

• 综述 •

异常血红蛋白病实验室检测研究新进展*

叶丽花¹

[摘要] 异常血红蛋白(Hb)病是由于珠蛋白基因缺陷、珠蛋白一级结构发生变化而产生新的分子结构改变的 Hb 变异体引起的一组遗传性疾病,与地中海贫血统称为 Hb 病,是最常见的出生缺陷之一,全球发病率位于第 3 位,是中国南方地区最常见的遗传性疾病之一。相较于地中海贫血,大多数异常 Hb 病在临床上无临床症状,发病率较低,使得对该病的认识不够广泛,因此目前还没有成熟独立的筛查诊断程序,异常 Hb 病往往是伴随地中海贫血筛查被发现,再通过基因测序检测才能明确诊断。

[关键词] 异常血红蛋白病;Hb 电泳;基因测序法

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2023.02.015

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

New progress in laboratory detection of abnormal hemoglobinopathy

YE Lihua

(Laibin Maternity and Children Healthcare Hospital, Laibin, 546100, China)

Corresponding author: YE Lihua, E-mail:181988895@qq.com

Abstract Abnormal hemoglobin(Hb) disease is a group of hereditary diseases caused by Hb variants that produce new molecular structural changes due to globin defects and changes in the primary structure of globin. Together with thalassemia, it is collectively known as Hb disease, that is one of the most common birth defects in the world, with the global incidence ranking third, is one of the most common genetic disease in southern China. Compared with Mediterranean anemia, most unusual Hb diseases are clinically asymptomatic, with low incidence and no enough wide understanding of the disease degree, so there is no mature independent screening diagnosis program. Abnormal Hb disease is often detected during thalassaemia screening and then confirmed by genetic sequencing.

Key words abnormal Hb disease; Hb electrophoresis; gene sequencing method

异常血红蛋白(Hb)病是由于 Hb 改变而引起机体正常功能改变,是由于珠蛋白(包括 α -珠蛋白、 β -珠蛋白、 δ -珠蛋白)基因突变致使肽链结构异常,因异常 Hb 部分或者完全取代正常 Hb 引起的一组疾病,是最常见的单基因遗传病之一,在世界上构成重大的公共卫生挑战^[1]。因大部分异常 Hb 病无血液学表型和贫血,仅在 Hb 电泳时发现异常蛋白条带。因而异常 Hb 病的发现往往依赖实验室的检测,通常异常 Hb 病的发现和筛查地中海贫血一样,通过血常规或 Hb 电泳进行,不同的是筛查阳性时直接进一步行基因测序来明确诊断。现就目前常用的异常 Hb 病筛查与实验诊断方法研究进展综述如下。

1 血常规筛查

异常 Hb 病多数没有血液学表型,王也飞等^[2]的研究中显示,除 HbE、HbYoungstown 和 HbM-Boston 外,多数 Hb 变异体本身并未造成患者出现明显的临床表现,往往是在合并其他疾病时出现了溶血、贫血等症状,尤其是与地中海贫血合并可造成中度或更严重的贫血,所以大规模筛查异常 Hb 病主要随着地中海贫血筛查进行。血常规筛查是地中海贫血的最常用方法之一。目前血常规检测是通过全自动血液细胞分析仪进行,主要运用电阻法和光散射法原理,及特殊细胞染色等细胞化学技术,VCS 联合检测等前沿手段,可以准确地测量血样并进行血细胞参数测量或者换算,彭政等^[3]研究显示血液分析仪对异常(或可疑)样本,特别是血液病患者样本具有很好的过筛作用。血常规筛查地中海贫血主要参数:平均红细胞体积(MCV)和平均红细胞血红蛋白量(MCH),通常以 $MCV < 82$ fL 和(或) $MCH < 27$ pg 作为筛查阳性,在相

*基金项目:广西来宾市科技计划项目资助(No:来科转 211829)

¹来宾市妇幼保健院(广西来宾,546100)

通信作者:叶丽花, E-mail:181988895@qq.com

同的检测条件下 MCH 比 MVC 受影响因素小更稳定。徐珊珊等^[4]认为以 MCH 作为地中海贫血筛查的指标具有较高的灵敏度。黄志卓等^[5]认为 Hb 电泳联合 MCV、MCH 筛查可明显提高筛查阳性率。通过血常规检测可快速、经济高效地提供检测筛查结果,适用于大规模婚检及孕检夫妇异常 Hb 病筛查。

