

团 体 标 准

T/ZGYCXH XXX—XXXX

人外周血红细胞 PIG-A 基因突变检测方法

Standard for the method of human erythrocyte PIG-A gene mutation

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国遗传学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国遗传学会提出并归口。

本文件起草单位：上海交通大学公共卫生学院、江苏鼎泰药物研究（集团）股份有限公司、中国食品药品检定研究院、上海益诺思生物技术股份有限公司、复旦大学。（以上单位排名不分先后）

本文件主要起草人：曹易懿、霍艳、文海若、周长慧、卢大儒、陆冬梅、栾洋、奚晶。

引 言

全球癌症负担持续加重，肿瘤发病率呈逐年上升趋势，对人群健康构成严重威胁。为构建更高效的健康监护体系，健康风险评估的研究方向已逐步转向挖掘早期、灵敏且以非疾病/非癌症为检测终点的特异性生物标志物，进而制定科学合理的疾病预防策略。其中，遗传损伤效应标志作为预测肿瘤发生的早期生物标志物，可为人群健康风险评估及疾病的早发现、早诊断、早治疗提供重要的科学依据。

磷脂酰肌醇聚糖A（Phosphatidyl inositol glycan class A，啮齿类动物*Pig-a*，人*PIG-A*）基因是糖基磷脂酰肌醇（Glycosylphosphatidylinositol，GPI）锚的管家基因，位于X染色体短臂（Xp22），GPI锚的作用是将多种细胞表面抗原锚定在细胞膜上。现有研究表明，至少有30个基因参与GPI锚的生物合成，其中仅*PIG-A*基因位于X染色体，且*PIG-A*与*PIG-C*、*PIG-H*等7个基因共同参与GPI锚生物合成的第一步。理论上，参与GPI锚合成的任意一个基因发生突变都可能导致GPI锚缺陷，但其余相关基因均位于常染色体，需两个等位基因同时发生突变才能导致GPI锚缺陷，此类情况较为罕见。由于男性仅有1条X染色体，女性的2条X染色体中存在1条随机失活的现象，因此位于X染色体的*PIG-A*基因，其唯一有活性的等位基因突变后即可导致GPI锚缺陷和细胞表面相应抗原缺失，且携带*PIG-A*基因突变的细胞能够正常存活，呈中性生长趋势，不会被机体清除。基于这一特性，当致突变物作用于基因组时，癌基因、抑癌基因等关键基因与*PIG-A*基因会同时被诱发突变，因此*PIG-A*基因可作为“报告基因”，通过检测细胞表面抗原缺失这一表型改变，统计发生突变的细胞数量，进而计算发生*PIG-A*基因突变细胞的频率，以此反映机体的遗传损伤水平。

人外周血红细胞*PIG-A*基因突变作为一种新兴的生物标志物，已在职业人群健康监测、药物治疗个体化评估等领域展现出良好的应用潜力。然而，要确保该检测方法的科学性与可靠性，建立标准化的操作程序及规范体系尤为关键。通过统一试验方法、规范实验条件，可显著提升实验室间检测数据的可靠性与可比性，有效降低因方法学差异导致的假阳性、假阴性结果发生率，为该标志物的广泛应用奠定基础。

本文件规范了人外周血红细胞*PIG-A*基因突变检测方法，涵盖样本采集与处理、*PIG-A*基因突变频率检测及质量控制等关键环节，为科研人员提供科学、规范的操作指引。该标准化方法具有经济高效、结果稳定可靠的技术优势，其推广应用将显著提升人外周血红细胞*PIG-A*基因突变检测的操作规范性与结果可比性，对推动该检测方法在生物医药、公共卫生等领域的深入应用，完善人群健康风险评估体系具有重要的实践意义。

人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变检测方法

1 范围

本标准规定了人外周血红细胞*PIG-A*基因突变检测方法的伦理要求、设备、耗材和试剂、操作步骤和质量控制等要求。

本标准适用于科学研究中检测人外周血红细胞*PIG-A*基因发生突变的频率。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过规范性引用构成本文件的必不可少条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB 19489—2008 实验室 生物安全通用要求

GB/T 38576-2020 人类血液样本采集与处理

YY/T 0588-2017 流式细胞仪

3 标准。术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

***PIG-A* 基因** *PIG-A gene*

磷脂酰肌醇聚糖A基因,是糖基磷脂酰肌醇锚的管家基因。

3.2

孵育 *incubation*

指在特定的环境条件下，使血液样本与抗体混合物共同作用的过程。

3.3

设门 *gating*

流式细胞仪的细胞分布图中划定某一区域的细胞群体，并对其进行单独分析。设门的目的是从复杂的细胞样本中筛选出具有特定特征的细胞亚群，以便更准确地进行后续分析。

3.4

外周血 *peripheral blood*

被造血器官释放入循环系统参与循环的血。

注：外周血区别于造血器官内的未成熟的血细胞或未被释放入循环的血细胞。通常指肘部曲侧静脉血液，有时也可为指端、耳垂血液。

4 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本文件。

D-PBS: Dulbecco's磷酸盐缓冲溶液 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

K₂-EDTA: 乙二胺四乙酸二钾 (Ethylenedinitrilotetraacetic acid dipotassium salt)

