

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.08.003

专用采血管对血浆中循环游离 DNA 保存效果的影响^{*}

徐 鹏^{1,2}, 段小瑜^{1,2△}, 张海梅³, 原昆鹏³

1. 威高集团有限公司国家工程实验室, 山东威海 264210; 2. 山东高创医疗器械国家研究院有限公司, 山东威海 264210; 3. 山东威高集团医用高分子制品股份有限公司, 山东威海 264210

摘 要:目的 验证专用采血管对血浆中循环游离 DNA(cfDNA)保存效果的影响。方法 分别用 EDTA-K₂ 抗凝管和两种 cfDNA 保存专用采血管采集健康成人外周血,待血样室温保存到固定的时间点时,分离提取血浆中的 cfDNA,定量检测不同时间点血浆中 cfDNA 水平的变化情况。结果 采集在 EDTA-K₂ 抗凝管中的血浆 cfDNA 水平随着时间的推移有逐渐升高后达到稳定的趋势,而采集在两种 cfDNA 保存专用采血管中的血浆 cfDNA 水平至少 7 d 内保持稳定。结论 血液标本在 EDTA-K₂ 抗凝管中长期存放会导致血浆中 cfDNA 水平不稳定,这种变化可能与血液中基因组 DNA 的污染和 cfDNA 降解的动态平衡有关,专用采血管能够在至少 7 d 内稳定血浆中 cfDNA 的水平,对后续 cfDNA 的定量检测及临床应用有重要作用。

关键词:专用采血管; 循环游离 DNA; 定量检测

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)08-1035-04

Influence of special blood collection tubes on preservation effect of circulating free DNA in plasma^{*}

XU Peng^{1,2}, DUAN Xiaoyu^{1,2△}, ZHANG Haimei³, YUAN Kunpeng³

1. National Engineering Laboratory, Weigao Group Co., Ltd., Weihai, Shandong 264210, China; 2. Shandong Gaochuang Medical Device National Research Institute Co., Ltd., Weihai, Shandong 264210, China; 3. Shandong Weigao Group Medical Polymer Products Co., Ltd., Weihai, Shandong 264210, China

Abstract:Objective To verify the influence of special blood collection tubes (BCT) on the preservation effect of circulating free DNA (cfDNA) in plasma. **Methods** The peripheral blood samples in healthy adults were collected by using the EDTA-K₂ anticoagulant tubes and two kinds of special BCT for cfDNA preservation. Plasma cfDNA was isolated and extracted when the blood samples were stored at room temperature to a fixed time point. The change of plasma cfDNA level was quantitatively detected at different time points. **Results** The level of plasma cfDNA collected in EDTA-K₂ anticoagulant tubes was gradually increased with time lapse and then reached a stable trend, while the level of cfDNA collected in two kinds of special BCT for cfDNA preservation remained stable for at least 7 d. **Conclusion** The long time storage of blood samples in EDTA-K₂ anticoagulant tubes may lead plasma cfDNA level to be unstable. This change may be related to the contamination of genomic DNA in blood and the dynamic balance of the cfDNA degradation. The special BCT can stabilize the cfDNA level in plasma within at least 7 d, which plays an important role in the follow-up quantitative detection and clinical application of cfDNA.

Key words:special blood collection tubes; circulating free DNA; quantitative detection

循环游离 DNA(cfDNA)是指存在于人体外周血液中、游离于细胞之外的 DNA,包括细胞溶解破裂后释放到血液中的 DNA 及胎儿细胞和突变细胞释放到血液中的外源 DNA。血液中 cfDNA 被发现已经超过 60 年了^[1],然而直到 1977 年 LEON 和他的同事在癌症患者血液中发现 cfDNA 水平升高,cfDNA 在临

床医学中的重要性才被人们所意识到^[2]。近几年由于 DNA 分离提取、定量检测及测序等分子生物学技术的发展,对 cfDNA 的研究和临床应用也取得突破,尤其在产前诊断、肿瘤疾病的筛查、治疗检测和预后评估等方面表现出令人振奋的应用潜力。