2 血红蛋白分析筛查

大部分异常 Hb 病只有异常 Hb 变异体而无临床表型,随着 Hb 分析技术的发展,Hb 分析筛查已成为异常 Hb 病筛查的主要手段。常用 Hb 分析有醋酸纤维素薄膜电泳、柠檬酸琼脂电泳、琼脂糖电泳、等电聚焦电泳、高效液相色谱技术、全自动毛细管电泳、质谱分析等。

2.1 醋酸纤维素薄膜电泳

醋酸纤维素薄膜电泳是用醋酸纤维素薄膜(CAC)作为支持介质进行的区带电泳。它的应用原理是带负电荷的 Hb 分子在电场中以不同的速率向阳极移动,因速率不同,各种 Hb 在 CAC 上的区带不同,从而将不同的 Hb 定性、定量分析。因 CAC 介质电泳有不吸附蛋白质,耗时短、无拖尾、图像清晰和透明且可以长期保存等优点,不仅能快速分离常见 Hb 组分且除了电泳仪和醋酸纤维素试纸条外,无需使用任何昂贵的精密仪器^[6],标本用量少,容易洗脱定量。但是实际临床工作中,样本的新鲜度及样品点样点,染色液质量、使用次数及染色时间,纤维素薄膜质量,电流强度等都可以影响电泳的分析结果,且 HbF 与 A 区带和 HbE 与 A2 区带都因有相同迁移率而无法分离,以及许多其他 Hb 也无法分辨清楚,使得其电泳结果可信度降低,目前已经慢慢被淘汰。

2.2 柠檬酸琼脂电泳

在柠檬酸盐琼脂电泳中,Hb 可逆地与硫酸化多糖琼脂糖凝胶结合,硫酸化多糖琼脂糖凝胶是 Difco 细菌琼脂的天然成分,在 pH 6.2 时仅带微弱的正电荷,而碳水化合物带净负电荷。另一方面,电内渗在阴极方向进行,这些相反的流动按照 Hb 对琼脂凝集素的亲和力顺序分离 Hb。通过计算机辅助建模确定 Hb 上的琼脂凝集素结合位点,并确定该位点与表现出异常柠檬酸琼脂迁移率的 Hb 变异体的关系。HbS、HbC 在其他电泳上因有相似的迁徙率而难以区分,柠檬酸琼脂凝集素对 Hb 有抗凝作用,可以用柠檬酸琼脂电泳将它们区分开,因此同时使用醋酸纤维素和柠檬酸琼脂电泳分析同一样品具有更大的覆盖范围的优点^[7]。柠檬酸琼脂电泳广泛用于异常 Hb 的研究,作为碱性电泳的辅助手段。

2.3 琼脂糖电泳

自 1959 年用凝胶作为支持介质进行电泳后,

打开了电泳的新篇章。琼脂糖凝胶电泳原理是不同 Hb 分子在碱性条件下的电荷不同、等电点也不同,分别涌向阴极或阳极而分离出不同的 Hb 条带,随着全自动电泳仪的出现逐渐取代了醋酸纤维素薄膜电泳。全自动琼脂糖凝胶电泳不仅能够定量检测出 HbA、HbF、HbA2 含量,还能检出各种异常 Hb,如 HbH、HbE、HbG 等,其分辨率极高,能够分辨出极微量异常 Hb,准确分析出 HbA2 及 HbF 异常增高者,为地中海贫血的诊断提供准确可靠的数据。但是与醋酸纤维素薄膜电泳一样,仍然难区分 HbE 和 A2,HbH 与 HbBarts 等区带很接近的变异体。因琼脂糖凝胶孔径大,不吸附蛋白质,其区带整齐无拖尾,重复性好且分辨率更高等优点,目前实际临床工作中琼脂糖电泳很少用来检测 Hb,而常用于 DNA 片段的分离,使用琼脂糖凝胶电泳以及核酸染色剂可以简单快速地根据迁移距离结合分子量标准大致判断 DNA 片段的大小^[8]。

