



## 血液样本质量的评估技术进展\*

孙青 梁锴 李岩\*\*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 生物样本为转化医学研究提供了宝贵的临床资源. 高效的生物样本质量检测技术对于临床样本分析结果的准确性和可靠性具有重要意义. 将有效的质控检测方法和特定的生物学标志物作为血液质量指标, 能够评估血液离体后的质量变化情况, 进而在样本分析前剔除低质量样本, 提升被分析样本和数据的总体质量和可靠性. 血液样本由血细胞和血浆组成, 包含核酸水平、蛋白质水平、代谢物水平等多个分子层面信息. 因此在分析样本前, 应根据样本类型和目标分子做出相应的质量评估. 目前血细胞中的核酸质量可利用多种检测技术对其浓度、纯度和片段完整性进行检测. 对于血浆和血清中的游离DNA以及结构不稳定的RNA小分子, 可利用对应的靶标分子作为整体质量检测指标. 但血细胞中mRNA离体表达水平的变化暂无明确的评估方法. 此外, 对于结构更为复杂的代谢小分子、蛋白质以及多肽片段, 目前的研究多利用核磁共振技术或各种分离纯化手段(包括色谱、免疫亲和分离、磁分离等)与质谱联用技术来寻找目标质控靶标分子. 这些分子作为标志物的可靠性、稳定性和准确性仍需验证. 目前对于代谢小分子、蛋白质及多肽的质谱鉴定技术的成本高, 无法满足大部分实验室对于样本质量检测的需求, 因此需要寻找可靠的质量标志物、开发新的检测手段来降低血液样本质量评估的成本, 顺利完成代谢小分子、蛋白质以及多肽片段的质量检测.

**关键词** 血液样本, 质量控制, 核酸, 代谢小分子, 蛋白质, 多肽

**中图分类号** Q7, Q81

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0375

随着现代医学的发展, 临床转化医学研究越来越受到重视. 探究疾病发生、发展和转化机制需要提供具体研究对象, 包括生物与疾病样本. 生物样本为转化医学研究提供了宝贵的临床资源, 其中, 血液样本作为临床信息的主要来源, 是致病机制、药物开发、免疫调控等领域的主要研究对象<sup>[1]</sup>.

血液样品是临床信息的重要来源, 按照处理方式的不同可将其分为全血(血细胞和血浆)、血浆、血清和血细胞等样本类型. 如果血液样本在“分析前”阶段未经妥善操作, 在采集、保存、运输等过程中, 血样的成分就有可能发生显著变化, 为后续科学研究和临床应用带来难以预料的误差. 血液样本的体外分析前变量包括采集管类型、离心前放置的时间和温度、离心细节、组织样本热缺血和冷缺血时间、添加剂使用、采样方式、样本固定方式和时间、长期贮存前的延迟时间、长期贮存方式、样本冷冻保存和复苏的方案等. 对这些影响给予充分关注, 能够最大限度保持样本的真实性<sup>[1-2]</sup>. 目前,

对血液样品的标准操作流程(standard operation procedure, SOP)已经形成一些普遍共识, 如: 减少离体后全血放置时间、尽量避免血样暴露于室温、减少血液的非冷冻保存期、长期存储的血样需要冷冻在-80°C冰箱或液氮环境、尽量保持血液存储温度恒定、避免反复冻融血样等等<sup>[3-4]</sup>. 在“分析前”阶段, 充分执行这些SOP, 能有效地减少由于样本自身变质导致的分析结果误差. 但是, 当分析人员拿到不同渠道来源的样品时, 往往很难知道这些样品在之前的流程中是否有效地遵循了SOP, 也很难知道结果中的差异是来自患者的生理状态, 还是来自分析前样品变质. 因此, 发现能够代表样本生物学质量的检测标准和检验技术一直是临床转

\* 中国科学院战略性先导科技专项基金(XDB38010000), 国家自然科学基金(21705160), 中国科学院战略生物资源能力建设项目(KFJ-BRP-017-01)资助.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-64887212, E-mail: yanli@ibp.ac.cn

收稿日期: 2021-01-04, 接受日期: 2021-02-23

化医学研究的关注点. 利用先进的系统生物学方法, 开发和建立新型质量技术标准和检测方法是临床生物样本研究的一个重要方向. 如果找到一些血液中的指标, 能够随着不同的“分析前”操作条件而发生显著性改变, 同时, 又不受一般的生理状态影响, 就能够通过这些指标来探知未知血样在“分析前”阶段是否有效地遵循了SOP, 明确血样的质量是否满足临床应用的标准. 此外, 这类血液质量指标要能通过较简单的方法进行测定, 从而在复杂的正式分析之前来剔除低质量样品.

血液样本质量评估应充分考虑待检测血液样本的组成成分和可应用的检测技术, 提供包括核酸水平、蛋白质水平、代谢物水平等多个分子层面的质量信息, 根据后续研究目标和检测技术的不同来选择准确的质量评估方案. 此篇综述总结了近年来实验室用于评估分析前过程对样本质量影响的各种质量检测技术和分子靶标. 同时对检测生物标志物和检测方法进行了系统的讨论, 为今后生物样本分析前的质量评估提供建议.

## 1 基于核酸水平的血液样本质量评估技术

血液样本中的核酸分子是临床检测和生物医学研究的重要指标. 随着测序技术的发展, 基因组与转录组学研究已成为基因功能探究、临床分子诊断以及药物筛选的重要手段<sup>[5-6]</sup>. 近年来对血液中的核酸研究主要以结构基因组学与功能基因组学为主, 本篇文章将主要探讨血细胞中的基因组DNA (gDNA)、转录组 (mRNA) 以及血清和血浆中游离的DNA (cfDNA) 和非编码小RNA (miRNA) 在进行研究前质量评估时使用的技术<sup>[7]</sup>.

