

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.14.002

游离线粒体拷贝数检测方法建立及应用 *

王决恒 周宇荀 李 凯 肖君华[△]

(东华大学化学化工与生物工程学院 上海 201620)

摘要 目的:线粒体在生理和病理过程中都起着重要作用,线粒体破碎后形成的游离线粒体与一系列疾病密切相关。然而,人体内游离线粒体的含量较低很难被稳定抽提且易降解等因素导致游离线粒体拷贝数检测具有极大挑战。本研究拟建立一种快速、准确检测外周血游离线粒体拷贝数定量 PCR 技术。**方法:**通过多重荧光定量 PCR 技术在 SLAN[®]-96S 全自动医用 PCR 分析系统上检测人外周血游离线粒体拷贝数,构建新的游离线粒体检测方案。游离核基因在人体外周血中的稳定性远大于游离线粒体,因此使用多拷贝参考基因 YH-1(300 拷贝)检测游离核基因作为对照组。**结果:**成功建立了核基因标准曲线和线粒体标准曲线,并筛选游离线粒体拷贝数检测最佳引物扩增片段长度为 82bp、血清有效分离时间在 2h 内、血清最佳分离方案为 1600 r/min 离心 10 min 再 16000 r/min 离心 10 min、磁珠法游离核酸抽提试剂盒抽提游离核酸得率最高的新流程。利用新方案对 100 例不同年龄段的随机人群外周血抽提游离线粒体拷贝数进行检测,结果显示 30-79 岁游离线粒体拷贝数与年龄之间的相关性参数为 $|R| = 0.18$ 、 P value = 0.077,游离线粒体拷贝数与性别之间的相关性参数为 $|R| = 0.27$ 、 P value = 0.061 即游离线粒体拷贝数与年龄和性别均无显著相关性,研究结果与报道一致。**结论:**表明优化后的方案可稳定检测游离线粒体拷贝数,提供了一种快速、准确检测游离线粒体拷贝数的方法。

关键词:线粒体 DNA; 荧光定量 PCR; TaqMan 探针; 外周血游离 DNA

中图分类号:Q-31;R244;Q593 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)14-2607-09

Establishment and Application of Detection Method for Cell Free Mitochondrial Copy Number*

WANG Jue-heng, ZHOU Yu-xun, LI Kai, XIAO Jun-hua[△]

(School of Chemistry and Bioengineering, Donghua University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: Mitochondria play an important role in physiological and pathological processes. Free mitochondria formed after mitochondrial fragmentation are closely related to a series of diseases. However, the low content of free mitochondria in human body is difficult to be extracted stably and easy to degrade, which leads to great challenges in detecting the copy number of free mitochondria. This study is to establish a rapid and accurate quantitative PCR technique for detecting the copy number of free mitochondria in peripheral blood. **Methods:** The copy number of free mitochondria in human peripheral blood was detected by multiplex fluorescence quantitative PCR on SLAN[®]-96S automatic medical PCR analysis system, and a new detection scheme of free mitochondria was constructed. The stability of free nuclear genes in human peripheral blood is much greater than that of free mitochondria, so the free nuclear genes were detected by multi-copy reference gene YH-1 (300 copies) as control group. **Results:** Nuclear gene standard curve and mitochondrial standard curve were successfully established, and the best primer amplified fragment length for detecting free mitochondrial copy number was 82bp, the effective separation time of serum was within 2h, the best separation scheme of serum was centrifuged for 10 min at 1600 r/min and then centrifuged for 10 min at 16000 r/min, and the new process of extracting free nucleic acid with magnetic bead method was the highest. The copy number of free mitochondria extracted from peripheral blood of 100 random people of different ages was detected by the new scheme, The results showed that the correlation parameters between free mitochondria copy number and age were $R = 0.18$, P value = 0.077, and the correlation parameters between free mitochondria copy number and sex were $R = 0.27$, P value = 0.061, that is, there was no significant correlation between free mitochondria copy number and age and sex. The results were consistent with the reports. **Conclusion:** The optimized scheme can detect the copy number of free mitochondria stably, and provides a rapid and accurate method for detecting the copy number of free mitochondria.

Key words: Mitochondrial DNA; Real-time quantitative PCR; TaqMan Probe; Circulating cell free DNA

Classification(CLC): Q-31; R244; Q593 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2022)14-2607-09

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31772550);上海市科委基金资助项目(17140903102)

作者简介:王决恒(1993-),男,硕士研究生,主要研究方向:遗传学,E-mail: 17775206638@163.com

[△] 通讯作者:肖君华(1968-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:医学分子遗传学,E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn,电话:13052427742

(收稿日期:2022-01-21 接受日期:2022-02-17)

前言

线粒体是一种存在于大多数细胞中的由两层膜包被的细胞器,是细胞中制造能量的车间,被称为 "power house"^[1]。线粒体除了作为细胞内能量生成的关键细胞器,还参与细胞凋亡、自由基生产、脂质代谢等代谢过程^[2,3]。因此,线粒体作为游离线粒体(circulating cell free mitochondrial, ccfmtDNA)直接来源^[4,5],使得游离线粒体含量与相关疾病有着密切联系^[6,7]。近年来,游离线粒体拷贝数的检测逐渐被应用于临床疾病试监测、肿瘤诊断^[8]、衰老标志物等^[9]领域,受到越来越多的外界关注^[10,11]。

荧光定量 PCR 技术是目前使用较多的外周血游离线粒体拷贝数检测的重要方法^[12,13]。然而生物体内的游离线粒体含量非常少并且片段较小^[14]、半衰期短,使得游离线粒体的分离、抽提、保存都变得极为困难^[8,15,16]。尽管现在市场上已经出现一些特殊的抗吸附游离核酸保存管,能够在一定程度上缓解对游离线粒体拷贝数检测所面临的困难,但是其价格也极其昂贵很难实现大规模检测游离线粒体^[16]。此外,游离线粒体极易降解得特性,使得游离线粒体拷贝数的检测变得困难,并且缺少一个相对稳定的对照。

面临以上的挑战,本研究通过筛选游离线粒体拷贝数检测最佳引物扩增片段长度、添加 Carrier DNA 避免核酸被吸附的影响、控制血清有效分离时间、探索血清最佳分离方案、选用得率最高游离核酸抽提试剂盒,构建新的游离线粒体检测新流程。在外周血游离核酸(circulating cell free DNA, ccfDNA)中除了游离线粒体之外还存在大量的游离核基因(circulating cell free nuclear DNA, ccfnDNA),由于核小体的存在使游离核基因比游离线粒体更加稳定^[17]。因此,将游离核基因拷贝数设为游离线粒体拷贝数检测的对照组。

