

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

地中海贫血基因检测 高通量测序法

Thalassemia gene detection-High throughput sequencing

(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

国家药品监督管理局 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。

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：

地中海贫血基因检测 高通量测序法

1 范围

本文件规定了采用高通量测序技术进行地中海贫血基因检测的原理、试验条件、试剂、仪器设备、样品、试验步骤、试验报告和质量控制要求。

本文适用于运用高通量测序技术进行地中海贫血基因检测的实验室质量评价和试剂盒性能确认。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 地中海贫血 *thalassemia*

3.2 测序文库 *sequencing library*

3.3 高通量测序 *high throughput sequencing*

3.4 聚合酶链式反应 *polymerase chain reaction*

3.6 碱基识别质量 *quality of base calling*

测序深度 *sequencing depth*

4 缩略词

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核苷酸 (*deoxyribonucleic acid*)

5 原理

6.1

运用高通量测序技术对待检DNA样本进行测序，将测序结果与参考基因组比对，报告待检样本中地中海贫血致病变异检出情况。

6 试验条件

实验室设备和设施要求应符合 GB 19489 的规定。

实验室用水应符合 GB/T 6682 的规定。

实验室应做到防止污染，应根据不同工作内容划分独立区域，并有明显标志，如试剂储备和准备区、样品制备区、扩增区、测序区、电泳室等，各区域间应避免交叉污染。

7 试剂

- 6.2 DNA 提取试剂。
- 6.3 测序文库构建试剂。
- 高通量测序试剂。

7.1 8 仪器设备

- 7.2 高通量测序仪。
- 7.3 PCR 仪。
- 8.1 打断仪。
- 8.2 荧光定量仪。
- 8.3 离心机。
- 8.4 磁力架。
- 8.5 冰箱：4℃、-20℃和-80℃。
- 8.6
- 8.7

9 样品

9.1 样品采集、保存和运输

- 9.1.1 样品采集应经过伦理审查和生物安全评价审查。
- 9.1.2 应严格按照试剂盒要求的样本类型及采样方法进行采样。
- 9.1.3 根据不同样本类型，外周血样品采集、保持和运输方法按附录 A，干血斑样品采集、保存和运输方法按附录 B，羊水样本采集、保存和运输方法按附录 C，唾液样本采集、保存和孕妇方法按附录 C。

样品接收与处理

应核对样品编号，记录样品信息，检查样品状态，避免样品包装破损、泄露或污染，否则应将该样品废弃，重新采样。

10.1

10 试验步骤

DNA 提取

10.1.1 通则

- 10.2 使用符合要求的核酸提取试剂盒，按照试剂盒操作步骤提取样本DNA。

10.1.2 DNA 样品浓度和完整性检测

样品DNA提取完成后，应使用荧光定量仪检测DNA样品浓度，使用琼脂糖凝胶电泳法检测样品DNA完整性。宜综合DNA样品浓度及完整性，判断DNA样品质量级别，判断依据见附录E。

测序文库构建与高通量测序

- 10.2.1 应使用合适的 DNA 样品和文库构建试剂进行文库构建。进行文库构建的 DNA 样品类别选择标准按表 1。

表1 进行文库构建的 DNA 样品类别选择要求

DNA样品类别	是否满足文库构建
A类	满足文库构建，DNA总量> 1 ug且浓度> 10 ng/uL
B类	满足文库构建，DNA总量> 100 ng且浓度> 10 ng/uL
C类	不完全满足文库构建要求，可以尝试进行该步骤，但不保证测序质量。 建议重新采样，重新提取待检样品基因组DNA

一般地，使用探针捕获技术路线进行文库构建的DNA样品应满足A类要求；使用PCR技术路线进行文库构建的DNA样品应满足B类要求。

10.2.2 应使用合格的文库和高通量测序试剂进行高通量测序。高通量测序按 GB/T35537-2017 的附录A 进行。

数据处理

10.3.1 数据质控

10.3.1.1 质控步骤

样品经过高通量测序得到的原始数据，应进行质量控制，去除测序接头序列和低质量序列，再进行后续生物信息学分析。

10.3.1.2 碱基识别质量值要求

测序完成后，应进行Q20、Q30的统计和评估。每个DNA样品可用数据对应的碱基识别质量值应符合如下要求：

- a) 大于 Q20 的碱基比例 $\geq 90\%$ ；
- b) 大于 Q30 的碱基比例 $\geq 85\%$ 。

10.3.1.3 可用数据量要求

可用测序数据量应达到试剂盒声明的满足检测需求所需最小数据量。每个样品测序生成的可用高质量序列数应大于试剂盒声明的满足检测需求所需最小序列数。

10.3.2 数据拆分

数据拆分率 $\geq 90\%$ 。

10.3.3 序列比对

拆分到待测样本的数据量比对到参考基因组目标区域的比例 $\geq 90\%$ 。

10.3.4 变异检测

检出SNV/indel测序深度 $\geq 20\times$ 。

11 试验报告

地中海贫血基因检测报告应包含以下信息。

- a) 基本信息：包括受试者姓名、性别、民族、年龄、籍贯、样本编号、联系方式、送检单位、送检科室、送检医师、送检日期、送检目的、送检样本类型、采集时间、标本状态（如溶血、凝固、脂血、母血污染等）。
- b) 检测结果及解释：检测项目名称、检测范围、检测方法、检测结果、结果解释、检测方法性能（如灵敏度、特异性、检测限、结果干扰因素和其他可能的技术局限性）。
- c) 试验报告应包含 α 地中海贫血、 β 地中海贫血、异常血红蛋白病等几种基因突变位点检出情况、纯杂合状态等详细结果。其中，若检出 α 地中海贫血，应区分静止型、轻型、HbH病及Hb Bart's水肿胎综合征。若检出 β 地中海贫血应区分轻型、中间型、重型。

12 质量控制

宜使用标准物质进行质量控制，评估定性与定量检测结果的准确性。

在描述结果时应注明检测结果的局限性，说明非本文件规定的可能影响检测结果的所有操作细节。

实验室资质和人员配备

- 12.1 从事地中海贫血基因检测实验室必须达到卫生部颁发的《医疗机构临床实验室管理办法》和《产前
12.2 诊断技术管理办法》及“附件1”和“附件2”的相关资质要求并实行全面的质量管理。
- 12.3 地中海贫血基因检测实验室除了必须全部满足常规检测项目的所有要求外，还必须有更加严格的，
特殊的质量控制措施以保证其结果的可靠性，满足室内质量控制（internal quality control, IQC）
和室间质量评价（external quality assessment, EQA）的质量要求。
-