孕妇血浆中的 cfDNA 在无创遗传病产前诊断中

^{*} 基金项目:国家区域创新中心科技专项项目(2017QYCX05)。

作者简介:徐鹏,男,助理工程师,主要从事临床分子诊断研究。△ 通信作者,E-mail:dxys324@126.com。

本文引用格式:徐鹏,段小瑜,张海梅,等.专用采血管对血浆中循环游离 DNA 保存效果的影响[J].检验医学与临床,2021,18(8):1035-

发挥重要作用^[3]。研究表明,胎儿和肿瘤细胞来源的 cfDNA 水平非常低,仅占总 cfDNA 水平的 10% 以下^[4],因此 cfDNA 检测的准确性和可靠性是其后续临床应用的基本保障。在血液标本的体外储存和运输过程中,不可避免地伴随着白细胞基因组 DNA 的释放及核酸酶对 cfDNA 的降解^[5],导致特异的 cfDNA 片段大小和比例发生变化,大量母源 DNA 的释放会影响胎儿 DNA 的检出,尤其会增加与母源 DNA 序列差异不大的胎儿 DNA 序列的检出^[6]。临床检测 cfDNA 时,阻止基因组 DNA 污染的一种处理方式是静脉采血后立即处理血样,但这种方式会限制 cfDNA 作为生物标志物的应用范围,尤其在缺乏血浆分离和低温储藏设备的地区,而使用 cfDNA 专用采血管采集血液标本,血液标本经常温保存和长时间运输后,仍能从血浆中提取得到高质量的 cfDNA,这种专用采血管在无创产前诊断和肿瘤防控中显示出重要作用。不同实验室对血浆 cfDNA 片段分布进行测序研究,结果一致表明,cfDNA 片段大小主要分布在 166 bp^[7-8],cfDNA 片段大小成为利用 PCR 技术进行定量检测时首要考虑的因素^[9]。本文采用人 Leptin 基因 166 bp 片段来研究不同保存时间血浆中 cfDNA 水平变化情况,与 EDTA-K₂ 抗凝管对比,探讨 cfDNA 专用采血管对延长血液中 cfDNA 保存时间的效果。

1 资料与方法

1.1 仪器和设备 EDTA-K₂ 抗凝管(E)为威高集团产品,cfDNA 专用采血管 K 及 cfDNA 专用采血管 A 为两个 cfDNA 保存管品牌。游离 DNA 提取试剂盒品牌为海狸生物。荧光定量 PCR 仪品牌为西安天隆 Gentier 96 E。

1.2 招募志愿者 志愿者来自威高集团职工,年龄 25~30 岁,健康的男性和女性各 10 例,入选的志愿者均被告知并签署知情同意书。

1.3 方法

1.3.1 血液采集 所有志愿者均空腹进行血液采集,实验分 6 个时间点采集每例志愿者的血液标本到一支 10 mL 的 EDTA-K₂ 抗凝管和两支 10 mL cfDNA 专用采血管中,采血量达到管壁标签标示刻度体积,每管采血完毕后立即轻柔倒转颠倒混匀 10 次,充分混匀血样与保护剂,将所有采血管放置于室温储存。

1.3.2 血浆分离 分别在 2 h、4 d、7 d、10 d、14 d、15 d 6 个时间点取出所有血液标本,颠倒混匀后于 4 ℃ 1 600×g 离心 10 min,转移最上层淡黄色血浆层至已标记的 2 mL 离心管中。4 ℃,1 600×g,将每个 2 mL 离心管再次离心 10 min,用移液器小心吸取血浆层至新的 1.5 mL 的离心管中,以上两步转移操作需注意移液器枪头不要触碰到白膜细胞层和暗红色沉淀。

1.3.3 磁珠法抽提 cfDNA 取 1 mL 血浆样品按照

游离 DNA 提取试剂盒的说明书要求进行 cfDNA 的提取,对制造商推荐的方案稍加修改,将蛋白酶 K 60 ℃ 处理时间从 10 min 增加到 1 h,使与 DNA 结合的蛋白质降解,DNA 充分游离,以逆转化学固定的影响。用 55 μL 预热缓冲液洗脱 cfDNA,并在 -80 ℃ 条件下保存。

1.3.4 血浆总 cfDNA 水平检测 使用 Thermo NanoDrop OneC 分光光度计检测从血浆中提取的总 cfDNA 水平。

1.3.5 实时荧光定量 PCR(q-PCR)定量检测 cfDNA 水平 采用 q-PCR 方法,通过已知浓度 Leptin 基因标准品 CT 值与其浓度的对数绘制标准曲线,准确定量人 Leptin 基因 166 bp 片段在不同时间点的水平变化来研究血浆中 cfDNA 的水平变化趋势,上游引物和探针的序列来自参考文献[10],下游引物使用 Primer Premier 5 软件设计的序列。Leptin 上游引物:5'-CAGTCTC-CTCCAAACAGAAAGTCA-3',下游引物:5'-CGGAG-GTTCTCCAGGTCGTTGGATA-3';Taqman 探针:5'-(FAM)bCGGTTTGGACTTTC(MGBNFQ)-3'。