同时,为了减少孔间差对实验结果的影响,将游离核基因对应的 300 拷贝的参考基因(YH-1)^[18]与游离线粒体的参考基因设置在同一反应体系通过 TaqMan 探针发定量检测构成双色荧光定量 PCR 体系。采用 300 拷贝内参是为了使游离核基因 Ct 值与游离线粒体 Ct 同时处于有效 Ct 范围(18-25),提高拷贝数检测准确度。最终建立稳定的游离线粒体拷贝数检测方案,并应于 100 个不同年龄段的人外周血游离线粒体拷贝数检测。

1 材料与方法

1.1 材料

血清样本来自江苏省太湖干部疗养院志愿者,所有研究参与者均已知情;磁珠游离 DNA 抽提试剂盒购自上海生物生物科技有限公司;柱式游离 DNA 抽提试剂盒;柱式血样 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;NovoStart® Probe qPCR Super Mix 购自近岸蛋白科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物和探针设计 从数据下载人线粒体(NCBI, Sequence ID: NC_012920.1)及人基因组(UCSC, hg38)序列,利用 Primer3-py 和 Oligo 7.6 设计游离线粒体及游离核基因的特异性上、下游引物及 TaqMan 探针。引物、探针由生物生工有限公司合成。

1.2.2 样本获取及保存 将血清分离时间在 2 h、5 h、6 h、7 h、12 h、24 h 的六个时间节点分离血清并抽提游离核酸,比较 6 个时间节点的游离核酸的拷贝数变化。评估出血清分离有效时间范围。

本实验的后续实验中均通过将收集所有研究对象静脉外周血 3 mL,在 2 h 内分离血清。同时,血清分离条件也进一步优化,从四个分离方案(H1)经 1600 r/min 低速离心 10 min;(H2)先经 1600 r/min 低速离心 10 min,再通过 16000 r/min 高速低温离心 10 min;(H3)全血,不离心;(H4)经 1600 r/min 低速离心 10 min,后通过 0.22 μ m 滤膜过滤;筛选出最优血清分离条件。在最优血清分离条件下实验,若出现溶血血清样本直接舍弃,置于 -20℃ 储存。

1.2.3 Carrier DNA 合成 为了解决游离线粒体上样时移液枪枪头、反应管对游离核酸产生的材料吸附效应,需要使用 TE 缓冲液对 PUC57 质粒空载体干粉进行稀释,制备成 5 ng/ μ L 的质粒溶液作为 Carrier DNA 溶液。同时,经过 Blast 比对、定量验证证明 Carrier DNA 的加入均不会干扰对游离线粒体定量检测,仅起到抗材料的核酸吸附作用。

1.2.4 游离 DNA 提取方法 评估了磁珠游离 DNA 抽提试剂盒(Order NO. B518770)、Ezup 柱式游离 DNA 抽提试剂盒(Order NO. B518270)两种不同 ccfDNA 提取方法对游离核酸拷贝数检测的影响。

1.2.5 样本质控 将上述两种不同血清分离方式在磁珠法方案下抽提的 cfDNA 样品,使用 NanoDrop 微量分光光度计检测核酸,筛选浓度 10~50 ng/mL 血清、纯度 OD₂₆₀/OD₂₈₀ $\approx$ 1.8 为合格样本,取 2 μ L 作为模板,进行多重定量 PCR 反应。

同时,为了确认游离线粒体的富集长度范围,使用 0.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。由于游离核酸的含量比较少且浓度比较低,需要通过纯化步骤提高游离核酸浓度。纯化过程中为了避免磁珠对核酸片段的偏好性,实验采用生工的核酸纯化吸附柱套件(Order NO. B615005-0100)对 20 个 15 μ L 的样本混和后纯化,电泳。

然而琼脂糖凝胶电泳检测核酸片段长度的分辨率较低,并且无法准确确定片段含量。因此,根据电泳结果分别使用 6 对引物对应片段长度为 82bp、108bp、121bp、155bp、203bp、352bp 共用同一个 TaqMan 探针进行定量检测,并比较各组间的拷贝数分析出游离线粒体引物设计的最佳富集范围。并使用基因组参考基因的一组引物、探针(PCR 扩增长度为 131bp)定量相同样本得出的拷贝数作为对照组。

1.2.6 核基因、线粒体标准品的制备 核基因标准品使用 Dzip 基因组 DNA 抽提试剂(全血)抽提人基因组 DNA 为模板,使用 Carrier DNA 溶液做溶解液, TaqMan 探针法定量,拷贝数梯度稀释 2.51 $\times$ 10⁵ copies/ μ L、2.51 $\times$ 10⁴ copies/ μ L、2.51 $\times$ 10³ copies/ μ L、2.51 $\times$ 10² copies/ μ L 的 4 个标准品;合成包含游离线粒体内参基因的 PUC57 质粒载体构建线粒体标准品长度 2.7 kb,使用 Carrier DNA 溶液做溶解液, TaqMan 探针法定量,做拷贝数梯度稀释 6.13 $\times$ 10⁷ copies/ μ L、6.13 $\times$ 10⁶ copies/ μ L、6.13 $\times$ 10⁵ copies/ μ L、6.13 $\times$ 10⁴ copies/ μ L、6.13 $\times$ 10³ copies/ μ L 的 5 个标准品,其 DNA 的拷贝数计算方法是根据公式 DNA 拷贝数/ μ L = 核酸浓度(ng/ μ L) $\times$ 10⁹/(660 $\times$ 标准质粒碱基数) $\times$ 阿伏

伽德罗常数。

1.2.7 游离核酸拷贝数检测多重定量 PCR 反应 反应体系为 20 μL , 使用近岸蛋白定量试剂盒 2 $\times$ ProbeMix 10 μL , ROX dye II 0.4 μL , 两对引物浓度 1 $\mu\text{mol/L}$, 各上样 0.2 μL , 两个探针浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 各上样 0.02 μL ; 模板 2 μL , 加 RNase free water 至 20 μL 。使用 SLAN® -96S 全自动医用 PCR 分析系统定量检测, 三步法扩增反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 循环条件: 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 退火 58 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 进行 40 个循环。

