

# 泰国型 $\alpha$ 缺失地中海贫血的快速基因诊断方法的建立及其临床应用\*

卿吉琳<sup>1</sup> 陈柳燕<sup>2△</sup> 谭卫红<sup>1</sup> 陈治中<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:建立一种快速、简便且无需核酸提取的泰国型  $\alpha$  缺失地中海贫血的快速基因诊断方法及其在产前诊断中应用。方法:设计可以扩增  $\alpha$ -珠蛋白基因簇中--<sup>THAI</sup> 等位基因的特征序列引物组,直接以待测样本为模板,不需要核酸提取,进行聚合酶链反应(PCR)直接扩增,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳即可分析结果。结果:成功建立泰国缺失型地中海贫血的快速基因诊断方法,并且直接以全血、羊水、干血斑、脐带血为模板进行扩增的结果与常规跨越断裂点聚合酶链反应(gap-PCR)技术确定基因型完全一致。结论:该法不需要提取核酸,减少操作步骤与实验室污染、节约成本、快速、准确,可作为常规方法用于临床样品的地中海贫血分子基因检测及巴氏水肿胎和缺失型 HbH 病的产前诊断及泰国型  $\alpha$ -地中海贫血的产前诊断新方法。

**[关键词]** 泰国型  $\alpha$ -地中海贫血;直接 PCR;产前诊断;基因诊断

**DOI:**10.13201/j.issn.1004-2806.2021.04.002

**[中图分类号]** R556 **[文献标志码]** A

## Development and clinical application of a rapid gene diagnosis method for Thai type thalassemia

QING Jilin<sup>1</sup> CHEN Liuyan<sup>2</sup> TAN Weihong<sup>1</sup> CHEN Zhizhong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Reproductive Medicine Center, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, 530021, China; <sup>2</sup>Joint Inspection Center of Precision Medicine, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region)

Corresponding author: CHEN Zhizhong, E-mail: tjchenzz@126.com

**Abstract Objective:** To establish a rapid, simple and non nucleic acid extraction based gene diagnosis method for Thai type Thalassemia and its application in prenatal diagnosis. **Methods:** The characteristic sequence Primers of-thai Allele in-globin gene cluster were designed, and the samples were directly amplified by PCR without nucleic acid extraction, the amplified products were analyzed by Agarose Gel electrophoresis. **Results:** A rapid genotyping method for Thai type Thalassemia was successfully established, and the results of direct amplification using whole blood, amniotic fluid, DBS and umbilical cord blood were identical with those determined by gap PCR. **Conclusion:** This method does not need to extract nucleic acid, reduces the operating procedure and the laboratory pollution, saves the cost, is fast, is accurate, thalassemia gene detection as a routine method for clinical samples and prenatal diagnosis of Bart's edematous foetus and absent type HBH are expected to be new methods for clinical prenatal diagnosis of Thai type thalassemia.

**Key words** thai type thalassemia; direct PCR; prenatal diagnosis; genetic diagnosis

$\alpha$ -地中海贫血( $\alpha$ -thalassemia,简称  $\alpha$ -地贫)属于常染色体隐性遗传病,是  $\alpha$ -珠蛋白基因簇的先天性遗传缺陷而导致  $\alpha$ -珠蛋白链合成减少或缺失为特征的遗传性溶血性贫血<sup>[1]</sup>。缺失型  $\alpha$ -地贫是  $\alpha$ -地贫的主要原因,缺失型  $\alpha$ -地贫是由于两个功能性  $\alpha$  基因全部缺失,则  $\alpha$  珠蛋白链的合成功能受抑制,例如东南亚人群中最常见的--<sup>SEA</sup>(东南亚型)以及--<sup>THAI</sup>(泰国型)<sup>[2-3]</sup>。泰国型  $\alpha$ -地贫是东南亚地区最常见的遗传性疾病之一,由于不同种族人群的

