

不同品牌cf-DNA保存管效果对比

李燕虹^{1,2}, 华静宇^{1,2}, 赵安琪^{1,2}, 李菲^{1,2}, 李丹杰^{1,2}, 程杰^{1,2*}, 崔景强^{1,2*}

¹河南省医用高分子材料技术与应用重点实验室, 河南 长垣

²河南驼人医疗器械集团有限公司, 河南 长垣

收稿日期: 2021年11月6日; 录用日期: 2021年12月9日; 发布日期: 2021年12月16日

摘要

目的: 对比驼人自主研发cf-DNA保存管与市售两种品牌DNA保存管对样本中cf-DNA保存效果。方法: 随机选取志愿者, 每位志愿者分别静脉采集血液至三种cf-DNA保存管, 采集样本分别保存0~2 h, 3 d, 7 d, 10 d, 14 d, 提取cf-DNA进行实时荧光定量PCR分析及二代测序。结果: 在驼人自主研发cf-DNA保存管与市售三种品牌cf-DNA保存管中保存样本测序结果保持一致, 驼人自主研发采血管可无损伤稳定保存样本。

关键词

采血管, cf-DNA, 实时荧光定量PCR, 二代测序

Comparison of Effects of Different Brands of cf-DNA Preservation Tubes

Yanhong Li^{1,2}, Jingyu Hua^{1,2}, Anqi Zhao^{1,2}, Fei Li^{1,2}, Danjie Li^{1,2}, Jie Cheng^{1,2*},
Jingqiang Cui^{1,2*}

¹Key Laboratory of Medical Polymer Materials Technology and Application (Henan Province), Changyuan Henan

²Henan Tuoren Medical Instrument Group Co. Ltd., Changyuan Henan

Received: Nov. 6th, 2021; accepted: Dec. 9th, 2021; published: Dec. 16th, 2021

Abstract

To compare the effect of self-developed DNA preservation tubes and three brands of commercially available DNA preservation tubes on cf-DNA preservation in samples. Methods: Randomly selected volunteers, blood samples from each volunteer were collected into three kinds of DNA preservation tubes, and the samples were stored for 0~2 h, 3 d, 7 d, 10 d and 14 d respectively. cf-DNA was extracted for q-PCR quantification and sequencing. Results: The sequencing results of samples stored

*通讯作者。

in the DNA preservation tubes independently developed by Camel man were consistent with those of the three brands on the market, and the samples could be stably preserved without damage.

Keywords

Vascular Collection, cf-DNA, q-PCR Quantification, Second Generation Sequencing

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

cf-DNA (cell free DNA, 简称 cf-DNA), 是指血液中游离于细胞外的 DNA [1]。cf-DNA 对于临床早期诊断意义重大, 随着 cf-DNA 分离纯化和鉴定技术日益完善, 临床和科研上越来越重视 cf-DNA 的研究和诊断[2] [3] [4]。cf-DNA 与疾病关系密切, 例如肿瘤细胞的 DNA 碎片可以游离到血液中, 通过对血液中 cf-DNA 的鉴定, 从而实现肿瘤的早期诊断, 做到早发现早治[5] [6]。胎儿的 DNA 也可以游离到孕妇的血液中, 因此可以通过分析孕妇血液中胎儿 cf-DNA, 判断胎儿是否存在遗传疾病等[7] [8]。

cf-DNA 检测过程中的测序设备昂贵且样本量通常较少, 为降低检测成本, 医院多委托专业的第三方平台进行集中检验。从医院收集样本到第三方检测平台进行样本处理和检验时间至少需要 2~3 天, 而普通的抗凝采血管收集的样本中 cf-DNA 含量在 1 天内即可发生降解, 使得该项检验无法正常开展[9] [10]。cf-DNA 对于采血管的要求非常高, 要具备保护 cf-DNA 不被降解, 起到稳定保存的功能[11] [12]。因此, 对于维持血液中 cf-DNA 含量长时间稳定保存的采血管需求日益增加。

目前市场上已出售多种含有 cf-DNA 稳定剂的采血管, 本文将本公司研发的采血管与市售两种品牌采血管进行对比, 验证驼人研发采血管与市售采血管对血液样本 cf-DNA 保存效果。