1.3 实验数据分析

1.3.1 标准曲线的建立 利用 SLAN® -96S 全自动医用 PCR 分析系统标准曲线建立功能, 自动生成标准曲线。

1.3.2 统计学分析 外周血分离血清抽提的游离 DNA 为模板, 进行多重定量 PCR 反应, 每个样本做 3 重复; 为保证数据可靠性, 重复样本的 Ct 值差异限定在 0.5 之内, 重复样本之间 Ct 差值大于 0.5 数据舍弃。符合标准的数据使用 GraophPad Prism9.0、Excel、SLAN8.2.2 软件、R 语言进行数据统计与分析。

1.3.3 拷贝数计算 应用绝对定量法计算游离线粒体 DNA 的拷贝数, 如式(1)所示。

游离线粒体 DNA 拷贝数/ μL = $10^{[(\text{标准曲线截距} - \text{Ct}) / \text{标准曲线斜率}]}$ (1)

式中: $10^{\wedge}$ 表示 Log_{10} (游离线粒体拷贝数/ μL) 对数的指数形式; Ct 为实时荧光定量 PCR 过程中扩增产物的荧光信号达到设定阈值时所经过的扩增循环数。

应用绝对定量法计算游离核基因的拷贝数, 如式(2)所示。

YH 拷贝数/ μL = $[(10^{[(\text{标准曲线截距} - \text{Ct}) / \text{标准曲线斜率}]} / 300)]$ (2)

式中: $10^{\wedge}$ 表示 Log_{10} (游离线粒体拷贝数/ μL) 对数的指数形式; Ct 为实时荧光定量 PCR 过程中扩增产物的荧光信号达到设定阈值时所经过的扩增循环数; 300 为多拷贝内参基因 YH 拷贝数。

拷贝数单位转换如式(3)所示。

拷贝数/ mL = [(拷贝数/ μL) 15 μL] / 3 mL (3)

式中: 根据血清占全血 30-40%, 从 3 mL 全血分离出 1 mL 血清, 再抽出 15 μL 游离核酸 (Carrier DNA 溶液洗脱)。因此, 拷贝数/ mL 表示每毫升全血中拷贝数; 拷贝数/ μL 表示抽提出的 1 μL 游离核酸中的拷贝数; 15 μL 表示 3 mL 全血中抽提出游离核酸的总体积; 3 mL 表示是全血体积; 1 mL 表示分离出的血清体积。

1.4 应用

对 100 例随机人群外周血样本 (男性、女性各 50 例, 分为 5 个年龄组 31-40 岁、41-50 岁、51-60 岁、61-70 岁、70-80 岁每个年龄组男性、女性各 10 例) 磁珠法抽提血清中 cfDNA 检测 ccfmtDNA 及 ccfndDNA 拷贝数。

2 结果与分析

2.1 引物设计

使用 Oligo 7.6、Primer3-py 软件设计 6 对引物和 1 个探针, 序号 1 中的引物、探针是针对基因组上 300 拷贝的参考基因、序号 2 ~ 序号 7 是根据琼脂糖凝胶电泳结果划分 6 个不同长度的片段设计出 6 对引物和一个 TaqMan 探针。引物及探针如下表 1 所示。

表 1 定量特异性引物、TaqMan 探针设计
Table 1 Quantitatively specific primers, TaqMan probe design

Number	Name	Primer/Probe(5'-3')	Product Length
1	YH-1F	GAAAGTGAAGTAGCCGGGC	131 bp
	YH-1R	TATTAGAGATGGGGTTTCAC	
	YH-Probe	FAM-CACGCCTGTAATCCCAGC-BHQ1	
2	Mt-F	CATCACCAGTATTAGAGGCAC	82 bp
	Mt-R	TTATGCTACCTTTGCACGGTT	
	Mt-Probe	VIC-TGCCCAGTGACACATGTTT-BHQ1	
3	Mt1-F	ACCCCGCCTGTTACCAA	108 bp
	Mt1-R	ACCTTTGCACGGTTAGGGTA	
	Mt-Probe	VIC-TGCCCAGTGACACATGTTT-BHQ1	
4	Mt2-F	AAATCTTACCCGCCTGT	121 bp
	Mt2-R	TATGCTACCTTTGCACGGTT	
	Mt-Probe	VIC-TGCCCAGTGACACATGTTT-BHQ1	
5	Mt3-F	TTACCCCGCCTGTTACCAA	155 bp
	Mt3-R	GAGCCATTTCATACAGGTCCC	
	Mt-Probe	VIC-TGCCCAGTGACACATGTTT-BHQ1	
6	Mt4-F	TTACCCCGCCTGTTACCAA	203 bp
	Mt4-R	GCAGGTCAATTTCACTGGTT	

续表 1 定量特异性引物、TaqMan 探针设计

Table 1 Quantitatively specific primers, TaqMan probe design

Number	Name	Primer/Probe(5'-3')	Product Length
7	Mt-Probe	VIC-TGCCCAGTGACACATGTTT-BHQ1	\
	Mt5-F	TTACCTCACTGTCAACC	352 bp
	Mt5-R	GTACTGTTTGCATTAATAAATT	
	Mt-Probe	VIC-TGCCCAGTGACACATGTTT-BHQ1	\

Note: The 6 pairs of primers numbered 2-7 share a set of quantitative TaqMan probes to detect cfmtDNA copy numbers; serial number 1 corresponds to 1 pair of primers and a probe to detect cell free nuclear gene copy numbers.

由表 1 可知,检测游离核基因拷贝数的探针引物为序号 1。检测游离线粒体拷贝数的引物探针为序号 2-7。为了满足双色荧光定量的标准,对序号 1 和 2、序号 1 和 3、序号 1 和 4、序号 1 和 5、序号 1 和 6、序号 1 和 7 共 6 对体系中的引物探针,使用 Oligo 7.6、Primer 3-py 进行引物互作分析,结果显示均符合引物互作标准,表示能够在同一体系下反应。

2.2 血清分离的有效时间

人外周血中的游离核酸的只有几个小时半衰期,为确定外周血被抽离致体外之后存放有效时间范围。通过对全血分离血清时间段设置为 2 h、5 h、6 h、7 h、12 h、24 h,使用序号 1、序号 2 对应引物、探针检测同一个样本的 6 个时间节点游离核酸拷贝数变化,如下图 1、图 2 所示。