### 1.1 血细胞中的核酸质量评估方法

gDNA和mRNA主要来源于白细胞, 包括淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞以及单核细胞. 白细胞构成人体免疫系统的首要屏障<sup>[1]</sup>, 因此, 以研究血细胞基因组突变、拷贝数变异以及可遗传修饰改变为主的基因组学和以血细胞基因表达变化为主的转录组学, 为探究免疫相关血液疾病的发生机制提供了有利证据<sup>[8]</sup>. 然而血细胞离体后不恰当的前处理方式可能导致细胞膜破裂, 核酸分子进入离体血液中, 此时血液温度、湿度、pH值以及核酸酶浓度的变化均可加速核酸水解. 因此严格评估血液前处理后的核酸质量成为后续研究的关键. 随着基因组和转录组测序技术的发展, 对于血细胞中核酸在浓度、纯度和片段完整性

上的参数需求越来越明晰. 常用的总核酸浓度检测方法包括紫外分光光度法和荧光光度法, 其中紫外分光光度法只用于测定浓度大于0.25 mg/L的核酸溶液, 而荧光光度法可进行更低浓度的定量分析 (1~5 ng). 紫外光度计检测的260 nm、280 nm、320 nm、230 nm下的吸光度分别代表了核酸、蛋白质、盐离子和有机溶剂, 因此核酸样本的纯度一般使用紫外光谱中 $A_{260/280}$ 、 $A_{260/230}$ 比值检测, 用以判断核酸样本中蛋白质和有机溶剂的污染. 核酸样本的片段完整性一般通过基因扩增后的琼脂糖凝胶电泳进行可视化评估<sup>[9]</sup>. 其中总RNA可采用微流控凝胶电泳技术 (2100生物分析仪) 中的RIN值判断核酸的片段完整性<sup>[1, 5-6]</sup>. 其原理是利用已知片段大小梯度, 生成迁移时间与片段大小的标准曲线, 即可通过不同迁移时间来确定样品的片段大小. 通过样品峰面积对已知浓度的分子质量标准的面积比值来对样品进行定量. 值得指出的是, 2100生物分析仪是通过检测血液RNA中占比最多的核糖体RNA片段完整性来评估RNA的总体降解情况, 但对于mRNA、miRNA等转录组与表观遗传RNA小分子没有特定的检测方式<sup>[1, 10]</sup>.

基于基因组DNA的稳定性, 前处理不利暴露因素对基因组的影响有限, 现有的检测技术基本可以满足基因组学研究的质控. 相较于稳定的DNA双螺旋结构, RNA的单链结构稳定性差、容易降解, 尤其是miRNA等短链长分子, 结构更不稳定, 样本处理过程中的不利因素暴露会对后续研究造成很大影响, 因此样本分析前质量评估尤为重要<sup>[11-12]</sup>. 除必要的浓度、纯度和片段完整性检测外, 血液中mRNA表达量可能随离体细胞残留转录活性而继续上调或下调, 这种因为样本前处理不规范而导致的mRNA表达量变化对转录组学研究也具有一定影响. 欧盟SPIDIA (用于体外诊断的通用分析前工具和程序的标准化和改进) 项目利用基因芯片结合荧光定量技术检测了不同前处理条件下血液中mRNA的质量, 并筛选出4种mRNA分子 (USP32、LMNA、FOSB、TNRFSF10C). 这些分子标志物既在人群中稳定表达, 同时在不同前处理条件下又会规律上调或下调, 因此可作为血液中mRNA分析前质量变化的生物标志物<sup>[13]</sup>.

随着单细胞基因组和转录组测序技术的发展, 科学研究对血液分析前的核酸质量提出了新的需求. 由于细胞破坏后, 可能会导致线粒体或核RNA占比升高 (大量细胞质中mRNA流失, 而线粒体

或核RNA含量基本不变),很有可能会根据这个结果形成一个细胞亚群,导致细胞分群错误.同时细胞损伤可能会伴随RNA的流失,许多基因可能会被认为“下调”而产生错误结论.因此单细胞测序技术要求血液中的细胞数量和活性占比达到检测需求.目前死细胞的鉴别一般通过DNA结合染料排除,利用死细胞膜通透性增大、不破膜情况下DNA染料即可进入的特点区分出死细胞.单细胞分析前样本质量可通过台盼蓝、碘化丙啶(PI)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、7-氨基-放线菌素D(7-AAD)等细胞染料着色死细胞,经流式细胞术鉴定样本中活细胞占比和数量是否满足单细胞测序需求<sup>[14]</sup>.

## 1.2 血清和血浆中的核酸质量评估方法

健康人外周血中的正常cfDNA和miRNA主要来源于血细胞,是细胞坏死、细胞凋亡及炎症反应后释放进入血浆中的<sup>[15]</sup>.因母体的血浆中含有胎儿的cfDNA和miRNA,肿瘤患者的血浆中含有循环肿瘤DNA(ctDNA)和肿瘤细胞释放的miRNA,因此这两种特殊人群的cfDNA和miRNA明显高于正常人,经常用来作为胎儿疾病和肿瘤标志物的研究对象<sup>[16-17]</sup>.

