



游离DNA研究进展及标准化的必要性*

方 艳^{1,2)} 刘 争²⁾ 高 颖²⁾ 邢德纯²⁾ 董莲华^{2)**} 杨靖亚^{1)**}

(1) 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; (2) 中国计量科学研究院前沿计量科学中心, 北京 100029)

摘要 游离DNA (cell free DNA, cfDNA) 作为一种新型分子标志物在疾病预测、肿瘤防治等方面的作用日益突出. 但在实现其广泛的临床应用前仍存在诸多障碍, 主要是cfDNA相关的标准较少, 导致目前的研究报道缺乏可比性, 检测结果缺乏稳定的可重复性, 从而降低了临床应用的可靠性. 本综述集中阐述了近年来cfDNA的相关研究进展, 包括cfDNA的样本来源、样本保存、样本提取、定性定量检测和应用, 并分析比较了cfDNA研究的各个环节采用的方法及其优缺点, 对其中存在的问题进行了剖析和总结, 指明了cfDNA相关标准制定的迫切性.

关键词 cfDNA, 数字PCR, 提取, 检测

中图分类号 Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0379

游离DNA (cell free DNA, cfDNA) 是由身体的所有组织 (包括正常功能组织和功能异常组织, 如肠道菌群或癌症等, 以及细胞、细菌、病毒、核酸-蛋白质复合物等^[1-2]) 释放到血清或血浆中的DNA片段. cfDNA通常被认为存在于血浆中, 但也被发现存在于其他体液中, 如胆汁、粪便、尿液^[3]及脑脊液等. 其类型主要分为循环肿瘤DNA (ctDNA) 和胎儿游离DNA (cffDNA).

首次报道cfDNA浓度升高是在自身免疫性疾病和白血病患者研究中^[4]. 随后的几十年间, 大量研究陆续表明, 癌症及一些炎症患者与健康受试者相比通常具有较高水平的cfDNA含量^[5]. 因此, 通过cfDNA检测进行人体健康监测^[6-8]具有重要意义, 基于cfDNA水平的胎儿染色体非整倍性、非侵入性产前检测是cfDNA技术在人体健康监测领域的首次成功应用^[9]. 此外, cfDNA检测还可用于肿瘤防治^[10]. 许多成人肿瘤患者要经历20~30年的病变才会最终形成癌症^[11-12], 癌症的高致死率很大一部分原因在于不能及早发现肿瘤的形成而导致较迟的医疗干预^[13]. 在癌细胞形成初期可以提前数月检测到cfDNA含量的改变, 因而可以通过早期cfDNA检测达到肿瘤防治的目的. 相比于肿瘤活检, cfDNA已被证明可以更好地代表肿瘤的完整遗传特征, 因此cfDNA可以作为标志物用于筛选

健康和无症状群体、疾病的早期检测、诊断和治疗、评价治疗效果及防控疾病复发^[14-17]. cfDNA作为分子标志物在肿瘤临床应用中的作用已被详述^[18-20].

很多研究利用cfDNA碱基长度之间的差异进行胎儿产前无创检测、肿瘤及移植治疗监控. cfDNA通过核小体介导的保护循环核酸酶的潜在机制, 天然地断裂为平均长度为167 bp的小片段^[21-22], 与类似研究发现的70%以上的血浆cfDNA片段长度小于300 bp, 平均大小为170 bp结果相符^[23-25]. 为了避免体内复杂因素的干扰, Bronkhorst等^[26]建立体外模型, 通过体外培养细胞并提取cfDNA进行性质探索, 与Yu等^[27]的实验结果共同表明, cfDNA于166 bp处的条带占比突出, 同时发现释放到体内的cfDNA片段大小不一, 通常这些片段大小与核小体DNA延伸的倍数有关, 范围从150 bp到1 000 bp, 原因可能在于cfDNA释放到循环系统的途径各不相同^[26]. 关于

* 国家质量基础共性关键技术重点研发专项 (2017YFF0204605) 和中国计量科学研究院基本科研业务费 (AKY1929) 资助项目.

** 通讯联系人.

董莲华. Tel: 18510031111, E-mail: donglh@nim.ac.cn

杨靖亚. Tel: 15692165856, E-mail: jy yang@shou.edu.cn

收稿日期: 2020-10-22, 接受日期: 2021-02-22

cfDNA 从体内释放到循环系统途径的猜想众多, 除去已被否定的部分猜想^[28-29], 还有3种可疑的来源: 凋亡、坏死和细胞的主动释放^[30]. 而来自坏死细胞的DNA片段通常大于10 000 bp^[31], 这表明大部分cfDNA在疾病和健康个体中都来源于凋亡细胞^[32-34], 大多数血浆或血清DNA的电泳结果也展示出了与凋亡细胞相似的梯形图谱.

目前针对cfDNA的相关研究报道普遍具有信息不全的现象, 例如关于cfDNA采集制备等细节交代不充分, 未详细提及样本的来源及其是否新鲜, 没有被立即处理的样本是如何保存的, 定性定量检测cfDNA时样本是否存在细胞及DNA酶的污

染或者发生样本的降解^[10]等, 此外, 报道中也很少提及结果的可重复性, 因而类似实验缺乏有效可比性, 结果质量不能被广泛评估. 本文旨在综述cfDNA近期研究现状和存在问题, 并提出cfDNA标准化的必要性, 从而为推进cfDNA研究和临床应用提供参考.

1 样本采集及处理

样本采集是cfDNA研究的关键步骤, 其次才涉及cfDNA的提取及检测应用. 表1列举了样本提取制备过程中的一些影响因素及其影响方式.