2. 实时荧光定量 PCR 分析

2.1. 材料及仪器

驼人自主研发采血管(10 mL), I 品牌采血管, II 品牌采血管, 台式高低速冷冻离心机, 实时荧光定量 PCR 仪(q-PCR), 24 Plus 真空泵, QIAamp DNA Kit(50)货号为 55128。

2.2. 标本来源和采集方法

征集志愿者, 志愿者为驼人集团 20~30 岁员工, 均知情并签署知情同意书。每位志愿者均采集驼人自主研发采血管, I 品牌采血管, II 品牌采血管 3 种 10 mL 采血管, 每种采血管采集 5 个时间点标本, 每管采集达到需要量之后血液会停止。采集完成后, 轻轻颠倒混匀 8~10 次, 让血液和稳定剂达到充分混合的状态。

2.3. cf-DNA 提取

每种品牌管保存时间点为 0~2 h、3 d、7 d、10 d、14 d, 保存至设定好的时间点, 将样本 4℃ 条件 3000 rpm 离心 10 min, 取 3 mL 上层血浆至 5 mL 离心管, 将 5 mL 离心管 4℃ 条件 10,000 rpm 离心 10 min 进行离心取 1.5 mL 上层血浆至新的 15 mL 离心管。按照 Qiagen 公司 QIAamp DNA Kit(50)货号为 55128)提取操作步骤进行 cf-DNA 提取。

2.4. q-PCR 检测 cfDNA 水平

本文采用人 h- β -actin 基因片段来研究不同保存时间血浆中 cfDNA 水平变化情况[13], 引物序列为: Forward 5'-AACTACCTTCAACTCCATCA-3', Reverse 5'-GAGCAATGATCTTGATCTTCA-3', 反应体系为 25 μ L, 上下游引物终浓度为 0.2 μ M, PCR 热循环条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s 共 40 个循环(结果见表 1、图 1)。

Table 1. Different brands of blood collection tubes save q-PCR quantitative ct values for cf-DNA

表 1. 不同品牌采血管对 cf-DNA 保存 q-PCR 定量 ct 值

	驼人采血管	I 品牌采血管	II 品牌采血管
0~2 h	28.93	29.40	29.56
3 d	29.27	29.33	28.83
7 d	29.67	29.25	29.66
10 d	29.17	29.39	28.72
14 d	29.37	29.38	29.08

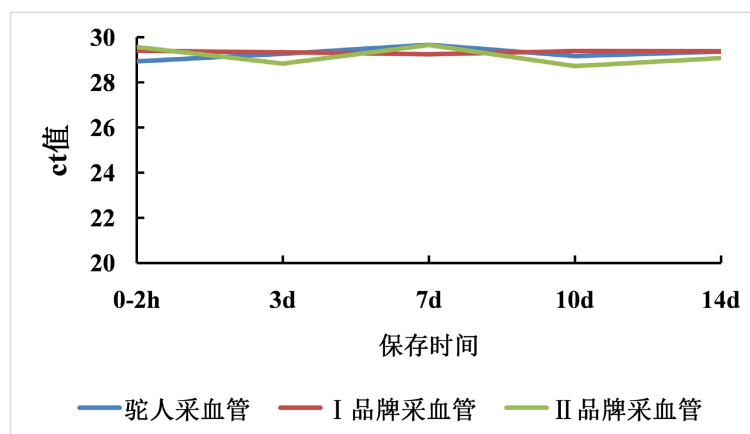


Figure 1. The change curve of qPCR quantitative ct value of different brands of blood collection tubes on cf-DNA storage

图 1. 不同品牌采血管对 cf-DNA 保存 q-PCR 定量 ct 值变化曲线

3. 临床应用验证

3.1. 样本来源及采集方法

选取已确诊肿瘤患者 5 名, 受试者 A、B、C、D、E 均使用驼人采血管(10 mL), I 管, II 管, II 管各 1 管血液, C、D、E 患者均使用第三方平台提供采血管多采集 1 管血液。采集完成后退出采血管, 轻轻颠倒混匀 8~10 次, 让血液和稳定剂达到充分混合的状态。

