

Ứng dụng kỹ thuật Multiplex ligation-dependent probe amplification xác định người lành mang đột biến gen α -thalassemia

Nguyễn Minh Ngọc, Lê Thị Phương, Trần Huy Thịnh, Trần Văn Khánh*

Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/12/2021; ngày chuyển phản biện 27/12/2021; ngày nhận phản biện 25/1/2022; ngày chấp nhận đăng 28/1/2022

Tóm tắt:

Bệnh α -thalassemia phần lớn là do đột biến xóa đoạn gen *HBA1* và *HBA2* gây thiếu hụt chuỗi α -globin cấu thành nên phân tử Hemoglobin (HGB). Tùy theo số lượng chuỗi α 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 đột biến gen α -thalassemia có ý nghĩa quan trọng trong tư vấn di truyền trước sinh và trước hôn nhân nhằm giảm tỷ lệ mắc bệnh trong cộng đồng. Bằng kỹ thuật Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) trên mẫu máu của 15 người nghi ngờ mang đột biến gen α -thalassemia, kết quả xét nghiệm các chỉ số hồng cầu (RBC) và huyết sắc tố đã xác định được 12/15 người mang đột biến $--^{SEA}$, 1/15 người mang đột biến $-\alpha^{3.7}$, 1/15 người mang đột biến $-\alpha^{4.2}$ và 1/15 người mang đột biến điểm *Hb constant spring* ($-\alpha^{HbCs}$).

Từ khóa: gen α -thalassemia, *Hb constant spring*, MLPA, người mang đột biến, $--^{SEA}$, $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

α -thalassemia là một bệnh tan máu bẩm sinh do giảm sản xuất chuỗi α -globin của huyết sắc tố. Bệnh được tìm thấy trên toàn thế giới, trong đó phần lớn ở các khu vực: Địa Trung Hải (19%), châu Phi (41,2%) và Đông Nam Á (44,6%) [1]. Hiện nay, khoảng 5% dân số thế giới mang đột biến gen α -thalassemia, bao gồm dạng α^+ -thalassemia và α^0 -thalassemia, phân bố rộng rãi ở các vùng và quốc gia khác nhau (chủ yếu ở Đông Nam Á). Tại Việt Nam, tỷ lệ người mang đột biến gen bệnh được phát hiện với tần số cao nhất trong khu vực [2, 3].

Bệnh α -thalassemia là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, gây ra do đột biến 2 gen α -globin (*HBA1* và *HBA2*) nằm trên nhiễm sắc thể số 16 dẫn đến giảm hoặc thiếu hụt tổng hợp chuỗi α -globin. Mỗi gen gồm 2 alen quy định tổng hợp chuỗi α -globin, như vậy mỗi phân tử HGB gồm 4 chuỗi α -globin, tùy thuộc vào số lượng alen bị đột biến và dạng đột biến mà các biểu hiện lâm sàng của bệnh α -thalassemia xảy ra ở các mức độ khác nhau. 90% các trường hợp là do đột biến xóa đoạn gen, có thể xảy ra trên 1 hoặc cả 2 gen *HBA1* và *HBA2*, hoặc toàn bộ cụm gen α -globin, bao gồm cả gen ζ globin; 10% còn lại là đột biến điểm [4]. Những đột biến này sẽ tạo ra các alen đột biến ở dạng α^0 -thalassemia (mất cả 2 gen α trên cùng 1 nhiễm sắc thể dẫn đến không tổng hợp được chuỗi α -globin) và α^+ -thalassemia (mất hoặc bất hoạt 1 gen α trên 1 nhiễm sắc thể dẫn đến giảm tổng hợp chuỗi α -globin) [2].