Table 1 Factors affecting cfDNA quality during sample extraction and their influencing ways
表1 样本提取过程中影响cfDNA质量的因素及其影响方式

影响因素		影响方式
物理因素	血浆/血清	血清cfDNA含量相对较多, cfDNA片段偏长; 血浆可以减少肿瘤来源DNA的稀释; 收集的血浆发生融血或DNA片段降解并产生基因组DNA污染
	离心管稳定时间	EDTA抗凝管: 6 h, 普遍接受时间为2 h; 存在白细胞稳定剂时: 2 d; Streck BCT管: 2周, 普遍接受时间为1周
	速冻	速冻处理样本不会增加cfDNA的得率
	离心力	样本提取过程中要经过两次离心, 首先1 000~3 000 r/min慢速离心10 min, 接下来13 000 r/min快速离心10 min
	温度	样本运输过程中要处于4℃低温环境下; 提取得到的cfDNA可在4℃放置, 长期保存在置于-80℃下
生物/化学因素	去污剂: Triton X-100、Tween-20、SDS	裂解细胞, 释放DNA
	苯酚/氯仿	苯酚: 有效变性蛋白质, 抑制DNase的降解作用; 氯仿: 去除残余的酚
	异戊醇	有助于分相, 使离心后的上层含DNA的水相、中间的变性蛋白质相及下层有机溶剂相维持稳定
	单价阳离子: 碘化钠	减少DNA分子之间的同性电荷相斥力, 而易于聚集沉淀
	蛋白酶K	酶解与核酸结合的组蛋白, 使DNA游离在溶液中, 适用于短时消化
	乙醇	沉淀DNA, 去除杂质

1.1 样本采集

cfDNA的样本来源涉及体内和体外, 体内提取用的样本来源广泛, 包括血浆、血清和全血, 荧光定量PCR(qPCR)测量发现, 血清中的cfDNA水平比血浆高出10倍^[35], 但血浆可以最大限度地减少对肿瘤来源cfDNA的稀释^[36], 血浆来源cfDNA的突变检测结果与活检结果更为接近^[37]. 保存的血浆样本或提取分离的cfDNA中, 每年有30%的DNA发生降解^[38]. 样本采集过程中所使用的血液采集管会对cfDNA产生影响^[39], 不宜使用具有细胞裂解功能的试管, 用于制备血浆的血液采集管必须提前用抗凝血剂处理. Wong等^[40]对孕妇

血浆中cfDNA进行分子分析, 系统研究包括时间、温度、力度和试管4个方面的操作和加工条件对cfDNA提取的影响, 发现Streck BCT管相比于EDTA管可以在较长时间内保存样本不发生降解. 另外, 样品的运输过程中会带来难以控制的变化, 过滤、离心时间、离心力, 以及离心程序都会影响cfDNA的提取及定量^[41]. 对于不能被立即处理而需要短期保存的样本应该置于BCT管并放置在低温环境中^[42], 同时要确保样品在运输过程中不会暴露在极端温度下^[43].

1.2 样本前处理

收集好的样本不能及时进行提取时, 要控制样

本从采集到处理的时间间隔和保存温度,避免影响 cfDNA 的得率^[44-45]. Risberg 等^[42]研究发现,用 K₃EDTA 管采集全血样本并于室温分别放置 0、6、24、48、96 h 及一周后提取 cfDNA,突变分子的数量以拷贝/毫升血浆表示时没有观察到统计学上的显著差异.此外,一些前处理操作可以提高 cfDNA 得率.为了解决 Qiagen 柱分离无细胞血浆 cfDNA 产率低的问题,薛等^[45]用 Triton X-100 处理血浆并加热,经过苯酚/氯仿(THP 方案)纯化后得到更高的产率. Bronkhorst 等^[26]的研究结果表明,添加蛋白酶 K 可以提高 cfDNA 得率,但样本的速冻处理并不能增加 cfDNA 得率. Fong 等^[46]比较从少量样本中提取血浆 cfDNA 的 7 种不同方法,发现经过碘化钠处理的手动方法获得的 cfDNA 得率最高.提取 cfDNA 的过程中,应避免所采用的操作方法及试剂耗材对于 cfDNA 的收集具有偏向性,防止遗漏小片段也避免降解基因组 DNA 造成 cfDNA 的污染.

2 cfDNA 提取试剂盒

目前用于 cfDNA 提取的试剂盒种类繁多,多集中于 QIAGEN 公司生产的一系列 DNA 提取试剂盒(表 2). 研究报道大多发现使用 Qiagen 柱分离纯化无细胞血浆 cfDNA 时产率较低且会损失部分小于 150 bp 的 DNA 片段^[47-48]. 早期研究中 Sozzi 等^[49]采用 QIAamp DNA Mini kit 在 4°C 下两次低速离心分离血浆,经 Qiagen 柱纯化 5 次后提取 cfDNA,并结合 DNA Dipstick TM Kit 试剂盒构建 receiver operating characteristic curve (ROC) 曲线实现 cfDNA 定量. 之后 Xue 等^[45]比较 QIAamp Blood DNA Midi Kit 和 Triton heat phenol (THP) 方案,以 *bcl-2* 为参考质粒, Pico Green 定量分析发现, THP 方案提取的 cfDNA 得率高于试剂盒法,而试剂盒操作过程中加入蛋白酶 K 会适当提高试剂盒的 cfDNA 得率. 同年 Fong 等^[46]采用 QIAamp DNA Blood kit 提取并用 Qubit 定量,结合 cfDNA 片段大小及定量检测结果得出结论,试剂盒法、苯酚-氯仿法和碘化钠法都具有较高的得率,其中碘化钠法的得率最高.