基因突变发生率不同,临床严重程度也不同<sup>[4]</sup>。泰国型缺失基因型在临床上可以形成中重型  $\alpha$  地贫,即泰国型缺失的 HbH 病和泰国型缺失的巴氏水肿胎,造成组织缺氧而引起胎儿水肿综合征,受影响的胎儿容易死产或在出生后不久死亡<sup>[1,4]</sup>。孕妇在妊娠期间的并发症,包括子痫前期(高血压、伴有或不伴有蛋白尿的液体潴留)、羊水过少(分别增加或减少羊水的积累)、出血、贫血和败血症<sup>[5]</sup>。考虑到这种综合征的严重程度和孕妇在怀孕期间的并发症,在一些高危人群中已经开始进行普遍婚检及产前筛查,以便能及时发现、处理泰国型缺失纯合子的地贫<sup>[6]</sup>。由于泰国型的血液学特征与东南亚缺失型  $\alpha$  地贫一致,均表现出小细胞低色素,平均细胞体积和平均血红蛋白含量降低等,因而可能造

\*基金项目:广西自然科学基金资助(No: 2017GXNSFAA198074)

<sup>1</sup>广西壮族自治区人民医院生殖医学中心(南宁,530021)

<sup>2</sup>广西壮族自治区人民医院精准联合检验中心

<sup>△</sup>广西中医药大学在读研究生

通信作者:陈治中,E-mail:tjchenzz@126.com

成误诊和漏诊<sup>[7]</sup>。

目前产前基因诊断的方法大多先采集孕妇外周血和胎儿的细胞样本(羊水、脐带血等),提取 DNA 或经过细胞培养后提取 DNA,再进行 PCR 扩增及对扩增产物进行分析<sup>[8]</sup>。如果不需要细胞培养和 DNA 提取,直接用取样标本扩增,可大大缩短检测所需时间和成本,也可避免在细胞培养和 DNA 提取过程中导致的样本间交叉污染和微量样本丢失。笔者研发一种能够直接对全血、羊水、脐带血、滤纸片干血斑(dried blood spots, DBS)等标本进行 PCR 直接扩增的检测泰国型  $\alpha$ -地贫方法,有望成为临床上产前诊断泰国型  $\alpha$ -地贫的新方法。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 标本来源

本研究中使用的所有抗凝外周血、脐带血、羊水、DBS 等生物样本均来自于我院的地贫患者和正常健康者,患者均知情同意,所有样本均经常规跨越断裂点聚合酶链反应(gap-PCR)技术确定基因型。同时收集 220 例外周血样本(已知基因型)进行单盲检测。

#### 1.2 引物的设计

如表 1 所示,可以扩增  $\alpha$ -珠蛋白基因簇中--<sup>THAI</sup> 等位基因的特征序列引物组上下游分别是 THAIF 和 THAIR,正常基因的特征序列引物组上

下游分别是 APF 和 APR,引物工作浓度 10  $\mu$ mol/L。

#### 1.3 快速检测--<sup>THAI</sup> 缺失型地贫的直接 PCR 法

采集抗凝外周血、-20 $^{\circ}$ C~-80 $^{\circ}$ C 保存未反复冻融的陈旧性抗凝外周血、培养羊水细胞、脐带血、DBS 样本等标本直接作为模板,也可以采用上述标本经核酸提取的 DNA 作为模板。配制 PCR 反应配方及体系,将引物 THAIF、THAIR、APF 和 APR、PCR 缓冲液、酶液、MgCl<sub>2</sub>、dNTP 和水配制反应体系。以待测样本直接为模板加入配制的反应体系中混合进行 PCR 扩增,PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 30 s,64 $^{\circ}$ C 退火 35 s,34 个循环,得到扩增产物(PCR 反应液配方体系及反应条件见表 2)。取 PCR 扩增中的产物 4.0~5.0  $\mu$ L,点样于 2.0%~2.5% 琼脂糖凝胶外加 0.005% 核酸染料,在 5 V/cm 电压下电泳 30~35 min,取出于凝胶成像系统里观察结果并拍照保存。

