

孕妇外周血超短片段游离DNA提取方法的优化

谢伟洁 曹宪振 钟佳通 温丽娟 胡亮 刘维强*

汕头大学医学院附属深圳妇儿医院(龙岗),深圳市龙岗区妇幼保健院 中心实验室,
广东 深圳 518172

【摘要】目的 超短片段游离DNA(ultra-short cell free DNA, uscfDNA)是一种新发现的cfDNA,具备疾病筛查分子标志物潜能。本项目拟通过优化孕妇外周血cfDNA提取方法,实现从孕妇外周血中高效分离和回收uscfDNA。**方法** 回顾性收集2021年11月至2024年8月于深圳市龙岗区妇幼保健院接受无创产前筛查(noninvasive prenatal screening, NIPS)孕周为12~37周检测的135例孕妇自愿者检测后剩余标本和临床资料。通过使用高比例磁珠和高比例醇类对常规提取方法和回收方式进行优化以提升cfDNA提取效果,将磁珠法与有机试剂抽提和醇沉淀相结合来提高纯化效果。**结果** 通过对常规提取方法的优化,从孕妇外周血中获取到50 bp左右的单链DNA的uscfDNA,在总cfDNA中占21%~96%。通过评估uscfDNA在基因组中的分布情况,发现其主要在启动子等调节区域富集。**结论** 本研究通过优化cfDNA提取纯化方法,实现了uscfDNA的高效提取。该方法或可为基于围产领域uscfDNA研究提供帮助。

【关键词】 超短片段游离DNA;提取方法;磁珠;单链DNA

【中图分类号】 R715.5

【文献标识码】 A

Optimization of ultra-short cell-free DNA extraction method from pregnant women's peripheral blood

Xie Weijie, Cao Xianzhen, Zhong Jiatong, Wen Lijuan, Hu Liang, Liu Weiqiang

(Central Laboratory, Affiliated Shenzhen Women and Children's Hospital (Longgang) of Shantou University Medical College (Longgang Maternity and Child healthcare Hospital of Shenzhen City), Shenzhen, Guangdong 518172, China)

【Abstract】 Objective Ultra-short cell-free DNA (uscfDNA) is a recently identified form of cfDNA with potential as a molecular biomarker for disease screening. The project aimed to optimise the methods for extracting cfDNA from maternal peripheral blood, to effectively isolate and recover uscfDNA. **Methods** Residual plasma samples and associated clinical data were collected from 135 pregnant women undergoing non-invasive prenatal screening (NIPS) between 12 and 37 weeks of gestation at Shenzhen Longgang Maternal and Child Health Hospital between November 2021 and August 2024. We optimised conventional extraction and recovery protocols using high-concentration magnetic beads and alcohols to enhance cfDNA extraction efficiency. The combination of magnetic bead-based extraction, organic solvent extraction, and ethanol precipitation improved purification efficiency. **Results** Using these optimised methods, we successfully extracted uscfDNA from maternal peripheral blood. The uscfDNA was characterised as predominantly single-stranded DNA

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2025.04.008

基金项目:深圳市自然科学基金项目(JCYJ20230807141908017);深圳市龙岗区科创局项目(LGKCYLWS2022013)

*通信作者:刘维强,E-mail:liuwq06@126.com

fragments of approximately 50 base pairs, accounting for 21~96% of the total cfDNA, with variation observed among samples. Analysis of uscfDNA distribution across the genome revealed significant enrichment in regulatory regions such as promoters. **Conclusion** This study successfully extracted uscfDNA by optimising the extraction and purification of cfDNA, providing an improved approach that could facilitate further research into uscfDNA in the perinatal field.

【Key words】 Ultra-short cell-free DNA; Extraction method; Magnetic beads; Single-stranded DNA (ss DNA)

游离核酸是存在于外周血或其他体液中的片段化 DNA 混合物,可反映肿瘤、妊娠、遗传、器官移植等疾病信息,且其具有无创特性^[1-3],现已广泛应用于肿瘤筛查、无创产前筛查中^[1,4,5],但现有筛查方法对疾病早筛效率仍有待进一步提升^[6]。研究发现,未被核小体保护的 DNA 可被剪切成约为 50 bp 的片段,占总短片段游离 DNA (cell free DNA, cfDNA) 的 20%~50%,其信号强度更强,变化趋势与较长片段不同^[7-9],但常规提取方法易导致此类超短片段 cfDNA (ultra-short cfDNA, uscfDNA) 丢失。uscfDNA 已证实其可作为敏感的肿瘤诊断标志物^[7,8]。

