

## 游离DNA保存管中咪唑烷基脲的定量检测方法

魏慧慧<sup>1#</sup>, 刘艳<sup>1#</sup>, 殷剑峰<sup>2</sup>, 苏丽红<sup>1</sup>, 王玉梅<sup>1\*</sup> (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 江苏康为世纪生物科技股份有限公司, 泰州 225300)

**摘要** 目的: 建立游离DNA保存管中咪唑烷基脲的定量检测方法。方法: 利用咪唑烷基脲水溶液中含有的尿囊素和甲醛的缩合片段, 可以与Nash's试剂反应生成黄色的产物[3,5-二乙酰基-1,4-二氢二甲吡啶(DDL)], 以其吸光度与咪唑烷基脲浓度成正相关的特性来测定咪唑烷基脲的含量。优化使用本方法检测该类产品的线性范围, 考察其定量限、精密度及准确度、特异性指标, 并以所建立的方法初步用于游离DNA保存管检测。结果: 本方法检测的线性范围确定为 $0.025 \sim 1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 定量限为 $0.057 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 以高、中、低浓度样品评估方法精密度, 其标准偏差均不大于10%。检测咪唑烷基脲国际标准品配制的模拟样品, 其回收率在85%~115%范围内, 且其结果不受常见添加剂的干扰; 用所建立的方法检测了两批两种规格的细胞游离DNA保存管, 结果均符合产品的技术要求。结论: 所建立的方法可以用于游离DNA保存管中咪唑烷基脲的定量检测。

**关键词:** 游离DNA保存管; 咪唑烷基脲; 线性; 定量限; 精密度; 准确度; 特异性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)09-1034-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.09.009

### Quantitative Detection Method of Imidazolidinyl Urea in Cell-free DNA Collection Tubes

Wei Huihui<sup>1#</sup>, Liu Yan<sup>1#</sup>, Yin Jianfeng<sup>2</sup>, Su Lihong<sup>1</sup>, Wang Yumei<sup>1\*</sup> (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Jiangsu Cowin Biotech Co., Ltd., Taizhou 225300, China)

**Abstract Objective:** To develop a quantitative detection method of imidazolidinyl urea in cell-free DNA collection tubes. **Methods:** The condensation fragment of allantoin and formaldehyde contained in imidazolidinyl urea aqueous solution could react with Nash's reagent to produce yellow products [3,5-diacetyl-1,4-dihydrodimethylpyridine (DDL)]. The absorbance was directly correlated with the concentration of imidazolidinyl urea, which could be adopted for assay of imidazolidinyl urea. The linear range of the method was optimized in this type of products, and its limit of quantitation, precision, accuracy and specificity performance were studied. The developed method was preliminarily applied to the detection of cell-free DNA collection tubes. **Results:** The linear range of this method was determined to be  $0.025 \sim 1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and the limit of quantification was  $0.057 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The precision of the method was evaluated with high, medium and low concentration samples, and the standard deviation was not more than 10%. The recoveries of simulated samples prepared with imidazolidinyl urea of international standard were in the range of 85%-115%, and the results were

作者简介: 魏慧慧 Tel: (010) 89203060; E-mail: huifortune@163.com

共同第一作者: 刘艳 Tel: (010) 67095448; E-mail: liuyan2006@nifdc.org.cn

通信作者: 王玉梅 Tel: (010) 52831678; E-mail: wangyumei@nifdc.org.cn

not disturbed by common additives. Two specifications from two batches of cell-free DNA collection tubes were tested with the developed method, and the results were all in line with the technical requirements of the products.

**Conclusion:** The developed method could be used for quantitative detection of imidazolidinyl urea in cell-free DNA collection tubes.

**Keywords:** cell-free DNA collection tubes; imidazolidinyl urea; linearity; limit of quantitation; precision; accuracy; specificity

血浆中无细胞DNA检测和分析在胎儿遗传疾病的产前诊断、恶性肿瘤的早期诊断,以及其他疾病的分子检测方面是一个新兴的领域<sup>[1-4]</sup>,作为一次性真空采血管的特殊类型,游离DNA保存管被广泛应用于该项检测技术的样本采集和保存。但在无细胞DNA的分析过程中,样品的处理、运输和加工过程极易受到污染,导致有核血细胞分解,进一步释放细胞基因组DNA,直接干扰检测结果的准确性。因此如何确保所提取无细胞DNA的量和特异性,需要从样品保存环节进行质量控制。除了常规抗凝剂EDTA具有的核酸酶抑制作用可以防止游离DNA降解外<sup>[5]</sup>,还需要依靠特殊添加剂起到稳定有核血细胞的作用,以达到无细胞DNA整体稳定的目的。咪唑烷基脲作为一种核酸酶抑制剂,常规被添加到游离DNA保存管中,但在国家药品监督管理局颁布的系列行业标准中,除了涉及系列抗凝剂的检测方法<sup>[6]</sup>,目前尚未形成咪唑烷基脲等添加剂的标准检测方法。