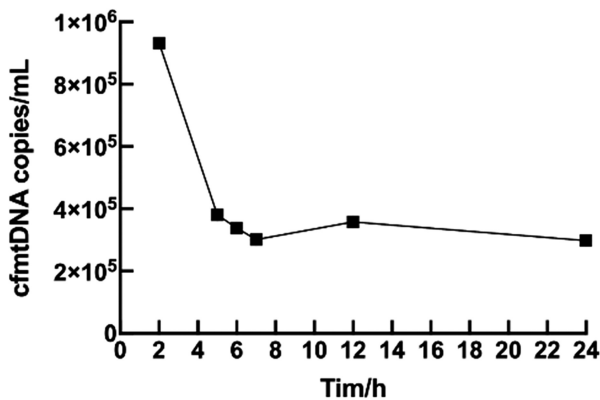


图 1 血清存放不同时间抽提游离线粒体 DNA 拷贝数

Fig. 1 Extracting cfmtDNA copies at different times of serum storage

Note: The abscissa coordinate indicates the time of whole blood storage (unit: h), and the vertical coordinate indicates the copies number of cfmtDNA detected at the corresponding time node

由图 1、图 2 可知,2 h 内分离的血清抽提游离核酸含量最高;全血存放 2-6 h 分离血清期间游离核酸降解最快;全血存放 6-24 h 期间游离核酸几乎不降解。图 1、图 2 中 12 h 时候游离线粒体拷贝数、游离核基因拷贝数会略有增加,猜测可能是细胞破碎产生更多的游离核酸。

2.3 样本长度检测

取纯化后的游离核酸 8 μ L 与 4 μ L Buffer 混合后取 10 μ L 溶液加入 0.5%的琼脂糖凝胶孔进行电泳检测游离核酸的长度,电泳条件为 120 V 恒压、35 min。电泳结果如图 3 所示。

由图 3 可知,游离核酸片段长度富集范围为 80-200bp、350bp,通过使用表 1 中序号 2-7 的 6 对引物对应片段长度为 A:82bp、B:108bp、C:121bp、D:155bp、E:203bp、F:352bp 共用同一个 TaqMan 探针对 6 组样本(每组 4 个样本,且样本相同)进行定量检测游离线粒体拷贝数,定量结果如图 4 所示。

由图 4 可知,游离线粒体定量引物扩增长度设置越短检测出的拷贝数较高;针对图 4 中游离线粒体拷贝数变化趋势,表

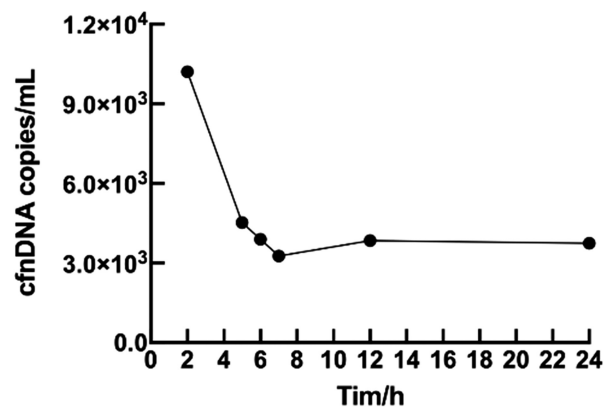


图 2 血清存放不同时间抽提游离核基因 DNA 拷贝数

Fig. 2 Extraction copies of cfnDNA at different times of serum storage

Note: The abscissa coordinate indicates the time of whole blood storage (unit: h), and the vertical coordinate indicates the copies number of cfnDNA detected at the corresponding time node

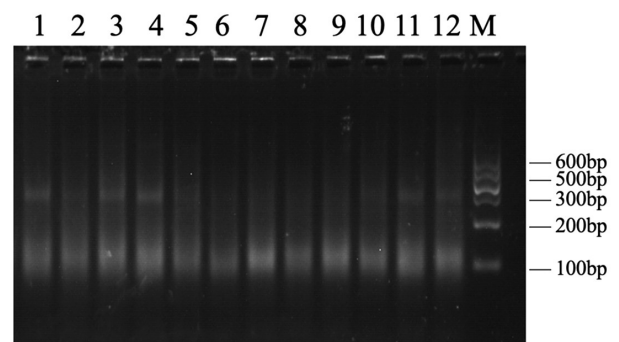


图 3 游离核酸电泳

Fig. 3 cfDNA electrophoresis

Lanes 1-12 represent cfDNA and lane M represents a DNA marker of 100-600 bp

明定量扩增较短片段对应的引物可以检测到更多的游离线粒体拷贝数。因此,本实验采用 82bp 长度片段对应的引物(即表 1 中的序号 2 对应一套引物及探针)作为检测游离线粒体拷贝数特异性定量引物。

2.4 多重定量 PCR 检测 ccfndNA 的标准曲线建立

使用 10 倍梯度系列稀释的高纯度核基因标准品 (2.51×10^5 copies/ μL ~ 2.51×10^2 copies/ μL) 4 个数量级拷贝数梯度对应线粒体样品 C_t 值构建的标准曲线如图 5 所示。

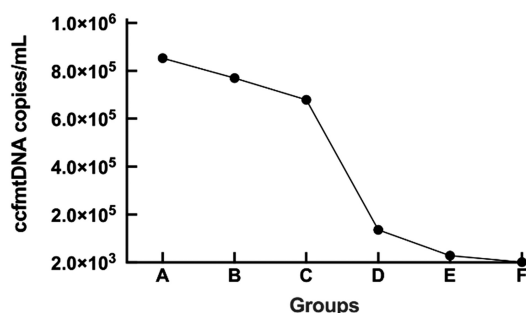


图 4 设计 6 个不同长度引物扩增片段定量拷贝数

Fig. 4 Design a quantitative copy number of amplified fragments of six primers of different lengths

Note: The ordinate coordinate represents the copies number of cfmtdNA, the abscissa coordinate represents the length of the primer corresponding to the 6 groups of samples as A: 82bp, B: 108bp, C: 121bp, D: 155bp, E: 203bp, F: 352bp.

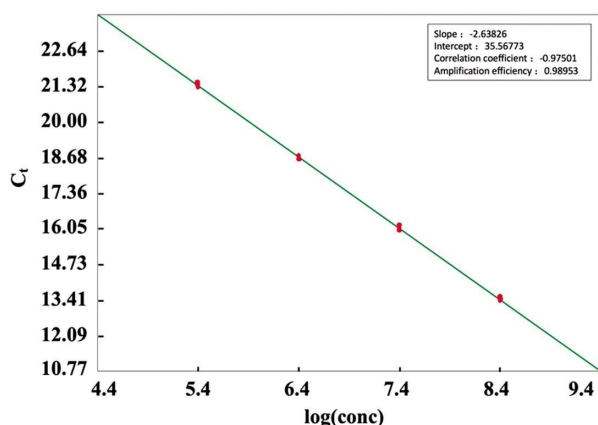


图 5 多重定量 PCR 检测 cfnDNA 拷贝数的标准曲线

Fig. 5 Standard curve of multiplex qPCR assay for the detection of ccfndNA

Note: The ordinate coordinate represents the C_t value; the abscissa coordinate represents $\log_{10}$ (ccfnDNA copies/ μL).