#### 1.4 数据分析及结果判定

根据 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析判读结果,只得到 1 条 317 bp 条带时,结果为正常野生型;得到 478 bp 和 317 bp 2 条带时结果初步判断为携带--<sup>THAI</sup> 等位基因;仅得到 1 条 478 bp 条带时,结果初步判断为--<sup>THAI</sup> 等位基因纯合子或者--<sup>THAI</sup> 等位基因纯合子待排除。结果初步判断为正常型。

表 1 检测--<sup>THAI</sup> 地贫特征序列的引物组

引物名称	序列编号	序列
APF	SEQ ID NO. 1	5'-TCCTTGGGGTAGCTCGAGTCAG-3'
THAIF	SEQ ID NO. 2	5'-TGCCCTCAACCCCTGACAAT-3'
APR/THAIR	SEQ ID NO. 3	5'-CTTGATCTGCACCTCTGGGTAG-3'

表 2 PCR 反应液配方体系及反应条件

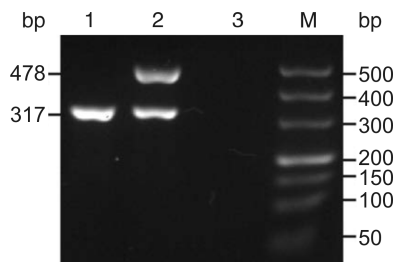
PCR 体系		PCR 反应条件		
组分	体积/ $\mu$ l	步骤	温度/ $^{\circ}$ C	时间与循环
MightyAmp Taq	0.5	1	95	5 min
2 $\times$ MightyAmp Buffer	10.0	2	94	30 s
THAIF	0.3	3	64	30 s
THAIF/APR	0.5	4	72	35 s 2 34 循环
APF	0.2	5	72	5 min
H <sub>2</sub> O	6.5	6	12	12 s
样本	2.0			

## 2 结果

### 2.1 全血标本扩增试验

为了证实直接 PCR 法检测--<sup>THAI</sup> 缺失型地贫对全血样本的扩增效果,选取携带--<sup>THAI</sup> 地贫与正常基因型的全血进行直接 PCR 试验,并设置阴性对照,结果见图 1。根据 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

分析,泳道 1 只得到 1 条 317 bp 条带,结果为正常野生型,泳道 2 得到 478 bp 和 317 bp 2 条带,结果为携带--<sup>THAI</sup> 等位基因。所有样本均能有效地扩增,条带单一且清晰,结果与常规 Gap-PCR 技术确定的基因型完全一致,片段大小正确,验证直接 PCR 法用于全血直接扩增的可行性。

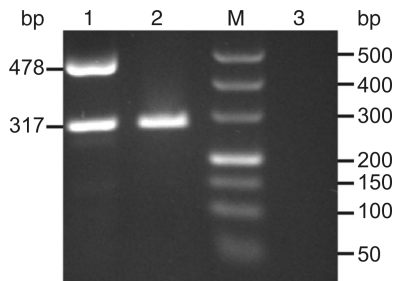


M: DL500DNA Marker (Takara Code No. 3590A); 1:正常野生型(全血);2:--<sup>THAI</sup> 杂合子(全血);3:阴性对照。

图 1 全血标本琼脂糖凝胶电泳结果

## 2.2 DBS 标本扩增试验

全血滴在滤纸片上制成 DBS,有很好的生物稳定性和安全性,应用 DBS 对于患者标本采集、保存和运输及流行病学调查则更为有利<sup>[9]</sup>。为了证实直接 PCR 法检测 $\alpha$ -THAI 缺失型地贫对 DBS 标本的扩增效果,选取携带 $\alpha$ -THAI 地贫与正常基因型的 DBS 进行直接 PCR 试验,并设置阴性对照,结果见图 2。根据 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析,泳道 1 得到 478 bp 和 317 bp 2 条带,结果为携带 $\alpha$ -THAI 等位基因,泳道 2 只得到 1 条 317 bp 条带,结果为正常野生型,所有样本均能有效地扩增,条带单一且清晰,结果与常规 Gap-PCR 技术确定的基因型完全一致,片段大小正确,验证直接 PCR 法用于 DBS 直接扩增的可行性。

