

**BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT LAI PHÂN TỬ NGƯỢC
(REVERSE-HYBRIDIZATION STRIP ASSAY) TRONG NGHIÊN CỨU
XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN GLOBIN GÂY BỆNH THALASSEMIA TẠI THÁI NGUYÊN**

Nguyễn Tiến Dũng^{1,*}, Nguyễn Kiều Giang^{1,2}

TÓM TẮT: Tan máu bẩm sinh (thalassemia) là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường rất phổ biến trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Xác định đột biến trên gen globin rất có ý nghĩa trong sàng lọc trước sinh và tư vấn di truyền dự phòng thalassemia đặc biệt là các thể nặng. Đề tài này nhằm mục tiêu xác định các đột biến gen bệnh thalassemia bằng kỹ thuật reverse-hybridization strip assay (lai phân tử ngược). 30 mẫu máu ngoại vi được xác định đột biến trên gen globin gây bệnh thalassemia bằng kỹ thuật lai phân tử ngược. Kết quả phát hiện 8 kiểu allele đột biến (Cd 41/42 (-TTCT) ; Cd 17 (A->T) ; Cd 71/72 (+A) ; Cd -28 (A->G)CD26 (G->A :HbE) ; ^{-SEA} ; ^{-α³⁷} ; ^{α^{CS}}) tổ hợp lên 7 kiểu gen gồm ^{-SEA} / ^{-α³⁷} ; ^{-SEA} / ^{α^{CS}} ; β/β^{41/42} ; β/β¹⁷ ; β/β^{71/72} ; β/β⁻²⁸ ; β/β^{CD26(HbE)}.

Từ khóa: lai phân tử ngược, gen globin, thalassemia

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tan máu bẩm sinh (thalassemia) là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường phổ biến toàn thế giới. Nguyên nhân gây bệnh là do các đột biến trên gen tổng hợp các chuỗi globin cấu tạo lên phân tử hemoglobin (Hb) dẫn đến thiếu hụt Hb trong hồng cầu. Trên thế giới, ước tính 7% phụ nữ có thai mang gen bệnh và mỗi năm có khoảng 330.000 trẻ được sinh mắc mới các thể thalassemia nặng (đồng hợp tử) tạo lên gánh nặng điều trị rất lớn cho cộng đồng [1].

Bệnh gây ra nhiều biến chứng nặng nề ảnh hưởng đến tuổi thọ chất lượng cuộc sống và giống nòi. Hiện nay chưa có phương pháp triệt để điều trị dứt điểm bệnh do đó, các chương trình dự phòng được xem là giải pháp bền vững và có hiệu quả trong giảm thiểu trẻ mắc mới thalassemia. Sàng lọc người mang gen trong cộng đồng, tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh là các hướng tiếp cận

chính của các chương trình dự phòng thành công tại nhiều quốc gia trước đây có tỷ lệ lưu hành bệnh cao [2]. Việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để xác định chính xác đột biến trên gen globin rất có ý nghĩa cho tư vấn di truyền cũng như chẩn đoán trước sinh.

Ở Việt Nam, phương pháp thường quy xác định gen đột biến trong thalassemia là multiplex PCR, ARMS-PCR giải trình tự vùng gen globin. Các phương pháp này thuận tiện khi phát hiện các đột biến đơn lẻ đã biết và có thể phải kết hợp với giải trình tự gen trong trường hợp đột biến không nằm trong panel sàng lọc hoặc một số biến thể hiếm gặp của Hb [3, 4]. Kỹ thuật Reverse hybridization (lai phân tử ngược) được cải tiến trên cơ sở của kỹ thuật lai phân tử có thể phát hiện cùng lúc được nhiều đột biến khác nhau trên cùng một gen. Đây là một quy trình mới, có nhiều ưu điểm so với các phương pháp hiện đang được áp dụng.