由图 5 可知, 参考基因与 C_t 值之间存在较好的线性关系 ($r^2 = 0.975$), 扩增效率为 98.953%。标准曲线的线性回归方程: $Y = -2.63826 \times \log_{10}(\text{conc}) + 35.56773$, 其中 Y 为 C_t 值, conc 为参考基因的拷贝数/ μL 。

2.5 多重定量 PCR 检测 ccfmtDNA 的标准曲线建立

使用 10 倍梯度系列稀释的 PUC57 质粒标准品 (6.13×10^7 copies/ μL ~ 6.13×10^3 copies/ μL) 5 个数量级拷贝数梯度对应线粒体样品 C_t 值构建的标准曲线如图 6 所示。

由图 6 可知, 结果表明, 参考基因与 C_t 值之间存在较好的线性关系 ($r^2 = 0.988$), 扩增效率为 99.114%。标准曲线的线性回归方程: $Y = -2.5264 \times \log_{10}(\text{conc}) + 34.7802$, 其中 Y 为 C_t 值, conc 为线粒体样品的拷贝数/ μL 。

2.6 血清样本分离方法比较

通过 4 种不同方式分离血清, 再使用磁珠法游离核酸抽提试剂盒抽出游离核酸, 并检测游离线粒体拷贝数, 结果如图 7 所示。

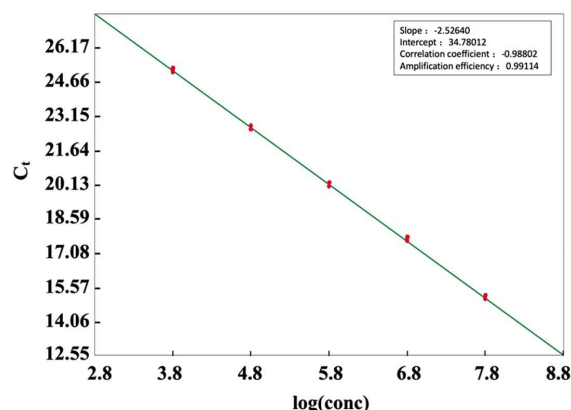


图 6 多重定量 PCR 检测游离线粒体拷贝数的标准曲线

Fig. 6 Standard curve of multiplex qPCR assay for the detection of ccfmtDNA

Note: The ordinate coordinate represents the C_t value; the abscissa coordinate represents $\log_{10}$ (ccfmtdNA copies/ μL).

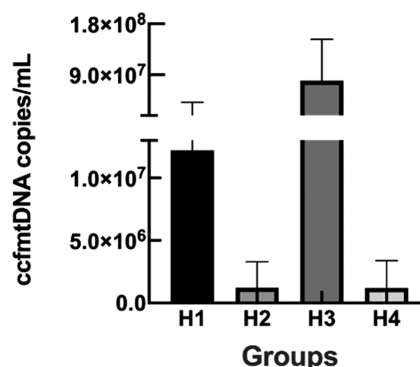


图 7 检测 4 种血清分离方案对应的游离线粒体拷贝数

Fig. 7 Detect the copies number of ccfmtDNA corresponding to four serum isolation protocols

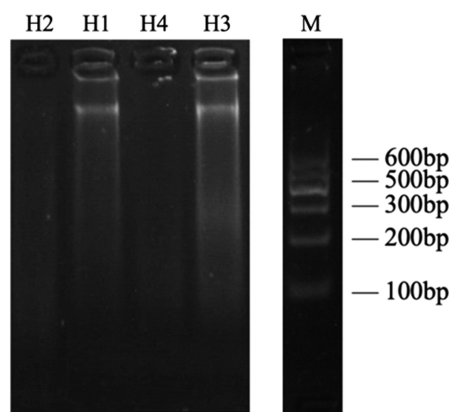


图 8 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 8 Agarose gel electrophoresis diagram

Note: Lanes H1, H2, H3, H4 represent free nucleic acids; lane M represents 600 bp Marker.

由图 7 可知, 方案 H1、H3 的游离线粒体拷贝数远远大于方案 H2、H4; 方案 H2、H4 拷贝数相当; 根据图中 4 个方案的

bar 比较,显示 bar 大小 $H1 > H3 > H2 = H4$,结果表明 H2、H4 方案获得游离线粒体更加稳定。考虑到 H1、H3 拷贝数远大于正常人体内游离线粒体拷贝数,猜测他们均受到基因组、细胞

碎片携带核酸的影响。因此,采用 0.5%琼脂糖凝胶电泳、核酸浓度测试仪器检测 4 组方案抽提的游离核酸,结果如图 8、表 2 所示。

表 2 不同血清抽提方案检测游离 DNA 的 OD260/OD280
Table 2 Different serum extraction schemes to detect OD260/OD280 of cell free DNA

OD260/OD280	H2	H1	H4	H3
Sample 1	1.753	1.243	1.733	0.813
Sample 2	1.720	1.160	1.670	0.720
Sample 3	1.591	1.171	1.651	0.771
Sample 4	1.712	1.152	1.702	0.722
Sample 5	1.763	1.243	1.773	0.843
Sample 6	1.747	1.207	1.737	0.767
Sample 7	1.712	1.162	1.712	0.742
Sample 8	1.697	1.127	1.577	0.737
Sample 9	1.783	1.243	1.813	0.723
Sample 10	1.792	1.662	1.832	0.752

Note: OD260/OD280 $\approx$ 1.8 Indicates that the sample is of satisfactory purity (>1.9 Indicates RNA contamination; <1.6 Indicates that there is contamination of proteins, phenols, etc

由图 8、表 1 可知,H1、H3 方案分离血清中含有大量的基因组 DNA, 并且 H1、H3 方案对应的游离核酸样本的 OD260/OD280 均小于 1.6, 表明 H1、H3 方案分离血清用于抽提游离核酸会受到细胞碎片及基因组的影响。因此,排除方案 H1、H3。方案 H2、H4 分离血清对应的游离核酸经检测均不含细胞碎片与基因组,综合成本及实验易操作性,最终选择方案 H1 作为本实验分离血清手段。