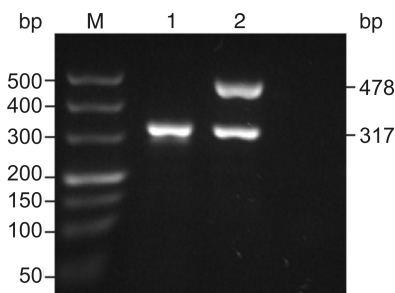


M: DL500DNA Marker (Takara Code No. 3590A);  
1:  $\alpha$ -THAI 杂合子(DBS); 2: 正常野生型(DBS); 3: 阴性对照。

图2 DBS 标本琼脂糖凝胶电泳结果

## 2.3 羊水标本扩增试验

为了证实直接 PCR 法检测 $\alpha$ -THAI 缺失型地贫对羊水标本的扩增效果,选取携带 $\alpha$ -THAI 地贫与正常基因型的羊水进行直接 PCR 试验,并设置阴性对照,结果见图 3。根据 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析,泳道 1 得到 478 bp 和 317 bp 2 条带,结果为携带 $\alpha$ -THAI 等位基因,泳道 2 只得到 1 条 317 bp 条带,结果为正常野生型,所有样本均能有效地扩增,条带单一且清晰,结果与常规 Gap-PCR 技术确定的基因型完全一致,片段大小正确,验证直接 PCR 法用于羊水直接扩增的可行性。

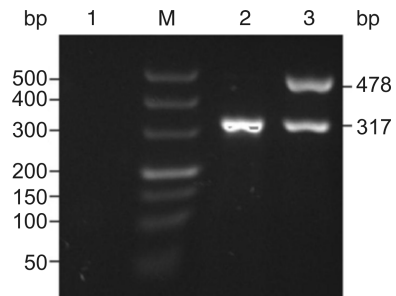


M: DL500DNA Marker (Takara Code No. 3590A);  
1: 正常野生型(羊水); 2:  $\alpha$ -THAI 杂合子(羊水); 3: 阴性对照。

图3 羊水标本琼脂糖凝胶电泳结果

## 2.4 脐带血标本扩增试验

为了证实直接 PCR 法检测 $\alpha$ -THAI 缺失型地贫对脐带血样本的扩增效果,选取携带 $\alpha$ -THAI 地贫脐带血提取的 DNA 与正常基因型的脐带血进行直接 PCR 试验,并设置阴性对照,结果见图 4。根据 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析,泳道 2 只得到 1 条 317 bp 条带,结果为正常野生型,泳道 3 得到 478 bp 和 317 bp 2 条带,结果为携带 $\alpha$ -THAI 等位基因,所有样本均能有效地扩增,条带单一且清晰,结果与常规 Gap-PCR 技术确定的基因型完全一致,片段大小正确,验证直接 PCR 法用于脐带血直接扩增的可行性。而且,脐带血 PCR 的扩增效率与提取 DNA 的 PCR 扩增效率基本一致,在一致的扩增效率情况下,本方法省略对脐带血中 DNA 提取的步骤,避免或减少标本污染及 DNA 降解的发生;实现短时间内高效检测脐带血样本。



M: DL500DNA Marker (Takara Code No. 3590A);  
1: 阴性对照; 2: 正常野生型(脐血); 3:  $\alpha$ -THAI 杂合子(提纯 DNA)。

图4 脐带血琼脂糖凝胶电泳结果

## 2.5 泰国缺失型直接 PCR 法在临床上应用

收集临床上 220 例外周血(已知基因型)采用进行泰国缺失型直接 PCR 法单盲试验,两者结果一致率 100%。

## 3 讨论

地贫是最常见的遗传性单基因疾病之一,这种珠蛋白基因疾病影响了数亿人,成为一个巨大的公共卫生负担,需要特别关注<sup>[10]</sup>。在中国南方的许多省份,地贫筛查被广泛使用,甚至被政府作为婚前体检的一部分<sup>[3,11]</sup>。因此,建立一系列合理的地贫检测方法是非常重要的。目前泰国缺失型 $\alpha$ 地贫尚无理想的治疗方法,因而产前诊断对有 $\alpha$ -THAI 缺失型地贫家族史的孕妇十分重要<sup>[7]</sup>。