RBC: 红细胞 (Red blood cell)

RET: 网织红细胞 (Reticulocyte)

5 伦理要求

人的血液样本获取必须遵守政府法律和所有相关机构的规定，在试验前应获得受试者的知情同意，并仅可在已通过项目伦理审查的医院、高校、科研机构和企业进行。

6 设备、耗材和试剂

6.1 主要和辅助设备

- 6.1.1 生物安全柜；
- 6.1.2 低温水平式离心机；
- 6.1.3 涡旋振荡器；
- 6.1.4 流式细胞仪（具有蓝色激光器 488 nm 和红色激光器 633/635 nm）；
- 6.1.5 移液器，规格为 2.5 μL 、10 μL 、20 μL 、200 μL 和 1000 μL ，或者其他合适的规格。

6.2 主要耗材

- 6.2.1 离心管：规格为 1.5 mL 的 EP 管和 15 mL，或者其他合适的规格；
- 6.2.2 吸头，规格为 10 μL 、200 μL 和 1000 μL ；
- 6.2.3 流式细胞仪上样管：根据仪器匹配合适的上样管。

6.3 主要试剂

6.3.1 血液抗凝剂

使用市售的 $\text{K}_2\text{-EDTA}$ 抗凝管，或在 0.9% 的生理盐水中添加 $\text{K}_2\text{-EDTA}$ ，配制为 12 mg/mL 的工作液，配制后可于 0 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 的低温环境中保存 1 个月。

6.3.2 *PIG-A* 突变频率检测样本的抗体

在 D-PBS 中加入以下抗体，配制后的各添加抗体如表 2 中的所示。

表1 *PIG-A* 突变频率检测样本的抗体组分及相应工作体积

添加试剂	工作体积 ^a
D-PBS	200 μL
FITC Mouse Anti-Human CD59 抗体	20 μL
10 倍稀释后 APC Mouse Anti-Human CD235a 抗体	2.5 μL
$\text{K}_2\text{-EDTA}$ 抗凝的全血	3 μL

^a以配制1个样本所需抗体量为例。抗体用量以BD产品为例，不同品牌可按说明书调整。进行操作当天，根据实际样本数量按比例进行配制。
^b使用前先用D-PBS进行10倍稀释，需现用现配。

6.3.3 RET%检测样本孵育的抗体

在 D-PBS 中加入以下抗体，配制后的各添加抗体如表 3 中的所示。

表2 RET%检测样本的抗体组分及相应工作体积

添加试剂	工作体积
D-PBS	200 μL
PE Mouse Anti-Human CD71 抗体	20 μL
10 倍稀释后 APC Mouse Anti-Human CD235a 抗体	2.5 μL

K ₂ -EDTA 抗凝的全血	3 μL
^a 以配制1个样本所需抗体量为例。抗体用量以BD产品为例，不同品牌可按说明书调整。进行操作当天，根据实际样本数量按比例进行配制。 ^b 使用前先用D-PBS进行10倍稀释，需用现配。	

6.3.4 用于圈定目标细胞群样本的抗体

表3 用于圈定目标细胞群样本抗体组分及相应工作体积

	添加试剂	工作体积
1. Blank 管（空白管）	D-PBS	200 μL
2. CD235a 抗体单阳管	D-PBS	200 μL
	10 倍稀释后 APC Mouse Anti-Human CD235a 抗体	2.5 μL
3. CD59 抗体单阳管	D-PBS	200 μL
	FITC Mouse Anti-Human CD59 抗体	20 μL
4. CD71 抗体单阳管	D-PBS	200 μL
	PE Mouse Anti-Human CD71 抗体	20 μL
上述1-4号管配制完成后，分别都加入3 μL用K ₂ -EDTA抗凝的全血。 ^a 使用前先用D-PBS进行10倍稀释，需用现配。		