受提取方法限制以及对 143 bp 左右胎盘来源 cfDNA 高度关注的影响, uscfDNA 在围产医学中的研究仍为空白。本研究拟通过优化孕妇外周血 cfDNA 的提取方法,探索孕妇外周血中是否存在 uscfDNA,为围产领域 uscfDNA 的研究奠定基础。

1 对象与方法

1.1 对象 回顾性收集 2021 年 11 月至 2024 年 8 月在深圳市龙岗区妇幼保健院接受无创产前筛查 (non-invasive prenatal screening, NIPS) 检测的孕周为 12~37 周的孕妇自愿检测后剩余标本和临床资料作为研究对象。本研究已获得受试者知情同意并经深圳市龙岗区妇幼保健院医学伦理委员会审查和批准(批准号:KYXM-2023-036)。

纳入标准:年龄大于 18 周岁;在深圳市龙岗区妇幼保健院进行了 NIPS 检测;单胎妊娠。

排除标准:信息缺失或失访;NIPS 检测结果为阳性;患有孕前高血压;自身存在非整倍体或其他遗传综合征。

1.2 方法

1.2.1 样本收集 采集自愿者 NIPS 检测后的剩余血浆样本。

1.2.2 DNA 的提取纯化

1.2.2.1 常规提取方法 采用 NIPS 常规提取方法,核酸提取试剂盒(武汉,华大基因),步骤如下:

(1)在 200 μl 血浆中加入 10 μl 蛋白酶 K, 14 μl 磁珠和 280 μl 裂解液,充分吹打混匀。室温孵育 15min 后进行磁珠分离 5min,直至溶液澄清,弃上清。

(2)加入 320 μl 清洗液 1 进行洗涤,振荡混匀,清除附着在 DNA 上的蛋白质和盐离子,后进行磁珠分离至溶液澄清,弃去上清。

(3)加入 320 μl 清洗液 2 进行第二次洗涤,振荡混匀,再进行磁珠分离至溶液澄清,弃去上清。

(4)重复步骤(3),进一步清洗掉杂质。

(5)加入 32 μl 洗脱缓冲液洗脱 DNA,振荡混匀,室温静置 5min,再进行磁珠分离 5min,取出上清备用。

1.2.2.2 优化方法 本方法在常规提取基础上优化:磁珠纯化步骤通过提高磁珠比例及高比例醇类提升 uscfDNA 回收率,并结合磁珠法、有机试剂抽提法与醇沉淀法强化纯化效果。使用 Exo I 酶明确提取到的 cfDNA 是双链还是单链性质。具体流程为“裂解-磁珠纯化-有机试剂抽提-磁珠纯化-醇沉纯化”,关键步骤如下:

(1)样本裂解:200 μl 血浆中加入 20 μl 20 mg/ml 蛋白酶 K (Invitrogen, 25530049) 及 11 μl 裂解液 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷(pH7.4)、0.5 mM 乙二胺四乙酸、20% 十二烷基肌氨酸钠和 10% Triton X-100),混匀 15s,60 °C 孵育 30 min。

(2)磁珠纯化 1:裂解产物中加入 100 μl

SPRIselect 磁珠(Beckman Coulter, B23319)和 600 μ l 结合液(80% 异丙醇、1M 氯化钠、0.5mM 乙二胺四乙酸),混匀 15s, 室温孵育 10 min 后磁珠分离 5min; 沉淀重悬于 500 μ l TE 缓冲液孵育 5 min, 磁分离后保留上清。

(3) 有机试剂抽提: 取上述上清, 加入 250 μ l 苯酚、240 μ l Buffer EX、10 μ l 异戊醇(索宝生物, P1012), 涡旋 15 s 后, 19 000 g 离心 5 min, 重复 2 次, 取 500 μ l 上清液。

(4) 磁珠纯化 2:500 μ l 抽提上清液中加入 200 μ l SPRIselect 磁珠和 1200 μ l 结合液, 室温孵育 10 min 后磁分离, 弃上清; 2 ml 85% 乙醇洗涤清洗 2 次, 干燥后溶于 100 μ l 无核酸酶水。

(5) 醇沉纯化: 100 μ l 上述产物, 加入 2 μ l 助沉剂(1M 氯化镁, 20mg/ml 糖原, ThermoFisher, R0561)及 250 μ l 100% 乙醇, -80 °C 低温孵育 1h; 4 °C 19000 g 离心 20 min, 弃上清, 85% 乙醇洗涤 2 次, 干燥后溶于 20 μ l TE 缓冲液, -20 °C 保存备用。