咪唑烷基脲水溶液中存在尿囊素和甲醛的缩合片段,在Nash's试剂中会分解释放出甲醛<sup>[7]</sup>。甲醛在接近中性的乙酰丙酮、铵盐混合液中,生成黄色的产物3,5-二乙酰基-1,4-二氢二甲基吡啶(3,5-diacetyl-1,4-dihydrodimethylpyridine, DDL),该产物在波长412 nm处的吸光度与甲醛含量成正比,根据供试品吸光度,计算供试品游离甲醛含量,进而得到咪唑烷基脲的含量,本研究旨在利用这一原理建立游离DNA保存管中咪唑烷基脲的定量检测方法。

## 1 材料与仪器

### 1.1 主要试剂

甘氨酸(分析纯,购自Sigma-Aldrich);咪唑烷基脲(国际标准品,购自USP,编号:1336806);EDTA·K<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司);乙酸铵(分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司);乙酸(分析纯,

购自国药集团化学试剂有限公司);乙酰丙酮(分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 仪器

电子天平(型号XSE205DU/81G,梅特勒托利多METTLER TOLEDO);酶标仪(型号SpectraMax M5, Molecular Devices公司);恒温水浴锅(型号SHHW21.420AH,天津市泰斯特仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 溶液的配制

咪唑烷基脲标准储备液:取USP标准品,以1 mL超纯水复溶成200 mg·mL<sup>-1</sup>标准储备液。

稀释液:参照采血管中添加剂含量<sup>[6]</sup>及市场调研结果,称取5 g EDTA·K<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O,加超纯水溶解并定容至25 mL,配制成浓度为200 mg·mL<sup>-1</sup>的EDTA·K<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O溶液;称取1.25 g甘氨酸,加超纯水溶解并定容至25 mL,配制成浓度为50 mg·mL<sup>-1</sup>的甘氨酸溶液。以EDTA·K<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O溶液(200 mg·mL<sup>-1</sup>)和甘氨酸溶液(50 mg·mL<sup>-1</sup>)进行1:1混合,配制成含100 mg·mL<sup>-1</sup> EDTA·K<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O和25 mg·mL<sup>-1</sup>甘氨酸的基质溶液。上述基质溶液以蒸馏水进行250倍稀释,配制含有0.4 mg·mL<sup>-1</sup> EDTA·K<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O和0.1 mg·mL<sup>-1</sup>甘氨酸的稀释液。

乙酰丙酮显色液:按照《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)方法<sup>[8]</sup>,称取乙酸铵15 g,加入适量水溶解,再加入乙酸0.3 mL、乙酰丙酮0.2 mL,摇匀,加水定容至100 mL即得,室温避光贮存,在规定的时间内使用。

### 2.2 样品处理与检测

样品以3000 g纵向离心1 min,根据样品中咪唑烷基脲的靶值范围,以蒸馏水进行一定比例稀释(如取40 μL保存液,稀释至10 mL),制备供试液。取供试液0.1 mL,加蒸馏水0.4 mL,摇匀,加乙酰丙酮显色液0.5 mL,摇匀,60℃水浴60 min,取出冷却至室温。取上述冷却至室温的反应液

0.2 mL加入96孔板, 设3个平行孔。以稀释液作为空白对照, 同法操作。于412 nm处测定吸光度。

### 2.3 方法学建立

#### 2.3.1 线性

以超纯水对咪唑烷基脲标准储备液(200 mg·mL<sup>-1</sup>)进行稀释, 配制成3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0 mg·mL<sup>-1</sup>系列标准溶液。取上述系列稀释的各标准溶液作为最终供试液进行检测, 处理和检测步骤同“2.2”项。以咪唑烷基脲浓度对其吸光度绘制标准曲线, 并求得标准曲线的直线回归方程。

