

PHÁT HIỆN NGƯỜI MANG GEN BỆNH β -THALASSEMIA BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN SANGER

Nguyễn Phan Long¹, Lê Thị Phương², Vương Vũ Việt Hà^{2,3}, Phan Tuấn Nghĩa¹, Trần Văn Khánh²

TÓM TẮT

β -thalassemia là một bệnh rối loạn di truyền lặn do đột biến gen HBB nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc thể số 11 gây suy giảm tổng hợp chuỗi β -globin. Mỗi năm có khoảng 60.000 – 70.000 trẻ em sinh ra bị bệnh β -thalassemia trên toàn thế giới trong đó có Việt Nam. Trên 350 đột biến gây bệnh β -thalassemia đã được công bố. Phát hiện người lành mang đột biến gen HBB gây bệnh β -thalassemia có vai trò quan trọng trong tư vấn di truyền, chẩn đoán trước sinh và chẩn đoán tiền lâm tở nhằm giảm tỉ lệ trẻ sinh ra bị bệnh. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu “xác định các đột biến trên gen HBB ở những người có nguy cơ cao mang đột biến gen gây bệnh β -thalassemia bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger”. Kết quả: xác định 10 đột biến gây bệnh bao gồm: CD26(HbE), CD17, CD41/42, CD95, CD35, CD71/72, IVS-I-1, -28, -88, IVS-II-654. Trong đó CD26(HbE) chiếm tỉ lệ cao nhất 38%; tiếp theo là CD17, CD41/42, -28, CD95 chiếm tỉ lệ lần lượt là 22%, 20%, 8%, 4%, các đột biến còn lại chiếm dưới 4%.

Từ khóa: β -thalassemia, β -globin, giải trình tự Sanger, đột biến gen HBB

SUMMARY

DETECTION OF β -THALASSEMIA CARRIERS BY SANGER GENE SEQUENCING

β -thalassemia is a recessive genetic disorder caused by mutations in the HBB gene located on the short arm of chromosome 11 causing impaired synthesis of the β -globin chain. Every year, about 60,000 - 70,000 children are born with β -thalassemia worldwide, including Vietnam. Over 350 mutations causing β -thalassemia have been published. Detecting healthy people carrying mutations in the HBB gene causing β -thalassemia disease plays an important role in genetic counseling and prenatal prediction to reduce the rate of babies born with the disease. The study was carried out to identify mutations in the HBB gene in people at high risk of carrying mutations in the gene causing β -thalassemia by Sanger gene sequencing. The results identified 10 pathogenic mutations including: CD26(HbE), CD17, CD41/42, CD95, CD35, CD71/72, IVS-I-1, -28, -88, IVS-II-654. Of which, CD26(HbE) accounted for the highest percentage of

38%; followed by CD17, CD41/42, -28, CD95, respectively, accounting for 22%, 20%, 8%, 4%, the remaining mutations accounted for less than 4%.