1.2.3 文库制备和测序 采用 VAHTS ssDNA 文库制备试剂盒(诺唯赞, ND620)制备文库。使用 Genemind SURFSeq 5000 测序平台(深圳市真迈生物科技有限公司)进行双端测序。

1.2.4 数据分析 使用 fastp v0.21.0、bowtie2 v2.4.2、Picard v2.27.5、MACS2 v2.2.91、SAMtools v1.15.1、deepTools v3.5.2、BEDTools v2.30.0、RE-GOA、R 软件包等软件对数据进行处理与分析。

2 结果

2.1 标本入组情况 根据入组排除标准, 在知情同意前提下共入组 135 例孕妇标本作为研究对象。

2.2 不同提取建库方法对 uscfDNA 的提取效果 运用常规提取建库方法作为比对方法, 对孕妇血浆中的 DNA 进行提取时无法回收 30~70 bp 的超短片段, 而运用优化方法进行 DNA 提取时成功回收了这部分超短片段, 其中大小为 50 bp 左右的片段最为丰富。这些超短片段对核糖核酸酶 I 处理具有

抵抗性, 但对脱氧核糖核酸酶 I 敏感, 且易被 ssDNA 特异性核酸外切酶降解(图 1)。

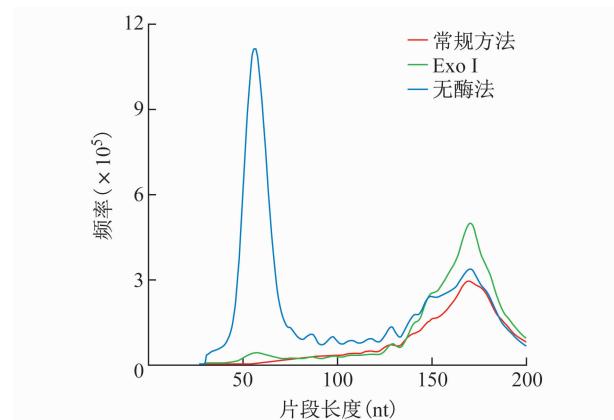


图 1 不同 DNA 提取建库方法对 uscfDNA 的提取效果

注: 运用常规方法、优化方法(无酶法, no enzyme)以及优化方法 + 核酸酶处理(Exo I)3 种提取建库方法进行 DNA 提取, 结果显示常规方法提取到的 cfDNA 主要分布在 100~200bp, 而优化方法还可提取到大小为 30~70bp 的 uscfDNA 且该部分超短片段可被 Exo I 酶降解。

2.3 优化方法在不同孕期对不同长度 DNA 的提取效率 对优化方法在不同孕期的妇女(妊娠早期: 20 人, 妊娠中期: 108 人, 妊娠晚期: 7 人)中 uscfDNA 的提取结果进行分析, 结果显示优化方法对长度为 30~70 bp 的 uscfDNA 的提取效率较高, 提取出的 uscfDNA 数量占总 cfDNA 的 21% 到 96% 不等, 中位数及四分位数间距分别为 61.26% (53.17%~70.22%)、65.32% (54.44%~75.05%)、42.58% (37.19%~65.53%), 运用秩和检验进行统计学分析, 其比例在妊娠早期和妊娠晚期之间的比较未达到统计学显著性差异, 但由于妊娠晚期组样本量较少(7 例), 未来可能需要进一步扩大样本量来进行验证(表 1)。

2.4 uscfDNA 在基因组中的分布情况 通过对测序数据进行生信分析, 来评估这部分 uscfDNA 在基因组中的分布情况, 发现在所有基因组特征中均可观察到这些超短片段相对应的峰, 且 uscfDNA 在启动子、5'UTR 和 CpG 岛中富集, 在低复杂性区域和简单重复区域的富集最为明显(图 2)。

3 讨论

uscfDNA 是一类循环游离 DNA 亚型, 其长度

峰值约为 50nt, 浓度与较长片段 cfDNA 相近, 主要来源于细胞凋亡或坏死后的核小体降解产物^[7,8]。目前已有研究表明, uscfDNA 可作为肿瘤诊断的分