Leptin 标准品、引物和探针均由上海生工生物工程股份有限公司合成,标准品倍比稀释成 $2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^8$ copy/mL,引物和探针的终浓度为 500 nmol/L。体系中引入 UDG 酶和热启动 DNA 聚合酶,预防 PCR 扩增产物的污染,抑制在低温条件下的非特异性扩增,两种酶在体系总的量为 0.5 U 和 2.0 U。PCR 反应采用 20 μL 的反应体系,PCR 热循环条件:50 ℃ 2 min,94 ℃ 10 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 共 45 个循环。每个标本设置 3 个复孔,设置 3 个无模板对照孔。

1.4 统计学处理 使用 SPSS21.0 软件进行分析和分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对标本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

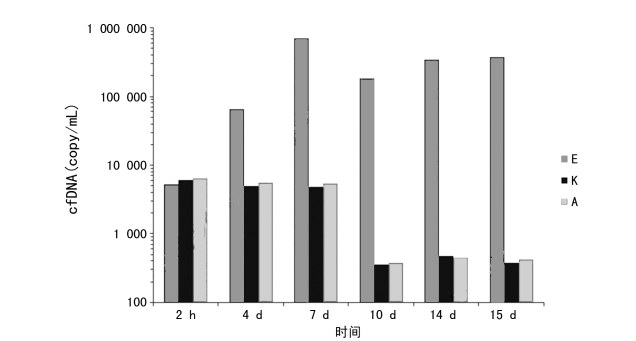
2.1 血浆总 cfDNA 水平的检测结果 血液采集到采血管后,室温保存 2 h、4 d、7 d、10 d、14 d、15 d,采血管中血浆总 cfDNA 的水平变化呈现出明显差异(表 1)。EDTA-K₂ 抗凝管中总 cfDNA 水平在室温存放至 4 d 时,与 2 h 总 cfDNA 水平相比降低,差异有统计学意义($t = 45.727, P = 0.014$)。储存 7~15 d 时,与 2 h 总 cfDNA 水平相比升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。两种 cfDNA 专用采血管中的血浆总 cfDNA 水平在 10 d 内保持稳定,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 q-PCR 检测不同保存时间血液标本 cfDNA 水平 血液标本采集到 3 种采血管后室温存放 2 h、4 d、7 d、10 d、14 d、15 d,cfDNA 水平有差异,结果如图 1。EDTA-K₂ 抗凝管中的血浆 cfDNA 在 4、7、10、14、15 d 时,相较于 2 h 时的水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),整个储存周期 cfDNA 水平波动式上

升。两种专用采血管中的血浆 cfDNA 水平在 4、7 d 时,相较于 2 h 的水平略微降低,但差异无统计学意义($P>0.05$);在 10、14、15 d 时的血浆 cfDNA 水平,相较于 2 h 的水平明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 不同采血管对血浆总 DNA 水平保存效果的影响($\bar{x}\pm s$, ng/ μ L)

时间	EDTA-K ₂ 抗凝管	专用采血管 K	专用采血管 A
2 h	6.36 $\pm$ 0.083	6.34 $\pm$ 0.255	6.31 $\pm$ 0.277
4 d	4.35 $\pm$ 0.021	5.32 $\pm$ 0.380	5.96 $\pm$ 0.082
7 d	11.56 $\pm$ 0.028	5.53 $\pm$ 0.424	5.71 $\pm$ 0.650
10 d	17.94 $\pm$ 0.534	5.04 $\pm$ 0.108	3.91 $\pm$ 1.155
14 d	25.64 $\pm$ 1.742	4.70 $\pm$ 0.096	3.75 $\pm$ 0.002
15 d	28.78 $\pm$ 0.817	3.93 $\pm$ 0.076	3.32 $\pm$ 0.214



