

综述

地中海贫血筛查及基因检测技术的研究进展[▲]

朱凤琳^{1,2} 赖允丽^{2,3} 何升^{2,3}

(1 广西中医药大学研究生院,广西南宁市 530200;

2 广西出生缺陷临床医学研究中心/广西生殖健康与出生缺陷防治重点实验室,广西南宁市 530002;

3 广西壮族自治区妇幼保健院广西出生缺陷预防控制研究所科学研究室,广西南宁市 530002)

【摘要】 地中海贫血是一种极具危害性的遗传性血液疾病,严重威胁人类健康,在我国东南沿海地区尤为常见。目前,临床治疗地中海贫血尚缺乏有效方法,因此做好预防工作以实现准确诊断至关重要,而精准的筛查技术与基因检测技术则是预防与治疗的关键。随着地中海贫血检测技术研究的不断发展,新型检测技术正呈现快速发展趋势。本文将从地中海贫血的筛查技术、基因检测技术,以及基于常规检测技术的新型检测方法等方面的研究进展进行阐述,以期提升公众对多样化地中海贫血检测技术及其发展历程的认知,进而为这些技术的推广、深入应用及后续优化升级开拓更为广阔的思路与视角。

【关键词】 地中海贫血;筛查技术;基因检测技术;综述

【中图分类号】 R 44;R 714.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2025)12-1841-06

DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2025.12.21

地中海贫血又称海洋性贫血或珠蛋白生成障碍性贫血,是一种常见的常染色体隐性遗传或不完全显性遗传的溶血性贫血^[1]。在2008年,全球大约有1%的夫妻存在生育患有血红蛋白病孩子的风险^[2]。地中海贫血根据受累基因、血红蛋白链位置可分为 α 、 β 、 γ 、 $\delta\beta$ 等类型,其中以 α -地中海贫血、 β -地中海贫血最为常见;地中海贫血还可以依据患者的临床表现分为静止型、轻型、中间型及重型4种类型^[3]。地中海贫血常见于热带国家^[4],在我国南方地区,尤其是广东、广西、海南等地区,是地中海贫血的高发区域^[5]。通常情况下,地中海贫血基因携带者并无明显的临床表现,但若为中间型、重型 α -地中海贫血或 β -地中海贫血,可致死或致残。目前,临床上针对地中海贫血的治疗手段尚不完善,故而精准挑选并恰当运用实验室检测技术,以实现地中海贫血的早筛查与早确诊,从而有效避免重症患儿的出生,是遏制该病发生的关键,亦是降低治疗成本的有效策略^[6]。本文将从地中海贫血的筛查技术、基因检测技术,以

及基于常规检测技术的新型检测技术等方面的研究进展进行阐述。

1 地中海贫血的筛查技术

1.1 血液学常规检查 地中海贫血患者的红细胞会出现典型的小细胞低色素特征,其血红蛋白(hemoglobin, Hb)水平可能正常也可能异常,因此在血液学常规检查项目中,与红细胞密切相关的指标备受关注,如平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)。目前多将 $MCV < 82$ fl或 $MCH < 27$ pg视为地中海贫血初筛的阳性标志^[7]。血液学常规检查凭借其操作便捷、费用低廉且适用范围广等优势被广泛应用,但其亦存在不足,例如难以鉴别缺铁性贫血等。

1.2 Hb电泳检测 传统Hb电泳检测多采用醋酸纤维薄膜电泳,操作时需反复洗涤红细胞以制备Hb溶液,易受技术水平等多方面因素的影响,导致检测结

▲基金项目:广西重点实验室运行补助项目(21-220-22);广西科技计划项目(桂科AD25069053);广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2021071)

第一作者简介:朱凤琳,在读硕士研究生,研究方向为临床免疫学和分子生物学检验。

通信作者简介:何升,博士后,研究员,硕士研究生导师,研究方向为地中海贫血防治。

果存在一定误差。毛细管电泳具有高灵敏度、高精度、耗时少、操作简便等优势,可以提升地中海贫血的诊断检出率,因此可考虑将醋酸纤维薄膜电泳检测向毛细管电泳检测转变。Hb电泳结果判定标准如下:当HbF高于2.0%或HbA₂高于3.5%时,可判定为β-地中海贫血;若出现HbH等异常Hb,或HbA₂低于2.2%时,可判定为α-地中海贫血;若未检出异常Hb,且HbA₂介于2.2%~3.5%之间,可判定为正常^[8]。然而,Hb电泳的检测范围有限,仅能分辨α-地中海贫血、β-地中海贫血和正常情况,还存在成本高、检测周期较长、操作较复杂等不足^[8-9]。