Keywords: β -thalassemia, β -globin, Sanger gene sequencing, HBB, gene mutation

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

β -thalassemia là một bệnh rối loạn di truyền do đột biến gen β -globin (Haemoglobin subunit Beta - HBB) dài 1606bp nằm trên cánh ngắn NST số 11 gây suy giảm tổng hợp chuỗi β -globin.¹ Sự suy giảm này làm thay đổi quá trình sản xuất Haemoglobin (Hb) trong máu. Tùy vào mức độ chuỗi β -globin suy giảm, bệnh được chia thành 2 trường hợp: β^0 (không có chuỗi β -globin được tổng hợp), β^+ (β -globin được tổng hợp ít). Có hơn 350 đột biến gây bệnh β -thalassemia đã được tìm ra, trong đó đột biến phổ biến là thay đổi 1 nucleotide, mất hoặc thêm oligonucleotide dẫn tới lệch khung.² Ở Việt Nam, có 9 đột biến được phát hiện trong quần thể, đột biến phổ biến nhất là đột biến CD17, đột biến CD26(HbE), CD42, CD95.³ β -thalassemia thường gặp nhất trong các bệnh lý haemoglobin thường gặp là β -thalassemia, haemoglobin E và α -thalassemia, trong đó tỉ lệ người mang gen bệnh thalassemia thay đổi từ 1,5 - 25%, tập trung hầu hết ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam.⁴ Những người có kiểu gen dị hợp tử thường không có biểu hiện lâm sàng và chỉ được phát hiện thông qua xét nghiệm công thức máu. Việc người mang kiểu gen dị hợp tử kết hôn và sinh con là nguồn phát tán gen chủ yếu ra ngoài cộng đồng. Chính vì thế, việc xét nghiệm, phát hiện những người mang gen bệnh β -thalassemia để tư vấn tiền hôn nhân và chẩn đoán trước sinh, chẩn đoán di truyền tiền lâm tở có vai trò rất quan trọng, làm giảm tỷ lệ mắc bệnh trong cộng đồng. Gần đây, các kỹ thuật sinh học phân tử như Multiplex ARMS-PCR, lai ngược dot-blot đã được sử dụng phổ biến, phương pháp này cung cấp một xét nghiệm sàng lọc nhanh chóng, chi phí rẻ, tuy nhiên kỹ thuật này chỉ phát hiện được các đột biến phổ biến đã biết trước. Với hơn 350 đột biến gen HBB đã được công bố thì kỹ thuật giải trình tự Sanger là phương pháp hiệu quả nhất để phát hiện toàn diện các đột biến đã biết cũng như đột biến mới.⁵ Xuất phát từ thực tế nêu trên, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu:

¹Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Bệnh viện Bưu Điện

Chịu trách nhiệm chính: Trần Văn Khánh

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 29.8.2022

Ngày phản biên khoa học: 21.10.2022

Ngày duyệt bài: 28.10.2022

xác định đột biến trên gen HBB bằng phương pháp giải trình tự gen Sanger ở những người có nguy cơ mang đột biến gen gây bệnh.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tiêu chuẩn lựa chọn: 50 người được chẩn đoán có nguy cơ mang đột biến gen gây bệnh β -thalassemia dựa vào kết quả xét nghiệm huyết học và điện di huyết sắc tố (MCV < 80fL, MCH < 27pg, HbA₁ < 96,5%, HbA₂ \geq 3,5% hoặc có thêm HbE, HbF)⁶

Tiêu chuẩn loại trừ: Những người không có đầy đủ các tiêu chuẩn trên, thiếu máu tán huyết do nguyên nhân khác, mắc thêm bệnh cấp tính khác và không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 3/2022 đến tháng 8/2022

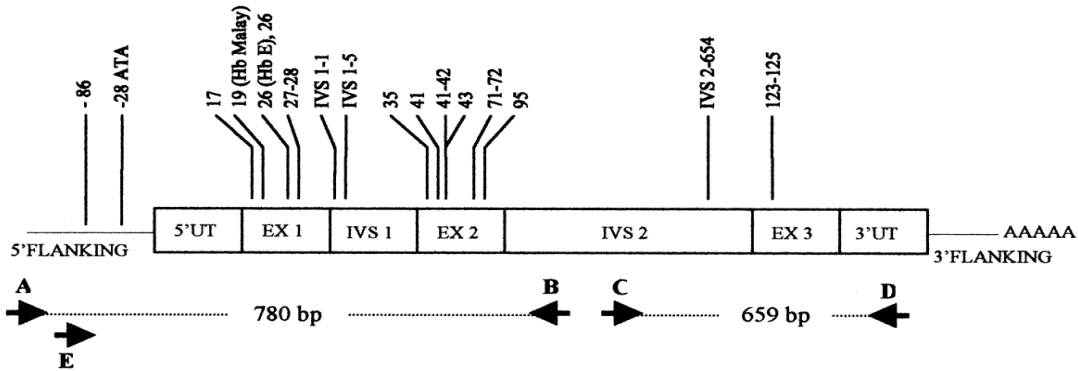
Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Nghiên cứu Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

Các quy trình áp dụng:

Phương pháp thu mẫu: 2mL máu tĩnh mạch của bệnh nhân nguy cơ mang đột biến gen β -thalassemia được thu thập vào ống chống đông EDTA.

Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu toàn phần bằng kit The Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mỹ), quy trình được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu DNA sau tách chiết được tiến hành đo nồng độ và độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ Nanodrop. Mẫu có tỷ số A260/A280 \geq 1.8 mới đạt yêu cầu về độ tinh sạch DNA và được sử dụng để phân tích gen.

Phương pháp PCR: Sử dụng các cặp môi đặc hiệu để khuếch đại toàn bộ gen HBB, theo nghiên cứu của Supatra Sirichotiyakul (2003), vị trí các môi trên gen HBB như hình 1.⁷ Thành phần phản ứng PCR có tổng thể tích 10 μ L gồm: DNA, môi xuôi và môi ngược (5 pmol/ μ L), GoTaq Hot Start Master Mix 2X. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/5 phút, [94°C/30 giây, 60°C/30 giây, 72°C/30 giây] x 35 chu kỳ, 72°C/5 phút, giữ sản phẩm PCR ở 15°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%, 100V trong 30 phút.



Hình 1: Sơ đồ vị trí các môi sử dụng trong nghiên cứu

Kỹ thuật giải trình tự gen Sanger: Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng cho bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, Mỹ). Thành phần phản ứng PCR giải trình tự gen gồm: Buffer Big dye 5X, Big dye Terminator v3.1, môi F/R (5 pmol/ μ L), sản phẩm PCR các exon gen HBB. 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.

2.3. Xử lý số liệu: Kết quả giải trình tự được xử lý trên phần mềm CLC MainWorkbench và so sánh với trình tự chuẩn từ Genebank. Thu

thập thông tin bệnh nhân và xử lý số liệu bằng phần mềm Excel.

2.4. Đạo đức trong nghiên cứu. Thông tin bệnh nhân nghiên cứu được giữ bí mật, số liệu được thu thập và tiến hành một cách trung thực và chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu. Nghiên cứu đã được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức Trường Đại học Y Hà Nội mã số IRB-VN01.001/IRB00003121/FWA 00004148.

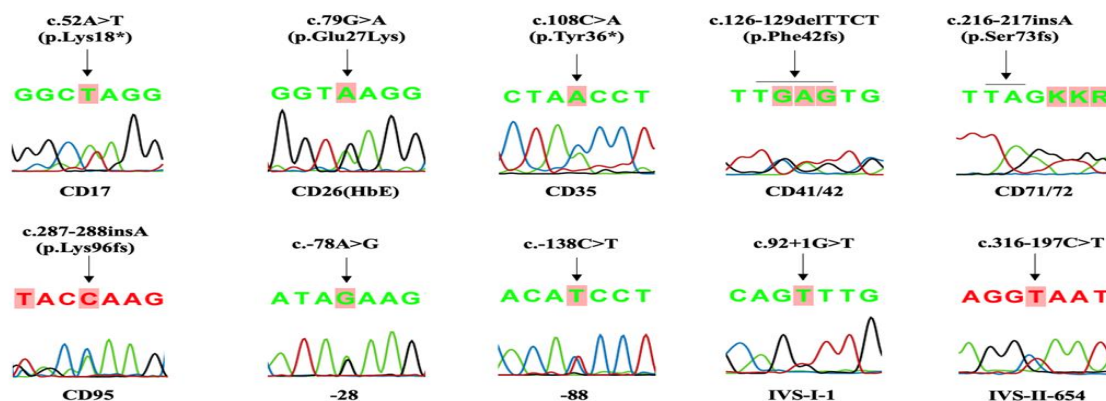
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm của nhóm mẫu nghiên cứu. Trong 50 mẫu nghiên cứu, độ tuổi và giới tính đã được thống kê và có kết quả như sau: người lớn có 42/50 mẫu nghiên cứu chiếm 84%, còn lại là trẻ em. Nữ chiếm 30/50 và nam chiếm

20/50 mẫu nghiên cứu. Độ tuổi trung bình của các mẫu nghiên cứu là 25. Tỷ lệ nam: nữ là 1,5:1.