注: E 为 EDTA-K₂ 抗凝管, K 为专用采血管 K, A 为专用采血管 A。

图 1 EDTA-K₂ 抗凝管和两种专用采血管血浆 cfDNA 水平

3 讨 论

cfDNA 作为新的生物标志物,其水平和组分的稳定性对后期的临床检测至关重要。无创产前诊断、胎儿性别的确定^[9]、肿瘤学监测及 RhD 阴性母亲的 RhD 基因型检测是 cfDNA 检测的主要应用领域^[10]。有效利用 cfDNA 靶点作为生物标志物的一个主要技术挑战是对稀有靶点进行量化,由于 cfDNA 的水平在血浆中的比例非常低,血浆分离离心力过大,白细胞破裂释放 DNA,都会进一步减少胎儿或者肿瘤来源 cfDNA 的比例^[11-12],最小化白细胞的破裂和核酸酶的降解是稳定保存血液标本中目标 cfDNA 比例的有效方式。cfDNA 专用采血管的应用很大程度上解决了血液保存时间的限制,使得缺乏相应提取和检测设备的地区能够进行异地血样检测。

q-PCR 是目前定量检测 cfDNA 水平的主要方法,检测机体中广泛分布且稳定出现的靶序列,定量分析 cfDNA 的水平变化。Leptin 基因位于 7 号染色体上,且存在于所有人体细胞中,通过血浆中 Leptin 基因的水平变化能够反映不同采血管对 cfDNA 保存效果的影响。

本研究对比了 EDTA-K₂ 抗凝管与 cfDNA 专用

采血管对于 cfDNA 保存效果的影响,EDTA-K₂ 抗凝管中 cfDNA 的水平在第 7、10、14、15 天明显升高,表明在血液标本的长期保存过程中不断有内源 DNA 释放造成的污染,在第 4 天,cfDNA 水平降低,表明在 EDTA-K₂ 抗凝管血液保存前期,核酸酶对 cfDNA 的降解作用强于内源 DNA 的污染,与之相反的两种专用采血管中 cfDNA 水平保持稳定,且有逐渐减少的趋势,证明专用采血管对稳定血液标本中 cfDNA 水平在一定时间内有积极的作用,专用采血管能稳定有核血细胞,减少内源 DNA 的释放,抑制核酸酶对 cfDNA 的降解作用,从而保持总 cfDNA 水平的稳定。

通过 q-PCR 检测血浆中提取的 cfDNA,EDTA-K₂ 抗凝管中的血浆 cfDNA 在 4、7、10、14、15 d 时,相较于 2 h 时的水平明显升高,表明 cfDNA 受到基因组 DNA 的污染,不同长度片段的分布和比例发生变化,与已有的研究结果一致^[13]。两种专用保存管中,cfDNA 在保存至 4 d 和 7 d 时,cfDNA 的水平稳定,保存至 10、14、15 d 时,cfDNA 的水平明显降低,表明两种专用采血管能保持 cfDNA 水平稳定至少 7 d,血液有核细胞的破裂和核酸酶对 DNA 的降解过程被有效抑制,10、14、15 d 时,cfDNA 水平降低暗示核酸酶对 DNA 的降解起到了主导作用。

综上所述,专用采血管能够抑制基因组 DNA 释放到血浆,同时保持最初的 cfDNA 水平,对血液标本保存过程中 cfDNA 的稳定起到积极的作用,稳定有核血细胞,抑制核酸酶的降解活性,对于 cfDNA 的后续分析和作为生物标志物准确检测奠定了基础。

参考文献

[1] DUVVURI B, LOOD C. Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases [J]. Front Immunol, 2019, 10: 502-506.

[2] BISCHOFF F Z, LEWIS D E, SIMPSON J L. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure [J]. Hum Reprod Update, 2005, 11(1): 59-67.

[3] ONO Y, SUGITANI A, KARASAKI H, et al. An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by resolving subsampling issues [J]. Mol Oncol, 2017, 11(10): 1448-1458.

[4] 李勤, 张毅, 丁宇烽, 等. 孕妇血样采集后体外存放对血浆中胎儿游离 DNA 水平的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(9): 1042-1045.

[5] BISCHOFF F Z, SINACORI M K, DANG D D, et al. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 9(9): CD003252.

[6] JIANG P, CHAN C W, CHAN K C, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(11): E1317-E1325.

(下转第 1041 页)

血浆 DD 水平检测是一种简单、灵活、有效的血栓筛查手段,但针对不同的患者,可能筛查标准存在一定的差异。对于无症状的卵巢癌深静脉血栓形成患者,本研究得出最佳的血浆 DD 筛查截断值低于本院的血栓形成危急值标准(2 000 ng/mL)^[14]。卵巢癌患者是下肢深静脉血栓形成的高危人群,且无症状性深静脉血栓的发生概率较高,故对于初诊的卵巢癌患者,血浆 DD 检测应同卵巢肿瘤标志物一样作为常规筛查手段,并适当降低血栓阳性筛查标准。另外,本研究在观察 17 例深静脉血栓形成患者的相关数据时发现,血浆 DD 水平与下肢深静脉血栓发生的严重程度并无一致性关系^[10],因此建议临床上联合血浆 DD 检测和下肢血管超声检查,筛查卵巢癌无症状性深静脉血栓的发生,对阳性结果患者应及时采取抗凝措施或延迟妇科手术或化疗治疗,避免病情进展。

参考文献

[1] ABU SAADEH F, NORRIS L, O' TOOLE S, et al. Venous thromboembolism in ovarian cancer: incidence, risk factors and impact on survival[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013, 170(1): 214-218.