Thái Nguyên là một tỉnh trung du miền núi phía Bắc, tỷ lệ lưu hành gen bệnh thalassemia tại đây khá cao, dao động từ 9-27% [5-7]. Điều này cho thấy vấn đề dự phòng bệnh thalassemia là rất cấp thiết tại Thái Nguyên. Tuy vậy, chưa có cơ sở y tế nào tại Thái Nguyên áp dụng các kỹ thuật các sinh học phân tử trong chẩn đoán đột

¹ Đại học Y dược Thái Nguyên

² Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên

* Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Nguyễn Kiều Giang

Email: drkiangk27@gmail.com

Ngày nhận bài: 26/5/2017

Ngày phản biện: 6/6/2017

Ngày chấp nhận đăng: 15/6/2017

biến gen gây bệnh thalassemia, vì thế chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: "Xác định các loại đột biến gen bệnh thalassemia dựa vào kỹ thuật reverse-hybridization strip assay"

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: 30 mẫu máu ngoại vi của người mang gen thalassemia được nghiên cứu. Bao gồm 15 mẫu có Hb bất thường (6 mẫu HbH-CS, 4 mẫu HbH, 5 mẫu HbE), 15 mẫu tỷ lệ HbA₂ >3,5%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: Cắt ngang mô tả
- Quy trình nghiên cứu

Điện di Huyết sắc tố: Các mẫu máu được làm điện di HST để chẩn đoán thể bệnh. Phân loại thể bệnh theo hướng dẫn của Bộ Y tế [2]. Bình thường: HbA₁ (96-98%); HbA₂ (0,5-3,5%); HbF (<1%). Bất thường: Beta thalassemia nếu HbA₂>3,5%; HbF>1%; Alpha thalassemia nếu có HbH hoặc/và Hb Bart's; Có HbE: Huyết sắc tố E; HbF và/hoặc HbA₂ tăng + HbE: bệnh beta thalassemia/HbE. Điện di HST được thực hiện trên máy Capillarys II – Sebia – France tại Trung tâm Huyết học Truyền máu- Bệnh viện Trung Ương Thái Nguyên.

Tách chiết DNA: 2ml máu tĩnh mạch của đối tượng nghiên cứu được chống đông bằng EDTA. DNA của các mẫu máu được tách chiết từ mẫu máu toàn phần bởi DNA Mini Blood Kit (Qiagen), kiểm tra độ tinh khiết của DNA tách chiết ở bước sóng 260nm/280nm, bảo quản lạnh (4°C) sau khi tách và âm sâu (-28°C) sau khi xét nghiệm gen.

Phản ứng khuếch đại DNA đích bằng PCR: Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu trong Mix với dung dịch Taq DNA Polymerase nồng độ 0,33U/μl cho (α thalassemia) và 0,2U/μl (cho β thalassemia) trong các chu kỳ nhiệt để cắt và khuếch đại các đoạn gen đích theo trình tự bổ sung. Chu

kỳ nhiệt tương ứng cho khuếch đại DNA α thalassemia là 95°C/5 phút; 97°C/40 giây – 64°C/40 giây – 72°C/1:30 phút (3 chu kỳ); 97°C/40 giây – 58°C/40 giây – 72°C/1:30 phút (37 chu kỳ) và 72°C/5 phút. Chu kỳ nhiệt cho khuếch đại DNA β thalassemia là 94°C/2 phút; 94°C/15 giây – 58°C/30 giây – 72°C/45 giây (35 chu kỳ) và 72°C/3 phút.

Thực hiện kỹ thuật reverse-hybridization strip assay: Nghiên cứu này sử dụng Kit Globin StripAssay do hãng ViennaLab Diagnostics GmbH của Austria phát triển dựa trên kỹ thuật Reverse hybridization. Bộ kit này bao phát hiện 22 đột biến trên gen β globin - dạng phổ biến ở người Đông Nam Á (gồm β-Globin StripAssay SEA), và 21 đột biến trên gen α globin (α-Globin StripAssay). Các kit trên đáp ứng tiêu chuẩn ISO, tất cả các sản phẩm đều được đánh dấu CE (Conformité Européene) và IVD (In Vitro Diagnostics).

