



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

人类辅助生殖技术用医疗器械
小鼠单囊胚 RNA-Seq 试验

Medical devices for human assisted reproductive technology-

RNA-Seq for mouse single blastocyst

(草案)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前言.....II

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语、定义和缩略语..... 1

4 试验方法..... 2

参考文献..... 5

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由中国食品药品检定研究院归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

人类辅助生殖技术用医疗器械

小鼠单囊胚 RNA-Seq 试验

1 范围

本文件规定了小鼠单囊胚RNA-Seq试验方法，适用于与配子和/或胚胎接触的人类辅助生殖技术用医疗器械的安全性评价。

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/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品

YY/T 0995 人类辅助生殖技术用医疗器械 术语和定义

YY/T 1434 人类辅助生殖技术用医疗器械 体外鼠胚试验

YY/T 1688 人类辅助生殖技术用医疗器械 囊胚细胞染色和计数方法

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语、定义

YY/T 0995、YY/T 1434和YY/T 1688界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1 单细胞测序 Single Cell Sequencing 指单细胞基因组或转录组的测序，从而获得基因组、转录组或其他多细胞信息，以揭示细胞种群差异和细胞进化关系。

3.1.2 单囊胚测序 Single blastocyst sequencing 对单个囊胚样本进行基因组或转录组测序，从而获得基因组或转录组的相关信息，揭示整个囊胚在基因组及某种特定状态下基因表达的特征。因单个囊胚细胞数量有限，尽管比单个细胞样本多，但难以采用常规的DNA或RNA提取纯化建库测序的实验流程，因此一般单囊胚测序都是借鉴单细胞测序流程进行建库测序及分析。

- 3.1.3 原始数据 Raw Data 测序平台测序下机的数据。
- 3.1.4 接头 adapter 为一段已知的短核苷酸序列，用于链接未知的目标测序片段。
- 3.1.5 序列标签 Reads：高通量测序平台产生的序列标签。
- 3.1.6 高质量数据量 high quality reads number 原始数据经过去除接头、低质量和N碱基、较短长度reads等质量控制后得到的数据。
- 3.1.7 冗余度 duplication rate 测序数据中冗余Reads所占的比例。
- 3.1.8 GC含量 GC content 测序数据中碱基G和C占的比例。
- 3.1.9 排序 samtools sort 对生成的bam文件中的所有reads按照某一个参数（默认为比对坐标）进行排序。
- 3.1.10 比对率 mapping rate 比对到参考基因组上的Reads占总Reads的比例。
- 3.1.11 唯一比对率 uniq mapping rate 比对到参考基因组唯一位置上的Reads占总Reads的比例。
- 3.1.12 转录本组装 Transcript Assembly 用测序的数据组装成转录本，一般分为有参考基因组的转录本组装和从头组装。
- 3.1.13 转录组从头组装 Transcript deno assembly 不依赖参考基因组，根据reads间的overlap进行序列拼接和组装成转录本。

3.2 术语和缩略语

下列缩略语适用于本文件：

ART: Assisted Reproductive Technology, 辅助生殖技术。

RNA-Seq: RNA转录组测序。

cDNA library: cDNA文库。

RT-PCR: 反转录聚合酶链式反应。

RT: reverse transcription, 反转录。

PBS: phosphate buffer saline, 磷酸盐缓冲液。

DNase: DNA酶，用于消化去除样本中的DNA。

RNase Inhibitor: RNA酶抑制剂。

Mix: 这里指几种试剂的混合物，以致能均匀分配到每个反应或样品中。

4 试验方法

4.1 主要仪器和器具

- a) PCR仪。
- b) 磁力架。
- c) 测序仪。
- d) 体视显微镜。
- e) 移卵装置。
- f) 其他常用仪器。

4.2 试剂

- a) 无核酸酶水 Nuclease-free water
- b) 脱氧核糖核苷三磷酸 dNTP
- c) RNA酶抑制剂 RNase Inhibitor
- d) 反转录酶 SuperScript III RTase
- e) 单链DNA结合蛋白
- f) 核酸外切酶I Exonuclease I
- g) 末端转移酶 Terminal transferase
- h) 核糖核酸酶H RNase H
- i) DNA聚合酶 Taq
- j) 无水乙醇
- k) 磷酸盐缓冲液
- l) 胚胎洗液：含有RNA酶抑制剂（RNase Inhibitor）的缓冲液，如PBS缓冲液加RNA酶抑制剂
- m) RNA保存液：PBS加PCR反应缓冲液和RNA酶抑制剂
- n) DNA建库试剂盒
- o) 测序试剂盒
- p) 引物

