia.⁷ Rất nhiều đột biến gen β -globin đã được báo cáo ở nhiều nhóm dân tộc và khu vực địa lý khác nhau, chủ yếu là các đột biến điểm như thay thế nucleotid, xóa hoặc chèn một vài nucleotide đơn lẻ dẫn đến đột biến dịch khung. Hiện tại, các bộ kit thương mại tại Việt Nam thường chỉ có thể phát hiện các đột biến điểm phổ biến nhất của β -thalassemia không bao gồm các đột biến xóa đoạn. Vì vậy, bệnh nhân hoặc người mang gen β -thalassemia xóa

đoạn rất dễ bị bỏ sót.

Lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) và thể tích trung bình hồng cầu (MCV) đã được sử dụng trong sàng lọc, chẩn đoán bệnh beta Thalassemia theo hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh Thalassemia của Bộ Y tế và được áp dụng rộng rãi. Trong nghiên cứu chúng tôi quan sát thấy tất cả các trường hợp mang đột biến xóa đoạn gen *HBB* đều có chỉ số MCH và MCV giảm, nồng độ HbA2 có thể tăng hoặc trong giới hạn bình thường và nồng độ HbF tăng cao. Hemoglobin thai nhi (HbF; $\alpha_2\gamma_2$), có ái lực oxy cao có thể vận chuyển oxy từ tuần hoàn của mẹ đến tuần hoàn của thai nhi được mã hóa bởi hai gen γ -globin gần như giống hệt nhau (*HBG2*, *HBG1*) là một phần của cụm gen β -globin, bao gồm 70 đến 90% dịch tan máu ở trẻ sơ sinh, giảm xuống < 1% sau 12 tháng. Khi có khiếm khuyết gen β cơ thể sẽ tăng biểu hiện của gen γ để duy trì mức hemoglobin hợp lý, tránh truyền máu thường xuyên. Nồng độ HbA2 tăng cao ở người mang gen β -thalassemia

là do lượng chuỗi β được sản xuất ít hơn, làm thay đổi tỷ lệ β/δ có lợi cho δ , do đó số lượng chuỗi α liên kết với β sẽ giảm xuống, trong khi chuỗi α liên kết với chuỗi δ sẽ tăng từ $\approx 2,5\%$ trong điều kiện bình thường lên 4% hoặc hơn khi chỉ có một gen β được biểu hiện.^{8,9}

Đột biến mất đoạn trong bệnh β Thalassemia chiếm khoảng $5\% - 10\%$ các đột biến trong cụm gen β -globin.¹⁰ Cho đến nay, hơn 80 trường hợp xóa liên quan đến cụm *HBB* đã được báo cáo và những trường hợp này dẫn đến nhiều kiểu hình lâm sàng khác nhau. Đột biến xóa đoạn exon 1 được tìm thấy trong một gia đình có 2 người con có biểu hiện lâm sàng thiếu máu nhược sắc hồng cầu nhỏ đã phải truyền máu, các chỉ số huyết học cho thấy nồng độ HbA1 giảm rất thấp ($16,6 - 17,5\%$) trong khi nồng độ HbF tăng rất cao ($79,1 - 80,1\%$). Kết quả MLPA cho thấy 2 người con mang đột biến đồng hợp tử vùng exon 1 gen *HBB*, bố mẹ đều là những người lành mang gen bệnh. Đột biến này chưa từng được công bố Việt Nam. Các dạng đột biến tương tự đã được báo cáo trên ngân hàng dữ liệu đột biến gen *HBB* (https://lovd.bx.psu.edu/home.php?select_db=HBB) như đột biến xóa 293bp c.-176_92+25del được tìm thấy ở dạng dị hợp tử trên bệnh nhân Thổ Nhĩ Kỳ, vùng xóa đoạn liên quan đến một phần của 5'UTR, toàn bộ exon 1 và đầu 5' của intron 1 (IVS-1) gen *HBB*; đột biến xóa 532bp từ vùng 5'UTR đến giữa exon 1 gen *HBB* c.-504_28del được tìm thấy dạng dị hợp tử trên một cặp song sinh người Canada. Các bệnh nhân được báo cáo có nồng độ HbA2 từ $7,1 - 8,1\%$; HbF từ $2,7 - 3,3\%$; MCH $21-23\text{pg}$; MCV $67 - 68\text{fL}$. Trong nghiên cứu của chúng tôi, bệnh nhân có giá trị MCH và MCV tương tự như các bệnh nhân trên, tuy nhiên nồng độ HbF tăng rất cao ($80,1\%$) trong khi nồng độ HbA2 lại ở ngưỡng bình thường ($3,3\%$). Tuy nhiên, cần nghiên cứu sâu thêm về điểm cắt đột biến (breakpoint) để xác định chính xác vị trí xóa đoạn, từ đó đưa ra

giải thích phù hợp với tình trạng kiểu hình của bệnh nhân, cũng như lựa chọn phương pháp xét nghiệm phù hợp.