#### 2.3.2 检测限和定量限

参考NLSI-EP17A-A2文件<sup>[9]</sup>, 以稀释液作为空白进行20孔平行测定, 根据拟合直线的斜率, 求得吸光度对应的浓度, 计算结果的平均值 $\bar{X}_B$ 和标准偏差SD<sub>B</sub>, 按照公式 $LOB=\bar{X}_B+1.645SD_B$ 计算, 获得空白限LOB浓度。根据计算结果, 配制接近或高于空白限浓度的低值样本, 即LOB~4LOB范围内4个样本, 分别测定5次, 根据拟合直线的斜率分别计算低值样本相应浓度的均值 $\bar{X}_n$ 和标准偏差SD<sub>n</sub>, 根据公式:  $SD_s^2=(n_1SD_1^2+n_2SD_2^2+n_3SD_3^2+n_4SD_4^2)/(n_1+n_2+n_3+n_4)$ , 计算方差的加权平均数, 从而得到样本测量标准偏差的集合估计SD<sub>s</sub>。根据公式 $LOD=LOB+1.645SD_s$ 计算检测限。

咪唑烷基脲发挥作用的浓度水平为0.1%~0.5%, 换算到保存液浓度范围为5%~25%, 经评估, 本方法的可接受总体误差目标设为0.4 mg·mL<sup>-1</sup>(测试液)。

结合检测限样本的测定偏差(Bias)和集合精度(SD<sub>s</sub>), 按照 $Bias+2SD_s$ 计算总体误差(Total Error, TE)。以总体误差在-0.4~0.4 mg·mL<sup>-1</sup>范围内, 且标准偏差不大于15%的最低浓度为方法定量限。

#### 2.3.3 精密度

将咪唑烷基脲标准储备液(200 mg·mL<sup>-1</sup>)10倍稀释为20 mg·mL<sup>-1</sup>。取20 mg·mL<sup>-1</sup>咪唑烷基脲溶液1 mL, 加入25 mL量瓶中, 用纯水定容并混匀, 配制成浓度为0.8 mg·mL<sup>-1</sup>的咪唑烷基脲溶液; 取0.5 mL加入25 mL量瓶中, 用纯水定容并混匀, 配制成浓度为0.4 mg·mL<sup>-1</sup>的咪唑烷基脲溶液; 再取0.25 mL加入100 mL量瓶中, 用纯水定容

并混匀, 配制成浓度为0.05 mg·mL<sup>-1</sup>的咪唑烷基脲溶液。制备高、中、低浓度精密样品供试液(浓度分别为0.8、0.4、0.05 mg·mL<sup>-1</sup>), 6个平行样品分别进行测定。根据公式 $RSD=SD/\bar{X}$ 计算相对标准偏差RSD。

#### 2.3.4 准确度

取咪唑烷基脲标准储备液(200 mg·mL<sup>-1</sup>)0.2 mL, 加入10 mL刻度管, 配制成理论靶值为40 mg·支<sup>-1</sup>的样品; 取标准储备液0.1 mL, 加入5 mL刻度管, 配制成理论靶值为20 mg·支<sup>-1</sup>的样品。将每种样品进行250倍稀释后成供试液, 分别测定3次, 进行回收率的计算, 目标设定为85%~115%。

#### 2.3.5 特异性

用含高浓度EDTA·K<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O和甘氨酸的稀释液稀释咪唑烷基脲标准储备液(200 mg·mL<sup>-1</sup>), 配制浓度分别为1.6、0.4、0.05 mg·mL<sup>-1</sup>供试液。处理和检测步骤同“2.2”项。

#### 2.3.6 供试品中咪唑烷基脲添加量测定

选取市场占有率较高的两家各2种规格(5 mL、10 mL)游离DNA保存管, 分别随机抽取3支, 以3000 g·min<sup>-1</sup>离心1 min。分别吸取各保存管中的保存液40 μL至试管中, 加水至10 mL, 摇匀, 制备成供试液, 待测。以所建立的方法, 对供试液进行检测, 按下式计算供试品中咪唑烷基脲的含量。

$$m=C_1 \times 250 \times V$$

式中:

$m$ -保存管中咪唑烷基脲的含量, 单位为mg;

$C_1$ -供试液的咪唑烷基脲浓度, 单位为mg·mL<sup>-1</sup>;

250-样品的稀释倍数;

$V$ -保存管中添加剂溶液的体积, 单位为mL。

## 3 结果

### 3.1 线性

在满足各点回收率在85%~115%范围内、相关系数 $r$ 不小于0.9900条件下, 去掉预设的高点和低点, 本方法检测的线性范围确定为0.025~1.6 mg·mL<sup>-1</sup>, 在此范围内, 相关系数 $r=0.9999$ , 如图1。换算到处理前样本的浓度范围为12.5~400 mg·mL<sup>-1</sup>。

