

人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变检测方法  
编制说明

上海交通大学公共卫生学院

2026 年 5 月 13 日



# 目 次

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 1. 任务来源.....                    | 1 |
| 2. 标准制订的背景和目的.....              | 1 |
| 3. 标准主要编制过程.....                | 2 |
| 4. 标准编制的基本原则.....               | 2 |
| 5. 研究目标.....                    | 2 |
| 6. 伦理要求.....                    | 3 |
| 7. 样本孵育条件的确定.....               | 3 |
| 7.1 主要添加试剂的确定.....              | 3 |
| 7.2 仪器和耗材.....                  | 5 |
| 8. 实验流程.....                    | 5 |
| 8.1 血样采集.....                   | 5 |
| 8.2 血液运输与保存.....                | 6 |
| 8.3 样本抗体孵育.....                 | 6 |
| 8.4 流式细胞仪上机检测.....              | 6 |
| 8.5 数据分析和记录.....                | 7 |
| 9. 检测方法质量控制.....                | 7 |
| 9.1 血液样本的保存.....                | 7 |
| 9.2 流式细胞仪的质量控制.....             | 7 |
| 9.3 检测结果的解读.....                | 8 |
| 10. 采用国内外标准情况.....              | 8 |
| 11. 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系..... | 8 |
| 12. 重大分歧意见的处理经过和依据.....         | 8 |
| 13. 标准作为团体标准发布的意见.....          | 8 |
| 14. 其他事项说明.....                 | 8 |



# 人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变检测方法

## 编制说明

### 1. 任务来源

为了填补我国毒理学研究领域内用于监测人体体细胞突变水平方法的标准空白，完善人群遗传损伤水平检测技术体系，由上海交通大学公共卫生学院牵头起草制订《人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变检测方法》草案，编制期限为 2026 年 1 月 28 日至 2027 年 1 月 27 日。2025 年 6 月 6 日，向中国遗传学会提交标准立项申请。

### 2. 标准制订的背景和目的

全球癌症负担日益加重，肿瘤发病率逐年升高，癌症已经成为严重威胁我国人群健康的重要公共卫生问题。我国癌症的早期诊断率较低，一部分原因是我国医疗资源的整体水平与发达国家仍存在差距，另一部分原因是仍缺乏早期发现癌症的生物标志与有效的健康监护策略。

现有成熟的生物标志多为以疾病（主要是肿瘤/癌症）为终点开发的效应标志。临床诊断用的肿瘤标志物（如癌胚抗原等）通常在已患病阶段对肿瘤进行辅助诊断，用于提示肿瘤的性质，难以进行疾病的预测。近年来，为了实施更有效的健康监护策略，健康风险评估的趋势已转向寻找更为早期、灵敏、以非疾病/非癌症为终点的特异性生物标志，并以此制定更加科学合理的预防策略。细胞内遗传物质的损伤作为分子起始事件被认为与肿瘤发生密切相关，因此遗传损伤效应标志可作为预测肿瘤发生的早期生物标志，可为人群健康风险评估以及疾病的早发现、早诊断和早治疗提供科学依据。

遗传毒性试验根据检测的遗传学终点可分为三大类：DNA 损伤、染色体损伤和基因突变。由于外周血是较易获取的人体生物样本且采集的时间点较为灵活，可用于长期监测人群的健康风险。因此可用于大样本量人群研究的检测遗传损伤效应的试验多数是基于血液样本建立的。目前可以适用于人群研究的检测遗传损伤效应的试验主要有单细胞凝胶电泳试验和微核试验，上述 2 个试验已经建立相关国标，但尚未有可以检测体细胞突变的标准。