3.2. Kết quả giải trình tự gen. Bằng phương pháp giải trình tự gen, nghiên cứu đã xác

định 50/50 người tham gia nghiên cứu đều mang đột biến gen HBB với 10 loại đột biến khác nhau đã được tìm thấy: CD26(HbE), CD17, CD41/42, CD95, CD35, CD71/72, IVS-I-1, -28, -88, IVS-II-654.



Hình 2: Hình ảnh các dạng đột biến đã tìm thấy trong nghiên cứu.

Đột biến thay thế nucleotide: -88, -28, CD17, CD26(HbE), CD35, IVS-I-1, IVS-II-654; đột biến lệch khung đọc: CD41/42, CD71/72, CD95. Đột biến CD95 được giải trình tự bằng mỗi ngược.

Bảng 7: Kết quả các loại đột biến phát hiện được

STT	Kiểu đột biến	Biến đổi c.DNA	Biến đổi protein	Exon/ Intron	Số alen	Tỷ lệ (%)
	Dị hợp tử đơn				46	92
1	CD26 (HbE)	c.79G>A	p.Glu27Lys	Exon 1	15	30
2	CD17	c.52A>T	p.Lys18*	Exon 1	10	20
3	CD41/42	c.126-129delTTCT	p.Phe42fs	Exon 2	10	20
4	CD95	c.287-288insA	p.Lys96fs	Exon 2	2	4
5	CD35	c.108C>A	p.Tyr36*	Exon 2	1	2
6	CD71/72	c.216-217insA	p.Ser73fs	Exon 2	1	2
7	IVS-I-1	c.92+1G>T		Intron 1	1	2
8	IVS-II-654	c.316-197C>T		Intron 2	1	2
9	-28	c.-78A>G		Promotor	4	8
10	-88	c.-138C>T		Promotor	1	2
	Đồng hợp tử				3	6
	CD26 – CD26	c.79G>A	p.Glu27Lys	Exon 1	3	6
	Dị hợp tử phối hợp HbE				1	2
	CD26 – CD17	c.79G>A - c.52A>T	p.Glu27Lys - p.Lys18*	Exon 1	1	2

Trong số đột biến được tìm thấy, đột biến CD26(HbE) là đột biến xuất hiện với tỷ lệ cao nhất với tần số 19/50 (38%), đột biến CD17 là đột biến nhiều thứ hai với tỷ lệ 11/50 (22%), đột biến CD41/42, -28, CD95 có tỷ lệ xuất hiện lần lượt là 10/50 (20%), 4/50 (8%), 2/50 (4%). Các đột biến còn lại chiếm dưới 4%. 3 trường hợp được xác định đồng hợp tử HbE và 1 trường hợp kết hợp đột biến CD26 và CD17. Không có đột biến mới được tìm thấy trong nghiên cứu.

3.3. Môi liên quan giữa đột biến và mức độ thiếu máu trên lâm sàng

Bảng 8: Môi liên quan giữa đột biến và một số chỉ số huyết học

Đột biến		MCV (x̄ ± SD)	MCH (x̄ ± SD)	HbA ₁ (x̄ ± SD)	HbA ₂ (x̄ ± SD)	HbF (x̄ ± SD)	HbE (x̄ ± SD)
Dị hợp tử đơn	CD26 (HbE)	73,6 ± 3,9	24,6 ± 1,9	73,4 ± 3,2	3,4 ± 0,5		23,1 ± 3,37
	CD17	59,8 ± 5,1	18,6 ± 1,8	93,4 ± 1,3	5,6 ± 0,5	1,27 ± 1,3	
	CD41/42	60,1 ± 5,2	18,6 ± 2,3	87,55 ± 17,8	5,4 ± 0,4	10,95 ± 22,8	

	-28	69,8 ± 2,3	22,6 ± 0,9	93,8 ± 0,2	5,9 ± 0,3	0,43 ± 0,2	
	CD95	53,7 ± 10	18 ± 2,4	90,7 ± 2,4	5,2 ± 0,3	4,1 ± 2,68	
	-88	74,3	24,1	79	5	16	
	CD35	64,1	19,1	93,3	5,9	0,8	
	CD71/72	76,4	24,9	94,1	5,9		
	IVS-I-1	64,6	21,6	94,1	5,4	0,5	
	IVS-II-654	62,5	19,1	95	5		
Đồng hợp tử	CD26 (HbE)	56,9 ± 3,1	19,2 ± 1,8	1,4 ± 2,42	5,4 ± 2,8	1,55 ± 1,6	90,6 ± 2,93
Dị hợp tử kép	CD26/CD17	73	24,7	60,8	3,3	11,3	18,6