Người lành mang đột biến gen bệnh là những người chỉ mang 1 đột biến α^0 , hoặc 1-2 đột biến α^+ . Những người này tuy không có biểu hiện lâm sàng, chỉ xuất hiện thiếu máu nhẹ khi làm xét nghiệm công thức máu, nhưng khi 2 người mang đột biến gen lấy nhau họ có nguy cơ sinh ra những đứa con bị bệnh với xác suất là

25%. Vì vậy, việc xác định đột biến trên người lành mang đột biến gen bệnh hướng tới mục tiêu tư vấn di truyền, từ đó ngăn ngừa và giảm tỷ lệ mắc bệnh trong cộng đồng là rất cần thiết.

Kỹ thuật MLPA có độ chính xác cao và kết quả nhanh chóng, là phương pháp hữu ích trong việc xác định các đột biến xóa đoạn đồng hợp tử cũng như dị hợp tử. Đồng thời cũng xác định các đột biến lặp đoạn và một vài đột biến điểm thường gặp trong cụm gen α -globin. Xuất phát từ thực tiễn nêu trên, nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu: “Xác định các đột biến gen ở người lành mang đột biến gen bệnh α -thalassemia bằng kỹ thuật MLPA”.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Nhóm nghiên cứu: 15 người được chọn dựa trên xét nghiệm công thức máu bất thường: RBC > 5,5 T/L, MCH < 27,0 pg, MCV < 80 fL, HGB < 130 g/l và kết quả điện di huyết sắc tố bình thường. Công thức máu của người lành mang đột biến gen bệnh được tổng hợp ở bảng 1.

Bảng 1. Công thức máu và chỉ số điện di huyết sắc tố của nhóm nghiên cứu.

n=15	Trung bình ($\pm$ SD)
RBC (T/L)	5,73 $\pm$ 0,54
HGB (g/L)	127,61 $\pm$ 17,62
MCV (fL)	67,2 $\pm$ 3,47
MCH (pg)	21,55 $\pm$ 1,49
HbA1 (%)	97,07 $\pm$ 1,43
HbA2 (%)	2,73 $\pm$ 1,15

*Tác giả liên hệ: Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Applying Multiplex ligation-dependent probe amplification technique to identify α -thalassemia carriers

Minh Ngọc Nguyen, Thi Phuong Le, Huy Thinh Tran, Van Khanh Tran*

Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 21 December 2021; revised 25 January 2022; accepted 28 January 2022

Abstract:

α -thalassemia disease is mostly caused by mutations in the *HBA1* and *HBA2* genes that lead to the deficiency in the α -globin chain, which builds up the haemoglobin molecule. Depending on the number of missing α chains, the clinical manifestations of the disease are at different levels. This disease is inherited in an autosomal recessive manner, hence identifying healthy individuals carrying mutations in the α -thalassemia gene is essential for prenatal and premarital genetic counselling to reduce the incidence in the community. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique was used to determine 15 people who were suspected of carrying the α -thalassemia gene based on their complete blood count. This study identified that there were 12/15 people carrying $--SEA$ mutation, 1/15 carrier having $-\alpha^{3.7}$ mutation, 1/15 carrier having $-\alpha^{4.2}$ mutation and 1/15 person carrying point mutation *Hb* constant spring $-\alpha^{HbCs}$.

Keywords: *Hb* constant spring, MLPA, mutation carriers, α -thalassemia, $--SEA$, $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$.

Classification number: 3.1

Tiêu chuẩn loại trừ: Những người thiếu máu do thiếu sắt.

Nhóm chứng: Mẫu máu của 5 người trưởng thành có công thức máu bình thường: số lượng RBC: 4,0-5,5 T/L; MCH: 27,0-34,0 pg; MCV: 80-95 fL; HGB: 30-150 g/l. Kết quả điện di huyết sắc tố bình thường: HbA1 96,5-98,5% và HbA2 là 1,5-3,5%.

Các mẫu trong nghiên cứu được thu thập và tiến hành các kỹ thuật sinh học phân tử tại Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

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 quang trên máy NanoDrop: nồng độ DNA 80-200 ng/ μ l, đánh giá độ tinh sạch bằng tỷ lệ A260/A280=1,8-2,0.