近年来，基于流式细胞术高通量检测开发的磷脂酰肌醇聚糖 A（Phosphatidylinositol glycan class A，啮齿类动物 *Pig-a*，人 *PIG-A*）基因突变试验得到了广泛关注。*PIG-A/Pig-a* 基因是糖基磷脂酰肌醇聚糖（Glycosylphosphatidylinositol, GPI）锚的编码基因。细胞表面存在许多分化抗原（如人 CD59，小鼠 CD24 等），这些抗原通过 GPI 锚连接在细胞表面。在 GPI 锚合成相关的基因中，只有 *PIG-A/Pig-a* 基因位于 X 染色体上。因此，*PIG-A/Pig-a* 基因单次突变即可导致该细胞 GPI 锚缺陷和表面相应抗原缺失。当致突变物作用于基因组时，重要基因（如癌症驱动基因）和 *PIG-A/Pig-a* 基因均会被诱发突变，因此将 *PIG-A/Pig-a* 基因作为一个“报告基因”，通过检测细胞表型（相应表面抗原是否缺失）来考察发生基因突

变的细胞数量，以此计算发生体细胞突变的频率。啮齿类动物红细胞 *Pig-a* 试验经过 10 多年的验证，在 2022 年被经济合作与发展组织（Organization for Economic Co-operation and Development, OECD）纳入可用于评价化学物致突变性的指南。近些年，人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变试验（之后简称：*PIG-A* 试验）也被应用在致癌物暴露人群（环境致癌物暴露、化疗药物治疗）的体细胞突变水平的监测。由于该试验具有耗时短和高通量的优势，因此展现出较好的应用前景。综上所述，将 *PIG-A* 试验标准化后可成为长期监测人群的健康风险的高效工具，并可作为现有遗传毒性测试评价方法的有效补充，为保护我国劳动者健康，预防和控制职业病提供更全面更有效的技术支持。

### 3. 标准主要编制过程

本标准的制定工作过程主要分为以下几个阶段：

#### （一）预研阶段

- 1) 2025 年 1 月-2025 年 5 月，依托上海交通大学公共卫生学院前期方法学研究基础，成立标准起草工作组；系统梳理国内外文献与方法，开展实验验证；确定标准框架、适用范围、关键参数与实验方案；完成标准草案与编制说明初稿。
- 2) 2025 年 6 月，向中国遗传学会提交立项申请。

#### （二）标准制定阶段

- 1) 2025 年 6 月-2026 年 1 月，标准立项，签订合同。根据专家意见修改标准草案，召开起草组研讨会议，形成标准征求意见稿 2 稿。
- 2) 2026 年 2 月-3 月，对技术内容进行研究，并确定各项指标。
- 3) 2026 年 4 月-12 月，组织行业内相关研究机构、高校、企业等进行标准验证，对外进行征求意见，收集行业内专家意见，召开起草组研讨会议，对意见进行处理，形成标准征求意见稿 3 稿。
- 4) 2027 年 1 月，通过中国遗传学会向社会公开征求意见。

### 4. 标准编制的基本原则

本标准的编制依据 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写》，并参照 WS/T 408-2024《定量检验程序分析性能验证指南》。本标准以促进人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变检测方法规范化和标准化为出发点，以技术标准必须具有广泛性、可操作性和适用性为工作目标，参考了现有人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变检测相关的科研文献，通过系统的测试验证，总结出该标准方法的关键环节和参数依据，以满足标准制定的通用性、普适性和先进性要求。

### 5. 研究目标

本标准规定了人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变检测的伦理要求、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的人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变频率的检测。

## 6. 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。

## 7. 样本孵育条件的确定

### 7.1 主要添加试剂的确定

根据大量实验数据及文献调研，确定了最佳添加剂的类别及推荐使用浓度，以确保人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变检测方法的可行性。

#### 7.1.1 血液抗凝剂

在血液采集过程中，使用血液抗凝剂保持红细胞的形态和渗透压，使其维持活性和正常体积。使用市售的乙二胺四乙酸二钾（Ethylenedinitrilotetraacetic acid dipotassium salt, K<sub>2</sub>-EDTA）采血管进行全血采集，或者在采集的血液中按比例加入以下试剂。试剂配制后的各成分终浓度达到表 1 所示的工作浓度。