Sản phẩm DNA đích khuếch đại được lai với Teststrip có sẵn chứa các đầu dò oligonucleotide đặc hiệu alen đột biến (mutant) và alen người bình thường không có đột biến (wild type). Sau các bước rửa đặc hiệu, trình tự giới hạn được phát hiện nhờ các phản ứng màu enzym.

Phiên giải kết quả: Quan sát các chỉ thị màu bằng mắt thường tương ứng với các đột biến gắn trên thanh strip. Xét nghiệm xác định đột biến gen được thực hiện trên hệ thống PCR tại labo bộ môn Vi Sinh, trường Đại Học Y Dược Thái Nguyên.

- Phân tích kết quả: sử dụng phần mềm thống kê stata phiên bản 12.0

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Nhận xét bảng 3.1: Tỷ lệ hợp tử (DHT) β-thalassemia chiếm tỷ lệ cao nhất 50,0%. Tiếp đó đến DHT kết hợp α⁰-thal và α⁺-thal (HbH) chiếm 33,3%. 5 trường hợp DHT Hb E (16,7%).

Nhận xét bảng 3.2: Có 10 trường hợp HbH do sự kết hợp giữa đột biến xóa đoạn dài kiểu SEA với đột biến xóa đoạn ngắn 3.7 hoặc đột biến điểm HbCS. Các kiểu này gây

tình trạng thiếu máu từ nhẹ đến trung bình. Các kiểu di hợp từ α^0 , β^0 đều gây tình trạng

thiếu máu nhẹ, các chỉ số MCV, MCH đều thấp hơn so với ngưỡng bình thường.

Bảng 3.1. Phân bố tỷ lệ thalassemia theo kiểu hình dựa trên điện di HST

Kiểu gen Thalassemia	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Di hợp từ kết hợp α^0 -thal/ α^+ -thal	10	33,3
Di hợp từ β^0 -thal hoặc β^+ -thal	15	50,0
Di hợp từ Hb E	5	16,7
Tổng	30	100

Bảng 3.2. Đặc điểm kiểu gen và các chỉ số huyết học liên quan đến kiểu gen

Kiểu đột biến	Số lượng	Kiểu Hb	Hb,g/dL	MCV,ft	MCH, pg
-- ^{SEA} / α^{37}	4	A ₂ A Bart's H	9,3±1,52	57,5±2,28	17,2±1,36
-- ^{SEA} / α^{CS}	6	A ₂ A Bart's H CS	7,3±1,84	64,7±3,54	22,1±1,78
$\beta/\beta^{41/42}$	9	A ₂ A (HbA2 ↑)	11,2±0,33	63,9±3,0	19,4±0,94
β/β^{17}	3	A ₂ A (HbA2 ↑)	10,5±0,28	65,7±0,49	20,7±0,49
$\beta/\beta^{71/72}$	2	A ₂ FA (HbA2 ↑)	11,4±0,89	70,4±8,97	22,1±1,6
β/β^{28}	1	A ₂ A (HbA2 ↑)	12,0	73,1	22,6
β/β^{CD26}	5	A ₂ EA (HbE)	11,0±1,2	78,7±3,86	25,1±1,46

Bảng 3.3. Phân bố tỷ lệ allele đột biến trong số đối tượng được khảo sát

Kiểu allele đột biến	Phân loại	Số allele	
		Số lượng	Tỷ lệ (%)
α-Thalassemia			
-- ^{SEA}	α^0	10	50,0
- α^{37}	α^+	4	20,0
- α^{CS}	α^+	6	30,0
Tổng		20	100
β-Thalassemia			
Cd 41/42 (-TTCT)	β^0	9	45,0
Cd 17 (A->T)	β^0	3	15,0
Cd 71/72 (+A)	β^0	2	10,0
Cd -28 (A->G)	β^+	1	5,0
Cd 26 (G->A)	β^+	5	25,0
Tổng		20	100

Nhận xét: Đột biến kiểu --^{SEA} chiếm tỷ lệ cao nhất trong nhóm alpha thalassemia. Trong nhóm beta thalassemia Đột biến CD 41/42 (-TTCT) chiếm tỷ lệ cao nhất tiếp đến là CD 26 (G->A:HbE)