Fleischhacker 等^[50]分别在柏林和慕尼黑两个实验室以人类内源性病毒 ERV、GAPDH 基因和 β 珠蛋白基因 3 种参考基因进行 cfDNA 定量分析,比较包括 QIAamp DNA Hemal Midi Kit 试剂盒、

Nucleo Spin 血浆 F 试剂盒(MN)和罗氏自动化系统(Magna Puer LC DNA 分离试剂盒-大体积,MP)在内的 3 种 DNA 提取试剂盒的提取效果. 多变量测试结果显示: DNA 产量对分离程序和所使用的目标基因有很强的依赖性, β 珠蛋白定量结果与其他两个靶基因之间存在极显著差异,而 *ERV* 与 *GAPDH* 的定量结果之间差异不显著; 定量结果与实验室位置关联较弱; 使用自动 Magna Pure 系统提取的血浆 DNA 产量最高,而经 Qiagen 柱提取的血浆 DNA 浓度相对较低. 3 个变量之间没有观察到交互作用.

2016 年有研究报道了 QIAamp 循环核酸试剂盒(QIA)、PME 循环游离 DNA 提取试剂盒(PME)、Maxwell RSC cfDNA 血浆试剂盒(RSC)、EpiQuick 循环无细胞 DNA 分离试剂盒(EQ)和两个连续版本的 NEXTprep -Mag cfDNA 分离试剂盒(NpM_{V1/2})的 cfDNA 提取率,发现 QIA 试剂盒和 RSC 试剂盒对含 KRAS 突变的 ctDNA 和未突变的 cfDNA 的分离效率相似,而 PME 和 NpM_{V2} 试剂盒的提取率较低^[51].

Devonshire 等^[52]比较 4 种 cfDNA 提取试剂盒(QIAamp® 循环核酸(CNA)试剂盒、NucleoSpin® 血浆 XS (NS) 试剂盒、FitAmp™ 血浆/血清 DNA 分离(FA)试剂盒和常用的 QIAamp DNA 血液(DBM)试剂盒)的提取效率,建立 GeNorm 法分析 7 种参考基因定量结果并结合数字 PCR (dPCR) 测定结果,发现各试剂盒的提取效率由高到低为 CNA 试剂盒>DBM 试剂盒>NS 试剂盒>FA 试剂盒,其中 CNA 和 NS 试剂盒较 DBM 试剂盒更有利于提取较小的 DNA 片段.

报道中各个实验室采用的 cfDNA 定量分析方法不同,因此不同试剂盒的提取效率缺乏可比性. 此外,由于缺少 cfDNA 片段大小的相关标准,不同实验室提取所得的 cfDNA 长度各不相同,以此为基础的 cfDNA 的定量结果更加缺乏可靠性.

QIAGEN 公司生产的试剂盒提取纯化过程中会造成 150 bp 以下小片段 DNA 的损失,因而定量结果通常偏低; 多数试剂盒含有 PCR 抑制剂,因而通过 qPCR 定量分析会导致结果偏低; 样品长时间储存会产生细胞的溶解进而污染 cfDNA 导致结果偏高. 笔者认为当提取所得的 cfDNA 片段长度不统一时,基于总 cfDNA 得率进行定量分析的方式不利于 cfDNA 的标准化研究.

Table 2 Comparison of cfDNA extraction kits and quantitative results
表2 cfDNA提取试剂盒及定量结果比较

试剂盒	定量方法	定量结果	参考文献
QIAamp DNA Mini试剂盒	结合DNA Dipstick TM Kit试剂盒 构建ROC曲线实现cfDNA定量	血浆DNA浓度为6~25 µg/ L和26~125 µg/ L 时, 可获得最佳结果, 记录的灵敏度分别为75%和54%, 特异性为86%和100%	[48]
QIAamp DNA血液试剂盒	荧光定量双链DNA	试剂盒法/苯酚-氯仿法和碘化钠法具有较 高的提取率, 其中碘化钠法所得结果最好	[45-46]
QIAamp循环核酸试剂盒 (QIA), PME自由循环 DNA提取试剂盒 (PME), Maxwell RSC ccfDNA 血浆试剂盒 (RSC), EpiQuick循环无细胞DNA 分离试剂盒 (EQ) 以及两个连续版本的NEXT- prep -Mag cfDNA分离试剂盒 (NpM _{V1/2})	使用微滴数字PCR (ddPCR) 对 总cfDNA和KRAS突变ctDNA馏分 进行定量. qPCR分析片段完整性	QIA试剂盒和RSC试剂盒对KRAS突变的 ctDNA和未突变的cfDNA的分离效率相似, 而PME和NpM _{V2} 试剂盒的产量明显较低	[51]
QIAamp®循环核酸 (CNA) 试剂盒, NucleoSpin®血浆XS (NS) 试剂盒和FitAmp™ 血浆/血清DNA分离 (FA) 试剂盒以及常用的 QIAamp DNA血液迷你 (DBM) 试剂盒	通过GeNorm法分析7种参考基因: ALUJ、TERT、NAGK、GAPDH、 RPPH1、ERV3、VP qPCR拷贝数 结果并通过dPCR验证	提取效率高顺序为CNA试剂盒>DBM试 剂盒>NS试剂盒>FA试剂盒, 且CNA和NS 试剂盒较DBM试剂盒能更好地反映提取液 中较小的DNA片段	[52]

3 cfDNA定量检测方法

3.1 cfDNA总含量定量检测

cfDNA 的定量检测方法主要包括两个层面, 一是对 cfDNA 的总含量进行定量, 评估提取效率和得率, 二是对 cfDNA 中变异基因进行定量, 用于指导临床应用. 针对 cfDNA 总含量的定量方法众多, 包括紫外光谱、荧光染料、荧光磁性粒子^[53]、竞争结合放射免疫分析^[5] (灵敏度范围 25~1 000 µg/ L)、放射性标记 DNA^[54] (灵敏度高达 1.6 µg/ L)、DNA 嵌入法^[55]、微珠、乳胶、扩增和磁学 (光束)^[56] 等方法, 但通常由于提取所得的 cfDNA 浓度较低, 导致此类定量方法缺乏准确性. 此外, 凝胶染色法可实现 cfDNA 片段大小的定量和半定量^[57], 但无法准确检测到少量 cfDNA 的存在; 芯片电泳法可以确定 cfDNA 片段大小分布和测量含量, 但定量结果依赖于具有准确量值和一定片段长度的 DNA 标准品.