为进一步验证通过 4 种不同方式分离血清,检测游离线粒体拷贝数结果的准确性。检测对应的游离核基因组拷贝数检测作为对照组,结果如图 9 所示。

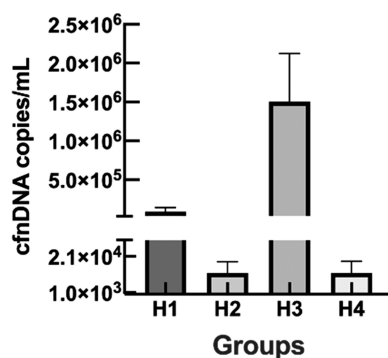


图 9 检测 4 种血清分离方案对应游离核基因的对照组拷贝数
Fig. 9 The copies number of cfntDNA to the four serum separation as control

Note: The ordinate coordinate indicates the copies number of cfntDNA (copies/mL); the abscissa coordinate indicates the 4 serum isolation protocols

由图 9 可知,从图上半部分中对应方案 H1 与 H3 的拷贝数较多,图下半部分中的方案 H2 与 H4 的游离线粒体拷贝数

相当并处于正常范畴之内。四种血清分离方式对应的游离核基因拷贝数比较出 H2 为最佳分离方案与图 7 的结果一致。表明上述游离线粒体检测选用 H2 方案作为血清分离最佳方案较为可靠。

2.7 ccfdDNA 抽提方案比较

目前,商业化游离核酸抽提试剂盒已经比较成熟,因此通过比较不同试剂盒抽提方法,筛选出游离核酸得率最高的试剂盒作为最优抽提方案。比较结果如图 10、图 11 所示。

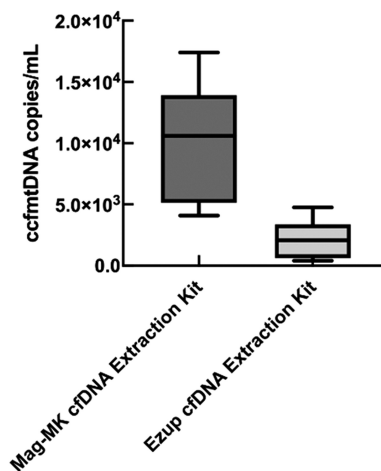


图 10 两种游离 DNA 抽提试剂盒对应游离线粒体的拷贝数
Fig. 10 The copies number of ccfdmtDNA detected by different cfDNA extraction Kit

由图 11、图 12 可知,磁珠法试剂盒抽提的游离核酸检测出的游离线粒体拷贝数、游离核基因拷贝数均优于吸附柱法抽提试剂盒,因此采用磁珠法试剂盒抽提游离核酸。

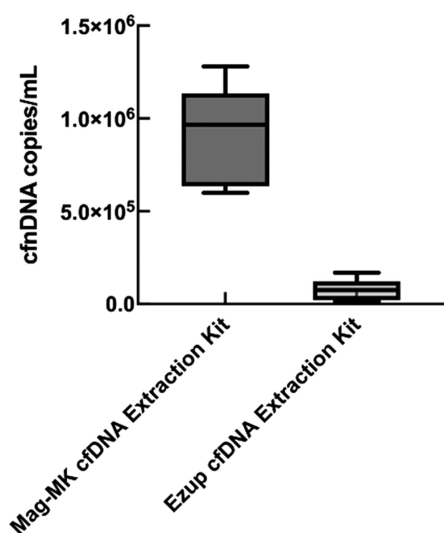


图 11 两种游离 DNA 抽提试剂盒对应游离核基因的拷贝数

Fig. 11 The copies number of cfDNA detected by different DNA extraction Kit

2.8 添加 Carrier DNA 溶液抗吸附验证

将本研究一组方案(使用不含 Carrier DNA 的缓冲液)定量检测 6 个相同样本的游离线粒体,定量结果如图 12 所示;另一组方案(使用 Carrier DNA 缓冲液)定量检测对应相同的 6 个样本的游离线粒体,定量结果如图 13 所示。

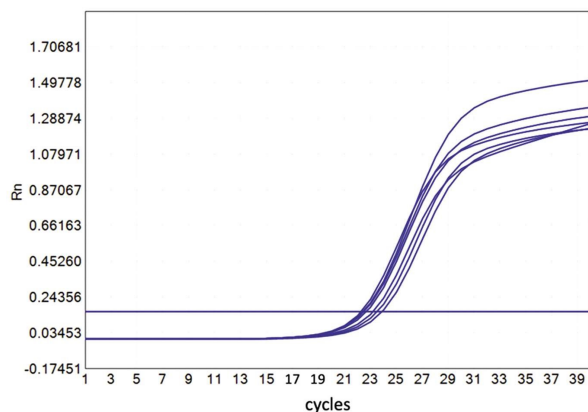


图 12 未添加 Carrier DNA 溶液定量检测 6 个相同样本游离线粒体的 Ct 值

Fig. 12 The Ct value of 10 cfmtDNA of 6 identical samples was not quantified with Carrier DNA solution was added

由图 12 可知,不采用 Carrier DNA 抗吸附时,在检测 6 例相同样本的游离线粒体 Ct 值,结果显示 6 个相同样本的 Ct 值的离散程度较大。图 13 可知,采用 Carrier DNA 抗吸附时,在检测 6 例同样样本的游离线粒体 Ct 值,结果显示 6 个样本的 Ct 值的离散程度进一步缩小。说明通过添加 Carrier DNA 的办法能够解决材料对核酸吸附问题。

2.9 应用

利用建立的方案抽提 100 名 30~80 岁受试者的外周血游离核酸(Carrier DNA 溶液作为洗脱液),并测定游离线粒体拷贝数在不同年龄段及性别中的变化情况,结果如图 14、图 15 所示。

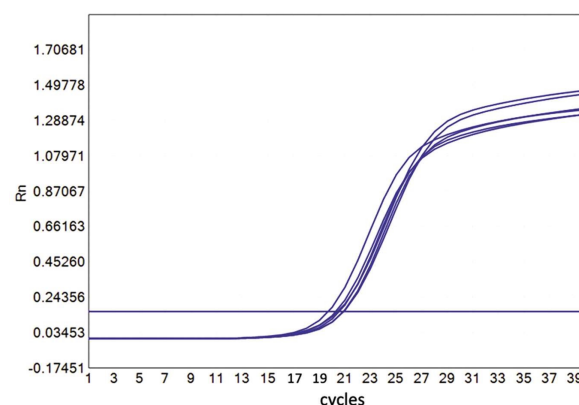


图 13 使用 Carrier DNA 溶液后定量检测同样 6 个样本游离线粒体基因 Ct 值

Fig. 13 The Ct value of cfmtDNA were quantitatively tested using Carrier DNA solution