4. BÀN LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Thái Nguyên ứng dụng kỹ thuật lai phân tử

ngược trong chẩn đoán các đột biến gen liên quan đến bệnh thalassemia. Trước đó, điện di huyết sắc tố là phương pháp thường quy để chẩn đoán thể bệnh thalassemia. Điện di HST có ưu điểm trong chẩn đoán thể beta thalassemia và một số biến thể Hb, tuy nhiên không phát hiện được các trường hợp mang gen α^0

thalassemia do đó nếu sử dụng để sàng lọc hoặc chẩn đoán trước sinh, phương pháp này sẽ bỏ sót các trường hợp DHT $--/\alpha\alpha$ từ đó không dự phòng được thể phù thai (Bart's Hydrop Fetalis).

Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn phương pháp lai phân tử ngược để chẩn đoán đột biến liên quan đến thalassemia. Do đó chúng tôi lựa chọn các trường hợp đã được xác định tình trạng mang gen trên điện di Hb để phát hiện đột biến trên các trường hợp này. So với các phương pháp thông thường, phương pháp này có một số ưu điểm trội hơn. Có thể cùng lúc phát hiện được nhiều đột biến nhờ phản ứng đơn giản (Kit α - β Globin StripAssay phát hiện trên 20 đột biến trên mỗi gen globin). Thời gian thực hiện xét nghiệm nhanh (trong vòng 6 đến 8 giờ), độ chính xác cao. Lượng DNA mẫu cần cho xét nghiệm ít (chỉ 10 đến 50ng DNA cho một phản ứng PCR duy nhất). Không sử dụng các hóa chất phóng xạ, phương tiện máy móc đơn giản (máy PCR, máy điện di agarose gel, máy lắc ...), phù hợp với điều kiện cơ sở vật chất của các labo y tế tuyến tỉnh. Đọc và phân tích kết quả bằng mắt thường qua chỉ thị màu trên các thanh phản ứng.

30 mẫu máu ngoại vi đã được lựa chọn trong đó 10 trường hợp HbH cần xác định các đột biến trên alpha globin, 15 trường hợp HbA₂ tăng và 5 trường hợp HbE cần xác định các đột biến trên gen beta globin. Kiểu hình của các trường hợp này được trình bày ở bảng 3.1. Các trường hợp DHT β -thal chiếm tỷ lệ cao nhất (50%) còn lại là DHT α^0 -thal/ α^+ -thal (33,3%) và DHT HbE (16,7%). Bằng phương pháp lai phân tử ngược, 100% các đột biến trên gen globin đã được phát hiện trong nghiên cứu này. Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy có 7 kiểu đột biến gen được phát hiện trong 3 nhóm kiểu hình đã trình bày ở bảng 3.1. Thể HbH được xác định do sự kết hợp của 2 loại đột biến là kiểu $--^{SEA}$ kết hợp với