表 1 血液抗凝剂的成分组成及其相应浓度

| 添加试剂                          | 工作浓度     |
|-------------------------------|----------|
| K <sub>2</sub> -EDTA          | 12 mg/mL |
| 可放置在 0 °C~8 °C 的低温环境中保存 1 个月。 |          |

#### 7.1.2 *PIG-A* 突变频率检测样本的抗体配制

由于红细胞在全血样本中占比非常大，因此对于采集的抗凝全血样本，直接取血液进行抗体孵育，无需分离红细胞。使用 Dulbecco's 磷酸盐缓冲溶液（Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D-PBS）预先配制孵育血液样本的抗体，同时检测多个样本，根据样本数按比例增加配制量。CD235a 抗体用于标记红细胞，包括成熟的红细胞（Red blood cell, RBC）和网织红细胞（Reticulocyte, RET）；CD59 抗体用于标记细胞表面 CD59 抗原的正常细胞，而未标记上的则为 *PIG-A* 突变的细胞。在 D-PBS 中加入以下抗体，配制后的各添加抗体如表 2 所示的工作浓度。

表 2 *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 <sup>a</sup> |
|--|-------------------|
| 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            |
| K <sub>2</sub> -EDTA 抗凝的全血   | 3 μL              |
| <sup>a</sup> 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。<br><sup>b</sup> 使用前先用D-PBS进行10倍稀释，需现用现配。 |                   |

### 7.1.3 RET%检测样本孵育的抗体配制

通常情况下在检测红细胞 *PIG-A* 突变频率的同时会检测 RET%。RET%用于辅助判断人体是否存在造血功能异常等问题，通常情况下 RET%的升高常见于溶血性贫血，急性失血（如消化道出血）的恢复期，骨髓增生活跃或者放化疗病人的恢复期。因此，检测 RET%也可以用来排除在一般人群中自述属于健康状态，但可能存在严重健康隐患的受试者

使用 D-PBS 预先配制孵育血液样本的抗体，同时检测多个样本，根据样本数按比例增加配制量。CD71 抗体用于标记所有红细胞中高表达 CD71 的 RET。在 D-PBS 中加入以下抗体，配制后的各添加抗体如表 3 所示的工作浓度。

表 3 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 <sub>2</sub> -EDTA 抗凝的全血   | 3 μL   |
| <sup>a</sup> 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。<br><sup>b</sup> 使用前先用D-PBS进行10倍稀释，需现用现配。 |        |

### 7.1.4 用于圈定目标细胞群样本的抗体

在流式细胞检测中，设定专门的圈门样本主要目的在于准确界定目标细胞群体，排除背景干扰和非特异性信号，确保数据分析的可靠性和可重复性，因此需要配制相应抗体进行孵育。在 D-PBS 中加入以下抗体，配制后的各添加抗体如表 4 所示的工作浓度。

表 4 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 $\mu$ L |
| 2. CD235a 抗体单阳管  | D-PBS                                  | 200 $\mu$ L |
|  | 10 倍稀释后 APC Mouse Anti-Human CD235a 抗体 | 2.5 $\mu$ L |
| 3. CD59 抗体单阳管  | D-PBS                                  | 200 $\mu$ L |
|  | FITC Mouse Anti-Human CD59 抗体          | 20 $\mu$ L  |
| 4. CD71 抗体单阳管  | D-PBS                                  | 200 $\mu$ L |
|  | PE Mouse Anti-Human CD71 抗体            | 20 $\mu$ L  |
| 上述1-4号管配制完成后，分别都加入3 $\mu$ L用K <sub>2</sub> -EDTA抗凝的全血。 |  |             |
| <sup>a</sup> 使用前先用D-PBS进行10倍稀释，需用现配。                   |  |             |