血清是血液离体凝固后的上层清液,其与血浆的区别是不含纤维蛋白原以及凝血因子.血清和血浆中的cfDNA只有170 bp左右,下一代测序技术可通过母体外周血中的cfDNA检测胎儿的21、18、

13对染色体的非整倍性<sup>[18]</sup>.而ctDNA检测技术包括限制性片段长度多态性、直接测序、高分辨率溶解曲线分析、数字PCR、低温变性共扩增PCR等,常用来分析肿瘤潜在生物标志物<sup>[15]</sup>.通过qPCR技术检测DNA中看家基因或稳定出现的某些非编码重复序列,可达到对cDNA定量和片段完整性检测的目的.2014年,研究人员在利用血清cfDNA浓度和完整性作为结直肠癌诊断和预后标志物的研究中,通过qPCR扩增ALU重复序列检测血清中的长(ALU-247 bp)和短(ALU-115 bp)DNA片段,以ALU-115片段浓度作为cfDNA总浓度,ALU-247/ALU-115浓度的比值作为cfDNA完整性值进行统计<sup>[19-20]</sup>.2018年在对子宫内膜癌的分子靶标研究中用了相同的内参基因<sup>[21]</sup>.除此之外,被用作cfDNA总浓度和片段完整性检测的基因还包括LINE 1(-97 bp和-259/-300 bp)<sup>[22-23]</sup>、APP(-67 bp和-180 bp)<sup>[24]</sup>等.2008年有研究者比较了在孕妇cfDNA无创性产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)中经常使用的6种内参基因(HBB、TERT、CAPDH、ALB、ACTB、TRG)分别在孕妇血浆DNA、非孕妇血浆DNA中的含量稳定性,发现这些内参基因在各组中稳定性从高到低依次为TERT、ACTB、ALB、HBB、TRG和CAPDH<sup>[25]</sup>.表1总结了部分文献中用于血液样本中cfDNA质量评估的内参基因<sup>[19-24, 26]</sup>.

Table 1 Reference genes used for cfDNA quality assessment in blood samples

表1 应用于血液样本中cfDNA质量评估的内参基因

检测方式	内参基因	浓度	片段完整性	疾病类型	参考文献
实时荧光定量PCR	ALU	ALU-115	ALU-247/ALU-115	结直肠癌、子宫内膜癌	[17-19]
	LINE1	LINE 1-97	LINE1-300/LINE1-97	淋巴瘤	[20]
	LINE1	LINE 1-97	LINE1-259/LINE1-97	肺癌	[21]
	APP	APP-67 bp	APP-180 bp/APP-67 bp	黑色素瘤	[22]
	L1PA2	L1PA2-99 bp	L1PA2-99 bp/L1PA2-222 bp	无	[24]

最新研究表明,血清和血浆中miRNA谱图的差异主要来源于细胞污染.因此血清和血浆中细胞含量最小化是miRNA作为生物标志物研究的质量前提<sup>[27]</sup>.外周血miRNA的定性检测可以采用miRNA芯片技术,检测结果可与Sanger miRBase数据库进行比对来评估血清或血浆中miRNA的总体质量(<http://www.mirbase.org/>).进一步的定量检测目前主要借助于实时荧光RT-PCR技术,利用

Taqman探针法可以实时检测血液样本中特定miRNA的量<sup>[16]</sup>.血液中miRNA的分析前质量可利用稳定表达的内参评估.表2中列出了常用于内参的miRNA.为了识别可能存在细胞污染的样本,2012年爱思唯尔公司开发了一个基于全基因组锁定核酸(LNA(TM))的miRNA qPCR平台,鉴定了血清和血浆样本中最常见的119个miRNAs,并给出血清/血浆中miRNA表达正常参考范围的平

均 Cq 值<sup>TM</sup>. 该研究还指出红细胞特异性 miR-451 和 miR-23a 的相对表达可作为血液样本溶血的指标<sup>[27]</sup>. 其他研究相继证明 miR-486-5p、miR-451、

miR-92a 和 miR-16 在红细胞中富集, 其含量可反映样本的溶血情况<sup>[28-33]</sup>.

Table 2 Reference miRNAs used for quality assessment in blood samples

表2 应用于血液样本中miRNA质量评估的内参基因

检测方式	内参miRNA	样本类型	疾病类型	参考文献
实时荧光定量PCR	let-7a	血清	肝癌	[26-27]
	snRNA u6	血清	肠癌、肝癌、胰腺癌	[26-27, 29-30]
	miR-221	血清	肝癌	[26, 29]
	miR-26a	血清	肠癌、肝癌	[26-27, 29]
	miR-16	血浆	乳腺癌、胃癌	[28, 31]