4.3 耗材

- a) 培养皿
- b) 磁珠
- c) 离心管
- d) 其他常用耗材

4.4 方法

4.4.1 供试品制备

4.4.1.1 试验设计

按YY/T 1434和YY/T 1688的试验结果，供试品样本选择无污染且满足要求的所有发育良好的正常形态学特征的小鼠囊胚，包括扩张囊胚和孵化囊胚。

供试品样本至少3个批次，每批次至少3个囊胚成功完成测序。

无RNA内控对照：无RNA，但含有所有相应的试剂。

无反转录酶内控对照：含囊胚中提取纯化RNA，但不经过反转录。

4.4.1.2 囊胚的准备

囊胚清洗：用4℃预冷胚胎洗液制成多个50 μL -100 μL 液滴，每个囊胚在液滴中依次连续清洗3次，每次间隔（2-5）分钟以去除残留的培养液。

注：获取和处理单个完整胚胎的关键在于快速精准地操作，尽量减少在操作中胚胎破坏甚至丢失；由于外界刺激和时间过长引起细胞表达上的改变以及外源RNA的污染。

4.4.1.3 囊胚RNA的保存或运输

经胚胎清洗液处理的囊胚转移至含RNA保存液的0.2 mL离心管（PCR级别）中。

用液氮连续冻融3次，离心数秒使样本置于离心管底。

注：样本可以直接用于进一步的RNA富集及纯化，也可储存于-80℃备用，储存时间应该越短越好，最好不超过2周。样本如需运输，需有至少不高于-20℃的冷链运输。

4.4.1.4 去除DNA（可选）：

经液氮冻融的囊胚可先通过DNA酶处理，去除DNA后，进行下一步的RNA富集及纯化，也可储存于-80℃备用。

4.4.2 囊胚RNA的富集及纯化

4.4.2.1 释放细胞RNA

- 1) 采用含DTT、RNA酶抑制剂和带poly T尾的反转录接头的缓冲溶液对细胞进行裂解，以促进RNA的释放，缓冲溶液加入体积应尽量小，以免影响后续反应（体系1示例见附录A）；
- 2) 加入裂解用缓冲溶液后，将其置于70℃干浴90s，立即冰置。

4.4.2.2 反转录

- 1) 采用 RNA 酶抑制剂、单链特异性 DNA 结合蛋白和反转录酶配置反转录反应体系，用反转录缓冲液稀释至合适的浓度（体系 2 示例见附录 A）；
- 2) 将配置混匀的反应液加入含有裂解后 RNA 的 PCR 管中，50℃ 孵育 30min 反应完成后，70℃ 失活反转录酶 15min，4℃ 保存。

4.4.2.3 去除未反应的引物

- 1) 采用核酸外切酶去除反应接头：
- 2) 37℃ 孵育 30 min，80℃ 孵育 25 min 使酶失活，4℃ 孵育 10 min，此时多余的引物都将被降解。

4.4.2.4 3'端加 poly A 尾

- 1) 采用末端转移酶对上一步产物添加 poly A 尾，反应体系中需包含 dATP、末端转移酶和核糖核酸内切酶，核糖核酸内切酶用于去除模板 RNA 链（体系 3 示例见附录 A）；
- 2) 37℃ 孵育 15min，70℃ 孵育 10min 使酶失活，4℃ 保存。

4.4.2.5 第二链合成

- 1) 采用可耐受热启动的 Taq 酶进行第二链合成，以尽量减少非特异性扩增，体系中应加入带有 poly T 尾的第二链合成引物（体系 4 示例见附录 A）；
- 2) 将反应体系置于 PCR 管中，采用热启动方式进行 PCR 扩增（反应程序 1 示例见附录 A）；

4.4.2.6 扩增

- 1) 将上一轮扩增产物进行 PCR 扩增，共扩增 20 个循环（反应体系 5 及程序 2 示例见附录 A）；

注：扩增完成后可以保存于-80℃，6个月。

4.4.2.7 PCR 产物纯化

- 1) 采用磁柱对 PCR 产物进行纯化，并采用 EB 溶液洗脱；
- 2) 对纯化获得的 PCR 产物进行浓度测定，并采用 2%TAE 琼脂糖电泳或 A2100，分析产物大小。

4.4.3 cDNA文库构建

- 1) 采用常规的 DNA 建库试剂盒进行操作，获得 DNA 文库；
- 2) 对扩增后的文库采用磁珠进行长度分选和纯化，最后回收 DNA 平均长度应为 450 bp；

4.4.4 cDNA文库质控

为了得到高质量的测序结果，必须对文库浓度进行精确测定。推荐使用实时 PCR 的方式对文库浓度进行绝对定量。此外，文库浓度还可以使用基于特异性识别双链 DNA 的荧光染料法进行测定，文库浓度应不低于 0.6ng/μL。