崔瑾等^[7]发现,仅采用血液学常规检查时血红蛋白病的检出率为84.29%,采用毛细管电泳检测时的检出率为82.67%,将这两种筛查方式联合应用可将检出率显著提升至99.11%。鉴于地中海贫血单项筛查项目存在漏诊的可能性,目前有学者推荐将筛查项目从单一指标向多指标联合筛查转变^[10]。例如,将血液学常规检查中的红细胞参数(MCV、MCH等)与Hb电泳检测指标(HbA₂、HbF等)联合应用进行筛查,能显著减少血红蛋白病的漏诊情况^[11]。有学者在对比MCV+MCH和MCV+MCH+HbA₂这两种指标组合时发现,MCV+MCH诊断地中海贫血的灵敏度更高,而MCV+MCH+HbA₂诊断地中海贫血的特异度更胜一筹;但MCV+MCH+HbA₂诊断β-地中海贫血的效能更优,而MCV+MCH则在地中海贫血初筛环节效果更佳^[12-15]。这种多指标联合筛查的方式是地中海贫血筛查领域的一大进展,其灵敏度、特异度均优于单一指标筛查,对地中海贫血的临床诊断具有重要意义。

1.3 其他筛查技术

1.3.1 质谱技术:质谱技术是当下极具发展潜力的分析手段之一,其在生命科学、材料分析、公安刑侦、食品安全、环境监测、航天和军事技术等诸多热门领域中都有着不可或缺的作用^[16-18]。早在1981年就有将质谱技术应用于Hb分析的相关研究报道^[19]。在20世纪,质谱技术成为化学领域的核心分析技术^[20]。近年来,有学者使用离子迁移率-质谱联用(ion mobility spectrometry-mass spectrometry, IMS-MS)技术分析HbA热稳定性和变性(Hb熔化),此技术最突出的优势是在分析目标分子时所需的特异性试剂用量少,并且

能为新变异体的鉴定及DNA测序提供有力的支持工具^[21]。然而,目前质谱技术存在一定的局限性,如操作环节复杂、费用高昂、仪器设备价格昂贵^[22]。在临床上,相较于液相色谱-质谱法,木签电喷雾电离直接质谱法在分析α-地中海贫血和β-地中海贫血样本与健康对照样本时,可通过检测电荷状态下,α-珠蛋白链和β-珠蛋白链在多电荷状态(如+11、+12、+13)下的信号强度比值差异来实现快速鉴别,且所需的样本量更少,其电离过程是在开放环境下进行的,在分析过程中可以直接加入未经处理的样品^[16],其灵敏度、特异度均较高。但截至目前,该技术尚未应用于地中海贫血的临床检测。基于木签电喷雾电离直接质谱法在血液学检测领域具有独特优势,将其应用于测定Hb肽链时的灵敏度、特异度高,且具有高通量、检测速度快等特点,该技术有望成为地中海贫血筛查的潜在手段^[23]。

1.3.2 等电聚焦电泳和高效液相色谱法:等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)电泳是利用不同蛋白质的等电点差异在电场下进行蛋白质分离。在Hb检测方面,IEF能够有效区分HbF、HbA及多种Hb变体,如HbS、HbC、HbE、HbD-Punjab和HbO-Arab。然而,该技术定量分析HbA₂的结果并不准确,并且会分离Hb的翻译后衍生物,这增加了结果解释的复杂性。尽管IEF电泳具有出色的分辨率,但其操作烦琐且缺乏精确的定量手段,解读IEF电泳结果亦要求技师具备丰富的经验积累^[19]。高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)自1983年起应用于血红蛋白病筛查领域,目前已是实验室检测的常用手段^[24]。HPLC能精准识别HbQ等异常Hb及电泳难以区分的条带,且所需标本量小,无需前处理,操作简便,可最大程度地减少人为误差。相较于传统Hb电泳检测,IEF与HPLC相结合有助于提高多种已知血红蛋白病鉴定的效率,但其存在耗时较多、需专业数据解读的局限性,故难以在临床上广泛应用于地中海贫血的筛查^[25]。此外,还有研究结果显示,质谱技术联合HPLC和毛细管电泳可应用于HbE等变异体的检测^[26]。因此,多技术联合检测或升级现有的检测系统将有力提升地中海贫血筛查的灵敏度与准确度。