子标志物, 在肿瘤诊断方面起到重要的作用^[8], 但在围产医学领域, 关于 uscfDNA 的研究仍处于空白阶段, 其潜在价值尚未得到充分关注。

表 1 优化方法对不同孕期妇女 uscfDNA 提取效率的比较

| 孕期 | 样本数(例) | 片段大小(bp) | 最大值(%) | 最小值(%) | 中位数(%) | 下四分位数(%) | 上四分位数(%) |
|------|--------|----------|--------|--------|--------|----------|----------|
| 妊娠早期 | 20 | 30~70 | 84.80 | 32.42 | 61.26 | 53.19 | 70.22 |
| | | 100~150 | 13.87 | 6.05 | 9.87 | 8.16 | 11.18 |
| | | 150~1000 | 59.41 | 9.15 | 27.42 | 16.80 | 37.82 |
| 妊娠中期 | 108 | 30~70 | 96.46 | 25.68 | 65.32 | 54.44 | 75.05 |
| | | 100~150 | 17.91 | 1.55 | 8.90 | 7.88 | 10.78 |
| | | 150~1000 | 64.50 | 1.98 | 24.24 | 15.81 | 37.73 |
| 妊娠晚期 | 7 | 30~70 | 75.93 | 21.99 | 42.58 | 37.19 | 65.53 |
| | | 100~150 | 20.35 | 6.25 | 11.90 | 8.31 | 14.53 |
| | | 150~1000 | 57.66 | 15.00 | 43.12 | 27.57 | 49.48 |

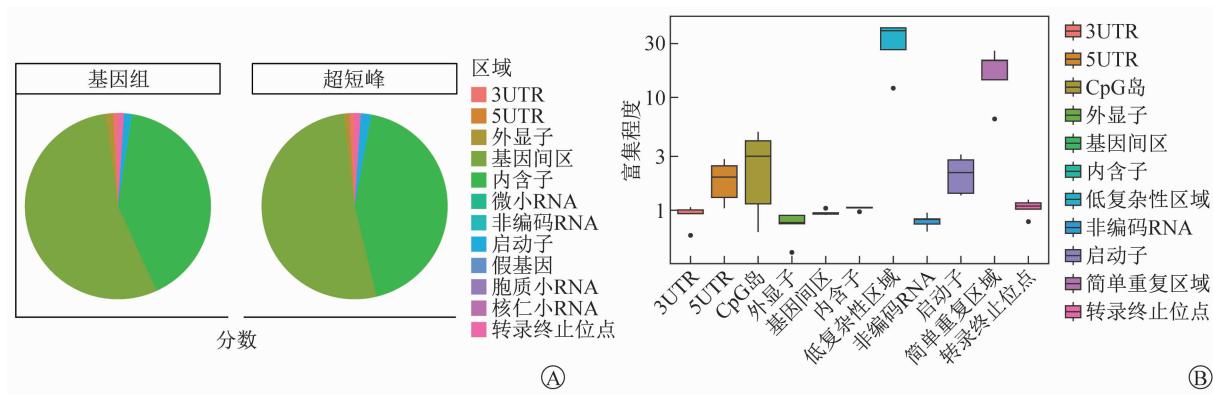


图 2 uscfDNA 在基因组中的分布情况

A: 调节区域中超短峰的分布情况显示 12 个基因组调节区域中均分布有超短峰; B: 调节区域中 uscfDNA 在启动子(promoter)、5'UTR 和 CpG 岛(CpG island) 中富集, 在低复杂性区域(low complexity) 和简单重复区域(simple repeat) 富集程度最明显

常规 cfDNA 提取方法因对短片段吸附能力不足, 易导致 uscfDNA 在提取过程中大量丢失, 无法满足后续研究需求。为解决这一技术瓶颈, 本研究针对 cfDNA 的提取、纯化流程进行了系统化优化。在提取环节, 通过使用高比例的磁珠和高浓度醇类, 增强对短片段 DNA 的吸附能力, 成功实现了长度约 50 nt uscfDNA 的高效捕获; 在纯化环节, 创新性将磁珠法、有机试剂抽提法与醇沉法相结合, 有效去除血浆中的蛋白杂质、核酸酶等干扰物质, 提升 uscfDNA 纯度。

基于上述优化策略, 本研究从孕妇外周血中成功提取到了 uscfDNA。经鉴定该片段为长度约 50nt 的单链 DNA, 浓度可占总 cfDNA 的比例 21% ~ 96%。与本团队前期针对子痫前期孕妇外周血

uscfDNA 研究相比, 本研究是在前期建立的提取框架基础上, 通过试剂比例调控、纯化步骤迭代, 更换毒性试剂等, 提升和量化了不同孕期(早、中、晚孕) uscfDNA 的分离效率(中位数分别为 61.26%、65.32%、42.58%, 四分位数间距分别为 53.17%~70.22%、54.44%~75.05%、37.19%~65.53%), 为 uscfDNA 作为早孕期分子标记物提供了方法学支撑。