### 7.1.5 其他试剂

- a) 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。

### 7.2 仪器和耗材

使用较为常规的设备，主要是为了保证操作等过程中的生物安全和样本检测的准确性。对使用的设备和试剂耗材的规格进行了确认。

#### 7.2.1 主要和辅助设备

- a) 生物安全柜；  
 b) 低温水平式离心机；  
 c) 涡旋振荡器；  
 d) 流式细胞仪（具有蓝色激光器 488 nm 和红色激光器 633/635 nm）；  
 e) 移液器，规格为 2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L 和 1000  $\mu$ L，或者其他合适的规格。

#### 7.2.2 主要耗材

- a) 离心管：规格为 1.5 mL 的 EP 管和 15 mL，或者其他合适的规格；  
 b) 吸头：规格为 10  $\mu$ L、200  $\mu$ L 和 1000  $\mu$ L；  
 c) 流式细胞仪上样管：根据仪器匹配合适的上样管。

## 8. 实验流程

本方法将实验流程分为 5 个关键环节，并逐一进行标准化研究，分别为：血样采集、血液运输与保存、样本抗体孵育、流式细胞仪上机检测、数据分析和记录。我们对这 5 个关键流程逐一分析了可能对红细胞 *PIG-A* 突变频率检测产生影响的步骤，并对其进行标准化，以提高检测准确性，达到标准化目的。

### 8.1 血样采集

单个样本通常需要约 10  $\mu\text{L}$  的全血即可满足检测需求。在实验室内获得少量血液样本通常使用指尖末梢采血方法, 在受试者健康体检等其他情况条件下获得的血液样本一般可采用静脉采血方法。采集的血液需使用抗凝剂进行保存。

a) 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  $\text{K}_2\text{-EDTA}$  溶液。取 2  $\mu\text{L}$  的  $\text{K}_2\text{-EDTA}$  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。若酒精未干燥就采血, 由于采集的血液量较少, 其中一部分血液就容易发生溶血。吸取 18  $\mu\text{L}$  的血液加入到 EP 管中 ( $\text{K}_2\text{-EDTA}$  溶液和血液的体积比为 1: 9), 并与预先加在底部的  $\text{K}_2\text{-EDTA}$  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  $\text{K}_2\text{-EDTA}$  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。这是由于粘附在管壁的血液容易干涸, 若检测时候取了这些血液容易发生假阳性的结果。

b) 静脉采血方法: 一般可直接通过肘静脉采血获得, 收集在  $\text{K}_2\text{-EDTA}$  静脉真空血常规采血管内, 充分混匀后取适量的血液转移到 EP 管中保存。

## 8.2 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  $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  的低温环境中 (例如冰盒等容器内), 宜在 24 小时内运送至实验室。置于  $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  的低温环境中血液样本需在 5 天内完成检测。使用时, 发现血液发生溶血则不应使用。吸取血液的时候, 不要吸取黏附在管壁的半干涸的液体。

## 8.3 样本抗体孵育

血液样本按 7 部分配制试剂及准备样本孵育的抗体。因多数抗体具光敏性, 易发生光漂白导致荧光信号减弱, 因此当所有样本加入  $\text{K}_2\text{-EDTA}$  抗凝的全血, 使用涡旋振荡器充分混匀后, 需放置于室温避光处孵育 1 小时。

## 8.4 流式细胞仪上机检测

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  $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  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。