6.3.5 其他试剂：

流式细胞仪上样检测用的缓冲液：D-PBS 含 10%的 16% methanol-free formaldehyde 溶液。

7 操作步骤

7.1 血样采集

本试验仅需采集 3 μL 全血即可满足检测要求，通常使用指端末梢采血法或静脉采血法。

7.1.1 指尖末梢采血方法：使用含 0.9%的氯化钠生理盐水配制 12 mg/mL 的 K₂-EDTA 溶液或使用市售的含 K₂-EDTA 抗凝剂的试管。取 2 μL 的 K₂-EDTA 溶液加入到 EP 管底部。用酒精棉球消毒手指腹，等待酒精干燥后，使用一次性末梢采血针按压指腹采血。吸取 18 μL 的血液加入到 EP 管中（K₂-EDTA 溶液和血液的体积比为 1: 9），并与预先加在底部的 K₂-EDTA 溶液反复吹吸几次，使其充分混匀，但应该要避免吹吸过程中产生较多气泡。根据实验设计需求，若需要更多体积的血液，则按比例相应增加 K₂-EDTA 溶液体积和采集的血量。若有吹吸过程中出现较多气泡或有血液黏附分散在 EP 管的侧壁，则需要更换新的移液器吸嘴，使用移液器小心地将血液转移到另外一个新的 EP 管底部。

7.1.2 静脉采血方法：通常经肘静脉采血并将血样收集于含 K₂-EDTA 抗凝剂的静脉真空采血管内，充分混匀后取适量的血液转移至 EP 管保存。

7.2 血液运输与保存

血液样本需低温运输到实验室，运输过程中样本储存管应置于 0 °C~8 °C 的低温环境中（如，在冰箱或在冰盒内临时保存），并在 5 天内完成检测。如样本出现肉眼可见的溶血则无法使用。吸取血样时，不应吸取黏附在管壁的半干涸的液体。

7.3 样本抗体孵育

7.3.1 按 6.3 部分配制试剂及准备样本孵育的抗体。

7.3.2 所有样本加入 K₂-EDTA 抗凝的全血后，使用涡旋振荡器充分混匀后，放置于室温避光处孵育 1 小时。

7.4 流式细胞仪上机检测

7.4.1 所有样本孵育 1 小时后，再次用涡旋振荡器充分混匀，以 300 g 离心力离心 5 min，充分去除上清液，用手指弹敲 EP 管的底部使得细胞松散不成团。然后，加入 0.5 mL 的流式细胞仪上样检测用的缓冲液，重复吹吸几次，使其充分混匀。将含有样本的 EP 管放置于 0 °C~8 °C 的低温环境中（例如冰盒等容器内），保持样本避光，待流式细胞仪上机检测。