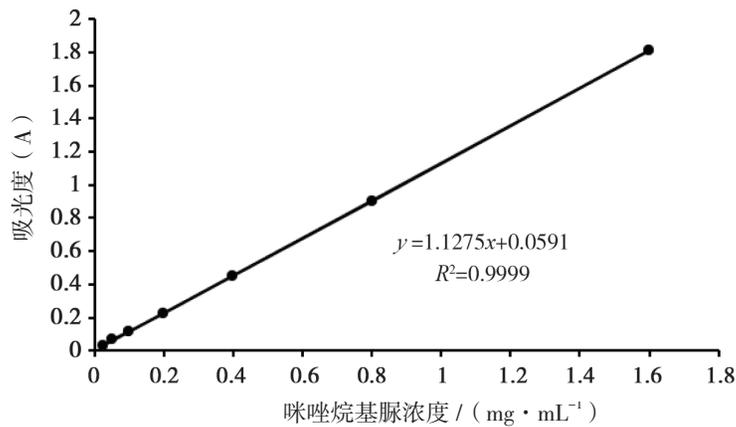


图1 咪唑烷基脲浓度与其吸光度的线性关系

### 3.2 检测限和定量限

在 $0.025 \sim 1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性范围内,以稀释液为空白进行的20次吸光度测定,经计算LOB为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,配制浓度在 $0.05 \sim 0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围的4个样本,分别进行5次测试,根据相应浓度的均值和标准偏差,计算 $SD_s$ 为0.0043,经计算得到检测限LOD为 $0.057 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,计算此浓度下的标准偏差RSD为7.0%,总体误差(TE)为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,误差间距为 $-0.01 \sim 0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,在

误差目标 $-0.4 \sim 0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,可以认为本方法的最低检测限LOQ与检出限LOD等同,为 $0.057 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 3.3 精密度

测定低、中、高浓度(分别为 $0.05$ 、 $0.4$ 、 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )各6个样品,精密度结果表明在常规应用浓度范围内,检测结果重复性较好。具体结果如表1。

表1 精密度结果( $n=6$ )

浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	吸光度 $\bar{X}$	SD	RSD/%
0.05	0.052	0.0033	6.37
0.4	0.394	0.0011	0.28
0.8	0.793	0.0021	0.26

### 3.4 准确度

参照游离DNA保存管5 mL和10 mL两种常用规格中咪唑烷基脲的含量,以咪唑烷基脲国际标准品配制的两种模拟样品,经检测并换算到

单支含量,与理论靶值比较,回收率结果均在85%~115%范围内,方法具有较好的准确性。具体检测结果见表2。

表2 准确度检测结果

理论含量 / ( $\text{mg} \cdot \text{支}^{-1}$ )	吸光度	测定浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	原液浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	计算含量 / ( $\text{mg} \cdot \text{支}^{-1}$ )	回收率 / %
20	0.7820	0.6907	172.67	17.27	86.4
40	0.8169	0.7217	180.42	36.08	90.2

## 3.5 特异性

基质中常规存在的EDTA·K<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O和甘氨酸

成分对检测结果无明显干扰,方法具有较好的特异性。具体检测结果见表3。

表3 特异性测定结果

理论浓度 / (mg · mL <sup>-1</sup> )	吸光度 $\bar{X}$	测定浓度 / (mg · mL <sup>-1</sup> )	回收率 / %
0.05	0.117	0.0502	100.5
0.4	0.536	0.3938	98.5
1.6	2.013	1.6016	100.3

## 3.6 供试品测定

测定供试品时,以咪唑烷基脲标准溶液的各浓度对其吸光度绘制标准曲线,其线性回归方程为  $y = 1.1268x + 0.0037$ , 相关系数  $r=0.9999$ 。供试品A

和B保存管5 mL规格保存液体积均为0.1 mL, 10 mL规格保存液体积均为0.2 mL, 技术要求及供试品溶液的实验数据及计算结果如表4所示, 均符合产品技术要求规定。

表4 供试品测定结果

厂家	规格	技术要求 / (mg · 支 <sup>-1</sup> )	测试液浓度 / (mg · mL <sup>-1</sup> )	原液浓度 / (mg · mL <sup>-1</sup> )	含量 / (mg · 支 <sup>-1</sup> )	符合性
A	5 mL	15 ~ 25	0.69	172.67	17.27	符合
	10 mL	30 ~ 50	0.72	180.42	36.08	符合
B	5 mL	>10	0.626	156.5	15.65	符合
	10 mL	>20	0.56	138.8	27.77	符合