## 2 基于代谢水平的血液样本质量评估技术

代谢组学是在后基因组学时代兴起的一门跨领域学科, 其主要目标是定量地研究生命体因外界刺激、病理生理变化以及本身基因突变而产生的体内代谢物水平的多元动态反应. 血浆和血清都是含有代谢物和大分子的水溶液, 包括蛋白质、脂质和脂蛋白, 会因机体功能紊乱或病理状态而改变. 因此, 这两种血液成分都是代谢组学研究的首选生物流体. 然而代谢组学的一个重大挑战是生物标本的复杂多样性. 许多研究人员在生物标志物的发现过程中主要关注仪器对实验结果的影响, 而忽略了样本本身存在的差异<sup>[34]</sup>. 研究表明分离细胞后代谢物的稳定性仍能被血清和血浆残留的酶或者其他蛋白质所影响. 分析前变量敏感的代谢物, 包括血清素、次黄嘌呤、牛磺酸、谷氨酰胺和谷氨酸、葡萄糖、乳酸、含硫氨基酸、蔗糖酸、麦芽糖、S1P 胆固醇代谢物、甘油三酯 (triglyceride, TG)、磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholines, PCS)、溶血卵磷脂 (lysophosphatidylcholines, LPCS) 和儿茶酚胺类、类花生酸类物质等都具有高度可变性, 因此, 这些化合物在被认为是疾病候选标志物之前应该认真评估<sup>[35]</sup>. 最常见的代谢组学分析方法是质谱 (MS) 和核磁共振 (NMR) 光谱. 质谱技术又分为液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 和气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS)<sup>[36]</sup>. 血清代谢组数据库中提供了在人体血清中检测到的代谢物的完整列表 (<http://www.serummetabolome.ca/>)<sup>[37-39]</sup>, 目前含有 25 373 种可检测的代谢物, 其中大部分是内源性分子 (23 916 内源性和 3 380 外源性, 有些代谢物是共同的). 数据库中已有可观察和量化的代谢分子可作

为血液质量评估的标准.

LC-MS 技术的应用范围包括非靶向代谢组学、靶向代谢组学、非靶向脂质组学和靶向脂质组学. 常用于氨基酸、糖类、醇类、有机酸、胺类、三羧酸循环中间体等水溶性小分子以及脂质大分子的靶向和非靶向分析. 2013 年, Yin 等<sup>[40]</sup> 应用超高压液相色谱-质谱联用技术 (UHPLC-MS) 驱动的非靶向代谢组学来反映样品处理条件对血液中代谢小分子的影响, 并提出代谢小分子可作为血液质量生物标志物的假设. 2018 年研究人员使用 UHPLC-MS 定量检测和验证这些生物标志物, 发现次黄嘌呤 (hypoxanthine) 以及鞘胺醇磷酸 (sphingosine-1-phosphate) 的相对含量可判定血样采集过程中是否有因过长时间的室温暴露导致的样本质量问题. 研究人员扩大样本量进一步严格验证了 S1P-d18 : 2 作为标志物的有效性、稳定性和普适性, 在普适性检测中研究排除了重大疾病和剧烈运动对该代谢小分子在血液中变化的影响<sup>[41]</sup>. GC-MS 技术常用于水溶性代谢物 (需要衍生化)、部分脂类和有机酸的靶向分析. 2016 年 Trezzi 等<sup>[42]</sup> 在利用 GC-MS 检测样品处理条件对血液中代谢小分子的影响时发现, 抗坏血酸和乳酸含量的比值 (LaCaScore) 可以作为血液质量参数来衡量样本前处理的质量, 但应避免在乳酸产量高的样本中使用, 例如跑完马拉松的受试者. 同年 Malm 等<sup>[36]</sup> 利用相同技术发现乳酸和葡萄糖含量的比值可以作为鉴别离心延迟时间的样品质量标志物.

核磁共振波谱法 (NMR spectroscopy) 常用于简单样品或纯化样品的物质鉴定和分析. SPIDIA 和 SPIDIA4P 相关研究表明, 生物流体的核磁共振波谱是评估血液样品质量的一种快速可靠的方法. 它

通过在规定的色谱范围内积分相应的信号区域, 计算不同光谱中各种代谢物的相对浓度, 并利用纯有机化合物的核磁共振波谱库、人类代谢组数据库 (HMDB) 等公共数据库进行信号识别 (www.hmdb.ca), 最终利用 AMIX 软件 (Bruker BioSpin srl) 对现有核磁共振数据与数据库进行匹配. 比对结果可使用非参数 Wilcoxon-Mann-Whitney 检验评估代谢物浓度变化的显著性. 数据库中显示, 血清/血浆代谢组的核磁共振可检测约 50 种主要化合物, 用以进行血液代谢物的质量比对<sup>[43]</sup>.

人体血液中还富含化学性质不同的类脂, 主要是脂肪酸、胆固醇和甘油三酯, 这些都是潜在的生物标志物. 在对脂质组分的研究中, Bruker-BioSpin 最近发布了用于生物流体中代谢物自动分析的 Bruker-IVDr (B.I.) 工具. 该平台还可对血浆或血清样本进行详细的脂蛋白亚类分析 (B.I.-LISA), 在全自动化的情况下一测量提供 100 多个脂蛋白相关参数, 因此可作为血液中脂质质量评估的新方法<sup>[43]</sup>.

### 3 基于蛋白质水平的血液样本质量评估技术

#### 3.1 血清和血浆中的蛋白质质量评估方法

生物样本库中储存的血浆和血清样本是利用临床蛋白质组学进行体外诊断的主要样本来源, 特别是在肿瘤学领域. 然而研究表明样本前处理造成的体外诊断结果偏差已经超过了组学研究差异<sup>[44]</sup>. 例如 2007 年美国健康与营养调查 (NHANES III) 在对 6 226 例血清样本中类胰岛素生长因子 (IGF) 的研究中发现, 样本前处理不同导致的 IGF 差异直接影响了其在肿瘤中作用的研究<sup>[45-46]</sup>. 因此, 进行蛋白质组学研究时不能忽略生物样本质量的重要性<sup>[47]</sup>. 血液中含有不同种类的蛋白酶, 其中多数来自于血液采集过程中血细胞分泌或细胞破碎释放的过程. 这些蛋白酶能够催化大分子质量的蛋白质降解为多肽, 或催化多肽降解为更小的碎片和氨基酸. 这种酶促降解过程的进展与温度和反应时间直接相关. 在一定范围内温度越高, 降解速率越快, 在可降解温度下放置时间越长, 降解越彻底. 这也是为什么血样需要尽量保存在较低温度的主要原因<sup>[48]</sup>. 因此, 血液中能够被蛋白酶催化降解的蛋白质和多肽有可能用来指示血样的环境暴露温度和存储时间的长短<sup>[49]</sup>. 检测血液中蛋白质降解程度需要分离提纯蛋白质并进行定性定量. 美国健康与

