ICS 11.100.10
CCS C44

中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测核酸方法通则

General rules of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for nucleic acid detection methods

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

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

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　发布

目　　录

前　　言……II
1 范围……1
2 规范性引用文件……1
3 术语和定义……1
4 略缩语……1
5 方法开发……2
5.1 检测方法原理……2
5.2 检测方法开发……2
5.3 检测程序……2
6 性能验证……3
6.1 检测仪器性能……3
6.2 检测试剂性能……3
7 结果解读……3
7.1 检测数据……3
7.2 解读方法……3
7.3 报告要求……3
参 考 文 献……5
附 录 A ……6

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。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测核酸方法通则

1 范围

本文件规定了实验室基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法检测核酸的方法通则,包括方法开发、性能验证、质量控制、结果解读。

本文件适用于临床或科研实验室基于质谱法对核酸样品进行检测方法的开发研究以及实施应用。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489-2008 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

核酸质谱 nucleic acid mass spectrometry

采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)原理进行核酸分析的技术。

3.2

核酸扩增 nucleic acid amplification

采用PCR技术体外复制样本核酸。

3.3

核苷酸消化 nucleotide digest

采用SAP消除反应体系中剩余dNTP。

3.4

单碱基延伸 single base extend

采用ddNTP在基因位点处只配对延伸一个碱基。

4 略缩语

PCR:聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction)

SAP:虾碱性磷酸酶(Shrimp Alkaline Phosphatase)

dNTP:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

ddNTP:双脱氧核糖核苷三磷酸(dideoxy ribonucleoside triphosphate)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

RNA:核糖核酸(Ribonucleic Acid)

MALDI-TOF MS:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

5 方法开发

5.1 检测方法原理

将生命体的体液、组织、血液、脱落细胞、口腔黏膜、毛发、粪便、病原体和微生物等生物样本提取成待测核酸（DNA/RNA），核酸样本进行多重PCR扩增，扩增产物经SAP去除剩余dNTPs，然后利用延伸引物和ddNTPs对目标位点进行单碱基延伸，通过对延伸产物进行检测实现对靶标的检测。也可以将PCR产物直接转化成质谱检测质量范围内的核酸片段进行检测。。检测方法是将待测核酸片段脱盐后加载至带有基质的核酸质谱芯片上，并采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOFMS)检测延伸产物分子量，分析得到核苷酸信息，进而得到基因信息。

5.2 检测方法开发

5.2.1 检测目标

检测前应根据检测试剂明确样本类型、样本数量、基因位点。

5.2.2 检测引物

根据基因位点选定核酸扩增的检测目标片段,设计扩增引物和延伸引物宜注意在多重扩增和多重单碱基延伸条件下的验证和确认。

5.2.3 检测试剂

检测试剂可包含核酸扩增试剂、核苷酸消化试剂、单碱基延伸试剂、阳离子树脂。

5.3 检测程序

检测程序宜参照附录A：检测程序。

5.3.1 检测准备

检测前应确认实验室的环境和设施、设备和器具、检测试剂和检测耗材、人员资质等符合要求。通过验证或/和确认后方可开展检测。

5.3.2 样本采集

根据样本采集要求，采集符合类型的生物样本，并采取适当措施贮存及运输。

5.3.3 核酸提取

根据样本核酸提取要求，处理样本、提取核酸，并检测所提取的核酸符合要求。

5.3.4 核酸扩增

根据核酸质谱检测试剂要求，采用扩增试剂对提取的核酸进行基因扩增得到扩增产物。

5.3.5 核苷酸消化

根据核酸质谱检测试剂要求，采用核苷酸消化试剂消除扩增产物中的核苷酸（dNTPs）得到消化产物。

5.3.6 单碱基延伸

根据核酸质谱检测试剂要求，采用单碱基延伸试剂对消化产物进行单碱基延伸得到延伸产物。

5.3.7 延伸产物除盐

根据核酸质谱检测试剂要求,采用离子交换树脂对延伸产物中的金属阳离子进行去除得到除盐产物。

5.3.8 核酸检测

根据核酸质谱检测设备说明书要求，将获得的产物加载到核酸质谱芯片，进行核酸质谱检测，并得到检测数据。

5.3.9 结果报告

根据检测试剂说明书及核酸质谱检测数据，报告检测结果。

6 性能验证

6.1 检测仪器性能

用检测仪器指定的质控品或标准品进行检测，核酸检测准确度应符合检测仪器说明书。

6.2 检测试剂性能

按核酸质谱检测试剂说明书要求，采用检测试剂配套质控品或参考品按检测程序进行检测，检测结果均符合检测试剂说明书。

7 结果解读

7.1 检测数据

核酸质谱原始检测数据应包含质谱数据、信号峰强度以及信号峰质量数据：

a) 质谱数据应包含每个检测位点的质荷比，以及延伸后的产物峰质荷比；
b) 信号峰强度数据应包含每个产物峰的峰高、信噪比、峰面积，等；
c) 信号峰质量数据可包含每个产物峰的分辨率、峰评分，Z-score 值，等。