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 (示意图, 各品牌流式细胞仪软件界面会有所不同)。

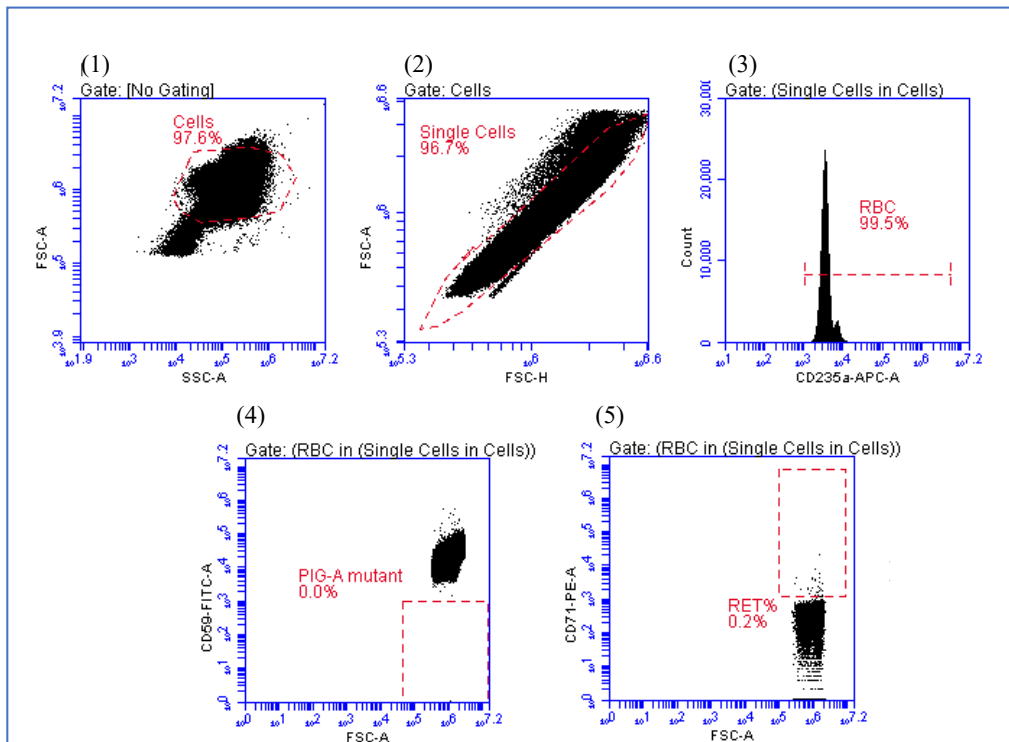


图 1 流式细胞仪检测设门示意图

(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%。

## 8.5 数据分析和记录

根据现有文献和前期实验数据：

a) *PIG-A* 突变率测定：至少检测  $1 \times 10^6$  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。

b) RET%测定：至少检测  $5 \times 10^4$  个 RBC，测定高表达 CD71 的 RET 数目，计算 RET%。

## 9. 检测方法质量控制

### 9.1 血液样本的保存

血液样本加样前需确保符合 8.2 中的要求，否则会引起 *PIG-A* 突变频率升高。

### 9.2 流式细胞仪的质量控制

流式细胞仪使用时需完成仪器的质量控制检测，确保仪器的状态正常。

### 9.3 检测结果的解读

根据现有文献和前期实验数据，本检测方法获得的 *PIG-A* 突变频率正常范围参考值  $0\sim 10\times 10^{-6}$ ；RET%正常范围参考值  $0\sim 0.5\%$ 。如果在检测中发现样本异常升高（如，*PIG-A* 突变频率大于  $200\times 10^{-6}$ ）则需考虑是否样本存在溶血情况。若排除血液样本保存质量的问题，重复测定结果仍异常升高，则提示受试者可能存在血液系统疾病（如，阵发性睡眠性血红蛋白尿症）。

### 10. 采用国内外标准情况

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。

本标准自主研制，无直接对应的国家/行业/国际同类标准，技术体系接轨 OECD 啮齿类 *Pig-a* 指南并完成人群应用转化。

### 11. 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准符合现行法律、法规和强制性标准的规定。

### 12. 重大分歧意见的处理经过和依据

标准研制过程无重大技术分歧，所有意见均经工作组审议与实验验证后统一处理。

### 13. 标准作为团体标准发布的意见

我国目前尚无人外周血红细胞 *PIG-A* 基因突变检测方法的国家/行业等标准，建议本标准以中国遗传学会团体推荐性标准发布，在遗传毒理、肿瘤预防、职业健康、环境监测等的科学研究领域推广，并逐步推动升级为行业/国家标准。

### 14. 其他事项说明

无其他需要说明的事项。