3.2. 样本处理

采集样本送至第三方检测平台待处理, 样本均 4 $^{\circ}$ C 保存, A 患者 4 种品牌采血管内样本及 B、C、D、E 第三方提供采血管样本送达检验机构立即进行样本的提取测序工作, B 患者 4 种品牌采血管内样本保存 3 d 进行样本提取测序, C 患者 4 种品牌采血管内样本保存 7d 进行样本提取测序, D 患者 4 种品牌采血管内样本保存 10 d 进行样本提取测序, E 患者 4 种品牌采血管内样本保存 14 d 进行样本提取测序, 根

据二代测序结果判断采血管对样本保存效果(结果见表 2)。

Table 2. Clinical application of mutation gene test results in cancer patients
表 2. 肿瘤患者临床应用变异基因检测结果

		驼人采血管	I 品牌采血管	II 品牌采血管	第三方采血管
A 患者	检出基因	未检出	未检出	未检出	/
	变异频率	/	/	/	/
B 患者	检出基因	KRAS	KRAS	KRAS	/
	变异频率	5%	4.59%	3.28%	/
C 患者	检出基因	NRAS	NRAS	NRAS	NRAS
	变异频率	2.2%	1.32%	4.8%	4%
D 患者	检出基因	未检出	未检出	未检出	未检出
	变异频率	/	/	/	/
	检出基因	TP53	TP53	TP53	TP53
	变异频率	48.88%	59.99%	61.72%	62.68%
E 患者	检出基因	PIK3CA (P.L540V)	PIK3CA (P.L540V)	PIK3CA (P.L540V)	PIK3CA (P.L540V)
	变异频率	40.4%	43.8%	45.16%	71.69%
	检出基因	PIK3CA (P.E545K)	PIK3CA (P.E545K)	PIK3CA (P.E545K)	PIK3CA (P.E545K)
	变异频率	40.11%	43.21%	44.48%	72.2%

4. 结果

4.1. q-PCR 定量结果(ct 值)

将志愿者血液采集到采血管后, 保存至设置时间点进行 cf-DNA 提取, 并进行 q-PCR 荧光定量检测采血管对 cf-DNA 保存效果, q-PCR 相对定量 ct 值曲线变化趋势呈水平线, 对保存 3 d、7 d、10 d、14 d 后提取 cf-DNA 进行定量 ct 值与保存 0~2 h 提取 cf-DNA 进行定量 ct 值差值均小于 1, 表明驼人自主研发采血管保存血浆 cf-DNA 效果与市售其他品牌采血管保存效果达到同一水平。

4.2. 二代测序结果

肿瘤患者血液样本在采血管中保存后, 采用二代测序技术检测变异基因, 五位患者检测结果一致, 经保存后的肿瘤患者 cf-DNA 未出现稳定剂导致基因突变及不可检测现象, 从而导致检测结果有误影响医生指导用药。且 C、D、E 患者样本保存时间分别在 7 d、10 d、14 d, 检测结果与保存在第三方采血管 3 天内完成 cf-DNA 提取检测结果保持一致。

结合 3.1 及 3.2 结果, 驼人采血管, I 采血管, II 采血管均可稳定保存 cf-DNA 长达 14 d。

5. 讨论

cf-DNA 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, 为保证样本在从医院收集到第三方检测平台进行处理和检验所需时间内样本内 cf-DNA 能够稳定保存, 即不降解, 不受细胞基因组 DNA 污染, 且添加稳定剂对其无致突变影响, 开发出的采血管需具备功能有: 保持血液细胞完整同时可抑制其生命代谢活动, 保证无基因组 DNA 释放到血浆中, 同时可使血浆中 cf-DNA 保持最初

水平无降解,且添加剂对 cf-DNA 无致突变作用[14][15][16]。

本文对比了驼人采血管, I 采血管, II 采血管对样本保存能力,将健康志愿者血液采集到采血管后,保存至设置时间点进行 cf-DNA 提取,并进行 q-PCR 荧光定量检测采血管对 cf-DNA 保存效果, q-PCR 相对定量 ct 值曲线变化趋势呈水平线。对保存 3 d、7 d、10 d、14 d 后提取 cf-DNA 进行定量 ct 值与保存 0~2 h 提取 cf-DNA 进行定量 ct 值差值均小于 1,说明三种采血管对样本保存,既保护血细胞完整抑制其代谢,又达到稳定血浆 cf-DNA 不降解功能,将肿瘤患者血液样本在采血管中保存后,采用二代测序技术检测变异基因,五位患者检测结果一致则说明采血管添加剂无致突变作用。