3.2 cfDNA基因变异定量检测

肿瘤细胞通过多种机制将 DNA 释放到血清或血浆中, 从而能够在血液中检测到与癌症相关的基因改变, 包括点突变^[58]、拷贝数变化、染色体重排和表观遗传畸变. 早前的测试表明, 使用全外显子组测序, 在标准深度 (~150×覆盖率) 下可以有效地从包含 5%~10% 肿瘤细胞的样本中检测到体细

胞改变^[59]. 高通量测序技术可以进行 cfDNA 中目标变异基因的检测^[60-61], 尤其是二代测序技术 (NGS) 的出现在一定程度内提高了野生型 DNA 背景中较低比例的突变信号^[62], 使得突变基因检出的准确性得以进一步提高^[63]. Yang 等^[64] 开发了一种基于 NGS 的 cfDNA 等位基因计数方法, 称为 cfDNA 条形码, 可以用于单基因疾病的无创性产前诊断. Adalsteinsson 等^[65] 开发了 ichorCNA 软件, 在事先未知肿瘤突变的情况下, 可从 0.1 倍覆盖的全基因组测序数据中量化 cfDNA 中的肿瘤突变基因含量. 然而测序技术对于 cfDNA 基因融合及点突变的检测结果仍然存在较大的变异^[66], NGS 技术尚无法满足低频突变 (<1%) 的检测需求.

基于 PCR 原理的 qPCR 和 dPCR 可实现 cfDNA 总含量和目标基因变异定量分析. qPCR 通过标准品拟合标准曲线定量, 首要问题是确定参考基因, 目前可用的参考基因种类繁多, 包括 GAPDH、β 珠蛋白、ERV 及 TERT 基因等^[50, 67], 而 β 珠蛋白定量结果与 GAPDH 和 ERV 两个靶基因定量结果之间存在极显著差异, 选用多个参考基因联合系统的统计分析方法或许可以平衡不同参考基因对于 cfDNA 定量结果的影响. 缺乏统一的参考基因和准确含量的 cfDNA 标准物质, 导致 qPCR 技术在 cfDNA 的定量分析中受到限制.

dPCR 相比 qPCR 或 NGS 具有更高的灵敏度,

可以实现突变丰度低至0.1%甚至更低丰度的准确检测^[68-70].而基于单个突变位点的检测,存在较大的拷贝数变异时可能会产生假阳性现象^[71].Cerebro是用于分析下一代癌症序列的数据统计学分析方法,它可以识别高可信度的体细胞突变,同时能够最大程度地减少假阳性结果^[72].

dPCR在晚期肿瘤检测中作用显著,但在早期筛检中缺乏灵敏度和可靠性,为此Diehl等^[73]建立一种新型珠乳扩增磁学(BEAMing)技术,可以确定PCR过程中的错误率.Laken等^[74]建立的短寡核苷酸质谱分析(SOMA)方法同样有助于提高cfDNA基因突变检测的灵敏度.随着技术发展,ddPCR以其高度灵敏性越来越多地被用于研究中^[75],但主要针对已知信息的变异基因检测.基因变异信息未知时需要预筛选方法,如变性高效液相色谱(DHPLC)、时间温度梯度电泳(TTGE)和单链构象多态性(SSCP)^[62].以往许多筛查癌源性cfDNA的方法都集中在对重复突变癌症基因中的体细胞单核苷酸变异(SSNVs)进行靶向检测^[76-77],但研究发现绝大多数转移性癌症都含有染色体臂长水平的体细胞拷贝数改变(SCNAs)^[78],SCNAs可能适用于更广泛的应用.此外,旨在实现肿瘤定位的甲基化检测方法正在被

广泛开发中^[79-83],甲基化检测结合hmC-CATCH技术已被证明可以极大提高cfDNA的检测灵敏度^[84].

cfDNA检测方法应用于真正的临床中必须考虑测试参数的第三方验证,如灵敏度、可靠性、内部和外部控制的使用,并需要食品药品监管部门和卫生部门的监管指导^[3].

4 cfDNA检测应用

当肿瘤活检不可行时,cfDNA、ctDNA的筛查是唯一有价值的标志物,可用于选择适合接受酶阻断靶向治疗的患者^[85].最常见的突变基因包括KRAS、EGFR、PIK3CA、BRAF、TP53、HER2等,表3列举了最近被广泛研究的癌症热点突变和研究结果,其中多采用NGS和dPCR方法进行变异基因检测.

目前关于cfDNA检测应用的热点研究中,定量检测方法多集中于具有高度灵敏性的dPCR技术,可以系统地比较不同基因位点的突变丰度.但各个研究报道中用于定量的参考基因有待统一,所选用的cfDNA片段长度也不同,不利于探讨cfDNA相较于基因组DNA的完整性,不能进一步探索血液中cfDNA的释放机制,影响cfDNA作为