对于 uscfDNA 提取效率验证中, 本优化方法的提取率显著高于既往研究报道的优化方法(中位数为 19.1%, 四分位数间距为 16.8%~22.0%)^[8]。这一优势主要源于本研究对试剂比例的精准调控—高浓度醇类可降低短片段 DNA 溶解度, 高比例磁珠可增强对短片段的吸附能力, 二者协同作用, 并结

合有机试剂抽提的杂质去除效果,大幅提升了 uscfDNA 的回收效率。此外,本优化方法操作简便,全程可在 2.5 h 内完成对 uscfDNA 的提取,且试剂成本低于现有同类方法,在保证 uscfDNA 富集效果的同时,为围产医学领域 uscfDNA 相关研究提供了经济、高效的技术支撑。

在肿瘤的研究领域,已有证据表明肿瘤患者外周血中的 uscfDNA 来源于肿瘤组织,携带肿瘤特异性分子信号。基于肿瘤患者 uscfDNA 异常基因组结构已被证实可作为肿瘤诊断的标志物^[1,8]。类比这一机制,本研究发现孕妇外周血中的 uscfDNA 在基因组区域富集上与正常对照存在差异,提示孕妇外周血 uscfDNA 有大量胎盘细胞凋亡的来源,其分子特征或与胎盘发育、子痫前期等妊娠期并发症存在关联。已有研究证实,孕妇外周血中的游离核酸主要来源于母体细胞和胎盘滋养细胞^[10,11],这为孕妇外周血中 uscfDNA 的胎盘来源提供了理论依据;同时,cfDNA 与 cell-free RNA (cfRNA) 在子痫前期相关基因表达早期变化中的作用已得到证实^[12,13],因此,检测孕妇特别是潜在妊娠并发症孕妇的外周血 uscfDNA 可能为早期预警妊娠期并发症提供新的生物标记物。

综上,本研究通过对优化 cfDNA 提取、纯化方法,有效解决了常规提取方法无法回收超短片段的技术难题,并分析了不同孕期 uscfDNA 的提取效能,实现了孕妇外周血 uscfDNA 的高效分离,为后续基于围产领域 uscfDNA 的生物学功能研究提供了有效的检测手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 谢伟洁:实施实验、分析/解释数据、起草文章;曹宪振:采集数据;钟佳通:采集数据;温丽娟:采集数据;胡亮:实施实验、采集数据;刘维强:酝酿和设计实验、分析/解释数据、获取研究经费。

参 考 文 献

- [1] LO YMD, HAN DSC, JIANG P, et al. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies[J]. *Science*, 2021, 372(6538): eaaw3616.
- [2] SNYDER TM, KHUSH KK, VALANTINE HA, et al. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(15): 6229-6234.
- [3] RANUCCI R. Cell-free DNA: Applications in different diseases[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1909: 3-12.
- [4] CHEN C, LI R, SUNJ, et al. Noninvasive prenatal testing of α -thalassemia and β -thalassemia through population-based parental haplotyping[J]. *Genome Med*, 2021, 13(1): 18.
- [5] CARBONE L, CARIATI F, SARNOL, et al. Non-invasive prenatal testing: Current perspectives and future challenges [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 12(1): 15.
- [6] CONTRO E, BERNABINI D, FARINA A. Cell-free fetal DNA for the prediction of pre-eclampsia at the first and second trimesters: A systematic review and meta-analysis [J]. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21(2): 125-135.
- [7] HISANO O, ITO T, MIURAF. Short single-stranded DNAs with putative non-canonical structures comprise a new class of plasma cell-free DNA[J]. *BMC Biology*, 2021, 19(1): 225.
- [8] HUDECJAVA I, SMITH CG, HÄNSEL-HERTSCHR, et al. Characteristics, origin, and potential for cancer diagnostics of ultrashort plasma cell-free DNA[J]. *Genome Res*, 2022, 32(2): 215-227.
- [9] SNYDER MW, KIRCHER M, HILL AJ, et al. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin[J]. *Cell*, 2016, 164(1-2): 57-68.
- [10] LO YM, TEIN MS, LAU TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(4): 768-775.
- [11] TSANG JCH, VONG JSL, JIL, et al. Integrative single-cell and cell-free plasma RNA transcriptomics elucidates placental cellular dynamics[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(37): E7786-E7795.
- [12] GUO Z, YANG F, ZHANG J, et al. Whole-genome promoter profiling of plasma DNA exhibits diagnostic value for placenta-origin pregnancy complications [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(7): 1901819.
- [13] MOUFARREJ MN, VORPERIAN SK, WONG RJ, et al. Early prediction of preeclampsia in pregnancy with cell-free RNA[J]. *Nature*, 2022, 602(7898): 689-694.

(收稿日期:2025-10-27)

编辑:曲晓星