6. 结论

综上所述,经驼人自主研发游离 DNA 保存管具备稳定保存 cf-DNA 功能,保持血液细胞完整同时可抑制其生命代谢活动,保证无基因组 DNA 释放到血浆中,同时可使血浆中 cf-DNA 保持最初水平无降解,且添加剂对 cf-DNA 无致突变作用。

参考文献

- [1] Liu, J.-P., Zhang, S.-C. and Pan, S.-Y. (2020) Value of Dynamic Plasma Cell-Free DNA Monitoring in Septic Shock Syndrome: A Case Report. *World Journal of Clinical Cases*, **8**, 200-207. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v8.i1.200>
- [2] 王洋, 边振远, 尹纯, 等. 血液游离 DNA 检测肝癌的临床应用研究进展[J]. 中华肝胆外科杂志, 2018, 24(5): 348-351. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2018.05.017>
- [3] 陈祥, 蒋最明, 顾敏, 等. 循环游离 DNA 在生理和病理诊断中的研究进展[J]. 肿瘤药学, 2020, 10(4): 401-405, 422. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-1264.2020.04.04>
- [4] 张阿芳, 张泓, 罗庆礼, 等. 血浆 DNA 浓度对急诊重症监护室休克患者预后的预测价值[J]. 中国急救医学, 2015(7): 628-633. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-1949.2015.07.013>
- [5] Lin, Y., Liang, D., Hu, P., et al. (2021) Application of Fetal Cell-Free DNA Enrichment in Non-Invasive Prenatal Screening: Experience from a Single Center in Eastern China. *Chinese Medical Journal*, **134**, 104-106. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001112>
- [6] Bai, J. and Chen, L. (2021) Genome-Scale Profiling of Circulating Cell-Free DNA Signatures for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Patients. *Cell Research*, **31**, 589-592. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00457-7>
- [7] Thomas, K., Lara, W., Stephanie, K., Felix, K., et al. (2017) Correlation of Cell-Free DNA Plasma Concentration with Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Translational Medicine*, **15**, 106. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1208-6>
- [8] Sai, S., Ichikawa, D., Tomita, H., et al. (2015) Quantification of Plasma Cell-Free DNA in Patients with Gastric Cancer. *Anticancer Research*, **27**, 2747.
- [9] 尹相林, 展秀君, 沈萍, 王艳秋, 王缘, 李若男, 张淑红, 关宝生. 人外周血 DNA 提取方法比较[J]. 黑龙江医药科学, 2014, 37(6): 47-48.
- [10] 陈丹丹, 朱主娜, 杨玉荣. 全血标本采集和处理方法对后续试验的影响[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013, 16(6): 861-866.
- [11] 徐鹏, 段小瑜, 张海梅, 原昆鹏. 专用采血管对血浆中循环 cf-DNA 保存效果的影响[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(8): 1035-1037+1041.
- [12] 姚凤兰, 陈瑜, 汪德海, 冷婵, 查祎, 张莉, 王中梅, 杨海平, 郑静, 葛红卫. 标本保存温度、时间和不同采血管对核酸检测结果的影响[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(6): 530-533.
- [13] Kost, T.A., Nicholas, T. and Hughes, S.H. (1983) The Nucleotide Sequence of the Chick Cytoplasmic β -Actin Gene. *Nucleic Acids Research*, **11**, 8287. <https://doi.org/10.1093/nar/11.23.8287>
- [14] Chen, Y.-S., Wu, Y.-Q., Zhang, Y., et al. (2020) Clinical Performance of Cell-Free Fetal DNA Testing for Fetal Aneuploidies and Subchromosomal Deletions/Duplications in a Cohort of 19,531 Pregnancies. *Reproductive and Developmental Medicine*, **4**, 163-168.
- [15] Liao, Y., Tang, X., Ming, Z., et al. (2021) Short-DNA Specific Blocker PCR for Efficient and Simple Enrichment of Cell Free Fetal DNAs with Short Lengths. *Chinese Journal of Chemistry*, **39**, 2101-2106.

- <https://doi.org/10.1002/cjoc.202100187>
[16] Qin, Z., Aljubimov, V., Zhou, C., *et al.* (2016) Cell-Free Circulating Tumor DNA in Cancer. *Cancer*, **35**, 1-9.
<https://doi.org/10.1186/s40880-016-0092-4>