Table 3 Hot spot tumors and mutation sites

表3 热点肿瘤及突变位点

肿瘤类别	检测方法	突变位点	分析	参考文献
胰腺癌	磁纳米颗粒、ddPCR、qPCR、NGS	KRAS G12D/V/R/C/A/S, G13D, NRAS	目的片段大小115 bp, 突变等位基因分数取值范围为0.01%~39.08%. ddPCCR精密度良好, 灵敏度高 于NGS, 单目标检测的变异等位基因分数介于0.001 5%至0.069%之间, 多目标检测的变异等位基因分数介于0.022%至0.16%之间	[86-87]
结直肠癌	NGS、IntPlex qPCR	KRAS c12/13、NRAS、BRAF V600E	平均片段大小100 bp, 突变检测率高于组织活检	[88]
结直肠癌、胰腺癌	ddPCR	KRAS G12A/C/D/V/R/S和G13D	基因组DNA裂解, 产生大于800 bp的长片段, 稀释 肿瘤来源的cfDNA	[36]
非霍奇金淋巴瘤和 前列腺癌	多重ddPCR		针对嗅觉受体(OR)基因的3个片段, 大小范围: 73~165 bp、166~253 bp、>253 bp, 利用STAT6基 因座阳性的小滴数来估计绝对cfDNA浓度	[89]
非小细胞肺癌	NGS、dPCR、ARMS	EGFR E746_A750del、L858R和T790M	三种测量方法具有良好的一致性. NGS和dPCR检测 耐药突变p.T790M的结果几乎完全一致, 患者检测 的临界值为突变率≥0.1% (cfDNA DNA总拷贝数 1 000) 或至少检测到一个拷贝的突变型	[90-91]

ARMS (amplification refractory mutation system), 扩增难治突变系统.

检测标记物的临床应用。

5 现存的问题

cfDNA 标准首先涉及表述 cfDNA 含量的单位, 目前被报道使用的单位包括质量体积浓度 $\mu\text{g/L}$ 、拷贝数、cfDNA/总 DNA (%) [31] 等, 不同的检测方法导致了 cfDNA 含量表述的不同。其次是片段大小的统一, cfDNA 片段长度的区别可应用于临床 [92], 综合已有的研究结果可以初步推断, 145 bp 处 ctDNA 片段大小的分布模式反映细胞增殖过程中释放的 cfDNA, 而 167 bp 处的片段可能反映细胞凋亡或血细胞成熟、转变所释放的 cfDNA。cfDNA 片段长度不仅取决于从细胞内释放的途径, 还包括提取过程的影响, 凝胶电泳、桑格测序、电子显微镜和原子力显微镜等方法都会对 cfDNA 的平均大小产生不同的估计, 片段长度从十几个碱基对到几万个碱基不等。除了提取过程中的影响, 还存在不同来源样本的影响, 血浆、血清、全血及肿瘤原发部位的 cfDNA 含量存在差异 [93], 差异的根源可能在于检测时期不同, 而原发部位的高含量 cfDNA 或许也能指引探究 cfDNA 的释放机制。

样本的运输和存储条件也会影响 cfDNA 的得率, 不能及时处理的样本要避免样本被污染或者发生降解, 采用 BCT 管保存在低温环境下的方式已获得广泛认可。在提取过程中, 要依据实验样本的来源, 结合产品说明采用合适的试剂盒。

cfDNA 的检测和定量有多种不同的方法, 最常见的 ctDNA 突变检测对象是 KRAS 基因 [94]。随着方法学的改进和更多肿瘤特异性基因改变的加入, 基于 EGFR [95]、BRAF [96]、ESR1 [97]、PIK3CA [98] 等基因的突变检测率各不相同, 因此很难与其他研究进行直接比较。

目前 cfDNA 提取、定量的最佳方法以及应用范围还没有达成共识, 发表的文献中普遍没有提及提取所得的 cfDNA 纯度, 例如紫外光谱测定的 A_{260}/A_{280} 值, 原因可能在于提取所得的 cfDNA 含量过低, 测得的浓度与纯度缺乏准确性。因此需要开发一种新的技术方法提高 cfDNA 的提取效率或者提出一种新的概念以描述 cfDNA 的纯度。

6 小结与展望

现有的报道和实验数据表明, cfDNA 可以作为一种有效的标志物用于临床诊断尤其是疾病的早期筛查, 为此非常有必要在 cfDNA 检测的各个环

节建立统一的标准, 包括样品的前处理、提取和定性定量检测。不同的肿瘤细胞具有不同的突变, 同一种肿瘤细胞发展的不同阶段也具有不同的突变 [35, 99], 不同位点的突变丰度是否存在检测过程中的相互干扰还未可知。只有对各个环节进行统一, 结果的重复性才能得到保障, 不同实验室不同研究平台之间才可以进行比较。

cfDNA 的精准检测既要实现准确定量, 又要实现原发肿瘤体内定位。肿瘤异质性的存在给未知来源的早期肿瘤筛选带来巨大障碍, 现存检测技术依旧存在结果不稳定、准确性差、检测成本高等诸多问题, 适合临床应用的 cfDNA 检测方法还需进行更广泛的深入研究。

目前中国和美国批准的具有临床实用价值的基于 cfDNA 的检测方法均限于检测肺癌患者 cfDNA 中 EGFR 突变的 Cobas EGFR 突变测试 v2 [100] 和检测大肠癌筛查患者 cfDNA 中 SEPT9 启动子甲基化的 Epi proColon 分析 [101]。制定完善的 cfDNA 相关标准可以确保 cfDNA 研究的进一步深入, 有利于设计具有更大内在价值的相关实验。同时可以确保同一实验室结果稳定可重复, 不同实验室方法和结果具有可比性, 唯有如此才能推动技术的逐步成熟, 最终实现 cfDNA 的临床应用价值。

参 考 文 献

- [1] Gahan P B, Stroun M. The virtosome—a novel cytosolic informative entity & intercellular messenger. *Cell Biochem Funct*, 2010, **28**(7):529-538
- [2] Pinki C, Debasis P, Nibedita M, *et al.* Thermostable direct hemolysin downregulates human colon carcinoma cell proliferation with the involvement of E-cadherin, and β -catenin/Tcf-4 signaling. *Plos One*, 2011, **6**(5):e20098
- [3] Zandvakili I, Lazaridis K N. Cell-free DNA testing: future applications in gastroenterology and hepatology. *Therap Adv Gastroenterol*, 2019, **11**: 1-13
- [4] Koffler D, Agnello V, Winchester R, *et al.* The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest*, 1973, **52**(1): 198-204
- [5] Leon S A, Shapiro B, Sklaroff D M, *et al.* Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, 1977, **37**(3): 646-650
- [6] Hayashi Y, Fujita K, Matsuzaki K, *et al.* Diagnostic potential of TERT promoter and FGFR3 mutations in urinary cell-free DNA in upper tract urothelial carcinoma. *Cancer Sci*, 2019, **110**(5): 1771-1779
- [7] Parikh A R, Corcoran R B. Monitoring resistance through liquid biopsy. *Ann Oncol*, 2018, **29**(1):8-11