2 地中海贫血的基因检测技术

2.1 多重不对称PCR技术 多重不对称PCR技术的原理是结合了多重PCR和不对称PCR的特点,通过在一个反应体系中使用多对引物且这些引物的浓度不相等,从而产生大量的单链DNA。近年来,有学者将多重不对称PCR技术与荧光探针熔解曲线法进行融合,开创性地研发出一种基因分型新方法——多重不对称PCR探针熔解曲线技术,并成功应用于9个非缺失型地中海贫血基因位点检测^[26-27]。该技术凭借操作简便、检测快速、污染风险低及成本低廉等优势,在地中海贫血基因检测领域展现出广阔的应用前景。

2.2 多重连接探针扩增技术 多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)是一种借助多个探针进行定量扩增以检测基因组DNA序列拷贝数变异的相对定量分析技术,可用于发现已知及未知的基因缺失情况。该技术以高效性、高特异度等优势,在人类基因组学等领域得到广泛应用。相关研究表明,借助P140 Probemix(用于MLPA检测的一种试剂盒,专门用于检测 α -珠蛋白基因的拷贝数变异),MLPA能够检测 α -珠蛋白三联体,如 $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$ 和 $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$ 等^[28]。此外,Chen等^[29]提出联合运用跨越断裂点PCR、巢式PCR、MLPA可检测香港型 $\alpha\alpha$ (Hong Kong $\alpha\alpha$, $HK\alpha\alpha$)基因型,其中MLPA与巢式PCR相互印证,能有效区分 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha^{anti-4.2}$ 、 $HK\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 、 $HK\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 与 β -地中海贫血共遗传、 $HK\alpha\alpha/--^{SEA}$ 、 $HK\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$ 与 β -地中海贫血共遗传、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha^{anti-4.2}$ 与 β -地中海贫血共遗传等基因型。然而,这种联合检测方案需要设计多组实验,流程复杂且耗时,难以在大规模人群筛查中广泛应用。

2.3 一代基因测序 一代基因测序即Sanger测序,其原理为各反应体系中含4种脱氧核苷酸三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)以实现扩增,同时加入少量特定的双脱氧核苷三磷酸(dideoxyribonucleoside triphosphate, ddNTP)来终止反应。该方法主要是基于传统的DNA合成、电泳分离和化学荧光检测技术,优势是测序读取片段长,可达到500~1 000个碱基对长度,以及准确率高达99.999%,缺点为通量较低,每次只能处理少量样本,导致整体效率不高,但成本较高。

2.4 二代基因测序 二代基因测序涵盖了Illumina、Ion Torrent及454 Sequencing等多种技术。Illumina的应用最为广泛,其也被称作高通量测序技术,核心在于高通量并行测序,能够一次性对数百万个DNA分子进行测序。Ion Torrent的测序原理是基于单个核苷酸的插入与释放,以快速的测序速度和较低的成本受到关注,不过其错误率相对较高。454 Sequencing借助荧光信号检测技术,采用乳液PCR(emulsion PCR)的方式,将单个DNA片段锚定于微珠之上,实现片段的扩增,随后利用焦磷酸测序法来监测核苷酸掺入过程中释放的焦磷酸,从而精确定DNA序列,尤其适合长序列的测序工作。这些技术在诊断地中海贫血携带者、新发或不明原因的复杂地中海贫血方面都展现出独特优势。目前,二代基因测序的靶向捕获技术已得到广泛运用,在地中海贫血的无创产前诊断和新基因突变检测领域中发挥关键作用。Maskoen等^[30]指出,二代基因测序作为非侵入式手段,在产前诊断条件受限的情况下,能够有效减少流产风险。相较于传统的一代基因测序、全基因组测序和全外显子测序,二代基因测序在高效性、快速性、高通量、低成本、高精度及复杂度分析等方面均具有明显的优势。