营养调查 (NHANES III) 在研究前处理条件对血清中 IGF 的影响时分别采用了酶联免疫和放射免疫技术测定血清中 IGF-1 和 IGFBP-3 的浓度<sup>[46]</sup>. Ayache 等<sup>[50]</sup> 利用酶联免疫吸附测定血浆中 99 种趋化因子和细胞因子随样本存放时间不同而引起的含量变化, 并发现血液在室温放置 2 h 后再处理会导致 37 个细胞因子水平显著升高, 而采血管中的蛋白酶抑制剂对血浆蛋白水平影响不大. 相较于酶联免疫技术, 利用色谱-质谱联用技术可检测种类更多、丰度更低的蛋白质, 且灵敏度高、分析通量高, 可同时进行定性和定量分析. 适用最广的质谱包括电喷雾质谱 (ESI-MS)、基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 和表面增强激光解吸电离/飞行时间质谱 (SELDI-TOF) 等. Govorukhina 等<sup>[51]</sup> 利用 LC-MS (MALDI-MS) 来检测血液凝固时间对血液中蛋白质分子的影响, 结果检测到富亮氨酸  $\alpha_2$  糖蛋白浓度在血液凝固时间超过 1 h 后显著降低, 因此提出该糖蛋白有望作为血液质量检测的生物标志物. 荷兰癌症研究所在利用 SELDI-TOF (2.5~200 ku) 质谱仪检测 10 年间收集的 140 位乳腺癌患者的血清样本时发现  $m/z$  3 089、 $m/z$  3 104、 $m/z$  5 908、 $m/z$  8 939 等 14 个蛋白质碎片峰的强度与样本存储时间相关. 它们随时间增长或呈现先增强后减弱的趋势, 或逐渐减弱, 或先增加后趋于稳定, 因此有望作为样本存储质量的检测标志物<sup>[52]</sup>. 除鉴定可作为血液质量标志物的蛋白质外, 质谱技术还可利用蛋白质谱图的峰数量和峰强度鉴定血液中蛋白质的整体质量. 例如 Timms 等<sup>[48]</sup> 利用离子交换色谱分离并结合 SELDI-TOF 质谱仪检测获得蛋白质谱图, 通过蛋白质谱图峰数量 PCA 主成分分析和计算峰强度  $P$  值获得不同前处理条件对蛋白质降解的影响, 并说明室温运输和长时间放置是操作过程中对血液质量影响最大的因素.

#### 3.2 血清和血浆中的多肽小分子质量评估方法

相对来说, 血液中的多肽比完整蛋白质更容易受蛋白酶的影响. 因为完整的蛋白质往往具有复杂的三维结构, 在未显著变性的情况下, 被酶解的速率较低, 而分子质量较小、结构简单的多肽链 (500~4 000 u) 则对酶解反应敏感得多<sup>[53]</sup>. BD 公司研究人员对血浆和血清中多肽组分的研究证实了这一观点: 血浆和血清中的多肽组分有显著性差异. 这是由于抗凝剂抑制了部分内源蛋白酶的活性. 因此加入蛋白酶抑制剂可以显著降低多肽降解

速率<sup>[53]</sup>. 同时该研究还发现血浆样本中的多肽片段随样本放置时间呈现多步反应、逐级降解现象. 因此他们提出, 通过体外加入同位素标记多肽(如FPA)来模拟内源性多肽的降解情况, 进而根据血液中FPA的酶解产物浓度来确定血液质量<sup>[54]</sup>. 同样, 在2013年, Findeisen等<sup>[55]</sup>通过在血液中加入一定浓度人工合成的标准肽(reporter peptide), 根据标准肽降解各时间段的中间产物以及不同阶段各产物色谱峰面积的比值来作为血液前处理的质量标志物. 目前, 无论采用内源性多肽还是外源加入标准肽作为血液质量标志物, 均需分离提纯多肽并进行降解产物定量检测. 分离提纯多肽常用技术包括利用孔径合适的滤膜(如Microcon YM-3)过滤大蛋白<sup>[53-54]</sup>、介孔纳米材料富集<sup>[56-57]</sup>、反相色谱分离(如C18)<sup>[53, 58]</sup>以及具有多肽亲和力的磁珠抓取<sup>[58-60]</sup>等. 多肽的靶向鉴定可用免疫亲和分析(例如ELISA)或LC-ESI-MS等; 多肽的非靶向分析常用MALDI-TOF(1 000~10 000 u)或ESI质谱仪等. 2010年研究人员利用HPLC与nanoLC-Q-TOF TANDEM 质谱联用技术检测血清中多肽质量, 将载脂蛋白A-IV、补体C3片段、转甲状腺素与不同载脂蛋白的氧化亚型等多肽分子作为血液质量评估的候选标志物<sup>[61]</sup>. 除鉴定可作为血液质量标志物的多肽外, 有研究人员利用血液中普遍存在的特征多肽同位素分布平均值半自动化筛选低质量多肽图谱, 从而剔除低质量血液样本<sup>[62]</sup>.