Kỹ thuật MLPA: Nghiên cứu sử dụng bộ kit SALSA MLPA của Hãng MRC Holland (Hà Lan) với bộ đầu dò P140 dành cho chẩn đoán α -thalassemia.

Tiến hành: 5 μ l DNA có nồng độ tối ưu trong khoảng 50-250 ng đã khử RNA được sử dụng làm khuôn cho phản ứng. MLPA gồm 4 bước chính là biến tính, lai hóa đầu dò, PCR và điện di mao quản. Các bước thí nghiệm và chu trình nhiệt của phản ứng được thực hiện tuân theo quy trình chung của nhà sản xuất.

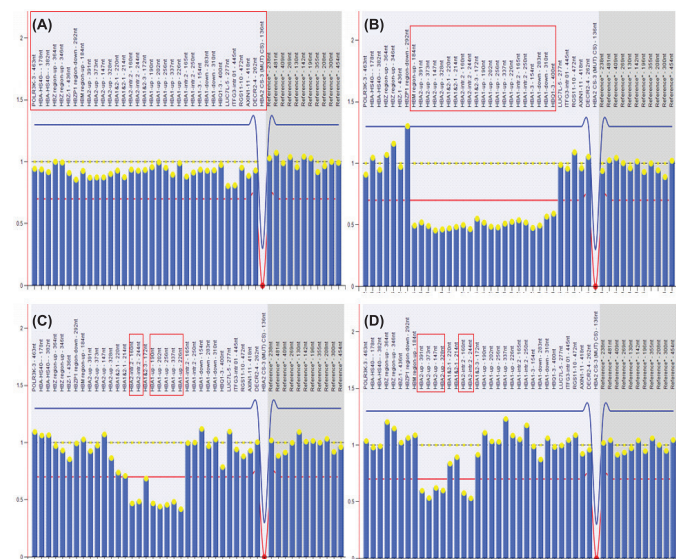
Kết quả MLPA được phân tích trên phần mềm COFFALYSER.Net để tính giá trị Dosage Quotient (DQ - thương số của tín hiệu đỉnh mẫu nghiên cứu so với mẫu đối chứng). Những đỉnh có giá trị DQ trong khoảng 0,8-1,2 là bình thường; DQ=0 tương đương với đột biến mất đoạn đồng hợp tử; DQ trong khoảng 0,4-0,65 được xác định là xóa đoạn dị hợp tử; DQ 1,3-1,65 là có đột biến lặp đoạn.

Đạo đức nghiên cứu: Những người mang đột biến gen bệnh α -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. Người tham gia có thể rút khỏi nghiên cứu bất cứ lúc nào.

3. Kết quả

3.1. Đột biến phát hiện được trên người lành mang đột biến gen bệnh

Đột biến mất đoạn lớn: Bằng kỹ thuật MLPA, nghiên cứu đã xác định được 14/15 người lành mang đột biến mất đoạn lớn vùng gen α -globin. Trong đó, 12/15 (80%) người mang đột biến $--SEA$, 1/15 (6,67%) người mang đột biến $-\alpha^{3.7}$ và 1/15 (6,67%) người mang đột biến $-\alpha^{4.2}$. Kết quả phân tích MLPA của từng nhóm đột biến được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Kết quả MLPA của nhóm chứng và nhóm nghiên cứu có đột biến mất đoạn lớn. Trục tung biểu thị giá trị DQ của các mẫu, trục hoành biểu thị các đỉnh của đầu dò trong bộ kit MLPA P140. (A) Nhóm chứng; (B) Nhóm mang đột biến $--SEA$; (C) Nhóm mang đột biến $-\alpha^{3.7}$; (D) Nhóm mang đột biến $-\alpha^{4.2}$.