2.5 三代基因测序 三代基因测序的原理是直接观测单个DNA分子在测序环节产生的信号,比如荧光信号或电流变化等,进而确定碱基序列。与传统方法不同,它无需借助PCR扩增,能高效、精准且迅速地测定DNA序列。自2010年开始,PacBio公司率先推出单分子实时测序(single-molecule real-time sequencing, SMRT)技术。随后在2014年,Oxford Nanopore Technology公司将Nanopore测序技术引入该领域,二者携手促进了三代基因测序技术的蓬勃发展。SMRT技术依旧采用边合成边测序的方式,以4种荧光信号标记4种dNTP,在碱基配对链合成延伸时,依据荧光信号的类型及持续时间来确定DNA碱基序列。而Nanopore测序技术则是基于DNA分子穿过纳米孔时,其序列中不同的核苷酸会对电流产生干扰,测序仪记录DNA穿过纳米孔时产生的电流信号,进而将特定的电流信号序列转换为核苷酸序列以完成测序。

目前,关于三代基因测序的研究报道主要集中于2021—2023年,且有关SMRT技术的研究多集中于Nanopore测序技术^[31]。PacBio公司在中国的合作

方为北京贝瑞基因科技有限公司,后者与中南大学湘雅医学院合作完成了基于SMRT技术的地中海贫血基因检测研究。Zhou等^[32]、Tang等^[33]的研究均证实了SMRT技术检测地中海贫血基因突变的准确性及可靠性,同时也发现该技术在检测罕见突变、减少漏诊或误诊等方面均优于跨越断裂点PCR、PCR-反向斑点杂交(PCR reverse blot hybridization, PCR-RDB)及下一代测序(next-generation sequencing, NGS)。而Jiang等^[34]发现, Nanopore测序技术在检测和解释地中海贫血基因型方面具有明显优势,能显著提高诊断准确性,并有助于地中海贫血患者个性化治疗策略的制订。

三代基因测序的两种典型技术各有优劣。SMRT技术产生长达数十个碱基的长读数,且精准度极高、误差率极低,但在建库过程需进行片段筛选以防止测序数据的偏向性,数据分析过程所需时间也相对较长,且测序设备体积庞大,硬件成本及测序成本高昂,难以实现临床广泛应用。与之相比, Nanopore测序技术受限于孔内核酸片段的长度^[35],相较于短片段,其分析长片段的错误率更高,且这些错误多为系统性问题,难以通过重复测序进行修正,同时测序成本也高于短读测序^[36]。但Nanopore测序技术仍具有诸多优势:读长优势明显,能读取更长的DNA序列片段、无需拼接,高结构变异识别率高,无需PCR反应,成本低;建库过程及数据分析过程用时更短,且支持数据实时分析功能,可有效缩短整体检测周期;测序设备体积小、便于移动,操作流程简单易上手,无需在特定实验室环境下操作,这使得其在医疗机构中的推广与普及更具可行性。通过选定基因的靶向Nanopore长读测序,可评估潜在的修饰变异和其他罕见的结构变异, Nanopore测序技术在检测基因未知缺失和复杂结构变异方面显示出巨大的潜力。

3 基于常规检测技术的地中海贫血新型检测技术

近年来,随着地中海贫血筛查技术和基因检测技术的不断进步,涌现出一系列基于常规检测技术的地中海贫血新型检测技术。这些新技术各具特色,在地中海贫血检测领域发挥重要作用,本部分将针对多重聚合酶链反应/反向点印迹试验 II (multiplex polymerase chain reaction/reverse dot blot assay II, M-PCR/RDBII)、单核

苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) scan技术(一种单核苷酸多态性检测技术)、拷贝数变异(copy number variation, CNV)plex技术(一种拷贝数变异检测技术)、Gazelle[一种基于血液芯片(pre-Gazelle原型)的便携式微芯片电泳平台^[37]]、新型全自动红细胞渗透性脆性分析仪RA-800(深圳普门科技股份有限公司)、基于HPLC的一种新型抗干扰血红蛋白分析系统等新技术进行总结。