2.4 等电聚焦电泳

等电聚焦电泳(IEF)是利用一种特殊的缓冲液(两性电解质)在凝胶(常用聚丙烯酰胺凝胶)内制造一个 pH 梯度,电泳时每种蛋白质将迁移到其等电点(pI)的 pH 处而形成区带电泳。Schaefer 等^[9]用 IEF 监测研究分析了乌干达共和国近 100 000 名婴幼儿的干血斑,分离出包括 HbA、HbF、HbS、HbC、HbStanleyvilleII、HbG-Pest、HbO-Arab、HbP-Nilotic、HbKenya 等变异体,由此可见 IEF 是筛查异常 Hb 快速、可重复的方法。IEF 与醋酸纤维素薄膜电泳比较具有无迁移、能低浓度检测和快速分离 Hb 等优点,但劳动强度大且对 HbA2 定量不够准确,在我国临床工作应用比较少。

2.5 高效液相色谱法

高效液相色谱法(HPLC)是利用离子交换树脂作为分离柱,根据 Hb 的理化性质不同,在分离柱的停留时间不同,将 Hb 高效分离及纯化。HPLC 具有灵敏快速,标本无需提前洗涤溶血处理,分辨率及特异性高等特点,现已经作为多数实验室常规 Hb 分析方法。HPLC 能快速、灵敏、高通量分离鉴定 Hb 变异体以及定量测定 HbA 及 HbF,有针对性的定值质控品,2012 年被 ICSH 推荐为分离和鉴定 Hb 变异体和定量测定 HbA 及 HbF 的标准方法。HPLC 样品用量少、经济、快速,对 HbS、HbA2 和 HbF 分类准确^[10],对于低浓度的 HbF 也能准确定量,又能分离出 HbE、HbQ、HbCS 等异常 Hb,有些传统 Hb 电泳无法区分的条带也可以分离出来。Polprasert 等^[11]用 HPLC 检测 HbE,并与 MCV 或 MCH 截点联合筛查 α^0 -地中海贫血复合 HbE,阳性预测值分别为 76.2% 和 77.4%;王也飞等^[12]研究显示,应用

HPLC 与血常规联合检测筛查 β -地中海贫血、HbH 病和异常 Hb 病的灵敏度、特异度高,与基因分析结果有较高符合率,且操作简便、快速,适用于临床快速筛查。屈艳霞等^[13]研究也显示,MCV 和 MCH 联合 HPLC 方法适合用于大规模人群筛查地中海贫血。HPLC 虽然分离率高,重复性好,但每次上样前需要校准,并且对于 Hb 含量过低或者过高的样本结果测定不准确,对色谱分离柱质量也有要求。

2.6 毛细管电泳

毛细管电泳(CE)是经典电泳和现代微柱分离相结合的一种分离技术。全自动毛细管电泳是将在阳极自动溶解红细胞的混合液体用高压在毛细管内电泳分离,在阴极 415 nm 处测定 Hb,用 Phoresis 程序对图像分析。全自动毛细管电泳标本用量更少,全自动化程度高,检测速度快(8 个通道数分钟检测 8 个样本),敏感性、分辨率较高(可识别 20 种最常见的 Hb 变异体),这些特点使其迅速发展成为实验室检测异常 Hb 最常用的手段。Phoresis 程序将电泳图分为 z1~z15 共 15 个区带。许伟华等^[14]用全自动毛细管电泳对 232 例异常 Hb 进行检测,检出了包括常见的 HbH、HbBart's、HbCS 和少见的 HbE、HbK、HbQ、HbG、HbJ 以及高含量的 HbF,证实全自动毛细管电泳在各种常见的异常 Hb 病中有重要的应用价值,可为地中海贫血及异常 Hb 病筛查及诊断提供快速准确的诊断依据。HbNewYork 在 HPLC 上不与 HbA 分离,而在全自动毛细管电泳 100% 能被检测出来,因此存在可能与正常血红蛋白组分共同洗脱的罕见变异体,建议使用至少 2 种互补的 Hb 电泳方法来检测血红蛋白种类^[15]。姚靖等^[16]利用干血片毛细管电泳技术定量分析 HbBart's 水平,对新生儿 α -地中海贫血的筛查准确性高,其确诊符合率为 93.45%。但是全自动毛细管电泳目前只有 HbA2 正常值的室内质控品,尚无其他 Hb 变异体的室内质控品,因而无法对其他 Hb 变异体精密度进行监测;对于某些 Hb 变异体纯合子或复合杂合子,因为 HbA 缺失,须与正常全血以 1:1 稀释溶解后电泳才能定位变异体;而且由于仪器精密度高,对环境要求很高,粉尘和温湿度改变都可以影响仪器的运行和结果的准确性。