Kết quả MLPA của nhóm chứng (hình 1A) cho thấy, các đỉnh của cụm gen quy định tổng hợp chuỗi α -globin (trong khung màu đỏ) có chiều cao đều nhau và giá trị DQ đều nằm trong giá trị bình thường (khoảng 0,7-1,3 theo như khuyến cáo của nhà sản xuất). Hình 1B các đỉnh từ *HBM* đến *HBQ1* (trong khung màu đỏ) có giá trị DQ 0,4-0,65, thấp hơn khoảng 1/2 so với người bình thường, tương ứng với khoảng mất đoạn --*SEA*. Tương tự như vậy, hình 1C thể hiện đột biến gây mất đoạn gen *HBA1* của đột biến $-\alpha^{3.7}$ và hình 1D có tín hiệu các đỉnh tại vùng gen *HBA2* thấp hơn với nhóm chứng, tương ứng với đoạn gen mất gây đột biến $-\alpha^{4.2}$.

Đột biến điểm $-\alpha^{HbCs}$: Có 1/15 (6,67%) người được xác định mang đột biến điểm $-\alpha^{HbCs}$ trong nghiên cứu này (hình 2).



Hình 2. Kết quả MLPA của người lành mang đột biến điểm $-\alpha^{HbCs}$.

Người mang đột biến $-\alpha^{HbCs}$ có kết quả MLPA gần giống với kết quả của nhóm chứng, giá trị DQ của các đầu dò đều nằm trong khoảng 0,7-1,3 nhưng xuất hiện thêm đỉnh *HBA2-CS*.

Tổng hợp kết quả MLPA của 15 người lành mang đột biến gen bệnh được thể hiện ở bảng 2.

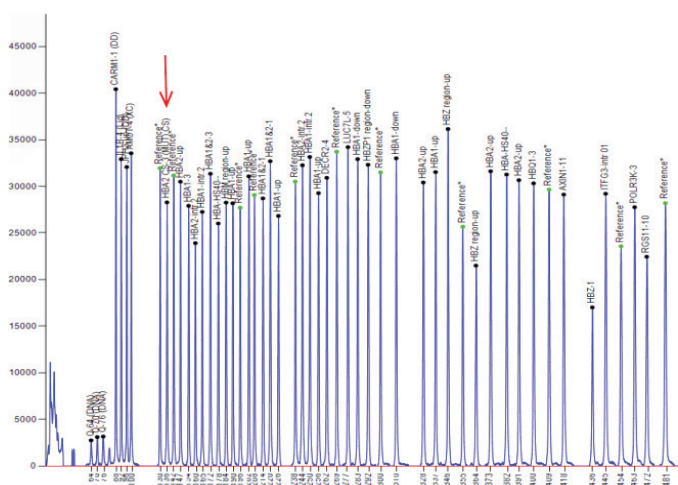
Bảng 2. Các dạng đột biến và kiểu gen phát hiện trên gen α -globin.

Dạng đột biến	Tên đột biến	Kiểu gen	Số lượng (n=15)
Dị hợp tử	$-\alpha^{3.7}$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	1 (6,67%)
Dị hợp tử	$-\alpha^{4.2}$	$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	1 (6,67%)
Chưa xác định được	$-\alpha^{HbCs}$	$\alpha^{Cs}/\alpha\alpha$	1 (6,67%)
Dị hợp tử	-- <i>SEA</i>	-- <i>SEA</i> / $\alpha\alpha$	12 (80%)

Tất cả 15 người tham gia nghiên cứu đều có đột biến gây bệnh α -thalassemia, trong đó có 14/15 (93,33%) người mang đột biến mất đoạn lớn và 1/15 (6,67%) người mang đột biến điểm gây bệnh. 12/15 (80%) người mang đột biến --*SEA*, các đột biến $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$ và $-\alpha^{HbCs}$ đều được phát hiện với tỷ lệ 1/15 (6,67%) người với mỗi loại đột biến.