Liang等^[38]发现M-PCR/RDBII检测只涉及一个多重PCR扩增系统(即一根试管),使样品制备过程更简单、更方便,但该技术存在一定的局限性,当仅检测出 $\alpha 2$ 与 $-\alpha^{3.7}$ (或 $\alpha 2$ 与 $-\alpha^{4.2}$)的阳性结果时需要谨慎实际基因型为 $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ (或 $\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$)、 $\alpha\alpha/HK\alpha\alpha$ 、 $HK\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ (或 $HK\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$)等的可能性。魏小凤^[39]的研究结果显示,采用SNPscan技术及CNVplex技术检测地中海贫血点突变、缺失的准确率达到100%,前者可检测 α/β -地中海贫血67个点突变位点,后者可检测缺失型 α/β -地中海贫血。该研究结果为地中海贫血的大范围人群检测及日常诊断提供了一种具有精准性、便捷性、高效率及经济性等优势的检测新技术。Shrivastava等^[40]发现,在印度,基于微芯片的即时护理设备Gazelle是一种低成本、快速、高精度的镰状细胞病(sickle cell disease, SCD)定量和定性检测方法。在资源有限的环境下和血红蛋白病负担高的发展中国家中, Gazelle可作为一种潜在的快速诊断筛查工具,其成本低、便携、快速,且准确性与血液学常规检查或HPLC相当。此外, Gazelle配备一套自动分析系统,可用于对每个样本进行解读,因此试验结果易于阅读,且这种自动分析解读功能的错误率极低。2020年, Hasan等^[37]在Gazelle设备原有版本基础上重新进行设计、开发并开展临床测试,经过改进后的Gazelle具备多光谱成像功能,尤其适用于新生儿地中海贫血的筛查。Zheng等^[41]将新型全自动红细胞渗透性脆性分析仪RA-800(深圳普门科技股份有限公司)的检测结果与目前临床实验室常用的AU680生化分析仪(Beckman Coulter)的检测结果进行比较,并以基因检测结果作为金标准,评价RA-800的适用性,结果显示, RA-800的性能指标满足临床要求,具有简单、经济、有效等优点。在经济欠发达地区、基层医疗机构及社区中心,应用RA-800联合血液分析仪筛查地中海贫血能显著提升检测效率与准确

性,避免漏诊、误诊的发生,并为遗传咨询工作提供参考依据。徐岩的研究团队提出了一种基于HPLC的新型抗干扰Hb分析系统^[42]。该系统经由对高压梯度洗脱法的改良,对高压层析柱中微球的粒径大小及筛板的孔径尺寸进行精准调整,同时对双柱塞往复式串联的高压泵结构实施优化改进,实现了对糖化血红蛋白及地中海贫血关键指标HbF/HbA₂和Hb变异体的精准检测,展现出良好的抗干扰性能与稳定的运行状态,具有产业化潜力^[42]。

基于常规检测技术的地中海贫血新型检测技术仍在不断发展,凭借各自独特的优势,能够有效提升筛查的效率与质量,进而提高诊断的准确性,并助力防控策略的优化,推动基因检测技术向更高层次迈进。然而,目前该领域可能仍处于探索阶段。

4 结 语

随着检测技术的不断发展,众多先进的分子生物学科研究成果逐渐被应用于实验室诊断实践,地中海贫血的诊断能力得以逐步提高。而在众多检测技术中,精准挑选合适的方法,需检验人员综合考量疾病特性、实验室设备条件及当地经济状况等因素。在地中海贫血的诊断流程中,血液学常规检查和Hb电泳检测是基础且关键的初步筛查方法。对于地中海贫血的确诊,则需依据相关指南,采用两种原理不同的检测手段联合判断。尽管多种检测技术的联合应用能够有效提高特异度、灵敏度、准确性,但仍存在局限性或漏诊风险。当下,针对地中海贫血基因诊断技术的研究正朝着快速精准、操作便捷、自动化、成本低廉及全面涵盖突变位点的方向迈进。因此,三代基因测序技术在地中海贫血基因检测领域备受瞩目,但关于三代基因测序技术中的Nanopore测序技术在地中海贫血检测方面的研究目前还处于初步探索阶段。此外,基于常规检测技术衍生的地中海贫血新型检测技术的提出及相关研究,为地中海贫血检测技术的发展注入了新的动力。未来应持续关注国内外最新技术动态,以便将科研成果迅速转化为实际可用的技术,提升诊断方法的敏感性和准确性,同时尽可能降低成本,为患者和临床医生提供更可靠的实验室诊断方案。

