



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 38165—2019

---

## 人体外周血中循环游离 DNA 浓度检测 基于 Alu 序列实时荧光 PCR 法

Detection of circulating cell-free DNA concentration in human peripheral blood—  
Real-time PCR method based on Alu sequence

2019-10-18 发布

2019-10-18 实施

国家市场监督管理总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准起草单位:成都中医药大学、四川省肿瘤医院、上海市计量测试技术研究院。

本标准主要起草人:何洋、肖洪涛、宋瑱、李燕、闻艳丽、冷平、刘刚、李东梅。

# 人体外周血中循环游离 DNA 浓度检测

## 基于 Alu 序列实时荧光 PCR 法

### 1 范围

本标准规定了人体外周血中循环游离脱氧核糖核酸(DNA)基于 Alu 序列的实时荧光聚合酶链式反应(PCR)定量检测方法。

本标准适用于循环游离 DNA 样品中 Alu 序列的定量检测。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**循环游离 DNA circulating cell-free DNA; cfdNA**

血液中来源于细胞凋亡和坏死的细胞外游离状态的短片段 DNA。

#### 3.2

**实时荧光 PCR real-time PCR**

在 PCR 反应体系中加入荧光基团,通过荧光信号的积累实时监控整个 PCR 扩增过程,实现对起始模板的定量及定性分析。

#### 3.3

**Ct 值 cycle threshold**

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

#### 3.4

**Alu 序列 Alu sequence**

散在分布于灵长类动物基因组中的中度重复序列。

注: Alu 序列具有 70%~98% 同源性,占人类基因组序列的 5%~10%,每个元件长度约为 300 bp。

### 4 原理

以提取的外周血循环游离 DNA 作为检测目标样品,以符合要求的人基因组 DNA 定量标准物质为标准品,采用实时荧光 PCR 技术,设计特异性引物分别扩增 Alu 序列中长度为 115 bp 和 219 bp 的片段,以标准品起始模板 DNA 浓度的对数为横坐标,Ct 值为纵坐标,制作标准曲线。根据标准曲线方程计算样品中的 Alu 序列拷贝数,结果用 copies/ $\mu$ L 表示。

5 引物

扩增 Alu 序列引物序列参见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列 (5'-3')	碱基数	产物长度/bp
Alu115F	CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG	20	115
Alu115R	CCCGAGTAGCTGGGATTACA	20	
Alu219F	CACGCCTGTAATCCCAGCACTTT	23	219
Alu219R	ATCTCGGCTCACTGCAACCTCC	22	

6 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。试验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

6.1 循环游离 DNA 提取试剂盒

推荐使用基于磁珠法的循环游离 DNA 提取试剂盒。

6.2 实时荧光 PCR 反应混合液

20  $\mu\text{L}$  反应体系含 1 U~2 U 的 *Taq* DNA 聚合酶、1 $\times$ PCR 缓冲液、2.0 mmol/L 的  $\text{Mg}^{2+}$ 、0.2 U UNG 酶(尿嘧啶-*N*-糖基化酶)、0.2 mmol/L 的 d(A,C,G)TPs(dATP 为脱氧腺苷三磷酸,dCTP 为脱氧胞苷三磷酸,dGTP 为脱氧鸟苷三磷酸)、0.2 mmol/L dUTP(脱氧尿苷三磷酸)、SYBR Green I 荧光染料。或者仪器配套的等效 SYBR Green 法的实时荧光 PCR 反应混合液。

6.3 DNA 标准物质

可定量 Alu 序列拷贝数的 DNA 标准物质,用于建立样品定量检测所需的标准曲线。

6.4 参比染料(ROX)

根据具体仪器需求决定使用与否。

7 仪器设备

7.1 实时荧光 PCR 仪。

7.2 恒温金属浴。

7.3 高速离心机。

7.4 微量移液器:0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 。

8 检验步骤

8.1 循环游离 DNA 提取

循环游离 DNA 按下列步骤提取:

- a) 2 mL 人体外周血于 4 ℃以 1 600×g 离心 10 min,离心后将上清转移到 1.5 mL 的离心管中,避免吸到中间层的白细胞;
- b) 再次以 4 ℃ 16 000×g 离心 10 min 去除残余细胞,将上清转入新的离心管中,即得所需的血浆;
- c) 按照每 500 μL 的血浆中加入 1 mL 结合缓冲液(Binding buffer) 35 μL (20 μg/μL)蛋白酶 K 60 μL (1 μg/μL) carrier RNA 比例加入试剂,混匀后于室温放置 1 min~2 min;
- d) 将上述混合样品于 10 000×g,4 ℃离心 5 min,吸取上清到另一个新 1.5 mL 离心管中,然后加入 10 μL 微型磁珠,室温,混匀 15 min~20 min;
- e) 将上一步产物分装到 1.5 mL 离心管中,放于磁力架上,静置 1 min~2 min,吸去废液;
- f) 加入洗涤缓冲液 500 μL,混匀后放于磁力架上,静置 1 min~2 min,吸去废液;
- g) 加入 70%乙醇 500 μL,混匀后放于磁力架上,静置 1 min~2 min,吸去废液;
- h) 加入 40 μL TE 缓冲液,55 ℃金属浴 10 min (每 30 s 混匀一次);
- i) 放于磁力架上,静置 1 min~2 min,收集溶液至新的离心管中,即得到循环游离 DNA;
- j) 提取后的循环游离 DNA 样品应立即开展后续的实时荧光 PCR 扩增试验。