4. Bàn luận

Hiện nay, có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử đã được phát triển cho phép xác định chính xác đột biến gen α -globin phổ biến hoặc hiếm gặp, giúp giải thích các kiểu hình khác nhau của bệnh. Một số nghiên cứu sử dụng các phương pháp khác nhau như Gap-PCR và giải trình tự DNA [5, 6]. Mỗi kỹ thuật đều có ưu điểm và nhược điểm của nó. Tùy theo điều kiện, mục đích và đối tượng nghiên cứu khác nhau mà mỗi công trình lựa chọn kỹ thuật phù hợp, hoặc kết hợp nhiều kỹ thuật giúp cho kết quả chính xác nhất trong thời gian ngắn nhất, với chi phí hợp lý nhất. Hơn 128 loại đột biến gen α -globin gây ra bệnh α -thalassemia đã được tìm thấy. Sự tương tác giữa các đột biến này có khả năng ngày càng tạo ra các kiểu hình khác nhau. Mức độ nghiêm trọng của bệnh tương quan chặt chẽ với việc giảm hoạt động của gen α -globin [7].



Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật MLPA, giống với nghiên cứu của J.Z. Liu và cs (2008) [8]. MLPA được chọn làm kỹ thuật chính để xác định đột biến gen α -globin trong nghiên cứu vì nó có một số ưu điểm so với các kỹ thuật thông thường khác được sử dụng để phát hiện bệnh α -thalassemia. Kỹ thuật Gap-PCR chỉ có thể xác định các đột biến mất đoạn đã biết và không thể xác định được các đột biến điểm. MLPA là một kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, không chỉ dừng lại ở việc xác định được các đột biến mất đoạn phổ biến đã biết trước, nó còn có thể xác định được các đột biến mất đoạn hiếm hoặc mới phát sinh của các gen α -globin gây bệnh α -thalassemia. Ngoài ra, MLPA còn có thể phát hiện được đột biến lặp đoạn và điểm $-\alpha^{HbCs}$ [8, 9].

Trong nghiên cứu này, các tác giả quan sát thấy đột biến --*SEA* chiếm 80% tổng số mẫu phân tích, trong khi $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$ và $-\alpha^{HbCs}$ có cùng tỷ lệ 6,67%. C. Hockham và cs (2019) [5] đã phát hiện ra rằng, --*SEA* là đột biến -thalassemia phổ biến nhất ở khắp khu vực Đông Nam Á, tương tự như những gì đã được tìm thấy trong nghiên cứu này. Ngoài ra, mức độ xuất hiện của -thalassemia là $-\alpha^{3.7}$ là phổ biến và $-\alpha^{HbCs}$ chiếm phần lớn các đột biến không xóa đoạn lớn trên toàn khu vực. Tần số gen của bệnh α -thalassemia được nghiên cứu ở Campuchia với $-\alpha^{3.7}$ là biến thể phổ biến nhất [6].

Nghiên cứu của T. Munkongdee và cs (2016) [6] cũng xác định các tần số là 0,3-0,8% đối với $-\alpha^{4.2}$, 0,8-1,1% đối với $--^{SEA}$ và 2,1-4,4% đối với đột biến $-\alpha^{HbCs}$ trong cộng đồng cùng với đột biến $-\alpha^{Pakséa}$ (0,9-3,6%). Tần số alen $-\alpha^{3.7}$ được xác định bởi R. Ahmad và cs (2013) [10] trong các quần thể Malaysia khác nhau dao động trong khoảng 6,2-29%. R. Ahmad và cs (2013) [10] cũng phát hiện ra rằng, tỷ lệ alen $-\alpha^{4.2}$ gặp ở quần thể bệnh nhân Mã Lai là 0-1,3%. Kết quả nghiên cứu không tương quan với các nghiên cứu trên do số lượng mẫu ít. Do đó, kết quả của nghiên cứu chưa thể hiện được sự phân bố chính xác của các dạng đột biến gen α -globin trong cộng đồng người Việt Nam.