$-\alpha^{3,7}$ (4 trường hợp) và $--^{SEA}$ kết hợp với $-\alpha^{CS}$ (6 trường hợp). Với DHT β thalassemia, 4 loại đột biến gen đã được phát hiện trong đó có 3 kiểu thuộc nhóm DHT β^0 thalassemia gồm $\beta/\beta^{41/42}$, β/β^{17} , $\beta/\beta^{71/72}$ và một kiểu gen thuộc nhóm β^+ thalassemia là β/β^{28} . Việc phát hiện được chính xác loại đột biến rất có ý nghĩa trong chẩn đoán trước sinh và tư vấn di truyền và là cơ sở cho đình chỉ thai nghén liên quan đến thalassemia. Theo y văn, các trường hợp β^0/β^0 hoặc β^0/β^E thường gây ra tình trạng thiếu máu nặng nề trên lâm sàng và là mục tiêu sàng lọc của các chương trình dự phòng [8]. Tuy vậy với nhóm β^+/ β^+ hoặc β^+/ β^E , tùy thuộc vào loại đột biến mà biểu hiện thiếu máu trên lâm sàng có thể từ nhẹ đến trung gian hoặc nặng. Các đặc điểm huyết học cũng phù hợp hơn khi phân bố theo các nhóm gen đột biến (Bảng 3.2). Với thể HbH, huyết sắc tố ở nhóm $--^{SEA}/\alpha^{CS}$ là thấp hơn hẳn nhóm $--^{SEA}/-\alpha^{3,7}$. Điều này được lý giải do đột biến điểm HbCS xảy ra trên gen HBA2, trên thực tế gen này chiếm ưu thế hơn HBA1 trong tổng hợp globin alpha do đó đột biến trên gen này thường dẫn đến tình trạng thiếu máu nặng nề hơn [9-11]. Có tác giả còn chỉ ra kiểu hình đột biến $--^{SEA}/\alpha^{CS}$ còn có thể gây phù thai và tử vong sơ sinh giống trường hợp Bart's Hydrop Fetalis. Với beta thalassemia, việc phân định được 2 nhóm β^+ và β^0 trong kết quả nghiên cứu đã giải thích tốt hơn cho các thay đổi trên huyết đồ. Nhóm đột biến β/β^0 thể hiện tình trạng thiếu máu nhẹ trên huyết đồ trong khi trường hợp β/β^+ được phân loại không thiếu máu, điều này là phù hợp với đặc điểm sinh học phân tử và mô tả ở các y văn trước đây. Với 5 trường hợp HbE, kỹ thuật lai ghép ngược đều phát hiện đột biến CD26 (G>A) gây ra biến đổi cấu trúc Hb tương ứng với trường hợp HbE. Tuy nhiên các chỉ số MCV, MCH và Hb trên huyết đồ chưa đại diện cho thể DHT HbE điển hình. Có thể do cỡ mẫu của chúng tôi

khả ít đồng thời DHT HbE có thể kết hợp với các đột biến trên gen globin alpha [12] mà trong nghiên cứu này chúng tôi chưa có điều kiện kiểm tra.

Về tần số allele đột biến, kiểu allele --^{SEA} chiếm tỷ lệ cao nhất trong nhóm đột biến trên gen globin alpha (50%). Với các đột biến trên beta globin, kiểu CD41/42 (-TTCT) là 45% tiếp đến là CD26 (G>A:HbE). Tần số allele đột biến rất có ý nghĩa trong việc lựa chọn kỹ thuật sàng lọc phù hợp. Ngoài ra, tần số allele còn sử dụng để ước tính tỷ lệ đồng hợp tử lặn trong quần thể ở các thế hệ kế tiếp từ đó có phương án dự phòng thích hợp.

Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật lai phân tử ngược tại Thái Nguyên bước đầu đã thành công trong xác định các đột biến trên gen globin liên quan đến thalassemia. Kết quả từ nghiên cứu này có thể được tham khảo cho xây dựng chương trình dự phòng thalassemia trong khu vực.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 30 mẫu máu Kết quả phân tích DNA bằng kỹ thuật lai phân tử ngược (reverse-hybridization Strip Assay) cho 30 mẫu được sàng lọc thalassemia như sau:

- 100% số mẫu đều xác định được các đột biến gen gây bệnh thalassemia gồm 7 kiểu gen xếp vào 4 nhóm kiểu hình:

- o DHT β^0 -thal là 46,7%: $\beta/\beta^{41/42}; \beta/\beta^{17}/\beta/\beta^{71/72}$
- o DHT β^+ -thal là 3,3%: β/β^{-28}
- o DHT kết hợp α^0 -thal/ α^+ -thal (HbH) chiếm 33,3%: --^{SEA}/ α^{37} ; --^{SEA}/ α^{CS}
- o DHT HbE là 16,7%: $\beta/\beta^{CD26(HbE)}$