- [8] Hidestrand M, Tomita-Mitchell A, Hidestrand P M, *et al.* Highly sensitive noninvasive cardiac transplant rejection monitoring using targeted quantification of donor-specific cell-free deoxyribonucleic acid. *J Am Coll Cardiol*, 2014, **63**(12): 1224-1226
- [9] Schmid M, White K, Stokowski R, *et al.* Accuracy and reproducibility of fetal-fraction measurement using relative quantitation at polymorphic loci with microarray. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018, **51**(6):813-817
- [10] Haber D A, Velculescu V E. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov*, 2014, **4**(6):650-661
- [11] Jones S N, Chen W D, Parmigiani G, *et al.* Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(11):4283-4288
- [12] Yachida S, White C M, Naito Y, *et al.* Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res*, 2012, **18**(22):6339-6347
- [13] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, **68**(6):394-424
- [14] Spindler K G, Boysen A K, Pallisgard N, *et al.* Cell-Free DNA in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncologist*, 2017, **22**(9):1049-1055
- [15] Hendriks R J, Dijkstra S, Smit F P, *et al.* Epigenetic markers in circulating cell-free DNA as prognostic markers for survival of castration-resistant prostate cancer patients. *Prostate*, 2018, **78**(5): 336-342
- [16] Mehra N, Dolling D, Sumanasuriya S, *et al.* Plasma cell-free DNA concentration and outcomes from taxane therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer from two phase III Trials (FIRSTANA and PROSELICA). *Eur Urol*, 2018, **74**(3):283-291
- [17] Christie E L, Fereday S, Doig K, *et al.* Reversion of BRCA1/2 germline mutations detected in circulating tumor DNA from patients with high-grade serous ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 2017, **35**(12):1274-1280
- [18] Bronkhorst A J, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*, 2019, **17**:100087
- [19] Jiang P, Chan K C A, Lo Y M D. Liver-derived cell-free nucleic acids in plasma: Biology and applications in liquid biopsies. *J Hepatol*, 2019, **71**(2):409-421
- [20] Quigley D, Alunkal J J, Wyatt A W, *et al.* Analysis of circulating cell-free DNA identifies multiclonal heterogeneity of brca2 reversion mutations associated with resistance to parp inhibitors. *Cancer Discov*, 2017, **7**(9):999-1005
- [21] Thierry A R, El Messaoudi S, Gahan P B, *et al.* Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, **35**(3):347-376
- [22] Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta*, 2010, **411**(21-22):1611-1624
- [23] Elshimali YI K H, Sarkissyan M, Wu Y, *et al.* The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *Int J Mol Sci* 2013, **14**: 18925-18958
- [24] Green C H J, Talbot E, Mwaba P, *et al.* Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of mycobacterial DNA in urine by nucleic acid amplification methods. *Lancet Infect Dis*, 2009, **9**:505-511
- [25] Li Y Z B, Rusterholz C, Kang A, *et al.* Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem*, 2004, **50**(6):1002-1011
- [26] Bronkhorst A J, Wentzel J F, Aucamp J, *et al.* Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1863**(1):157-165
- [27] Yu S C, Chan K C, Zheng Y W, *et al.* Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(23):8583-8588
- [28] Bevilacqua R, Nunes D N, Stroun M, *et al.* The use of genetic instability as a clinical tool for cancer diagnosis. *Semin Cancer Biol*, 1998, **8**(6):447-453
- [29] Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, *et al.* K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*, 1997, **112**: 1114-1120
- [30] Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, *et al.* About the possible origin and mechanism of circulating DNA: apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta*, 2001, **313**(1-2):139-142
- [31] Jahr S, Hentze H, Englisch S, *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 2001, **61**(4): 1659-1665
- [32] Holdenrieder S, Stieber P. Apoptotic markers in cancer. *Clin Biochem*, 2004, **37**(7):605-617
- [33] Nagata S, Nagase H, Kawane K, *et al.* Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ*, 2003, **10**(1):108-116
- [34] Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol*, 2005, **23**:853-875
- [35] Gormally E, Caboux E, Vineis P, *et al.* Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res*, 2007, **635**(2-3):105-117
- [36] Lee J-S, Kim M, Seong M-W, *et al.* Plasma vs. serum in circulating tumor DNA measurement: characterization by DNA fragment sizing and digital droplet polymerase chain reaction. *Clin Chem Lab Med*, 2020, **58**(4):527-532
- [37] Pittella-Silva F, Chin Y M, Chan H T, *et al.* Plasma or serum: which is preferable for mutation detection in liquid biopsy?. *Clin Chem*, 2020, **66**(7):946-957
- [38] Sozzi G, Roz L, Conte D, *et al.* Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst*, 2005, **97**(24):1848-1850
- [39] Deans Z C, Butler R, Cheetham M, *et al.* IQN path ASBL report from the first European cfDNA consensus meeting: expert opinion on the minimal requirements for clinical ctDNA testing. *Virchows Archiv*, 2019, **474**(6):681-689