由于外周血中免疫球蛋白成分、抗凝剂等通常是 PCR 抑制剂<sup>[12-13]</sup>。研究表明 Taq-DNA 聚合酶和黄金 Taq-DNA 聚合酶是 PCR 中最常用的聚合酶,当外周血含量在体系中不到 0.2% 时,聚合酶活性可被完全抑制<sup>[13-14]</sup>。现有的实验室常规产前基因诊断泰国缺失型 $\alpha$ 地贫检测相关的技术主要

基于 Gap-PCR 结合电泳或者杂交的方法、荧光定量 PCR 的方法检测,这些方法均需要从外周血等样本中提取 DNA 和 RNA 的方法多种多样。然而,这些方法一般都费时费力,而且会增加成本。此外,这些方法中涉及的多个样品处理步骤增加了交叉污染的风险,并导致靶标丢失,使得实验易出现假阴性或者假阳性,导致误检或者漏检<sup>[15-16]</sup>。此外,一些 PCR 抑制剂在 DNA 和 RNA 提取后仍然存在<sup>[8,17]</sup>。因此,倘若能建立一种不需要提取 DNA,直接进行样本扩增,进行泰国型  $\alpha$ -地贫的检测,一种简单、能快速准确基因分型的技术手段,对遗传咨询及产前诊断具有重要意义。

近年来,从外周血直接扩增的 PCR 方法一直是研究者的期盼,但是这些方法通常需要样本预处理,样品预处理包括预热、交替加热冷却和外周血的冻融,这些都是非常耗时和繁琐的<sup>[18-20]</sup>。本研究所述的直接 PCR 法可以实现单管单次闭管反应完成--<sup>THAI</sup> 缺失型地贫等位基因的检测,最大程度上减少提取核酸而引起的实验室污染或标本间交叉污染或 DNA 降解,避免结果的假阳性和(或)假阴性;同时采用内对照,使得泰国型  $\alpha$ -地贫基因诊断结果判读更加直观;采用直接 PCR 法进行待测样本直接扩增,不需要提取与纯化 DNA,节省 DNA 提取所需的时间、人力、试剂成本等,且无需配备提取用仪器设备,大大简化了实验步骤和污染的可能。而且如图 1~4 所示,本研究所检测样品可选自新鲜采集的抗凝外周血、-20℃~-80℃保存且未经反复冻融的陈旧性抗凝外周血、羊水细胞、脐带血、DBS 样本等,能检测的标本类型多样。另外,在--<sup>THAI</sup> 缺失型地贫的诊断中,本方法降低所需的样本量,临床患者更容易接受;同时也适用 DBS 样本,有很好的生物稳定性和安全性,应用 DBS 对于患者标本采集、保存和运输及流行病学调查则更为有利,特别是边远地区样本采集及运输、保存更方便,有利于地贫的防治工作开展<sup>[9,21-22]</sup>。另一方面,本研究采用琼脂糖凝胶电泳法,正如图 1-4 呈现的结果所示,条带清晰易于判定,是目前使用 PCR 分子诊断技术中最廉价的实验体系构建方法,成本更低,不需要昂贵的仪器和探针设计,各级实验室和医院都易开展。检测(含电泳时间)只需要约 2 h,在较短的检测时间内即可获得与常规 DNA 扩增一致的检测结果,缩短 TAT 时间,便于患者就诊。

综上所述,针对现有检测方法普遍存在操作繁琐、易污染和降解、耗时耗力的缺点,我们开发出一种新的检测--<sup>THAI</sup> 缺失型地贫的直接 PCR 法,通过直接将采集到的标本作为扩增模板,不需要提取纯化 DNA 进行直接 PCR 反应,并将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳直观地读取结果。该方法可实现快