参 考 文 献

- [1] 覃明雄,李焯晨.地中海贫血知多少[J]. 青春期健康, 2023,21(14):59.
- [2] Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators [J]. Bull World Health Organ, 2008, 86(6):480-487.
- [3] Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias [J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(4):245-255.
- [4] 吕 珊. 非常见缺失型 alpha-地中海贫血筛查方法的建立[D]. 百色:右江民族医学院, 2020.
- [5] 李 朋,张 杰. 地中海贫血基因检测方法的研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2016,31(4):891-894.
- [6] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京:人民军医出版社, 2011:7-30.
- [7] 崔 瑾,孙晨雨,程 伟,等. 重庆地区血红蛋白病的患病率及其基因型和血液学表型分析[J]. 重庆医科大学学报, 2023,48(3):279-285.
- [8] 徐冬云,张 霜,孟伟伟. 妊娠妇女地贫诊断中血红蛋白电泳检测技术的应用价值分析[J]. 世界复合医学, 2020,6(8):86-88.
- [9] 袁自佳. 地中海贫血和缺铁性贫血诊断与鉴别诊断中血常规检验的应用价值体会[J]. 名医, 2019(3):145.
- [10] 陈宇涛,高伟豪,林丽飞. 血液红细胞形态与地中海贫血的相关性研究[J]. 农垦医学, 2022,44(2):119-121.
- [11] 谢快快,陈祖阵. 血常规联合血红蛋白电泳在临床地中海贫血基因诊断中的应用价值[J]. 中国现代药物应用, 2024,18(20):80-83.
- [12] 庞雪利,杜红飞,阳 燕,等. 异常血红蛋白电泳原因分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2023,31(3):830-836.
- [13] 高丽玲,林春玉. 血清铁含量联合 MCV、Hb 检测在妊娠妇女地中海贫血筛查中的效果评价[J]. 现代诊断与治疗, 2021,32(13):2120-2122.
- [14] 罗志彝. 红细胞平均体积筛查方法在地中海贫血诊断中的应用价值[J]. 中国当代医药, 2019,26(33):162-164,168.
- [15] 贾吉宏. 糖化血红蛋白联合 MCV、MCH、RDW-SD 筛查地中海贫血的临床应用研究 [D]. 百色:右江民族医学院, 2023.
- [16] 黄婷婷. 基于直接质谱的地中海贫血筛查新方法研究与 15 万育龄人群地中海贫血基因突变谱分析[D]. 南昌:南昌大学, 2023.
- [17] Banerjee S. Empowering clinical diagnostics with mass spectrometry[J]. ACS Omega, 2020, 5(5):2041-2048.