Đột biến mất đoạn $--^{SEA}$ chiếm tỷ lệ cao trong nghiên cứu này. Kết quả này phù hợp với thực tế rằng, kiểu mất đoạn này là dạng đột biến phổ biến nhất ở Đông Nam Á, dẫn đến thiếu 2 gen α -globin trên nhiễm sắc thể 16 [11]. Trạng thái đồng hợp tử của đột biến này ($--^{SEA}/--^{SEA}$) sẽ làm mất hoàn toàn 4 gen α -globin, do đó không thể tổng hợp chuỗi α -globin. Nếu trường hợp này xảy ra khi mang thai sẽ làm phát sinh quá trình tự trùng hợp các chuỗi γ globin trong bào thai, tạo ra Hb Bart's; loại α -thalassemia này không có khả năng giải phóng ôxy đến mô, gây phù thai, do đó thai nhi sẽ chết hoặc chỉ sống được một thời gian rất ngắn sau khi sinh [12].

$-\alpha^{HbCs}$ được tìm thấy với tỷ lệ thấp trong các mẫu nghiên cứu của nhóm tác giả (1/15 mẫu). Ở Đông Nam Á, $-\alpha^{HbCs}$ đặc biệt phổ biến ở Thái Lan và Lào [13]. Ở các nước khác trong khu vực Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam, số liệu về tỷ lệ mang $-\alpha^{HbCs}$ trong dân số còn hạn chế [14]. Đột biến $-\alpha^{HbCs}$ được gây ra bởi sự thay thế TAA->CAA ở vị trí codon kết thúc của gen *HBA2* (c.427T>C), gây ra sự kéo dài chuỗi protein α -globin. Việc nghiên cứu $-\alpha^{HbCs}$ trong cộng đồng là rất quan trọng. Tế bào RBC có liên kết chuỗi globin $-\alpha^{HbCs}$ đã được chứng minh sẽ gây ra hiện tượng tán huyết. Thông thường, dị hợp tử của $-\alpha^{HbCs}$ không có triệu chứng, nhưng khi kết hợp với sự xóa đoạn $--^{SEA}$ có thể gây ra bệnh HbH [15]. Vì vậy, việc xác định các đột biến này đóng vai trò rất quan trọng trong việc tư vấn di truyền trước sinh và sàng lọc trước sinh.

Kỹ thuật MLPA có độ nhạy và đặc hiệu cao nên hoàn toàn có thể ứng dụng trong chẩn đoán xác định các đột biến xóa đoạn và đột biến α^{HbCs} trên gen α -globin gây bệnh α -thalassemia. Tuy nhiên, do kinh phí hạn hẹp, nghiên cứu mới chỉ tiến hành cỡ mẫu nhỏ, chưa đánh giá được tần suất người lành mang đột biến gen bệnh α -thalassemia trong dân số. Ngoài ra, còn khoảng 10% đột biến điểm trên cụm gen α -globin không thể phát hiện bằng phương pháp MLPA. Vì vậy, cần kết hợp thêm phương pháp khác như giải trình tự gen Sanger hoặc Next-generation sequencing trên cỡ mẫu lớn để xác định được toàn bộ các đột biến gen gây bệnh α -thalassemia và đưa ra bản đồ đột biến gen α -globin cũng như tần suất người lành mang đột biến gen bệnh α -thalassemia trên quần thể người Việt Nam.

5. Kết luận

Bằng kỹ thuật MLPA nghiên cứu đã xác định được 4 loại đột biến trong 15 mẫu người lành mang đột biến gen bệnh α -thalassemia. Bao gồm 3 đột biến xóa đoạn ($--^{SEA}$, $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$) và 1 đột biến điểm $-\alpha^{HbCs}$. Dạng xóa $--^{SEA}$ được tìm thấy nhiều nhất trong