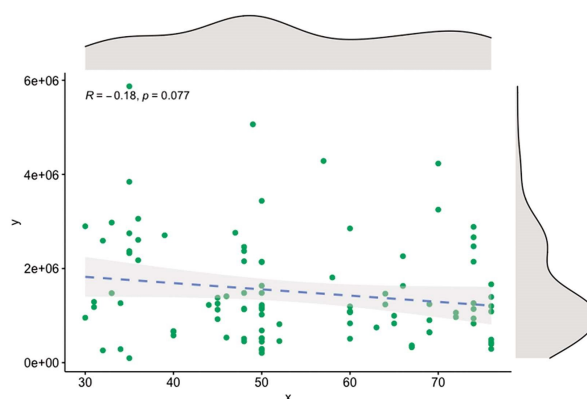


图 14 游离线粒体拷贝数与年龄的关系

Fig.14 Relationship between free mitochondrial copy number and ages

Note: The vertical coordinate y represents the cfmtDNA copy number (copies/mL) in the middle reaches of serum; the abscissa x indicates age/year.

由图 14 可知,通过 spearman 相关系数分析游离线粒体与年龄之间关系,结果显示 $|R| = 0.18 < 0.19$, $R^2 = R \text{ squared} = 0.0324 < 0.1$, $P \text{ value} = 0.077 > 0.05$,表示在不区分性别的前提下 30-80 岁与游离线粒体的相关性程度极低,游离线粒体拷贝数随年龄增长存在不显著下降趋势。

为了进一步分析性别之间的游离线粒体拷贝数相关性,利用建立的方案抽提 100 名 30~80 岁受试者的外周血游离核酸(Carrier DNA 溶液作为洗脱液),并测定游离线粒体拷贝数在不同性别的相关性,结果如图 15 所示。

由图 15 可知,分析游离线粒体与年龄之间关系中 $0.2 < |R| = 0.27 < 0.39$, $R^2 = R \text{ squared} = 0.00729 < 0.1$, $P \text{ value} = 0.061 > 0.05$,表示在 30-80 岁年龄段内性别的游离线粒体的相关性程度低,性别之间的相关性不显著。

3 讨论

线粒体 DNA 拷贝数与人类的许多遗传疾病及癌症的发生发展^[19,20]、个体发育衰老过程及环境暴露影响等多方面密切相关^[21],常常被用作线粒体功能障碍和细胞衰老的生物标志物^[22]。而游离线粒体作为线粒体的直接产物是否也可以作为衰老和

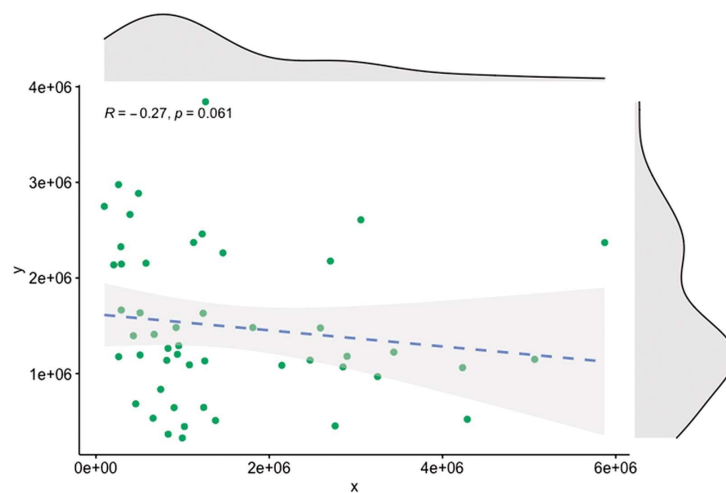


图 15 游离线粒体拷贝数不同性别中的相关性

Fig.15 Correlations between the different genders of free mitochondrial copies

Note: The y-axis vertical coordinate represents the copies number of male cfmtDNA between 30-69 age in 1 mL serum; the x-axis abscissa coordinate indicates the copies number of female cfmtDNA between 30-69 age in 1 mL serum.

肿瘤预测的标志物有待进一步研究。游离线粒体拷贝数检测方法有多种。例如,高通量全基因组测序^[23,24]、微滴式数字 PCR 技术,这些技术存在成本高、对样本需求量大等缺点^[11]。定量 PCR 检测游离线粒体拷贝数仍是目前应用范围最广的检测手段。

在这里,本研究为了能够通过定量 PCR 技术达到准确检测游离线粒体拷贝数的目的,经过获取稳定的血清、抽提稳定游离核酸、避免材料吸附核酸等优化步骤,利用 300 拷贝的游离核基因参考基因作为对照组^[18],发现血清有效分离时间需在 2 h 内、结合经济和操作因素血清最佳分离方案为 1600 r/min 离心 10 min 再 16000 r/min 离心 10 min、通过双色荧光定量 PCR 技术筛选出游离线粒体定量的引物扩增最佳长度为 82bp 即在片段允许范围内的最短片段、使用添加 Carrier DNA 办法解决材料抗吸附问题、比对出磁珠法游离核酸抽提试剂盒比吸附住法抽提游离核酸得率更高且用时更短。由于核小体的存在使得游离核基因相较于游离线粒体要更加稳定,因此该方案中各个环节的优化采用检测游离线粒体拷贝数为判定标准,并使用游离核基因拷贝数为对照组做进一步验证,最终实验结果表明二者结论一致。

成功构建具备经济、快速准确、易操作、适用于大样本检测的特性方案,适用于在大样本、大范围人群中游离线粒体拷贝数检测。并应用于不同年龄段随机人群的游离线粒体拷贝数检测。分析 30-79 岁年龄段的 100 名随机人群外周血游离线粒体拷贝数,评估游离线粒体拷贝数与年龄、性别之间的相关性程度,结果显示游离线粒体拷贝数与年龄之间的相关性参数为 $0 < |R| = 0.18 < 0.19$, $P \text{ value} = 0.077 > 0.05$ 以及游离线粒体拷贝数与性别之间的相关性参数为 $0.2 < |R| = 0.27 < 0.39$, $P \text{ value} = 0.061 > 0.05$,表明 30-80 岁年龄段游离线粒体与年龄和性别的相关性程度极低与 Santiago D^[7,25]等人报道一致。根据 Ellinger J^[26]等人研究中游离线粒体拷贝数与性别及年龄之间相关性的参数为 All $P \text{ value} > 0.25 > 0.05$, 79 bp 片段对应定量引物检测游离线粒体拷贝数均高于 230 bp 片段对应定量引物检测游离线粒体拷贝数,其结果表明游离线粒体拷贝数与年