2.7 质谱分析

质谱(MS)分析是一种根据分子的质量(分子量)与电荷之比来鉴定分子的技术,应用非常广泛。试剂与目标分子特异性结合减少干扰,能更准确地识别是质谱分析强大优势。随着质谱法的发展,与液相色谱相结合,以液相色谱作为高通量进样系统,质谱作为检测系统的液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)技术也迅速发展。LC-MS/MS 把液相色

谱的高分离能力和质谱能够提供相对分子质量与结构信息的优点结合起来。异常 Hb 病是因珠蛋白基因突变而产生新的异常 Hb,其分子量(M)已发生改变。LC-MS/MS 检测异常 Hb 病是通过胰酶裂解 Hb 形成肽段,肽段按不同质荷比分离排列,得到含质荷比和离子峰强度信息的质谱图,分析突变前后珠蛋白链合成量及分子质量的变化,通过分析质谱图离子峰出现、消失或信号改变的质荷比,筛选和鉴定异常 Hb 病的标志性肽段,确定 Hb 变异体的类型;与多肽同位素内标结合,可同时对正常 Hb、异常 Hb 进行定性定量分析。余朝文^[17]研究表明 LC-MS/MS 技术用于异常 Hb 病,特别是地中海贫血筛查,灵敏度和特异度均高于 98%,采样速度快(60 s/例),检测通量高,成本低廉。Wiesinger 等^[18]研究用高分辨率质谱法(HRAM/MS)对新生儿筛查的适用性;干血斑中血红蛋白病和 β -地中海贫血的鉴定,结果显示使用 HRAM/MS 筛查对罕见突变和 β -地中海贫血具有更高的特异性,并且经济、自动化。除鉴定 Hb 外,质谱分析还可以对氨基酸序列进行一定程度上的分析,这对于鉴定新变体和确认 DNA 测序很有帮助, Lee 等^[19]认为使用 LC-MS/MS 技术检测 Hb,有助于异常 Hb 病进行更精确的分子诊断。但质谱分析 Hb 需要有分析蛋白质的技术专长及非常昂贵的仪器,使其在运用中有所限制。

3 基因测序诊断

应用血常规检查及 Hb 分析筛查诊断 Hb 病有一定的缺陷,有些 Hb 组分无法分辨清楚,使得电泳结果可信度降低,诊断准确率低,已经不能满足临床诊断需要,有的已经被淘汰,有的只能用于筛查,随着科技进步,实验诊断技术的发展,异常 Hb 病的诊断技术已经逐步被 Sanger 序列测定和高通量测序替代。

3.1 Sanger 序列测定

1953 年 DNA 序列测定就被报道,但是直至 1977 年 Sanger 发明末端终止测序法才迅速发展起来。DNA 序列测定(Sanger 法)也称为一代测序,其测定原理是利用一种 DNA 聚合酶(脱氧核苷酸三磷酸 dNTP)延伸结合在待定模板上的引物,直至掺入链终止核苷酸(双脱氧核苷三磷酸 ddNTP)为止。Sanger 序列测定可以针对珠蛋白基因序列突变位点设计引物进行 PCR 测序,确定的突变位置和突变的性质,是地中海贫血基因点突变最直接全面的检测方法,也是目前点突变验证的金标准^[20-21],是鉴定诊断异常 Hb 病的主要方法。但是 DNA 测序法操作繁琐,存在只能对单一序列测序通量不够等缺点,使得它在实际临床应用中有所限制。