7.2 解读方法

根据质谱原始结果进行分析后可以得到相关检测数据，进而得到生物样本的最终检测结果，对于最终检测结果的判读应符合核酸检测试剂说明书的要求。

原则上对检测结果的判读应遵循先确定产物峰的分子量（质荷比）是否符合产品规定的质量范围要求，再对产物峰的质量数据进行评估，确定是否符合产物峰质量要求，并根据核酸产品检测说明书所列出的标准进行判读，确定最终输出可靠结果。

7.3 报告要求

根据核酸检测试剂说明书要求输出结果报告。如需引用实验结果，则应至少包括实验时间、样品名称、实验孔位、检测位点等有效信息。

参 考 文 献

1. 中国核酸质谱应用专家共识，中华医学杂志2018年3月27日第98卷第12期。

2. 核酸基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在结核病和非结核分枝杆菌病诊断中的临床应用专家共识，中国防痨杂志2023年6月第45卷第6期。

3. XXXXXXX

4. XXXXXXX

附 录 A

不同类别检测应考虑因素举例

由于核酸质谱适用的生物样本类型以及基因型的多样性，需根据样本类型、目的基因型、以及临床意义等因素对相关检测数据以及解读方法进行筛选和初步确定,并在随后的产品研发过程中进行修正和确认。

以下举例说明不同检测类别采用核酸质谱检测方法应考虑的因素。

1．胚系突变检测

检测胚系突变时，对检测数据的质控，应考虑检出信号峰的质荷比是否位于预设分子量区间内，还应考虑检出信号峰的峰高或信噪比是否需要超过设定最低检出强度才认定为有效峰进行基因分型分析，此类质控标准还可以进一步包括对峰评分、分辨率等指标的质控。

对基因分型分析，可以考虑检出信号峰的峰高/信噪比需要达到或超过特定阈值后认为该基因型有效检出，并结合检测试剂配套阴阳性质控品或者参考品的设定，输出相应的结果。阈值的设定可以参考核酸质谱平台生产商建议、已有产品或者权威文献所列该平台的建议、以及相关专家共识等等，随后在开发过程中予以修正和最终确认。

2．体细胞突变检测

在开发体细胞突变以及游离核酸检测应用时，考虑到所要检测的是特定位点的低频突变，在实验方法上可能存在富集、选择性扩增等偏好性的靶向检测方法，上述胚系突变检测分析方法并不一定完全适用，可以引入 Z-score 等信号标准化模型对峰信号值进行处理，来分辨低频突变在特定位点上形成的信号峰相对于阴性样本数据的显著性。Z-score 模型可用于评价待测阳性样本与阴性样本信号之间的差距，数值越大，表明此待测样本在此位点所获信号与阴性样本所获信号的数据离散度越大，则越可能成为一个低频位点的真实信号峰。具体数值可以参考核酸质谱平台生产商建议、已有产品或者权威文献所列该平台的建议、以及相关专家共识等等，随后在开发过程中予以修正和最终确认。

3．拷贝数变异检测

在拷贝数变异检测应用开发中，可以根据临床应用的具体需求，在实验流程中额外引入拷贝数确定的外源性序列，通过与外源性序列信号峰的比较，设定检出限等相关参数；或者通过设计引物同时检

测内源性基因组中相应的并系同源区的信号峰进行比对得到检测结果，并在研发过程中对相关参数予以修正和最终确认。

4. 病原体检测

在病原体检测应用开发中，可以根据临床应用的具体需求，在实验流程中额外引入拷贝数确定的外源性序列，通过与外源性序列信号峰的比较，设定检出限等相关参数；或者超过延伸引物转化率（Extension Rate）特定阈值来体现检出，具体数值可以参考核酸质谱平台生产商建议、已有产品或者权威文献所列该平台的建议、以及相关专家共识等等，随后在开发过程中予以修正和最终确认。

5. 甲基化检测

在甲基化检测应用开发中，核酸质谱通过检测并比较重亚硫酸盐转化后同一 CpG 位点甲基化和非甲基化信号峰的比例，体现靶向位点的甲基化程度，具体数值可以参考核酸质谱平台生产商建议、已有产品或者权威文献所列该平台的建议、以及相关专家共识等等，随后在开发过程中予以修正和最终确认。