4.4.5 测序

4.4.5.1 测序前文库质检

文库浓度应大于 0.6 ng/μL，片段应分布在 200 bp-700 bp 范围之内。

4.4.5.2 上机测序

对于质检合格的文库，根据每个文库的预期数据量和测序仪使用说明书进行上机。

4.4.6 测序数据分析

4.4.6.1 Seq数据（reads）质量评估（用 Linux，Command-line instructions in cloud）

测序完成后得到原始数据（raw data .fastq 格式），使用质控软件（Trimmomatic，FastqQC，Fastp 等）进行去接头（adaptor）、去除低质量碱基、reads 长度过滤（默认最短 20 bp）等处理，获得高质量测序数据并统计生成质控报告，完成测序数据质控。质控报告统计需要包含原始数据量（raw reads number）、高质量数据量（high quality reads number），冗余度（duplication rate），GC 含量（GC content）等信息，据以上指标数值在不同样本间的波动给出数据质量评估结果。

4.4.6.2 比对至小鼠参考基因组

使用比对软件（Hisat2，STAR，Tophat2 等）将质控后的高质量测序数据（.fastq）比对到已构建索引的小鼠参考基因组 GRCm38 上，比对信息经过排序（samtools sort）后保存为 bam 文件。比对结果统计建议包含比对率（mapping rate）、唯一比对率（uniq mapping rate）、外显子比对率、内含子比对率、rRNA 比例等指标。之后利用生成的 bam、参考基因组和基因组注释文件（gtf）进行转录本组装（Transcript Assembly），用于新基因或新转录本分析，可用软件有 Cufflinks，StringTie 等；异常转录本分析相关的转录组从头组装（deno assembly）则可以使用 Trinity、SOAPdenovoTrans、Velvet-Oases 等软件利用高质量测序数据完成。完成单样本结果的整合和过滤后，对于多样本合并，可以通过 StringTie 等软件完成。

4.4.6.3 生成丰度矩阵

根据比对排序生成的 bam 文件和参考基因组注释文件（.gtf）进行样本表达定量（HTSeq，featureCounts，StringTie，Cufflinks，eXpress，Salmon 等软件）形成丰度统计矩阵。

近年来，涌现出一些分析工具可实现不经过比对（Alignment free）直接进行 reads 与转录本关联，常用的软件有 Sailfish、Salmon、quasi-mapping 和 kallisto。

4.4.6.4 通过 PCA（principal component analysis）和 sample clustering 进行 QC

对于多样本分析，建议对定量结果进行主成分（PCA，principal component analysis）和样本聚类，

用于解析样本间关联和结构特征，分析并去除聚类异常样本。

4.4.6.5 基因表达差异性分析（RDESeq2 package）

将定量后的结果（表达矩阵）作为输入，使用 DESeq2, edgeR, Cuffdiff, Limma 等软件完成基因表达差异分析。

注：根据试验设计要求，需进行不同试验组之间或/和与阴性对照的基因表达差异性分析。进一步的分析如基因本体（GO, gene ontology）富集分析（enrichment analysis）、信号通路分析（如 KEGG pathways）和临床疾病相关意义的分析（如用 ClinVar 2019）等等。