#### 4 总结与展望

综上所述, 良好的生物样本质量是获得可靠研究成果的前提, 严格控制样本分析前变量可有效提高样本质量. 利用有效的质控检测方法和特定的生物标志物作为血液质量指标可有效评估血液离体后的质量变化情况, 进而在样本分析前剔除低质量样本. 目前以全血和血细胞样本中核酸作为研究对象的组学分析, 其样本质量检测技术主要用于评估DNA和总RNA浓度、纯度和片段完整性, 对于mRNA暂无明确的质控靶标分子. 以血清和血浆样本中的核酸作为分子靶标的分析, 其样本质量检测技术主要用于评估细胞来源的核酸污染. 对于血清和血浆样本中结构更为复杂的代谢小分子、蛋白质以及多肽片段, 目前有效的质量检测手段多采用分离纯化技术与质谱联用和核磁共振技术来获取样本分子组成信息. 目前已发现一些分子可作为潜在标志物检测分析前变量对样本整体质量的影响. 然而

这些分子作为标志物的可靠性、稳定性和准确性仍需验证, 同时抗体结合和质谱检测技术成本高, 无法满足大部分实验室对于样本质量检测的需求, 因此需要寻找可靠的质量标志物、开发新的检测手段, 来降低血液质量评估成本, 顺利完成代谢小分子、蛋白质以及多肽片段的质量检测.

#### 参 考 文 献

- [1] Shabihkhani M, Lucey G M, Wei B, *et al.* The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clinical Biochemistry*, 2014, **47**(4-5): 258-266
- [2] Huang L H, Lin P H, Tsai K W, *et al.* The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One*, 2017, **12**(9): e0184692
- [3] Malentacchi F, Ciniselli C M, Pazzagli M, *et al.* Influence of pre-analytical procedures on genomic DNA integrity in blood samples: The SPIDIA experience. *Clinica Chimica Acta*, 2015, **440**: 205-210
- [4] Malentacchi F, Pizzamiglio S, Ibrahim-Gawel H, *et al.* Second SPIDIA-DNA external quality assessment (EQA): influence of pre-analytical phase of blood samples on genomic DNA quality. *Clinica Chimica Acta*, 2016, **454**: 10-14
- [5] Malentacchi F, Pazzagli M, Simi L, *et al.* SPIDIA-DNA: an external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for DNA-based analyses. *Clinica Chimica Acta*, 2013, **424**: 274-286
- [6] Pazzagli M, Malentacchi F, Simi L, *et al.* SPIDIA-RNA: first external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *Methods*, 2013, **59**(1): 20-31
- [7] 赵晋平, 徐平丽, 孟静静, 等. 从结构基因组学到功能基因组学. *生命科学研究*, 2006(S1): 58-62  
Zhao J P, Xu P L, Meng J J, *et al.* *Life Science Research*, 2006(S1): 58-62
- [8] Dufva O, Pölonen P, Brück O, *et al.* Immunogenomic landscape of hematological malignancies. *Cancer Cell*, 2020, **38**(3): 380-399
- [9] Verderio P, Pizzamiglio S, Ciniselli C M, *et al.* Methodological and statistical issues in developing an External Quality Assessment scheme in laboratory medicine: focus on biomarker research. *New Biotechnology*, 2019, **52**: 54-59
- [10] Stephenson N L, Hornaday K K, Doktorchik C T A, *et al.* Quality assessment of RNA in long-term storage: The All Our Families Biorepository. *Plos One*, 2020, **15**(12): e0242404
- [11] Rodriguez A, Duyvejonck H, Van Belleghem J D, *et al.* Comparison of procedures for RNA-extraction from peripheral blood mononuclear cells. *Plos One*, 2020, **15**(2): e0229423
- [12] 蒋超, 曹日昇, 陈俊娣, 等. 生物样本库中血液样本 microRNA 和 DNA 的检测方法学探讨. *中国医药生物技术*, 2015, **10**(6): 484-488  
Jiang C, Cao R S, Chen J D, *et al.* *Chinese Medicinal*