3.2 高通量测序技术

高通量测序技术又叫二代测序技术,是继一代测序之后发展起来全新的测序技术。二代测序能够在单个反应中同时对数百万个 DNA 分子并行测序^[22],可以一次性对点突变、小插入缺失、大片段缺失和拷贝数增加等进行检测。高通量测序以其简单、更快速、更高分辨率、高通量的特点,成为在多个临床领域最具有应用前景的技术之一。基于高通量测序的检测方式包括靶向测序、全外显子组测序、全基因组测序及转录组测序^[23],各种方法的合理联合应用能够对 α -珠蛋白和 β -珠蛋白全长基因序列进行高通量测序,在地中海贫血高发区,利用高通量测序技术进行地中海贫血基因检测,可提高罕见地中海贫血的检出率,有效避免漏检。2018年普嘉杰^[24]用二代测序诊断1例由 β -珠蛋白基因3号外显子上的1个自发的移码突变引起的异常 Hb 病,2020年赵婷婷^[25]用二代测序检测诊断出13种不同的异常 Hb,包括5种 α -珠蛋白链变异体和8种 β -珠蛋白链变异体,说明二代测序在异常 Hb 病检测诊断有着重要的作用。Chen 等^[26]用下一代测序(NGS)对地中海贫血诊断的评估显示:NGS对突变位点的鉴定与 Sanger 测序和 Gap-PCR 鉴定的突变位点一致,NGS的敏感度和特异度为100%,在检测地中海贫血的大缺失和非缺失缺陷中具有很高的准确性和可重复性。陆国荣^[27]认为在地中海贫血高发区,利用高通量测序技术进行地中海贫血基因检测,可提高罕见地中海贫血的检出率,有效避免漏检。与一代测序相比,可以对多序列并行测序,缩短了研究周期和成本,适合对大量样本进行研究,但是其测序片段被限制在250~300 bp,有些量少的序列无法大量扩增而丢失信息造成配错碱基。

截止目前,人类 Hb 变异和地中海贫血突变的 HbVar 数据库记载有700多种 Hb 变异体,据报道我国异常 Hb 病的人群携带率为0.337%,以云南最高约为5.950%,其次为江苏的0.507%,再次为新疆的0.420%。任天凤^[28]研究显示广东信宜地区育龄人群异常 Hb 病携带率为0.566%,超过江苏,共检出异常 Hb 病12种,HbE、Hb Q-Thailand、HbNewYork、HbJ-Bangkok 等类型,而 Huang 等^[29]研究显示中国东南部福建省异常 Hb 病的总体患病率为0.260%,除 HbQ-Thailand 和 HbNewYork 外,还报道了 HbJ-Bangkok、HbG-Taipei、HbG-Coushatta 和 HbMaputo。因此异常 Hb 病的筛查与诊断对于婚育指导及产前诊断具有重要意义。异常 Hb 病具有分布较广且有地域性的特点,因无临床表型而隐匿性大,大部分是随着地中海贫血筛查时 Hb 电泳出现异常 Hb 变异体而被发现,目前还没有成熟的试剂盒可以检测。已

发现的大多数异常 Hb 病的携带者没有临床症状,少数有明显的生理功能异常,某些异常 Hb 病(如 HbCS、HbE 等)合并地中海贫血可导致中重度贫血,因此完善异常 Hb 变异体检测方法对今后异常 Hb 病的防控具有重大意义。近年来 Hb 的分离技术不断在更新,随着高效液相色谱技术、全自动毛细管电泳、质谱分析技术的发展,大家普遍支持用质谱技术与 HPLC 和 CE 相结合检测筛查异常 Hb 病,如上文提到的 LC-MS/MS 和高分辨率质谱法(HRAM/MS)技术。

目前 DNA 检测方法正在不断发展,随着全球移民和多种族社会的发展趋势,DNA 检测方法已从有针对性的人群特异性的方法向通用方法发展,如 Sanger 测序(点突变)和二代测序技术。通过 DNA 序列分析明确诊断有助于新生儿和产前 Hb 病的筛查。二代测序技术是目前较常用的新 DNA 测序技术,虽然目前未被常规使用,但二代测序可能很快就会成为一些异常 Hb 病的实验室诊断方法。还有最新的三代测序,贝瑞公司已经联合许多医院用于异常 Hb 病的科研研究。相信在不久的将来,异常 Hb 病会有更加完善的筛查技术和基因诊断技术平台。