Các mẫu nghiên cứu đều có các chỉ số MCV < 80 fL, MCH < 27 pg, HbA₁ < 96,5%, HbA₂ > 3,5%. Kiểu gen đồng hợp tử gần như không có HbA₁, các kiểu gen dị hợp tử có HbA₁ giảm trong đó các kiểu gen dị hợp tử kép có mức HbA₁ giảm nhiều so với dị hợp tử đơn. Các mẫu đột biến CD26 đều xuất hiện HbE.

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu được thực hiện trên 50 người tham gia nghiên cứu được xác định có nguy cơ mang đột biến gen HBB gây bệnh β -thalassemia dựa trên các chỉ số xét nghiệm máu lâm sàng. Với độ tuổi trung bình 25 và người lớn chiếm 84% tương ứng 42/50 mẫu. Như vậy, các đối tượng trong nghiên cứu này đa số là người lớn. Về giới tính có thể thấy tỷ lệ phân bố của bệnh giữa nam và nữ là 1,5:1. Tỷ lệ của nữ cao hơn so với nam tuy nhiên chênh lệch không có nhiều ý nghĩa do cỡ mẫu chưa nhiều, hơn thế nữa β -thalassemia là bệnh di truyền trên NST thường nên tỷ lệ mang gen bệnh không liên quan đến giới tính.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ mang đột biến CD26(HbE) chiếm tỷ lệ cao nhất với 36,5% ở tất cả bệnh nhân β -thalassemia. Trong nghiên cứu của Lan Thi Thuong Vo (2018) và cộng sự trên 244 bệnh nhân có chỉ số HbA₂ > 3,5% để sàng lọc nguy cơ mắc bệnh β -Thalassemia, đột biến CD26(HbE) có tỷ lệ cao nhất với tần số xuất hiện 128/244 bệnh nhân (chiếm 52,46%).⁸ Như vậy, nghiên cứu này có kết quả phù hợp với nghiên cứu của Lan Thi Thuong Vo, tuy nhiên có sự chênh lệch về tỷ lệ có thể do cỡ mẫu chưa nhiều. CD26(HbE) là một trong những đột biến gây bệnh β -thalassemia phổ biến nhất trong cộng đồng người Đông Nam Á chuyển bộ 3 mã hoá Acid Glutamic (GAG) thành Lysine (AAG). Đột biến CD26(HbE) ảnh hưởng đến sự cắt nối tiền mRNA của HBB, do đó tạo ra haemoglobin bất thường HbE. Trong quá trình dịch mã gen thành protein, các intron trong tiền mRNA cần được loại bỏ thông qua quá trình cắt nối. Các đột biến gen HBB tại chỗ cắt nối kích hoạt các vị trí

cắt nối sai lệch làm giảm hiệu quả của cắt nối mRNA bình thường, dẫn đến sản sinh chuỗi β -globin không có chức năng làm phát sinh bệnh β -thalassemia.⁹ Tất cả các trường hợp phát hiện HbE đều có đột biến CD26. Điều này cho thấy độ nhạy của phương pháp điện di huyết sắc tố đạt 100% đối với HbE.

Đột biến CD17, CD35 là các đột biến vô nghĩa, CD41/42, CD71/72, CD95 là các đột biến lệch khung. Các đột biến này làm mất chức năng tổng hợp chuỗi β -globin tạo kiểu hình β^0 . Đột biến lệch khung CD95 được phát hiện hầu hết ở người Việt Nam nên được gọi là đột biến Việt Nam.⁸ Nghiên cứu cũng phát hiện 1 trường hợp 23 tuổi mang đột biến dị hợp tử phối hợp CD17-CD26(HbE) tuy mang 2 đột biến nhưng không có biểu hiện bệnh, chỉ số HbA₂ < 3,5%, có thể mắc bệnh HbE/ β -Thalassemia thể nhẹ, hiếm có biểu hiện lâm sàng.