4.4.6.6 关键图表

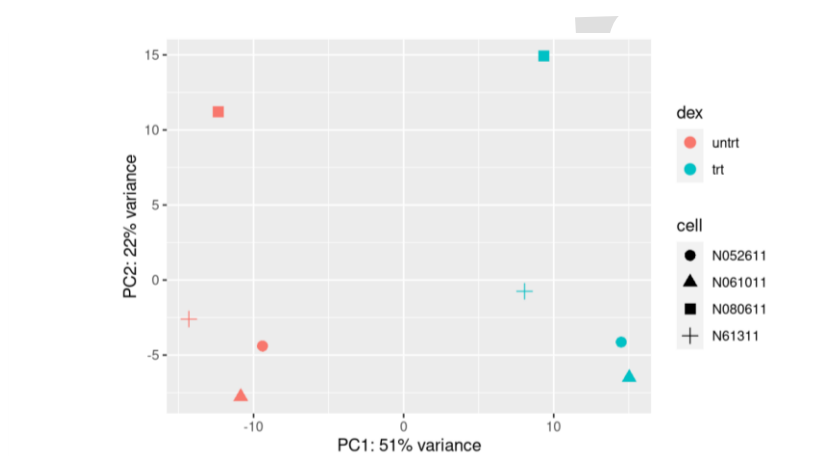


图 1 实验条件作为因子的 PCA 图

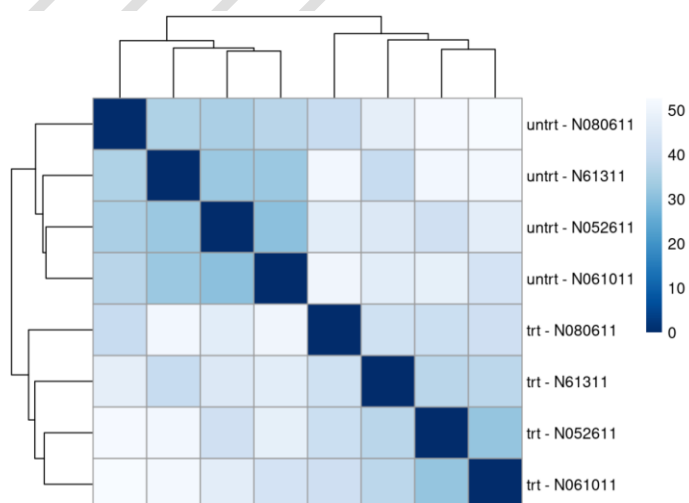


图 2 层次聚类图

4.4.6.7 数据意义分析

PCA 图意义: PCA 分析是探索多维数据的一种方法, 所得数据将在二维平面上展示主要差异情况。如果看到数据按着分组进行聚集, 预示着后续的差异表达结果会比较可靠; 如果数据分组聚集不明显, 意味着期望效果可能会被无关信号淹没, 可能需要做进一步探索其他的变异来源。图 1 中, 组间能够比较好的区分, 但是正方形代表的细胞 N080611 与组内其他细胞较远, 这提示细胞种类间数据有差异, 但是组间都有类似的趋势, 预计对分组差异表达影响有限。

层次聚类图的意义: 与 PCA 图类似, 层次聚类图用于评估样本间的相似性。图 2 中所示为计算样本间的欧氏距离所得数据, 颜色越深说明样本之间越相似。

4.4.6.8 主要的几个指标

4.5 判断标准

因转录组测序及分析存在波动性, 部分指标并未形成统一, 因此本标准只建议对以下指标进行质控, 其他指标可根据应用目的自行制定质控标准

- a) 测序前文库质检, 文库浓度应大于 0.6 ng/μL, 片段分布在 200 bp-700 bp 范围之内
- b) 比对率 (mapping rate, >75%)
- c) 外显子比对率 (>90%)
- d) rRNA 比例 (<15%)

4.6 试验报告内容

试验报告应包含如下信息:

- a) 供试品信息;
- b) 试验条件;
- c) 试验程序;
- d) 试验结果;
- e) 试验结论。

附录A

A.1 反应体系1示例

表A.1

试剂名称	体积 (μL)	终浓度
无核酸酶水	2.8	
10×PCR 缓冲液	0.45	0.9×
25 mM MgCl ₂	0.27	1.35 mM
0.1 M DTT	0.225	4.5 mM
0.5 μM 引物	0.125	12.5 nM
2.5 mM dNTP	0.09	0.045 mM
RNA 酶抑制剂	0.045	0.18 U/μL
总体积	4-5	

A.2 反应体系2示例

表A.2

试剂名称	体积 (μL)	终浓度(U/μL)
反转录酶	0.33	13.2
RNA 酶抑制剂	0.05	0.4
单链特异性 DNA 结合蛋白	0.07	0.07 U
Total	0.45	—

A.3 反应体系3示例

表A.3

试剂名称	体积 (μL)
无核酸酶水	0.8
10×核酸外切酶反应缓冲液	0.1
核酸外切酶 I	0.1
总体积	1

A.4 反应体系4示例

表A.4

试剂名称	体积 (μL)	终浓度
无核酸酶水	4.26	—
10×PCR 反应缓冲液	0.6	1×
25 mM MgCl ₂	0.36	1.5 mM
100 mM dATP	0.18	3 mM
末端转移酶	0.3	0.75 U/μL
核糖核酸内切酶 H	0.3	0.1 U/μL
总体积	6	—

A.5 反应体系5示例

表A.5

试剂名称	体积 (μL)	终浓度
无核酸酶水	59.28	-
10×PCR 反应缓冲液	7.6	1×
dNTP	7.6	0.25 mM
100 μM 引物	0.76	1 μM
Taq 酶	0.76	0.05 U/μL
总体积	76	

A.6 反应程序1示例

表A.6

温度	时间
95℃	3 min
50℃	2 min
72℃	20 min
4℃	10 min

A.7 反应程序2示例

表 A.7

循环数	温度	时间
1	95 ℃	3 min
1	95 ℃	30 sec
1	67 ℃	1 min
18-20	72 ℃	6 min
	+6 sec/循环	
1	4 ℃	Hold

参考文献

- [1] Tang F , Barbacioru C , Nordman E ,et al.RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell[J].Nature Protocols, 2010, 5(3):516.
-