龄与性别无显著相关性,越短的片段对应的定量引物检测游离线粒体拷贝数更高。经过比较发现,本研究在不使用特殊血液保存管及游离核酸储存管等价格较高的耗材的情况下,实验同样能够稳定、快速检测游离线粒体拷贝数,得到的结论与 Santiago D^[7,25]、Ellinger J^[26]等人研究结论一致。本文为定量 PCR 能稳定检测出外周血游离线粒体拷贝数在临床检测领域做了重要补充。

参考文献 (References)

- [1] Vo T D, Palsson B O. Building the power house: recent advances in mitochondrial studies through proteomics and systems biology [J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2007, 292 (1): C164-C177
- [2] Fielden L F, Kang Y, Newton H J, et al. Targeting mitochondria: how intravacuolar bacterial pathogens manipulate mitochondria [J]. Cell Tissue Res, 2017, 367(1): 141-154
- [3] Singh S, Singh T G, Rehni A K, et al. Reviving mitochondrial bioenergetics: A relevant approach in epilepsy [J]. Mitochondrion, 2021, 58: 213-226
- [4] Kramer P, Bressan P. Mitochondria Inspire a Lifestyle [J]. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2019, 231: 105-126
- [5] Angelova P R, Dinkova-Kostova A T, Abramov A Y. Assessment of ROS Production in the Mitochondria of Live Cells [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2202: 33-42
- [6] Yang G T, Tang M X, Zhang H Q, et al. Altered Circulating Cell-free Mitochondrial DNA of Patients with Congenital Scoliosis [J]. Spine, 2021, 46(8): 499-506
- [7] Ullah H, Arbab S, Khan M I U, et al. Circulating cell-free mitochondrial DNA fragment: A possible marker for early detection of Schistosoma japonicum [J]. Infection Genetics and Evolution, 2021, 88: 104683
- [8] Palande V, Raviv Shay D, Frenkel-Morgenstern M. Detection of Cell-Free DNA in Blood Plasma Samples of Cancer Patients [J]. J Vis Exp, 2020(163): e61449
- [9] Trifunov S, Paredes-Fuentes A J, Badosa C, et al. Circulating Cell-Free

- Mitochondrial DNA in Cerebrospinal Fluid as a Biomarker for Mitochondrial Diseases[J]. *Clinical Chemistry*, 2021, 67(8): 1113-1121
- [10] Shandilya R, Kumari R, Bunkar N, et al. A photonic dual nano-hybrid assay for detection of cell-free circulating mitochondrial DNA [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 208: 114441
- [11] Trumpff C, Michelson J, Lagranha C J, et al. Stress and circulating cell-free mitochondrial DNA: A systematic review of human studies, physiological considerations, and technical recommendations [J]. *Mitochondrion*, 2021, 59: 225-245
- [12] Tang Y M, Zou B J, Wang R Y, et al. Multiplex-invasive reaction-assisted qPCR for quantitatively detecting the abundance of EGFR exon 19 deletions in cfDNA [J]. *Analytical Methods*, 2020, 12 (26): 3344-3350
- [13] Sinha S K, Brown H, Loftus A, et al. Development of a qPCR cfDNA analysis method for the assessment of tumor burden and metastatic status in live PDX mice[J]. *Cancer Research*, 2019, 79(13): 1077-1077
- [14] Kobayashi M, Ito J, Shirasuna K, et al. Comparative analysis of cell-free DNA content in culture medium and mitochondrial DNA copy number in porcine parthenogenetically activated embryos [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2020, 66(6): 539-546
- [15] Lee H, Na W, Park C, et al. Centrifugation-free extraction of circulating nucleic acids using immiscible liquid under vacuum pressure[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5467
- [16] Sato A, Nakashima C, Abe T, et al. Investigation of appropriate pre-analytical procedure for circulating free DNA from liquid biopsy [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(61): 31904-31914
- [17] Rao S, Han A, Zukowski A, et al. Transcription factor-nucleosome dynamics inferred from plasma cfDNA delineates tumor and tumor-microenvironment phenotype [J]. *Cancer Research*, 2021, 81 (13): 2611-2611
- [18] Sun G Z, Cao H, Bai Y, et al. A novel multiplex qPCR method for assessing the comparative lengths of telomeres[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2021, 35(9): e23929
- [19] Errichiello E, Venesio T. Mitochondrial DNA variants in colorectal carcinogenesis: Drivers or passengers?[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(10): 1905-1914
- [20] Sercel A J, Patananan A N, Man T, et al. Stable transplantation of human mitochondrial DNA by high-throughput, pressurized isolated mitochondrial delivery[J]. *Elife*, 2021, 10: e63102
- [21] Dolcini J, Wu H T, Nwanaji-Enwerem J C, et al. Mitochondria and aging in older individuals: an analysis of DNA methylation age metrics, leukocyte telomere length, and mitochondrial DNA copy number in the VA normative aging study [J]. *Aging-U.S.*, 2020, 12(3): 2070-2083
- [22] Franke K, Bublak P, Hoyer D, et al. In vivo biomarkers of structural and functional brain development and aging in humans [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2020, 117: 142-164
- [23] Falk A, Long E, Hofman V, et al. NGS analysis on tumour and cfDNA for personalized genotype-directed therapy in NSCLC patients: Are the clinical benefits always there?[J]. *Virchows Archiv*, 2016, 469: S308-S309
- [24] Mileyko V, Moiseenko D, Grinchenko A, et al. NGS cfDNA data as a basis for the development of qPCR diagnostic systems [J]. *Annals of Oncology*, 2018, 29: 2-2
- [25] Padilla-Sanchez S D, Navarrete D, Caicedo A, et al. Circulating cell-free mitochondrial DNA levels correlate with body mass index and age [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2020, 1866(12): 165963
- [26] Ellinger J, Müller D C, Müller S C, et al. Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies[J]. *Urol Oncol*, 2012, 30(4): 509-515