- Biotechnology, 2015, **10**(6): 484-488
- [13] Zhang H, Korenkova V, Sjoback R, *et al.* Biomarkers for monitoring pre-analytical quality variation of mRNA in blood samples. *Plos One*, 2014, **9**(11): e111644
- [14] Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, *et al.* Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nature Cell Biology*, **22**(1): 38-48
- [15] Messaoudi S E, Rolet F, Mouliere F, *et al.* Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta*, 2013, **424**: 222-230
- [16] 陈荣, 刘光辉, 周总光. 外周血 microRNA 作为肿瘤标志物的研究进展. *中国普外基础与临床杂志*, 2012, **19**(9): 1020-1023  
Chen R, Liu G H, Zhou Z G. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*, 2012, **19**(9): 1020-1023
- [17] Gormally E, Caboux E, Vineis P, *et al.* Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutation Research*, 2007, **635**(2-3): 105-117
- [18] Liu S Y, Huang S J, Chen F, *et al.* Genomic analyses from non-invasive prenatal testing reveal genetic associations, patterns of viral infections, and Chinese population history. *Cell*, 2018, **175**(2): 347-359. e14
- [19] Hao T B, Shi W, Shen X J, *et al.* Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 2014, **111**(8): 1482-1489
- [20] Bedin C, Enzo M V, Bianco P D, *et al.* Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *Journal International of Cancer*, 2017, **140**(8): 1888-1898
- [21] Vizza E, Corrado G, De Angeli M, *et al.* Serum DNA integrity index as a potential molecular biomarker in endometrial cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2018, **37**(1): 16
- [22] Wu J, Tang W, Huang L, *et al.* The analysis of cell-free DNA concentrations and integrity in serum of initial and treated of lymphoma patients. *Clinical Biochemistry*, 2019, **63**: 59-65
- [23] Fan Y, Shi M, Chen S, *et al.* Analysis of serum cfDNA concentration and integrity before and after surgery in patients with lung cancer. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand)*, 2019, **65**(6): 56-63
- [24] Salvianti F, Pinzani P, Verderio P, *et al.* Multiparametric analysis of cell-free DNA in melanoma patients. *Plos One*, 2012, **7**(11): e49843
- [25] Yang Q, Ali H A, Yu S, *et al.* Evaluation and validation of the suitable control genes for quantitative PCR studies in plasma DNA for non-invasive prenatal diagnosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 2014, **34**(6): 1681-1687
- [26] Breitbach S, Tug S, Helmig S, *et al.* Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *Plos One*, 2014, **9**(3): e87838
- [27] Blondal T, Nielsen S J, Baker A, *et al.* Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*, 2013, **59**(1): S1-S6
- [28] Occhipinti G, Giulietti M, Principato G, *et al.* The choice of endogenous controls in exosomal microRNA assessments from biofluids. *Tumour Biology*, 2016, **37**(9): 11657-11665
- [29] Zheng G, Wang H, Zhang X, *et al.* Identification and validation of reference genes for qPCR detection of serum microRNAs in colorectal adenocarcinoma patients. *Plos One*, 2013, **8**(12): 324
- [30] Kumar S, Keerthana R, Pazhanimuthu A, *et al.* Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 2013, **50**(3): 210-214
- [31] Li Y, Xiang G M, Liu L L, *et al.* Assessment of endogenous reference gene suitability for serum exosomal microRNA expression analysis in liver carcinoma resection studies. *Molecular Medicine Reports*, 2015, **12**(3): 4683-4691
- [32] Stabile L P, Lyker J S, Huang L, *et al.* Inhibition of human non-small cell lung tumors by a c-Met antisense/U6 expression plasmid strategy. *Gene Therapy*, 2004, **11**(3): 325-335
- [33] Song J, Bai Z, Han W, *et al.* Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Digestive Diseases & Sciences*, 2011, **57**(4): 897-904
- [34] Stevens V L, Hoover E, Wang Y, *et al.* Pre-analytical factors that affect metabolite stability in human Urine, plasma, and serum: a review. *Metabolites*, 2019, **9**(8): 156
- [35] Hernandez V V, Barbas C, Dudzik D. A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. *Electrophoresis*, 2017, **38**(18): 2232-2241
- [36] Malm L, Tybring G, Morritz T, *et al.* Metabolomic quality assessment of EDTA plasma and serum samples. *Biopreservation & Biobanking*, 2016, **14**(5): 416-623
- [37] Wishart D S, Feunang Y D, Marcu A, *et al.* HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 2018, **46**(D1): D608-D617
- [38] Wishart D S, Jewison T, Guo A C, *et al.* HMDB 3.0-the human metabolome database in 2013. *Nucleic Acids Research*, 2013, **41**(D1): D801-D807
- [39] Wishart D S, Tzur D, Knox C, *et al.* HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Research*, 2007, **35**(Database issue): D521-D526
- [40] Yin P, Peter A, Franken H, *et al.* Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clinical Chemistry*, 2013, **59**(5): 833-845
- [41] Liu X, Hoene M, Yin P, *et al.* Quality control of serum and plasma by quantification of (4E, 14Z)-sphingadienine-C18-1-phosphate uncovers common preanalytical errors during handling of whole blood. *Clinical Chemistry*, 2018, **64**(5): 810-819
- [42] Trezzi J P, Bulla A, Bellora C, *et al.* LacaScore: a novel plasma sample quality control tool based on ascorbic acid and lactic acid levels. *Metabolomics*, 2016, **12**: 96
- [43] Ghini V, Quaglio D, Luchinat C, *et al.* NMR for sample quality assessment in metabolomics. *New Biotechnology*, 2019, **52**: 25-34