Đột biến Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)⁰-thalassemia lần đầu tiên được Trent và cộng sự báo cáo vào năm 1988. Nipon Chalaow và cộng sự xác nhận điểm cắt đột biến có kích thước khoảng 12,6kb khi tiến hành nghiên cứu 180 cá nhân người Thái Lan có HbF cao và xác định được 28 trường hợp ($15,5\%$) mang đột biến xóa đoạn này. Các nghiên cứu đã xác định rằng việc xóa đoạn Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)⁰-thalassemia là một trong những đột biến xóa đoạn phổ biến nhất được tìm thấy ở các quần thể từ tiểu lục địa Ấn Độ đến các nước Đông Nam Á.⁶ Đột biến làm mất toàn bộ gen β một phần gen δ . Các bệnh nhân mang đột biến trong nghiên cứu của chúng tôi cũng như các bệnh nhân được báo cáo ở khu vực Đông Nam Á đều có biểu hiện thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc, nồng độ HbA2 nằm trong giới hạn điển hình của β ⁰-thalassemia thông thường ($3,5 - 5\%$), nhưng có sự khác biệt rõ rệt với các đột biến điểm ở mức HbF ($16,7 - 21,6\%$). Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy rằng mất đoạn Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)⁰-thalassemia là một đột biến xóa đoạn thường gặp nhất trong quần thể người Việt. Mặc dù, chỉ có 5 trường hợp không có quan hệ huyết thống được nghiên cứu, nhưng có đến 3 trường hợp mang đột biến Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)⁰-thalassemia.

Xóa đoạn $G\gamma^+(A\gamma\delta\beta)$ ⁰-thal là dạng đột biến xóa đoạn β -globin phổ biến nhất ở Trung Quốc. $G\gamma^+(A\gamma\delta\beta)$ ⁰-thal có phạm vi mất đoạn khoảng 78,9kb, bao gồm một phần gen tổng hợp γ globin, toàn bộ các gen tổng hợp δ và β -globin và các trình tự DNA có chức năng điều hòa của gen tổng hợp β -globin. Mất cụm gen *HBB* hoặc đột biến vùng điều hòa của gen tổng hợp γ -globin dẫn đến sự biểu hiện liên tục của gen tổng hợp γ -globin, do đó, làm gia tăng đáng kể nồng độ HbF ở người trưởng thành. Bệnh nhân

mang đột biến xóa đoạn dị hợp tử trong nghiên cứu có giá trị MCV 76,9fl, MCH 25,7pg, nồng độ HbA1 78,3% HbA2 5% và HbF 16,7%. Giá trị này tương đồng với nghiên cứu của Norafiza Mohd Yasin và cộng sự trên quần thể người Malaysia và nghiên cứu của Yuanjun Wu trên bệnh nhân Trung Quốc.^{8,11} Các báo cáo trên thế giới chỉ xác định được dạng dị hợp tử; chưa có bất kỳ báo cáo nào về dạng đồng hợp tử, có lẽ những trẻ mang đột biến đồng hợp không sống sót trong giai đoạn đầu của thai kỳ.^{3,11}

Các đoạn xóa hiếm gặp nhưng thường bị bỏ sót. Nghiên cứu về đột biến xóa đoạn cụm gen β -globin ở tất cả các trường hợp có nồng độ HbF tăng cao mà không tìm thấy đột biến gen *HBB* bằng xét nghiệm strip assay và giải trình tự Sanger là rất cần thiết, giúp cung cấp thông tin có giá trị về các dạng đột biến gen β -globin đồng thời làm sáng tỏ cơ chế tác động của các đột biến đó lên biểu hiện kiểu hình của bệnh. Từ đó giúp bác sĩ lâm sàng hiểu rõ hơn về dữ liệu huyết học và kiểu hình lâm sàng dự kiến, đưa ra phác đồ điều trị phù hợp cho từng bệnh nhân cũng như tư vấn di truyền cho các cá nhân mang đột biến gen bệnh. Ngoài ra, phát hiện các dạng đột biến xóa đoạn trên bệnh nhân Việt Nam là cơ sở khoa học cho các nhà sản xuất kit test bổ sung thêm các dạng đột biến vào bộ kit mà không dừng lại ở 22 đột biến phổ biến như bộ kit β -globin Strip Assay vẫn đang được sử dụng phổ biến ở nước ta hiện nay.

V. KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ

Bằng kỹ thuật MLPA nghiên cứu đã xác định được một gia đình có 2 bệnh nhân mang đột biến xóa đoạn đồng hợp tử exon 1 gen *HBB*, 03 trường hợp mang đột biến xóa đoạn Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)⁰-thalassemia và 01 trường hợp mang đột biến $G\gamma^+(A\gamma\delta\beta)$ ⁰-thal.

Với các trường hợp bệnh nhân có đặc điểm lâm sàng rõ, xét nghiệm công thức máu thể hiện hồng cầu nhỏ nhược sắc (MCH < 27pg;

MCV < 80fL) và xét nghiệm điện di huyết sắc tố bất thường (HbF tăng, HbA2 > 3,5% hoặc bình thường) nhưng không phát hiện được đột biến gen *HBB* bằng phương pháp lai β -globin Strip Assay và giải trình tự Sanger, thì cần làm thêm xét nghiệm MLPA để xác định đột biến xóa đoạn lớn gen *HBB*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rao E, Kumar Chandraker S, Misha Singh M, et al. Global distribution of β -thalassemia mutations: An update. *Gene*. 2024;896:148022. doi:10.1016/j.gene.2023.148022
2. ClinVar. NM_000518. NCBI. Accessed July 13, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>
3. Thein SL. The Molecular Basis of β -Thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(5). doi:10.1101/cshperspect.a011700
4. Langer AL. Beta-Thalassemia. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds. *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed July 14, 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1426/>
5. Motum PI, Hamilton TJ, Lindeman R, et al. Molecular characterisation of Vietnamese HPFH. *Hum Mutat*. 1993;2(3):179-184. doi:10.1002/humu.1380020305
6. Chalaow N, Thein SL, Viprakasit V. The 12,6 kb-deletion in the β -globin gene cluster is the known Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)⁰-thalassemia commonly found in Southeast Asia. *Haematologica*. 2013;98(9):e117-e118. doi:10.3324/haematol.2013.090613
7. Bach KQ, Nguyen HTT, Nguyen TH, et al. Thalassemia in Viet Nam. *Hemoglobin*. 2022;46(1):62-65. doi:10.1080/03630269.2022.2069032
8. Steinberg MH, Nagel RL. Hemoglobins of the Embryo, Fetus, and Adult. In: Forget BG, Weatherall DJ, Higgs DR, Steinberg MH,

eds. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*. 2nd ed. Cambridge University Press; 2009:119-136. doi:10.1017/CBO9780511596582.011

9. Amato A, Cappabianca MP, Perri M, et al. Interpreting elevated fetal hemoglobin in pathology and health at the basic laboratory level: new and known γ - gene mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2014;36(1):13-19. doi:10.1111/ijlh.12094

10. Yasin NM, Abdul Hamid FS, Hassan S, et al. Molecular and hematological studies in a cohort of beta zero South East Asia deletion (β^0 -thal SEA) from Malaysian perspective. *Front Pediatr*. 2022;10. doi:10.3389/fped.2022.974496

11. 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

DETECT β -GLOBIN GENE CLUSTER DELETIONS BY MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION

β -thalassemia is one of the most common autosomal recessive disorders due to reduced (β^+) or absent (β^0) synthesis of the beta globin chains of the hemoglobin (Hb) tetramer. Over 350 mutations in the β -globin cluster were reported on the ClinVar database. Gross deletions which accounted a small proportion of beta-thalassemia were often overlooked because they had not been integrated into commercial kits. Since Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) can identify deletion/duplication mutations with high sensitivity and specificity, it will be used in this study to determine β -globin gene cluster deletions in 8 individuals suspected as β -thalassemia carriers (HbA2 > 3.5%, HbF > 10%; MCH < 27pg; MCV < 80fL) which could not be detected by hybridization and Sanger sequencing. The results identified 4 members of a family carrying deletion exon 1 of the *HBB* gene, 3 cases carrying Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)0-thalassemia mutation, and 1 case of Chinese $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ -thal mutation.

Keywords: β -thalassemia, β -globin deletion, MLPA, Thai/Vietnamese ($\delta\beta$)0-thalassemia.