- [18] Macklin A, Khan S, Kislinger T. Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research[J]. Clin Proteomics, 2020, 17(1): 17.
- [19] Wada Y, Hayashi A, Fujita T, et al. Structural analysis of human hemoglobin variants with field desorption mass spectrometry[J]. Biochim Biophys Acta, 1981, 667(2): 233-241.
- [20] Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis[J]. Anal Chem, 2000, 72(6): 1156-1162.
- [21] Dasauni P, Chhabra V, Kumar G, et al. Advances in mass spectrometric methods for detection of hemoglobin disorders[J]. Anal Biochem, 2021, 629: 114314.
- [22] Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, et al. ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin A₂[J]. Int J Lab Hematol, 2012, 34(1): 1-13.
- [23] Lee YK, Kim HJ, Lee K, et al. Recent progress in laboratory diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathy: a study by the Korean Red Blood Cell Disorder Working Party of the Korean Society of Hematology[J]. Blood Res, 2019, 54(1): 17-22.
- [24] Itälä L, Seppä K, Turpeinen U, et al. Separation of hemoglobin acetaldehyde adducts by high-performance liquid chromatography-cation-exchange chromatography[J]. Anal Biochem, 1995, 224(1): 323-329.
- [25] Gupta SP, Hanash SM. Separation of hemoglobin types by cation-exchange high-performance liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1983, 134(1): 117-121.
- [26] Traeger-Synodinos J, Harteveld CL. Advances in technologies for screening and diagnosis of hemoglobinopathies[J]. Biomark Med, 2014, 8(1): 119-131.
- [27] 胡晓艳, 吴宇亮, 李科铮, 等. 基于探针熔解曲线分析技术的非缺失型地中海贫血基因检测方法的建立[J]. 广东医学, 2019, 40(17): 2444-2449.
- [28] Zhang M, Lin Z, Chen M, et al. Application of the single-molecule real-time technology (SMRT) for identification of *HKαα* thalassemia allele[J]. Lab Med, 2023, 54(1): 65-71.
- [29] Chen DM, Ma S, Tang XL, et al. Diagnosis of the accurate genotype of *HKαα* carriers in patients with thalassemia using multiplex ligation-dependent probe amplification combined with nested polymerase chain reaction[J]. Chin Med J(Engl), 2020, 133(10): 1175-1181.
- [30] Maskoen AM, Rahayu NS, Laksono B, et al. Cell-free fetal DNA as a non-invasive method using pyrosequencing in detecting beta-globin gene mutation: a pilot study from area with limited facilities in Indonesia[J]. Front Pediatr, 2022, 10: 902879.
- [31] Zhan L, Gui C, Wei W, et al. Third generation sequencing transforms the way of the screening and diagnosis of thalassemia: a mini-review[J]. Front Pediatr, 2023, 11: 1199609.
- [32] Zhou C, Du YP, Zhang HX, et al. Third-generation sequencing identified a novel complex variant in a patient with rare alpha-thalassemia[J]. BMC Pediatr, 2024, 24(1): 330.
- [33] Tang HS, Xiong Y, Tang JQ, et al. Screening and diagnosis of rare thalassemia variants: is third-generation sequencing enough?[J]. Arch Pathol Lab Med, 2025, 149(1): e1-e10.
- [34] Jiang FM, Liu WQ, Zhang LM, et al. Noninvasive prenatal testing for β -thalassemia by targeted nanopore sequencing combined with relative haplotype dosage (RHDO): a feasibility study[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 5714.
- [35] van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, et al. The third revolution in sequencing technology[J]. Trends Genet, 2018, 34(9): 666-681.
- [36] Ling X, Wang C, Li L, et al. Third-generation sequencing for genetic disease[J]. Clin Chim Acta, 2023, 551: 117624.
- [37] Hasan MN, Fraiwan A, An R, et al. Paper-based microchip electrophoresis for point-of-care hemoglobin testing[J]. Analyst, 2020, 145(7): 2525-2542.
- [38] Liang HF, Li LJ, Yang H, et al. Clinical validation of a single-tube PCR and reverse dot blot assay for detection of common α -thalassaemia and β -thalassaemia in Chinese[J]. J Int Med Res, 2022, 50(2): 3000605221078785.
- [39] 魏小凤. 基于SNPscan及CNVplex技术的地中海贫血突变分子诊断技术研究一例Hb Agrinio合并东南亚型缺失导致Hb H病的分子遗传学研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- [40] Shrivastava S, Patel M, Kumar R, et al. Evaluation of microchip-based point-of-care device "Gazelle" for diagnosis of sickle cell disease in India[J]. Front Med(Lausanne), 2021, 8: 639208.
- [41] Zheng S, Li Q, Ou T, et al. Clinical performance study of a new fully automated red blood cell permeability fragility analyzer[J]. J Healthc Eng, 2022, 2022: 5642907.
- [42] 徐岩, 姚甜甜, 胡文雍, 等. 一种新型抗干扰高效液相色谱法血红蛋白分析系统[J]. 生物医学工程学杂志, 2021, 38(5): 940-950.

(收稿日期: 2025-09-14 修回日期: 2025-11-17)