[2] SATOH T, OKI A, UNO K, et al. High incidence of silent venous thromboembolism before treatment in ovarian cancer[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(8): 1053-1057.

[3] MAHAJAN A, BRUNSON A, WHITE R, et al. The epidemiology of cancer-associated venous thromboembolism: an update[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2019, 45(4): 321-325.

[4] KHORANA A A, CARRIER M, GARCIA D A, et al. Guidance for the prevention and treatment of cancer-associated venous thromboembolism[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2016, 41(1): 81-91.

[5] 陈青山, 章智荣, 董红红, 等.《胸部恶性肿瘤围术期静脉血栓栓塞症预防中国专家共识(2018 版)》解读之 D-二聚

体篇[J]. *中国肺癌杂志*, 2019, 22(12): 761-766.

[6] 马爱矿, 高华丽, 王敏, 等. HE4、CA125 和 CA199 联合 D-二聚体检测在卵巢癌早期诊断中的应用[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2019, 26(7): 793-795.

[7] 刘建军, 崔林, 刘兴祥, 等. 血浆 D-二聚体水平与卵巢癌患者临床特征及化疗预后的关系研究[J]. *癌症进展*, 2018, 16(6): 766-769.

[8] AY C, PABINGER I, COHEN A T. Cancer-associated venous thromboembolism: burden, mechanisms, and management[J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(2): 219-230.

[9] KAWAGUCHI R, FURUKAWA N, KOBAYASHI H. Cut off value of D-dimer for prediction of deep venous thrombosis before treatment in ovarian cancer[J]. *J Gynecol Oncol*, 2012, 23(2): 98-102.

[10] EBINA Y, UCHIYAMA M, IMAFUKU H, et al. Risk factors for deep venous thrombosis in women with ovarian cancer[J]. *Medicine*, 2018, 97(23): e11009.

[11] 李文智, 罗林, 杨昆良, 等. CT 肺动脉成像联合下肢静脉成像评估肺动脉栓塞与下肢深静脉血栓的相关性[J]. *中国医学影像技术*, 2016, 32(4): 521-525.

[12] SAKURAI M, SATOH T, MATSUMOTO K, et al. High pretreatment plasma D-dimer levels are associated with poor prognosis in patients with ovarian cancer independently of venous thromboembolism and tumor extension[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2015, 25(4): 593-598.

[13] 李瑞娟, 赵爽, 潘玲. 下肢深静脉血栓患者的血浆 D-二聚体的检测分析[J]. *中国伤残医学*, 2016, 24(11): 78-79.

[14] 梁凌云, 陈艳霞, 何艳. 高水平 D-二聚体在血栓性疾病诊断中的临床价值[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(10): 1328-1331.

[15] SWIER N, VERSTEEG H H. Reciprocal links between venous thromboembolism, coagulation factors and ovarian cancer progression[J]. *Thromb Res*, 2017, 150: 8-18.

(收稿日期: 2020-02-26 修回日期: 2021-01-06)

(上接第 1037 页)

[7] PÖS O, BIRÓ O, SZEMES T, et al. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications[J]. *Eur J Hum Genet*, 2018, 26(7): 937-945.

[8] 李铁军, 张孝卫. 循环游离 DNA 的定量检测及面临的问题[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(3): 215-219.

[9] FINNING K M, CHITTY L S. Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2008, 13(2): 69-75.

[10] CHAN K C A, JIANG P, ZHENG Y W, et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(1): 211-224.

[11] NORTON S E, LECHNER J M, WILLIAMST, et al. A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR[J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(15): 1561-1565.

[12] WEI L, WU W, HAN L, et al. A quantitative analysis of the potential biomarkers of non-small cell lung cancer by circulating cell-free DNA[J]. *Oncology Letters*, 2018, 16(4): 4353-4360.

[13] JIANG P Y, LO Y M D. The long and short of circulating cell-free dna and the ins and outs of molecular diagnostics[J]. *Trends Genet*, 2016, 32(6): 360-371.

(收稿日期: 2020-05-30 修回日期: 2021-01-26)