注:可使用磁珠法或其他等效方法提取循环游离 DNA。

8.2 DNA 标准品工作液的配制

取 DNA 标准物质制备标准品工作液。用非接触式超声波破碎仪将 DNA 标准物质按超声功率 280 W、超声时间 5 s、间隙时间 5 s、总工作时间 20 min 的程序片段化为 300 bp~500 bp 片段,用一级水按照表 2 方法进行梯度稀释。

注 1: DNA 标准物质片段化程序可根据实际使用的仪器进行调整。

注 2: 超声片段化后,可经过 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段化范围在 300 bp~500 bp。

表 2 DNA 标准品工作液配制方法

DNA 标准品工作浓度	配制方法
$X \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$	取 10 μL 标准物质母液至 90 μL 水中
$X \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$	取 10 μL $X \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 标准品工作液至 90 μL 水中
$X \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$	取 10 μL $X \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 标准品工作液至 90 μL 水中
$X \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$	取 10 μL $X \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 标准品工作液至 90 μL 水中
$X \times 10^{-1} \text{ copies}/\mu\text{L}$	取 10 μL $X \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 标准品工作液至 90 μL 水中
注: X 为实际应用的 DNA 标准物质的赋值,DNA 标准品浓度按此进行计算。	

8.3 实时荧光 PCR 扩增

8.3.1 实时荧光 PCR 反应体系

本方法采用 SYBR Green 法,按表 3 配制反应体系,各样品配制 3 个复孔,加样过程先将除 DNA 模板以外的各组分预混合,分装到荧光定量 PCR 反应孔中 19 μL/孔,最后加入标准品或待测样品 1 μL/孔,加好后盖紧盖子,短暂离心,立刻进行 PCR 扩增。



表 3 实时荧光 PCR 扩增体系(总体积 20  $\mu\text{L}$ )

体系组分	加样量/ $\mu\text{L}$
实时荧光 PCR 反应混合液( $2\times$ )	10
PCR 上游引物(10 mmol/L)	0.4
PCR 下游引物(10 mmol/L)	0.4
一级水	8.2
DNA 模板(标准品或待测样品)	1

## 8.3.2 实时荧光 PCR 反应程序

将配制好的 PCR 反应体系放入实时荧光 PCR 仪,按表 4 的反应程序扩增。

表 4 实时荧光 PCR 扩增反应程序

步骤 1(1 个循环)	步骤 2(1 个循环)	步骤 3(40 个循环)	
		变性环节	退火延伸环节(采集荧光)
50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s	60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s
注:可根据不同品牌预混液、仪器设备说明书要求对程序进行调整。			

## 9 质量控制

所有样品设 3 个重复,根据检测数值的取舍标准[如下 a)、b)]选择有效孔:

a) 标准曲线上各数据点复孔,可根据标准曲线线性关系的好坏来判断是否舍去,可舍去明显影响标准曲线相关性(使  $R^2 \geq 0.99$ )的复孔数据。整条曲线上舍去的复孔数不得超过 3 个。

b) 当待测样品各复孔间检测  $C_t$  值的标准差大于 0.5 时,该数据应重新检测。

扩增效率应在 70%~110%之间;

标准曲线的相关系数  $R^2 \geq 0.99$ ;

空白对照: $C_t$  值  $\geq 30.0$ ,若空白对照  $C_t$  值小于 30.0 可采用脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)处理实时荧光 PCR 反应混合液和试验用水,灭活 DNase I 后重新检测。

## 10 结果计算

采用标准曲线法,对结果进行定量分析,直接测得各稀释梯度标准物质的  $C_t$  值,以  $C_t$  值为纵坐标、各稀释梯度标准物质浓度的对数( $\lg X_0$ )为横坐标作图,得到标准曲线和线性回归方程,最后将待测样品的  $C_t$  值带入式(1)。计算出待测样品的 Alu 序列 115 bp 片段和 Alu 序列 219 bp 片段的拷贝数。

$$X_0 = M \times (1 + E)^{-C_t} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$X_0$ ——样品初始浓度,单位为拷贝数每微升(copies/ $\mu\text{L}$ );

$M$ ——荧光阈值,基线内 3 个~15 个循环荧光信号标准差的 10 倍;

$E$  ——扩增效率,计算方法为  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ , slope 为标准曲线斜率。

## 11 检测过程中生物安全措施

按照 GB/T 19489 的规定执行。