速完成检测并出具检测结果报告,成功实现快速产前诊断--<sup>THAI</sup> 缺失型地贫,具有快捷简洁、高度的稳定性、灵敏性和准确性,有较好的临床应用前景与成本效益,适用于大规模人群筛查及各级医院应用开展,具有较好的应用前景。因此,建立泰国型  $\alpha$ -地贫的快速基因诊断方法,进行有效的产前基因诊断,避免泰国型缺失的 HbH 病和泰国型缺失的巴氏水肿胎儿的出生,对减少社会和患者家庭的负担,实现优生优育有着极其重要的意义<sup>[23]</sup>。

#### 参考文献

- [1] Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. Thalassaemia[J]. Lancet, 2018, 391(10116):155-167.
- [2] Weatherall DJ. The Evolving Spectrum of the Epidemiology of Thalassaemia [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2018, 32(2):165-175.
- [3] Saboor M, Mobarki AA, Hamali HA, et al. Frequency and genotyping of alpha thalassaemia in individuals undergoing premarital screening[J]. J Pak Med Assoc, 2021, 71(1):101-104.
- [4] Galanello R, Cao A. Gene test review. Alpha-thalassaemia[J]. Genet Med, 2011, 13(2):83-88.
- [5] Barnett R. Thalassaemia [J]. Lancet, 2019, 394(10204):1135.
- [6] Mankhemthong K, Phusua A, Suanta S, et al. Molecular characteristics of thalassaemia and hemoglobin variants in prenatal diagnosis program in northern Thailand[J]. Int J Hematol, 2019, 110(4):474-481.
- [7] Nopparatana C, Nopparatana C, Saechan V, et al. Prenatal diagnosis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemias in southern Thailand[J]. Int J Hematol, 2020, 111(2):284-292.
- [8] Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal[J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(5):1014-1026.
- [9] Bibi S, Siddiqui TR, Alam SE, et al. Comparison of dried blood spots with conventional blood sampling for diagnosis of hepatitis b & c through serological and molecular technique; a pilot study[J]. J Pak Med Assoc, 2020, 70(7):1214-1219.
- [10] Sahiratmadja E, Seu M, Nainggolan IM, et al. Challenges in Thalassaemia Carrier Detection in a Low Resource Setting Area of Eastern Indonesia: the Use of Erythrocyte Indices [J]. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2021, 13(1):e2021003.
- [11] Lu F, Dai Q, Zhang X, et al. Comparison between capillary zone electrophoresis and capillary isoelectric focusing for thalassaemia screening in southern China [J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(8):e22567.
- [12] Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(1):345-350.

血清 CRP、PCT 水平和 ANA 阳性率具高于非感染患者,血清 CRP、PCT 及 ANA 对白血病化疗所致败血症具有良好的诊断效能,三者联合检测可进一步提高诊断敏感性和特异性。但本研究样本量较少,有关以上三种指标对白血病化疗后并发败血症患者预后的评估未进行探讨,有待后续扩大样本量进行验证和研究。