7.4.2 4 个用于圈定目标细胞群的样本设定合适的检测条件，然后再上机测定每个检测样本，设定过程如图 1。

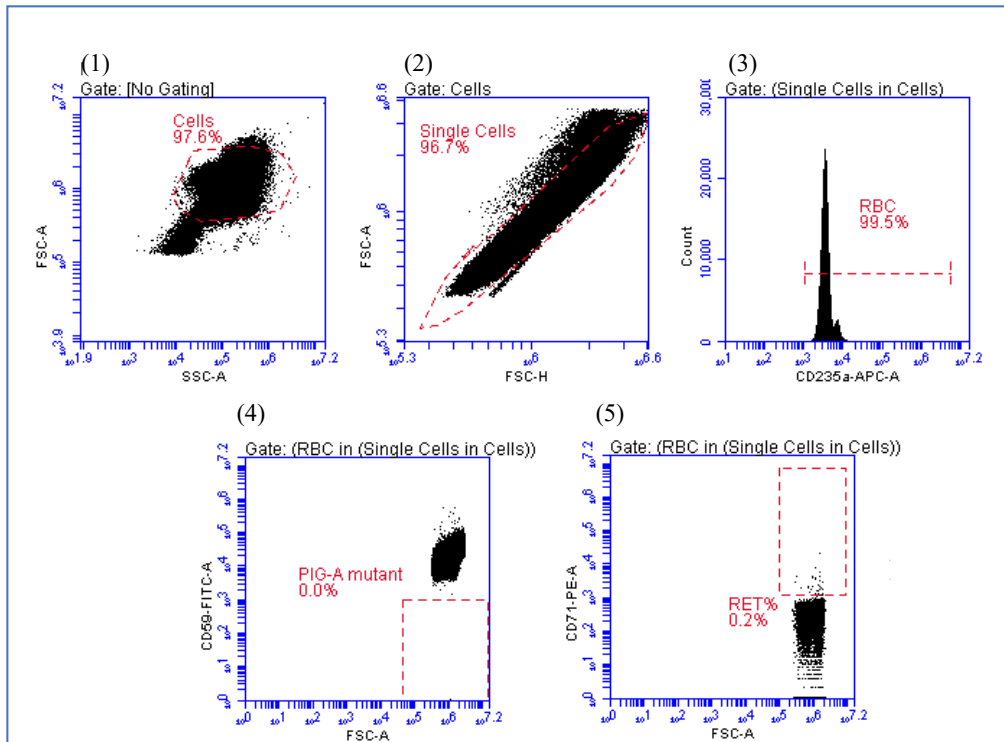


图 1 流式细胞仪检测设门示意图

(1) “FSC-A vs SSC-A”散点图，用于圈定主细胞群“Cells”，用于排除死细胞和细胞碎片。(2) “FSC-A vs FSC-H”散点图，用于圈定单个细胞群“Single Cells”，用于排除黏连的细胞。(3) “CD235a-APC-A”直方图，用于圈定 CD235a 阳性的细胞群“RBC”，即红细胞（包括 RBC 和 RET）。(4) “CD59-FITC-A vs FSC-A”散点图，用于在 RBC 群内圈定 CD59 阴性区域的细胞即“*PIG-A* mutant”突变的细胞，该门内的细胞用于计算 *PIG-A* 突变频率。(5) “CD71-PE-A vs FSC-A”散点图，用于在 RBC 群内圈定 CD71 高表达的细胞即“RET”，该门内的细胞用于计算 RET%。

7.5 数据分析和记录

7.5.1 *PIG-A* 突变率测定：至少检测 1×10^6 个 RBC，测定细胞表面抗原 CD59 缺失的细胞数目，计算 *PIG-A* 突变率。

7.5.2 RET%测定：至少检测 5×10^4 个 RBC，测定高表达 CD71 的 RET 数目，计算 RET%。

8 质量控制

8.1 血液样本加样前应符合 7.2 部分中的要求，否则会引起 *PIG-A* 突变频率升高。

8.2 流式细胞仪使用时应完成仪器的质量控制检测，确保仪器的状态正常。

参考文献

- [1] Cao, Y., Wang, T., Xi, J., Tian, W., Liu, W., Sun, Y., Liu, W., You, X., Li, A., Zhang, G., *et al.* (2023). Benchmark dose estimation for benzene-exposed workers in China: Based on quantitative and multi-endpoint genotoxicity assessments. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 330, 121765.
- [2] Cao, Y., Wang, T., Xi, J., Zhang, G., Wang, T., Liu, W., You, X., Zhang, X., Xia, Z., and Luan, Y. (2020a). PIG-A gene mutation as a genotoxicity biomarker in human population studies: An investigation in lead-exposed workers. *Environmental and molecular mutagenesis*.
- [3] Cao, Y., Wang, X., Liu, W., Feng, N., Xi, J., You, X., Chen, R., Zhang, X., Liu, Z., and Luan, Y. (2020b). The potential application of human PIG-A assay on azathioprine-treated inflammatory bowel disease patients. *Environmental and molecular mutagenesis* 61, 456-464.
- [4] Cao, Y., Xi, J., Tang, C., Yang, Z., Liu, W., You, X., Feng, N., Zhang, X.Y., Wu, J., Yu, Y., *et al.* (2021). PIG-A gene mutation as a genotoxicity biomaker in polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed barbecue workers. *Genes and environment : the official journal of the Japanese Environmental Mutagen Society* 43, 54.
- [5] Cao, Y., Yang, L., Feng, N., Shi, O., Xi, J., You, X., Yin, C., Yang, H., Horibata, K., Honma, M., *et al.* (2016). A population study using the human erythrocyte PIG-A assay. *Environmental and molecular mutagenesis* 57, 605-614.
- [6] Dertinger, S.D., Avlasevich, S.L., Bemis, J.C., Chen, Y., and MacGregor, J.T. (2015). Human erythrocyte PIG-A assay: an easily monitored index of gene mutation requiring low volume blood samples. *Environmental and molecular mutagenesis* 56, 366-377.
- [7] Dobrovolsky, V.N., Elespuru, R.K., Bigger, C.A., Robison, T.W., and Heflich, R.H. (2011). Monitoring humans for somatic mutation in the endogenous PIG-a gene using red blood cells. *Environmental and molecular mutagenesis* 52, 784-794.
- [8] Haboubi, H.N., Lawrence, R.L., Rees, B., Williams, L., Manson, J.M., Al-Mossawi, N., Bodger, O., Griffiths, P., Thornton, C., and Jenkins, G.J. (2019). Developing a blood-based gene mutation assay as a novel biomarker for oesophageal adenocarcinoma. *Scientific reports* 9, 5168.
- [9] Horibata, K., Ukai, A., Ishikawa, S., Sugano, A., and Honma, M. (2016). Monitoring genotoxicity in patients receiving chemotherapy for cancer: application of the PIG-A assay. *Mutation research Genetic toxicology and environmental mutagenesis* 808, 20-26.
- [10] Lawrence, R., Haboubi, H., Williams, L., Doak, S., and Jenkins, G. (2020). Dietary and lifestyle factors effect erythrocyte PIG-A mutant frequency in humans. *Mutagenesis*.
- [11] Xi, J., Cao, Y., Wang, Y., You, X., Liu, W., Wang, T., Yin, J., Ma, J., Wang, Z., Wu, N., *et al.* (2023). PIG-A gene mutation as a mutagenicity biomarker among coke oven workers. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 178, 113872.