- Kiểu đột biến và tần số allele đột biến: 8 kiểu đột biến gen được phát hiện gồm Cd 41/42 (-TTCT); Cd 17 (A->T); Cd 71/72 (+A); Cd -28 (A->G)CD26 (G->A:HbE); --^{SEA}; -- α^{37} ; α^{CS} . Đột biến kiểu --^{SEA} chiếm tỷ lệ cao nhất trong nhóm alpha thalassemia (50%). Đột biến Cd 41/42 (-TTCT) chiếm tỷ lệ cao nhất (45%) trong nhóm beta thalassmia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Modell, B. and M. Darlison (2008), Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Bull World Health Organ. 86(6): p. 480-7.
2. Cao A. (2002), Screening for thalassemia A model of succes. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. 29(2): p. 305-328.
3. Ngô Diễm Ngọc và cs (2013), Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong phát hiện đột biến gen a globin của bệnh a thalassemia. Tạp chí nghiên cứu y học. 81(1): p. 14-18.
4. Nguyễn Khắc Hân Hoan và cs (2011), Tầm soát và chẩn đoán trước sinh đột biến gen thalassemia Tạp chí công nghệ y học, 2011. 73(2): p. 1-8.
5. Nguyễn Kiều Giang, Nguyễn Thái Dũng (2016), Thực trạng mang gen bệnh tan máu bẩm sinh ở phụ nữ dân tộc Tày, huyện Định Hoá, tỉnh Thái Nguyên. Tạp chí Y học Việt Nam. 448: p. 13-20.
6. Ngọc HV (2007), Nghiên cứu thực trạng bệnh beta thalassemia và một số yếu tố liên quan ở trẻ dân tộc Tày và Dao huyện Định Hoá Thái Nguyên, Đại Học Y Dược Thái Nguyên.
7. Vân VTB. (2001), Nghiên cứu thực trạng mang gen bệnh b Thalassemia ở dân tộc Nùng và Mông tại xã Tân Long Đồng Hỷ Thái Nguyên. Đại học Y Dược Thái Nguyên.
8. Khánh, BQ. (2015), Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm và đột biến gen ở bệnh nhân beta Thalassemia/HbE. Kỷ yếu hội nghị khoa học Thalassemia toàn quốc lần thứ I: tr. 150-156.
9. Trục DB. (2012), Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh hbh do đột biến sea/hbcs trên gen α globin. Tạp chí Y Học Việt Nam. Số đặc biệt tháng 9: tr. 212-215.
10. Chui DHK., Fucharoen S., Chan V. (2003), Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. Vol. 101.

pp.791-800.

11. Rabiee M., Shams JA., Zafargandie N. (2015), The Adverse Effects of Pregnancies Complicated by Hemoglobin H (HBH) Disease. Iran J Pathol. 10(4): p. 318-21.

12. Sanchaisuriya K. et al (1997), Molecular and hematological characterization of HbE heterozygote with alpha-thalassemia determinant. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 28 Suppl 3: p. 100-103.

SUMMARY

REVERSE HYBRIDIZATION STRIPASSAY DETECTION OF GLOBULIN GENE MUTATIONS OF THALASSEMIA IN THAINGUYEN

Nguyen Tien Dung¹, Nguyen Kieu Giang^{1,2}

¹Thai Nguyen Pharma-Medical University

²Central Hospital of Thai Nguyen

Thalassemia is the most common inherited blood disorder in the world as well as in Vietnam. Identification globulin gene mutations are very significant in carrier screening and prenatal diagnostic of thalassemia, especially in severe forms. This study aims to identify the thalassemia gene mutations by reverse-hybridization globin strip assay. 30 peripheral blood samples were screened using the reverse hybridization technique. Eight mutant alleles were identified include Cd 41/42 (-TTCT) ; Cd 17 (A->T) ; Cd 71/72 (+A) ; Cd -28 (A->G) CD26 (G->A :HbE) ; ^{-SEA} ; ^{-α³⁷} ; ^{α^{CS}} . Seven genotype were found: ^{-SEA} / ^{-α³⁷} ; ^{-SEA} / ^{α^{CS}} ; β/β^{41/42} ; β/β¹⁷ ; β/β^{71/72} ; β/β²⁸ ; β/β^{CD26(HbE)} .