### 参考文献

- [1] Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment[J]. *Am J Hematol*, 2017, 92(9): 946-965.
  - [2] 陈红英, 杨洪, 刘文君. 265 例儿童急性白血病临床特征分析[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2017, 22(6): 313-316.
  - [3] 陈晓敏, 唐柳, 刘洋, 等. 成人急性淋巴细胞白血病患者化疗期间院内感染的病原菌分布和耐药情况、危险因素分析[J]. *山东医药*, 2020, 60(6): 58-61.
  - [4] 赵彩芳, 魏斌, 骆超, 等. PCT、Activin-A 等生物学指标在急性白血病患者化疗后粒细胞缺乏期感染中的诊断价值[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(3): 539-542.
  - [5] Ramesh V, Venkata N, Sankar J. Mixed Malarial Infection with Pancytopenia in a Child with Acute Lymphoblastic Leukemia: An Unusual Presentation[J]. *Indian J Med Paediatr Oncol*, 2017, 38(1): 92.
  - [6] 徐兆珍, 曹建滨, 韩丽, 等. 抗核抗体系列及补体检测对狼疮性肾炎的诊断意义[J]. *国际免疫学杂志*, 2017, 40(4): 365-368.
  - [7] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会, 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗指南(2016 年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(10): 837-845.
  - [8] 中华医学会血液学分会, 中国医师协会血液科医师分会. 中国中性粒细胞缺乏伴发热患者抗菌药物临床应用指南(2016 年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(5): 353-359.
  - [9] 宋春鸽, 马若巾, 杨晓煜, 等. 血清超敏 C-反应蛋白与降钙素原及内毒素对白血病患者化疗后感染的诊断价值研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(21): 4898-4901.
  - [10] 杨爱景, 王波, 李桂霞, 等. 动态监测白血病化疗后粒细胞期合并感染患者血清炎症因子水平变化的临床意义[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(19): 4395-4397.
  - [11] Huang Z, Liu WJ, Guo QL, et al. Platelet parameters and expression of platelet membrane glycoprotein in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 16074-89.
  - [12] 何华云, 雷翠蓉, 陈新红, 等. 血清炎症因子、血小板相关指标单独及联合检测对新生儿细菌感染性败血症的诊断价值[J]. *山东医药*, 2017, 57(2): 53-55.
  - [13] 施灵敏, 徐智胜. CD64、血清降钙素原及 C-反应蛋白在儿童急性淋巴细胞白血病化疗后合并细菌感染早期诊断中的意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(4): 467-469.
  - [14] Pisetsky DS. EULAR recommendations for disease management; guidance not guidelines[J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(6): 935-938.
  - [15] 王结珍, 梁培松, 王伟佳, 等. 血清 PCT、IL-6 和 CRP 水平检测对白血病患者化疗并发败血症的诊断价值[J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(2): 88-90.
  - [16] 陈向华, 王建吉, 耿学丽, 等. 抗核抗体和抗核抗体谱联合检测诊断自身免疫性疾病的临床价值[J]. *河北医学*, 2017, 23(8): 1278-1281.
- (收稿日期: 2020-10-23)
- 
- (上接第 232 页)
- [13] Li Y, Pan X, Roberts ML, et al. Stability of global methylation profiles of whole blood and extracted DNA under different storage durations and conditions [J]. *Epigenomics*, 2018, 10(6): 797-811.
  - [14] Abu Al-Soud W, Rådström P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(12): 4463-4470.
  - [15] 沈茹, 陈云明, 杨晓红, 等.  $\alpha$  地中海贫血筛查及诊断技术的进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(1): 68-72.
  - [16] Brancaleoni V, Di Pierro E, Motta I, et al. Laboratory diagnosis of thalassemia [J]. *Int J Lab Hematol*, 2016, 38 Suppl 1: 32-40.
  - [17] Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(2): 485-493.
  - [18] Geiger K, Zach C, Leiherer A, et al. Real-time PCR based HLA-B\* 27 screening directly in whole blood [J]. *HLA*, 2020, 95(3): 189-195.
  - [19] Grabias B, Essuman E, Quakyi IA, et al. Sensitive real-time PCR detection of Plasmodium falciparum parasites in whole blood by erythrocyte membrane protein 1 gene amplification [J]. *Malar J*, 2019, 18(1): 116.
  - [20] Wichian P, Yamsri S, Sanchaisuriya K, et al. Whole Blood PCR for Rapid Screening of  $\alpha$ 0-Thalassemia [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2018, 48(2): 231-235.
  - [21] Kuehn BM. Dried Blood Spots May Offer Route to Wider Antibody Testing [J]. *JAMA*, 2020, 324(19): 1933.
  - [22] Cho HD, Kim J, Lee JY, et al. A novel dried blood spots analysis combined with on-spot reaction for determination of trimethylamine N-oxide and its related compounds [J]. *Talanta*, 2020, 210: 120639.
  - [23] Nittayaboon K, Nopparatana C. Molecular characterization of Hb H disease in southern Thailand [J]. *Int J Hematol*, 2018, 108(4): 384-389.
- (收稿日期: 2021-03-02)