tất cả các mẫu với 12/15 người mang kiểu xóa đoạn này. Các đột biến khác được xác định với số lượng thấp hơn: 1/15 người mang đột biến $-\alpha^{3.7}$, 1/15 người mang đột biến $-\alpha^{4.2}$ và 1/15 người mang đột biến $-\alpha^{HbCs}$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Modell, M. Darlison (2008), "Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators", *Bull. World Health Organ.*, **86**(6), pp.480-487, DOI: 10.2471/blt.06.036673.
- [2] J. Old, C.L. Harteveld, J.T. Synodinos, et al. (2012), *Prevention of Thalassemias and Other Haemoglobin Disorders*, Publishers Thalassemia International Federation, 184pp.
- [3] L.P.W. Goh, E.T.J. Chong, P.C. Lee (2020), "Prevalence of alpha(α)-thalassemia in Southeast Asia (2010-2020): A meta-analysis involving 83,674 subjects", *Int.J. Environ. Res. Public Health*, **17**(20), DOI: 10.3390/ijerph17207354.
- [4] C.L. Harteveld, D.R. Higgs, (2010), " α -thalassaemia", *Orphanet J. Rare Dis.*, **5**, DOI: 10.1186/1750-1172-5-13.
- [5] C. Hockham, S. Ekwattanakit, F.B. Piel, et al. (2019), "Estimating the burden of α -thalassaemia in Thailand using a comprehensive prevalence database for Southeast Asia", *Elife*, **8**, DOI: 10.7554/elife.40580.
- [6] T. Munkongdee, J. Tanakulmas, P. But, et al. (2016), "Molecular epidemiology of hemoglobinopathies in Cambodia", *Hemoglobin*, **40**(3), pp.163-167, DOI: 10.3109/03630269.2016.11587.
- [7] D.R. Higgs, W.G. Wood, (2008), "Long-range regulation of alpha globin gene expression during erythropoiesis", *Curr. Opin. Hematol.*, **15**(3), pp.176-183, DOI: 10.1097/MOH.0b013e3282f734c.
- [8] J.Z. Liu, H. Han, J.P. Schouten, et al. (2008), "Detection of α -thalassemia in China by using multiplex ligation-dependent probe amplification", *Hemoglobin*, **32**(6), pp.561-571, DOI: 10.1080/03630260802508111.
- [9] C.L. Harteveld, A. Voskamp, M. Philipsen, et al. (2005), "Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution Multiplex ligation-dependent probe amplification", *J. Med. Genet.*, **42**(12), pp.922-931, DOI: 10.1136/jmg.2005.033597.
- [10] R. Ahmad, M. Saleem, N.S. Aloysisious, et al. (2013), "Distribution of alpha thalassaemia gene variants in diverse ethnic populations in Malaysia: Data from the institute for medical research", *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, pp.18599-18614, DOI: 10.3390/ijms140918599.
- [11] Q.W. Qiu, D.D. Wu, L.H. Yu, et al. (2013), "Evidence of recent natural selection on the Southeast Asian deletion ($--^{SEA}$) causing α -thalassemia in South China", *BMC Evolutionary Biology*, **13**(1), DOI: 10.1186/1471-2148-13-63.
- [12] S. Farashi, C.L. Harteveld (2018), "Molecular basis of α -thalassemia", *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **70**, pp.43-53, DOI: 10.1016/j.bcmd.2017.09.004.
- [13] S. Fucharoen, P. Winichagoon (2011), "Haemoglobinopathies in Southeast Asia", *Indian J. Med. Res.*, **134**(4), pp.498-506.
- [14] V.H. Nguyen, K. Sanchaisuriya, K. Wongprachu, et al. (2013), "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.*, **52**(4), pp.161-165, DOI: 10.1016/j.bcmd.2013.12.002.
- [15] W. Jomoui, G. Fucharoen, K. Sanchaisuriy, et al. (2015), "Hemoglobin constant spring among Southeast Asian populations: Haplotypic heterogeneities and phylogenetic analysis", *PLOS ONE*, **10**(12), DOI: 10.1371/journal.pone.0145230.