- [44] Karsan A, Eigel B J, Flibotte S, *et al.* Analytical and preanalytical biases in serum proteomic pattern analysis for breast cancer diagnosis. *Clinical Chemistry*, 2005, **51**(8): 1525-1528
- [45] Rai A J, Vitzthum F. Effects of preanalytical variables on peptide and protein measurements in human serum and plasma: implications for clinical proteomics. *Expert review of proteomics*, 2006, **3**(4): 409-426
- [46] Berrigan D, Potischman N, Dodd K W, *et al.* Serum levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I binding protein-3: quality control for studies of stored serum. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2007, **16**(5): 1017-1022
- [47] Jackson D H, Banks R E. Banking of clinical samples for proteomic biomarker studies: a consideration of logistical issues with a focus on pre-analytical variation. *Proteomics Clinical Applications*, 2010, **4**(3): 250-270
- [48] Timms J F, Arslan-Low E, Gentry-Maharaj A, *et al.* Preanalytical influence of sample handling on SELDI-TOF serum protein profiles. *Clinical Chemistry*, 2007, **53**(4): 645-656
- [49] Mannisto T, Surcel H M, Bloigu A, *et al.* The effect of freezing, thawing, and short- and long-term storage on serum thyrotropin, thyroid hormones, and thyroid autoantibodies: implications for analyzing samples stored in serum banks. *Clinical Chemistry*, 2007, **53**(11): 1986-1987
- [50] Ayache S, Panelli M, Marincola F M, *et al.* Effects of storage time and exogenous protease inhibitors on plasma protein levels. *American Journal of Clinical Pathology*, 2006, **126**(2): 174-184
- [51] Govorukhina N I, De Vries M, Reijmers T H, *et al.* Influence of clotting time on the protein composition of serum samples based on LC-MS data. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, **877**(13): 1281-1291
- [52] Gast M C W, Van Gils C H, Wessels L F A, *et al.* Influence of sample storage duration on serum protein profiles assessed by surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2009, **47**(6): 694-705
- [53] Yi J, Kim C, Gelfand C A. Inhibition of intrinsic proteolytic activities moderates preanalytical variability and instability of human plasma. *Journal of Proteome Research*, 2007, **6**(5): 1768-1781
- [54] Yi J, Liu Z, Craft D, *et al.* Intrinsic peptidase activity causes a sequential multi-step reaction (SMSR) in digestion of human plasma peptides. *Journal of Proteome Research*, 2008, **7**(12): 5112-5118
- [55] Findeisen P, Thumfart J O, Costina V, *et al.* MS-based monitoring of proteolytic decay of synthetic reporter peptides for quality control of plasma and serum specimens. *American Journal of Clinical Pathology*, 2013, **140**(3): 314-323
- [56] Fan J, Gallagher J W, Wu H J, *et al.* Low molecular weight protein enrichment on mesoporous silica thin films for biomarker discovery. *Journal of Visualized Experiments*, **2012** (62): 3876
- [57] Liang K, Wu H, Hu T Y, *et al.* Mesoporous silica chip: enabled peptide profiling as an effective platform for controlling bio-sample quality and optimizing handling procedure. *Clinical Proteomics*, 2016, **13**: 34
- [58] Girolamo F D, Alessandrini J, Somma P, *et al.* Pre-analytical operating procedures for serum low molecular weight protein profiling. *Journal of Proteomics*, 2010, **73**(3): 667
- [59] Baumann S, Ceglarek U, Fiedler G M, *et al.* Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 2005, **51**(6): 973-980
- [60] West-Nielsen M, Høgdall E V, Marchiori E, *et al.* Sample handling for mass spectrometric proteomic investigations of human sera. *Analytical Chemistry*, 2005, **77**(16): 5114 - 5123
- [61] Pieragostino D, Petrucci F, Boccio P D, *et al.* Pre-analytical factors in clinical proteomics investigations: impact of *ex vivo* protein modifications for multiple sclerosis biomarker discovery. *Journal of Proteomics*, 2010, **73**(3): 579-592
- [62] Nicolardi S, Palmlad M, Dalebout H, *et al.* Quality control based on isotopic distributions for high-throughput MALDI-TOF and MALDI-FTICR serum peptide profiling. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010, **21**(9): 1515-1525

## Quality Assessment for The Blood Samples\*

SUN Qing, LIANG Kai, LI Yan\*\*

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** Biological samples play essential roles in biomedical studies, especially in “-omics” analyses. Recently, researchers have found that preanalytical effects and storage duration have direct effects on molecular biology-based procedures. The lack of guidelines for the collection, transport, and storage of samples could lead to the degradation of target molecules such as DNA, RNA, and proteins. These may also lead to inaccurate results in research laboratories. Therefore, sample quality should be assessed at the nucleic acid, metabolite, and protein levels depending on sample components, research objectives, and detection technologies. This review describes the specific biomarkers and proper tools for monitoring the quality of human blood in clinical laboratories. Genomic DNA (gDNA), messenger RNA (mRNA), cell-free DNA (cfDNA), and small noncoding RNA (miRNA) are the main nucleic-acid components of blood samples used in research. This review summarizes the techniques used for the purification, yield analysis, and integrity analysis of gDNA and total RNA, including UV spectrophotometric analysis, qubit fluorometric quantification, and agarose gel electrophoresis. The internal reference genes used in cfDNA and miRNA quality control are also listed. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of reference genes is commonly conducted, and the results reflect the quantity and fragment integrity of cfDNA and miRNA. However, no effective markers have been used for mRNA quality control. Therefore, the development of effective biomarkers is required for quantifying mRNA and small RNA molecules. Moreover, effective markers can be used for detecting changes in mRNA expression levels *in vitro*. Regarding metabolism, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is the most common analytical method for the study of small metabolic molecules in blood. Matching between the available NMR data and reference databases can be applied to assess significant changes in metabolites and to evaluate blood sample quality. In addition, both metabolites and proteins can be quantified through mass spectrometry (MS). Typically, they are first enriched through affinity interactions (*e.g.*, chromatography, immunoaffinity, and magnetic approaches) and then quantified through MS. This review summarizes the metabolites, proteins, and peptides identified by MS as biomarkers for blood quality control. However, their accuracy and effectiveness have not been widely recognized. Because various techniques have been used and a series of markers have been identified, the stability and accuracy of these molecules still need to be verified for quality control. Moreover, due to the high cost of MS, these techniques are not widely used in laboratories. Therefore, in the future, new quality control parameters should be identified for blood sample assessment.

**Key words** blood sample, quality control, nucleic acid, metabolite, protein, peptide

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0375

---

\* This work was supported by grants from Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDB38010000), The National Natural Science Foundation of China (21705160), and Biological Resources Program, Chinese Academy of Sciences (KFJ-BRP-017-01).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-10-64887212, E-mail: yanli@ibp.ac.cn

Received: January 4, 2021 Accepted: February 23, 2021