- [40] Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, *et al.* Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem*, 2013, **46**(12): 1099-1104
- [41] Chiu R W, Poon L L, Lau T K, *et al.* Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem*, 2001, **47**(9):1607-1613
- [42] Risberg B, Tsui D W Y, Biggs H, *et al.* Effects of collection and processing procedures on plasma circulating cell-free DNA from cancer patients. *J Mol Diagn*, 2018, **20**(6):883-892
- [43] Hidestrand M, Stokowski R, Song K, *et al.* Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther*, 2012, **31**(2):122-128
- [44] Angert R M, LeShane E S, Lo Y M, *et al.* Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem*, 2003, **49**(1):195-198
- [45] Xue X, Teare M D, Holen I, *et al.* Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta*, 2009, **404**(2):100-104
- [46] Fong S L, Zhang J T, Lim C K, *et al.* Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients. *Clin Chem*, 2009, **55**(3):587-598
- [47] Vermeulen C, Geeven G, Wit E D, *et al.* Sensitive monogenic noninvasive prenatal diagnosis by targeted haplotyping. *Am J Hum Genet*, 2017, **101**(3):326-339
- [48] Schmidt B, Weickmann S, Witt C. Improved method for isolating cell free DNA. *Clin Chem*, 2005, **51**(8):1561-1563
- [49] Sozzi G, Conte D, Mariani L, *et al.* Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res*, 2001, **61**(12):4675-4678
- [50] Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, *et al.* Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta*, 2011, **412**(23-24):2085-2088
- [51] Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, *et al.* A comparison of cell-free DNA isolation kits: isolation and quantification of cell-free dna in plasma. *J Mol Diagn*, 2017, **19**(1):162-168
- [52] Devonshire A S, Whale A S, Gutteridge A, *et al.* Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2014, **406**(26):6499-6512
- [53] Dressman D, Yan H, Traverso G, *et al.* Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(15):8817-8822
- [54] Fournie G J, Gayral-Taminh M, Bouche J P, *et al.* Recovery of nanogram quantities of DNA from plasma and quantitative measurement using labeling by nick translation. *Anal Biochem*, 1986, **158**(2):250-256
- [55] Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, *et al.* Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res*, 2000, **60**(3):707-711
- [56] Janku F, Angenendt P, Tsimberidou A M, *et al.* Actionable mutations in plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget*, 2015, **6**(14):12809-12821
- [57] Wang B G, Huang H Y, Chen Y C, *et al.* Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res*, 2003, **63**(14):3966-3968
- [58] Grasselli J, Elez E, Caratu G, *et al.* Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*, 2017, **28**(6): 1294-1301
- [59] Cibulskis K, Lawrence M S, Carter S L, *et al.* Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(3):213-219
- [60] Cristiano S, Leal A, Phallen J, *et al.* Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature*, 2019, **570**(7761): 385-389
- [61] Cheng M L, Solit D B. Opportunities and challenges in genomic sequencing for precision cancer care. *Ann Intern Med*, 2018, **168**(3):221-222
- [62] Calvez F L, Ahman A, Tonisson N, *et al.* Arrayed primer extension resequencing of mutations in the TP53 tumor suppressor gene: comparison with denaturing HPLC and direct sequencing. *Clin Chem*, 2005, **51**(7):1284-1287
- [63] Salk J J, Schmitt M W, Loeb L A. Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nat Rev Genet*, 2018, **19**(5):269-285
- [64] Yang X, Zhou Q, Zhou W, *et al.* A cell-free DNA barcode-enabled single-molecule test for noninvasive prenatal diagnosis of monogenic disorders: application to beta-thalassemia. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, **6**(11):1802332
- [65] Adalsteinsson V A, Ha G, Freeman S S, *et al.* Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. *Nat Commun*, 2017, **8**(1):1324
- [66] Supplee J G, Milan M S D, Lim L P, *et al.* Sensitivity of next-generation sequencing assays detecting oncogenic fusions in plasma cell-free DNA. *Lung Cancer*, 2019, **134**: 96-99
- [67] Yuan C C, Miley W, Waters D. A quantification of human cells using an ERV-3 real time PCR assay. *J Virol Methods*, 2001, **91**(2): 109-117
- [68] Buder A, Setinek U, Hochmair M J, *et al.* EGFR mutations in cell-free plasma DNA from patients with advanced lung adenocarcinoma: improved detection by droplet digital PCR. *Target Oncol*, 2019, **14**(2):197-203
- [69] Beck J, Hennecke S, Bornemann-Kolatzki K, *et al.* Genome aberrations in canine mammary carcinomas and their detection in cell-free plasma DNA. *Plos One*, 2013, **8**(9):e75485
- [70] Ballester L Y, Glitza Oliva I C, Douse D Y, *et al.* Evaluating circulating tumor DNA from the cerebrospinal fluid of patients with melanoma and leptomeningeal disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2018, **77**(7):628-635
- [71] Snyder M W, Simmons L E, Kitzman J O, *et al.* Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. *N Engl J Med*, 2015, **372**(17):1639-1645
- [72] Wood D E, White J R, Georgiadis A, *et al.* A machine learning approach for somatic mutation discovery. *Sci Transl Med*, 2018,