## 4 讨论

随着胎儿游离DNA在无创产前诊断的临床意义和随之而来商业上的成功,近年来开始聚焦肿瘤游离DNA在肿瘤液态活检中的种种应用<sup>[10-11]</sup>, 相关体外诊断试剂盒也一直是申报的热点。游离DNA的用途广泛,可直接应用于下游检测,如数字PCR和高通量测序等<sup>[12-13]</sup>。目前正在申报的产品中,有许多涉及循环血液游离DNA的样本,因此,游离DNA的保存质量对后续的临床检测结果起重要作用<sup>[14-15]</sup>,这就需要保存管中添加核酸酶抑制剂以及有核细胞保护剂,既要防止在运输、保存过程中血浆中的核酸酶对游离DNA的降解,又要避免血液有核细胞中基因组DNA的释放<sup>[16]</sup>。目前上市的一次性真空采血管较多,但未查到获批的针对游离DNA保存的采血管或保存管,意味着目前市场上具备游离DNA保存

的采血管大都处于无证状态,各医疗检测机构在进行高通量测序检测或其他使用游离DNA样本时使用的游离DNA保存管均处于不被监管的状态,属于监管漏洞。由于没有可参考的针对游离DNA保存管的评价方法,笔者在接收的检验中,也是发现了企业在制定技术要求时,有的故意回避该项检验,只做常规采血管检测项。

本研究建立了一种针对游离DNA保存管中咪唑烷基脲的定量检测方法,该法检测的线性范围确定为0.025 ~ 1.6 mg · mL<sup>-1</sup> (相当于保存液12.5 ~ 400 mg · mL<sup>-1</sup>),定量限为0.057 mg · mL<sup>-1</sup> (相当于保存液14.25 mg · mL<sup>-1</sup>);运用低、中、高3个浓度验证了方法的精密性,在常规应用浓度范围内,检测结果重复性较好;以加标回收的方法验证了方法的准确度与特异性,回收率结果在85% ~ 115%内,

说明方法具有较好的准确性,且不受常见添加剂的干扰。同时以所建立的方法初步应用于游离DNA保存管检测,结果均符合产品技术要求。

该方法经山东省医疗器械检测中心、江苏康为世纪生物科技股份有限公司、广州阳普医疗科技股份有限公司等多家验证,其线性、准确性、精密度和特异性均符合作为该特殊采血管评价的要求。同时,基于该研究成果起草并申报了医疗器械行业标准“人体静脉血样采集容器中添加剂量 第6部分-咪唑烷基脒”,为采血管的市场监管提供有效的技术支持。

#### 参考文献:

- [1] 戚庆伟,周希亚,蒋宇林,等.分子时代产前筛查和产前诊断技术和理念的变迁及发展[J].中国科学:生命科学,2021,51(8):997-1006.
- [2] Corcoran RB, Chabner BA. Cell-free DNA Analysis in Cancer[J]. N Engl J Med, 2019, 380(5):501-502.
- [3] Ranucci R. Cell-Free DNA: Applications in Different Diseases[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1909:3-12.
- [4] Szilágyi M, Pös O, Márton É, et al. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18):6827.
- [5] Barra GB, Santa Rita TH, de Almeida Vasques J, et al. EDTA-Mediated Inhibition of DNases Protects Circulating Cell-Free DNA from ex Vivo Degradation in Blood Samples[J]. Clin Bio Chem, 2015, 48(15):976-981.
- [6] 国家食品药品监督管理总局. YY 0314-2021 一次性使用人体静脉血样采集容器[S]. 2021.
- [7] T Nash. The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction[J]. Biochem J, 1953, 55(3):416-421.
- [8] 中华人民共和国药典:四部[S]. 2020.
- [9] Pierson-Perry JF, Vaks JE, Durham AP, et al. CLSI EP17 A2 Ed. 2 (2012) Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [10] Galardi F, Luca F, Romagnoli D, et al. Cell-Free DNA-Methylation-Based Methods and Applications in Oncology[J]. Biomolecules, 2020, 10(12):1677.
- [11] Gai W, Sun K. Epigenetic Biomarkers in Cell-Free DNA and Applications in Liquid Biopsy[J]. Genes (Basel), 2019, 10(1):32.
- [12] Okada T, Mizukami Y, Ono Y, et al. Digital PCR-based Plasma Cell-Free DNA Mutation Analysis for Early-Stage Pancreatic Tumor Diagnosis and Surveillance[J]. J Gastroenterol, 2020, 55(12):1183-1193.
- [13] Bianchi DW, Chiu RWK. Sequencing of Circulating Cell-free DNA during Pregnancy[J]. N Engl J Med, 2018, 379(5):464-473.
- [14] 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):1035-1037.
- [15] 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.
- [16] Martignano F. Cell-Free DNA: An Overview of Sample Types and Isolation Methods[J]. Mol Biol, 2019, 909:3-27.

(收稿日期 2022年1月25日 编辑 邹宇玲)