利益冲突 作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李友琼,田矛. 血红蛋白病对糖化血红蛋白测定结果的影响[J]. 中国临床新医学,2022,15(8):773-776.
- [2] 王也飞,吴蓓颖,夏文权,等. 异常血红蛋白病患者血液学表型和基因型分析[J]. 中国实验血液学杂志,2021,29(4):1280-1288.
- [3] 彭政,肖芳. 血液分析仪过筛作用在血液病诊断中的临床应用评价[J]. 临床血液学杂志,2020,33(2):130-133.
- [4] 徐珊珊,顾恒,李铭臻. 地中海贫血筛查指标平均红细胞血红蛋白含量可靠性的分析[J]. 山西医药杂志,2021,50(9):1442-1444.
- [5] 黄志卓,高云,巢薇,等. 广西柳州地区地中海贫血筛查及基因分型结果研究[J]. 临床血液学杂志,2022,35(6):414-418.
- [6] Kumar R, Derbigny WA. Cellulose Acetate Electrophoresis of Hemoglobin[J]. Methods Mol Biol,2019,1855:81-85.
- [7] Adu P, Simpong NL, Kontor K, et al. Misleading presentation of haemoglobin electrophoresis data[J]. Ghana Med J,2017,51(1):36-38.
- [8] 薄秀梅. 核酸染色剂对 DNA 在琼脂糖凝胶电泳中迁移速度的影响[J]. 安徽农业科学,2020,48(3):1-3,10.
- [9] Schaefer BA, Kiyaga C, Howard TA, et al. Hemoglobin variants identified in the Uganda Sickie Surveillance Study[J]. Blood Adv,2016,1(1):93-100.
- [10] Baig MA, Swamy KB, Baksh AD, et al. Evaluation of role of HPLC(Merits & Pitfalls), in the diagnosis of

- various hemoglobinopathies & thalassemic syndromes [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2021, 64(3):518-523.
- [11] Polprasert C, Wongprachar P, Suksusut A, et al. Comprehensive screening for coexisting heterozygous α -thalassemia in hemoglobin E trait [J]. *Hematology*, 2020, 25(1):276-279.
- [12] 王也飞, 吴蓓颖, 夏文权, 等. 高效液相色谱技术联合红细胞参数在血红蛋白病筛查中的应用 [J]. *诊断学理论与实践*, 2021, 20(3):271-278.
- [13] 屈艳霞, 左连东, 陈桂兰, 等. 血液学指标联合 HPLC 方法在育龄人群地中海贫血筛查中的价值 [J]. *中国妇幼保健*, 2020, 35(8):1476-1479.
- [14] 许伟华, 刘冬霞, 龙辉, 等. 全自动毛细管电泳仪在异常血红蛋白筛查中的应用 [J]. *实验与检验医学*, 2018, 36(2):178-181.
- [15] Li Y, Tian M, Qin T, et al. Capillary Electrophoresis Resolves Inconclusive HPLC Analysis for Hemoglobin Variants: a Study of Two Cases [J]. *Clin Lab*, 2018, 64(7):1305-1309.
- [16] 姚靖, 刘恩赐, 李肖妹, 等. 干血片毛细管电泳技术在新生儿 α -地贫筛查中的应用 [J]. *数理医药学杂志*, 2021, 34(2):228-230.
- [17] 余朝文. 基于质谱技术的临床重要疾病代谢相关标志物的鉴定及应用研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
- [18] Wiesinger T, Mechtler T, Schwarz M, et al. Investigating the suitability of high-resolution mass spectrometry for newborn screening: identification of hemoglobinopathies and β -thalassemias in dried blood spots [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2020, 58(5):810-816.
- [19] 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.
- [20] Rets A, Clayton AL, Christensen RD, et al. Molecular diagnostic update in hereditary hemolytic anemia and neonatal hyperbilirubinemia [J]. *Int J Lab Hematol*, 2019, 41(Suppl 1):95-101.
- [21] Jamwal M, Sharma P, Das R. Laboratory Approach to Hemolytic Anemia [J]. *Indian J Pediatr*, 2020, 87(1):66-74.
- [22] Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA. Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(5):269-285.
- [23] 竺晓凡. 二代测序技术在先天性骨髓衰竭综合征诊断中的合理应用与结果分析 [J]. *临床血液学杂志*, 2020, 33(11):746-748.
- [24] 普嘉杰. 二代测序诊断一例 HBB 外显子自发显性突变导致异常血红蛋白 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [25] 赵婷婷. 罕见血红蛋白病突变类型临床血液学特征的研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2020.
- [26] Chen P, Yu X, Huang H, et al. Evaluation of Ion Torrent next-generation sequencing for thalassemia diagnosis [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(12):300060520967778.
- [27] 陆国荣. 高通量测序技术在湖南汝城县地中海贫血基因突变类型分析中的应用 [D]. 衡阳: 南华大学, 2021.
- [28] 任天凤. 广东信宜地区育龄人群异常血红蛋白病筛查分析 [J]. *中国现代药物应用*, 2021, 15(6):240-242.
- [29] Huang H, Xu L, Chen M, et al. Molecular characterization of thalassemia and hemoglobinopathy in Southeastern China [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):3493.
- (收稿日期: 2022-09-01 修回日期: 2022-10-17)