Nghiên cứu cũng xác định được 1 trường hợp đột biến ở vị trí cắt nối không bình thường trong intron 2 của HBB bao gồm đột biến ở nucleotide 654, 705 hoặc 745 (IVS-II-654, IVS-II-705 và IVS-II-745) và 1 trường hợp đột biến ở vị trí cắt nối trong Intron 1 (IVS-I-1). Đột biến Cytosine thành Thymine ở nucleotide 654 của gen HBB ở intron 2 (IVS-II-654) là một trong những đột biến phổ biến nhất gây ra bệnh β -thalassemia ở người Trung Quốc và Đông Nam Á ảnh hưởng đến sự cắt nối gen HBB ở giai đoạn tiền mRNA, đột biến IVS-I-1 cũng làm bất hoạt vị trí cắt nối đầu 5' làm cho quá trình cắt nối bị RNA bị gián đoạn.⁹ Đột biến -28 là đột biến ở vùng khởi động làm giảm sự gắn yếu tố phiên mã của hộp TATA, từ đó làm giảm biểu hiện RNA của HBB.

Các đột biến β -thalassemia được phát hiện ở nhiều vị trí trong gen, phổ biến nhất là ở 2 Exon 1 và 2 (chiếm 86%) trong đó Exon 1 chiếm 58%, Intron 2 chiếm 2%. Có 10% đột biến ở vùng khởi động (Promotor). Xét về chức năng gen, 86% đột biến ở giai đoạn dịch mã RNA, 14% đột biến ở giai đoạn phiên mã. Đột biến ở giai đoạn dịch mã RNA gây bệnh nặng hơn do β -globin không còn được tổng hợp, các đột biến ở giai

đoạn phiên mã do vẫn tổng hợp được β -globin nên gây bệnh nhẹ hơn.

Về mối liên quan đột biến với các chỉ số huyết học cận lâm sàng, nhóm đột biến dị hợp tử kép với đồng hợp tử có mức độ thiếu máu nặng hơn so với kiểu gen dị hợp tử trong đột biến đồng hợp tử CD26 có mức độ thiếu máu nhiều nhất với mức HbA₁ giảm gần về 0. Tất cả 50 người tham gia nghiên cứu đều có MCV < 80 fL, MCH < 27 pg. Hồng cầu nhỏ, nhược sắc là một đặc điểm của β -thalassemia, hai chỉ số này thường được sử dụng để sàng lọc thalassemia ở cộng đồng. Cơ chế chính của đặc điểm huyết học này là do kém tổng hợp haemoglobin, sinh hồng cầu không hiệu quả ở tủy xương, vì có đột biến gen HBB. Với đột biến đồng hợp tử CD26(HbE), do không còn β -globin được tổng hợp nên không có HbA₁. Các đột biến còn lại do vẫn tổng hợp được 1 phần chuỗi β -globin nên HbA₁ giảm. Do không còn hay giảm tổng hợp β -globin, chuỗi α -globin dư thừa sẽ kết hợp với chuỗi γ hay δ , làm tăng tỷ lệ HbF và HbA₂.

Kỹ thuật giải trình tự gen Sanger hiện đóng vai trò quan trọng trong việc phát hiện các đột biến điểm gây bệnh β -thalassemia trên gen HBB nói riêng và các bệnh lý di truyền khác nói chung. Phản ứng giải trình tự chỉ thực hiện trong một ống nghiệm duy nhất với 4 loại nucleotide được đánh dấu huỳnh quang riêng biệt, chỉ điện di mao quản trên 1 hàng duy nhất, từ đó tiết kiệm thời gian, công sức của người làm kỹ thuật. Với nguyên lý trên, tất cả các đột biến đều được phát hiện kể cả các đột biến hiếm gặp hay mới mà các kỹ thuật khác không phát hiện được. Đây là ưu điểm vượt trội hơn hẳn so với kỹ thuật ARMS-PCR hay lai ngược dot-blot vốn chỉ phát hiện được các đột biến phổ biến đã biết rõ như CD17, CD26, CD41/42, không phát hiện được các đột biến hiếm hay mới và phải thiết kế mỗi và đầu dò đặc hiệu cho từng đột biến, các đoạn mỗi suy biến có thể gắn vào vị trí khác trong hệ gen tạo sản phẩm không đặc hiệu, số lượng đột biến phát hiện bị hạn chế trong một lần chạy kỹ thuật, lai ngược dot-blot cần có trình độ cao để tạo lập và đánh giá chất lượng của bộ kit và chỉ phát hiện được những đột biến thiết kế sẵn. Ngược lại, kỹ thuật giải trình tự Sanger có thể đọc được toàn bộ trình tự đầy đủ của gen HBB gồm các đoạn exon, intron, trình tự điều hòa phiên mã, dịch mã,... đều có thể xác định trình tự, đảm bảo hầu hết các đột biến liên quan đến β -thalassemia có thể phát hiện được.⁷ Nghiên cứu này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc xác