- 10(457):eaar7939
- [73] Diehl F, Li M, Dressman D, *et al.* Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(45):16368-16373
- [74] Laken S J, Jackson P E, Kinzler K W, *et al.* Genotyping by mass spectrometric analysis of short DNA fragments. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(13):1352-1356
- [75] 邢德纯, 王霞, 孙锁柱, 等. 分子诊断技术在乳腺癌检测中的最新进展. *生物化学与生物物理进展*, 2020, **47**(3):224-232
Xing D C, Wang X, Sun S Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2020, **47**(3):224-232
- [76] Newman A M, Lovejoy A F, Klass D M, *et al.* Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(5):547-555
- [77] Lanman R B, Mortimer S A, Zill O A, *et al.* Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *Plos One*, 2015, **10**(10):e0140712
- [78] Beroukhi R, Mermel C H, Porter D, *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 2010, **463**(7283):899-905
- [79] Shen S Y, Singhania R, Fehringer G, *et al.* Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature*, 2018, **563**(7732):579-583
- [80] Zhang J, Han X, Gao C, *et al.* 5-Hydroxymethylome in circulating cell-free DNA as a potential biomarker for non-small-cell lung cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2018, **16**(3):187-199
- [81] Shen S Y, Burgener J M, Bratman S V, *et al.* Preparation of cfMeDIP-seq libraries for methylome profiling of plasma cell-free DNA. *Nat Protoc*, 2019, **14**(10):2749-2780
- [82] Song C X, Yin S, Ma L, *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine signatures in cell-free DNA provide information about tumor types and stages. *Cell Res*, 2017, **27**(10):1231-1242
- [83] Li W, Zhang X, Lu X, *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine signatures in circulating cell-free DNA as diagnostic biomarkers for human cancers. *Cell Res*, 2017, **27**(10):1243-1257
- [84] Zeng H, He B, Xia B, *et al.* Bisulfite-free, nanoscale analysis of 5-hydroxymethylcytosine at single base resolution. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(41):13190-13194
- [85] Rijavec E, Coco S, Genova C, *et al.* Liquid biopsy in non-small cell lung cancer: highlights and challenges. *Cancers (Basel)*, 2020, **12**(1):17
- [86] Yang Z, LaRiviere M J, Ko J, *et al.* A multianalyte panel consisting of extracellular vesicle miRNAs and mRNAs, cfDNA, and CA19-9 shows utility for diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 2020, **26**(13):3248-3258
- [87] Hussung S, Follo M, Klar R F U, *et al.* development and clinical validation of discriminatory multitarget digital droplet PCR assays for the detection of hot spot KRAS and NRAS mutations in cell-free DNA. *J Mol Diagn*, 2020, **22**(7):943-956
- [88] Thierry A R, Pastor B, Jiang Z Q, *et al.* Circulating DNA demonstrates convergent evolution and common resistance mechanisms during treatment of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2017, **23**(16):4578-4591
- [89] Alcaide M, Cheung M, Hillman J, *et al.* Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR. *Sci Rep*, 2020, **10**(1):12564
- [90] Tang C, Zhu L, Zhang L, *et al.* Establishment and validation of a novel droplet digital PCR assay for ultrasensitive detection and dynamic monitoring of EGFR mutations in peripheral blood samples of non-small-cell lung cancer patients. *Clin Chim Acta*, 2020, **510**:88-96
- [91] Provencio M, Perez-Barrios C, Barquin M, *et al.* Next-generation sequencing for tumor mutation quantification using liquid biopsies. *Clin Chem Lab Med*, 2020, **58**(2):306-313
- [92] Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz A M, *et al.* Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med*, 2018, **10**(466):eaat4921
- [93] Miller A M, Shah R H, Pentsova E I, *et al.* Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid. *Nature*, 2019, **565**(7741):654-658
- [94] Janku F, Huang H J, Fujii T, *et al.* Multiplex KRASG12/G13mutation testing of unamplified cell-free DNA from the plasma of patients with advanced cancers using droplet digital polymerase chain reaction. *Ann Oncol*, 2017, **28**(3):642-650
- [95] Sacher A G, Pawletz C, Dahlberg S E, *et al.* Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer. *JAMA Oncol*, 2016, **2**(8):1014-1022
- [96] Hong D S, Morris V K, El Osta B, *et al.* Phase IB study of vemurafenib in combination with irinotecan and cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer with BRAFV600E mutation. *Cancer Discov*, 2016, **6**(12):1352-1365
- [97] Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, *et al.* Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med*, 2015, **7**(313):313ra182
- [98] Arend R C, Londono A I, Montgomery A M, *et al.* Molecular response to neoadjuvant chemotherapy in high-grade serous ovarian carcinoma. *Mol Cancer Res*, 2018, **16**(5):813-824
- [99] Herrmann S, Zhan T, Betge J, *et al.* Detection of mutational patterns in cell-free dna of colorectal cancer by custom amplicon sequencing. *Mol Oncol*, 2019, **13**(8):1669-1683
- [100] Odogwu L, Mathieu L, Goldberg K B, *et al.* FDA benefit-risk assessment of osimertinib for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor T790M mutation. *Oncologist*, 2018, **23**(3):353-359
- [101] Warren J D, Xiong W, Bunker A M, *et al.* Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med*, 2011, **9**(1):133

Research Progress of Free DNA and The Necessity of Standardization*

FANG Yan^{1,2)}, LIU Zheng²⁾, GAO Ying²⁾, XING De-Chun²⁾, DONG Lian-Hua^{2)**}, YANG Jing-Ya^{1)**}

¹⁾College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

²⁾Center for Frontier Metrology, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China)

Abstract As a new molecular marker, free DNA (cell free DNA, cfDNA) plays an increasingly important role in disease prediction, tumor prevention and treatment. However, there are still many obstacles before achieving a wide range of clinical application, mainly due to the lack of cfDNA-related standards, resulting in the lack of comparability of current research reports and the lack of stable repeatability of test results, thus reducing the reliability of clinical application. This review focuses on the related research progress of cfDNA in recent years, including sample source, sample preservation, sample extraction, qualitative and quantitative detection and application of cfDNA. We analyze and compare the various methods used in each link of cfDNA research and their advantages and disadvantages, analyze and summarize the problems existing in each link, and put forward the urgency of the formulation of cfDNA related standards.

Key words cfDNA, digital PCR, extract, detection

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0379

* This work was supported by grants from National Quality Foundation Key Technology Research and Development Project of China (2017YFF0204605) and Basic Scientific Research Programme Supported by National Institute of Metrology, China (AKY1929).

** Corresponding author.

DONG Lian-Hua. Tel: 86-18510031111, E-mail: donglh@nim.ac.cn

YANG Jing-Ya. Tel: 86-15692165856, E-mail: jyyang@shou.edu.cn

Received: October 22, 2020 Accepted: February 22, 2021