định đột biến điểm trên gen HBB bằng phương pháp giải trình tự gen Sanger, đặc biệt là ở những người có tiền sử gia đình mắc β -thalassemia từ đó kết quả nghiên cứu giúp ích cho việc lập kế hoạch chẩn đoán trước sinh, chẩn đoán phôi tiền làm tổ và tư vấn di truyền.

V. KẾT LUẬN

Áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger để xác định đột biến ở người mang gen bệnh β -thalassemia ở 50/50 mẫu nghiên cứu đã xác định được 10 đột biến trên gen HBB gây bệnh β -thalassemia: CD26(HbE), CD17, CD41/42, CD95, CD35, CD71/72, IVS-I-1, -28, -88, IVS-II-654. Trong đó CD26(HbE) (38%), CD17 (22%) CD41/42 (20%), -28 (8%), CD95 (4%), các đột biến còn lại chiếm dưới 4%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Turner A, Sasse J, Varadi A.** Rapid detection of pathological mutations and deletions of the haemoglobin beta gene (HBB) by High Resolution Melting (HRM) analysis and Gene Ratio Analysis Copy Enumeration PCR (GRACE-PCR). *BMC Medical Genetics*. 2016;17(1):1-14. doi:10.1186/s12881-016-0334-y
2. **Jaing T, Chang T, Chen S, Lin C, Wen Y, Chiu C.** Molecular genetics of β -thalassemia. *Medicine*. 2021;45(June). doi:10.1097/MD.00000000000027522
3. **Doro MG, Casu G, Frogheri L, et al.** Molecular Characterization of β -Thalassemia Mutations in Central Vietnam. *Hemoglobin*. 2017;41(2):96-99. doi:10.1080/03630269.2017.1321013
4. **Filon D, Oppenheim A, Rachmilewitz EA, Kot R, Ba Truc D.** Molecular analysis of β -thalassemia in Vietnam. *Hemoglobin*. 2000;24(2):99-104. doi:10.3109/03630260009003428
5. **Cai L, Wang W, Wang F, et al.** A comparison of MASS-PCR and ARMS-PCR for the detection of lung cancer gene mutation. *Translational Cancer Research*. 2019;8(7):2564-2569. doi:10.21037/tcr.2019.10.37
6. **Colaco S, Colah R, Nadkarni A.** Significance of borderline HbA₂ levels in β thalassemia carrier screening. *Scientific Reports*. 2022;12(1):1-10. doi:10.1038/s41598-022-09250-5
7. **Sirichotiyakul S, Saetung R, Sanguansermstri T.** Analysis of β -thalassemia mutations in northern Thailand using an automated fluorescence DNA sequencing technique. *Hemoglobin*. 2003;27(2):89-95. doi:10.1081/HEM-120021541
8. **Vo LTT, Nguyen TT, Le HX, Le HTT.** Analysis of Common β -Thalassemia Mutations in North Vietnam. *Hemoglobin*. 2018;42(1):16-22. doi:10.1080/03630269.2018.1428621
9. **Zakaria NA, Bahar R, Abdullah WZ, et al.** Genetic Manipulation Strategies for β -Thalassemia: A Review. *Frontiers in Pediatrics*. 2022; 10(June):1-14. doi:10.3389/fped.2022.901605