



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

胚胎植入前染色体结构异常检测方法

Pre-implantation genetic testing for chromosomal structural rearrangements

(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
胚胎植入前染色体结构异常检测方法	1
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法一：高通量测序法	1
5 方法二：基因芯片法	3
6 方法三：单分子测序法	5
参 考 文 献	7

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。

本文件由归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

胚胎植入前染色体结构异常检测方法

1 范围

本文件规定了胚胎植入前染色体结构异常检测的术语与定义、原理、试剂和材料、适用仪器、样本要求、检测方法和结果分析。

本文件适用于对植入前囊胚样本采用高通量测序、基因芯片或单分子测序技术进行染色体结构异常检测。

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。

YY/T 0995 人类辅助生殖技术用医疗器械 术语和定义

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

染色体结构异常 chromosomal structural rearrangements

又称染色体结构重排，指在物理、化学、生物学和遗传学因素等多种因素的作用下，染色体发生断裂，断裂片段未在原位重接，而是移动位置与其他片段相接或丢失，即异常重接，造成基因数目、位置或顺序发生改变。

染色体结构异常由于染色体断裂，重组或交换，导致的染色体畸变，包括染色体缺失，重复，倒位，易位。

3.2

平衡易位 balanced translocation

是指非同源染色体的染色质发生交换而引起染色体结构变化，存在染色体片段位置的改变但基因总数不变，包括相互易位和罗氏易位。

4 方法一：高通量测序法

4.1 原理

对染色体结构异常家系样本的脱氧核糖核酸（DNA）及胚胎活检样本的全基因组扩增产物进行高通量测序，包括对DNA样本进行酶切打断，两端添加测序接头，磁珠分选富集200~500bp大小的文库片

段，构建好测序文库。然后利用高通量测序技术进行测序，利用生物信息学技术把测序得到的碱基序列定位到人基因组参考序列上，在全基因组范围内进行SNP分析，结合家系亲缘关系筛选出有效信息SNP位点，完成家系单体型图谱构建。最后对结构异常（如易位，下文以易位为例）断点上下游紧密连锁的区域进行分析，鉴别出携带型胚胎和正常型胚胎。

4.2 试剂和材料

4.2.1 核酸提取或纯化试剂；

核酸提取或纯化试剂用于对外周血或组织细胞样本进行核酸提取、富集、纯化等。所提取的基因组DNA，提取产量应 $\geq 1\mu\text{g}$ ，核酸完整性好（主条带清晰，无降解），OD260/OD280为1.4~2.0。

4.2.2 全基因组扩增试剂；

全基因组扩增试剂基于恒温扩增体系，可以以单个细胞或者微量样本为模板实现全基因组的无差别扩增。单细胞基因组经扩增后可达到95%以上的覆盖度，扩增产物大小在2-100kb之间，平均产物长度大于10kb，扩增产物浓度大于200ng/ μL 。

4.2.3 高通量测序文库构建试剂；

文库构建试剂主要由相应功能的酶（如内切酶、DNA连接酶、DNA聚合酶等）、核苷酸序列（如引物、接头序列、标签序列等）、缓冲液及dNTP组成。适用于对基因组DNA及全基因组扩增产物进行文库构建，所建文库浓度 $> 6\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

4.2.4 文库质检试剂；

可使用荧光定量、生物分析仪、qPCR等方式对文库质量及浓度进行测定。

4.2.5 高通量测序试剂。

与基因测序仪配合使用，用于高通量测序以获取样本序列信息。使用该试剂检测标准品，测序所得序列信息与已知参考序列信息的符合率应 $\geq 99\%$ 。

4.3 适用仪器

基因测序仪。基因测序仪主要由主机、基因测序仪控制软件组成，对DNA样本进行测序，以检测基因序列。使用标准文库在双端100bp测序读长下，测序通量不低于60G，测序有效通量不低于300M reads，碱基识别质量百分比（Q30）不低于80%，测序准确率应不低于99.0%。

4.4 样本要求

外周血和囊胚滋养层细胞。囊胚滋养层细胞是在胚胎体外受精发育至囊胚期，从囊胚期胚胎滋养外胚层分离至少5个细胞作为待检样本。

采集平衡易位患者及其配偶的外周血以及所有待检胚胎。当有平衡易位患者父亲、母亲（父母核型已知，其一为易位携带）或子代样本（已知核型）时，则额外采集其父亲、母亲或子代之一的外周血；当无平衡易位患者父亲、母亲或子代样本时，需有邻位分离的不平衡易位胚胎。

4.5 检测方法

4.5.1 模板 DNA 准备

外周血样本采用核酸提取或纯化试剂,按照说明书操作进行DNA提取。所提DNA总量不低于500ng,提取后的DNA溶液,若不立即进行实验,应保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$,保存时间不长于12个月。

囊胚滋养层细胞样本,按照说明书操作制备全基因组扩增产物,扩增产物浓度应不低于 $200\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

4.5.2 文库构建

DNA样本(包括外周血提取的DNA,以及胚胎活检细胞全基因组扩增产物),使用高通量测序文库构建试剂,按照如下操作,完成文库构建。

1) DNA酶切

取 $50\sim 200\text{ng}$ 的DNA样本,在酶切混合液作用下进行酶切打断,打断成具有特定黏性末端的DNA片段。

2) DNA片段末端加接头

将接头混合液加入到酶切后的DNA中,在DNA连接酶作用下,完成DNA片段和接头的连接。

3) 片段筛选

使用DNA纯化磁珠进行片段筛选,最终洗脱后获得 $200\sim 500\text{bp}$ 的文库片段。

4) 文库扩增

通过PCR反应对文库片段进行适当放大,同时在PCR过程中带入含有样本标签序列,反应结束后使用DNA纯化磁珠进行纯化,获得终用于上机测序的文库。

4.5.3 文库定量

使用文库质检试剂对文库进行定量,文库浓度需 $>6\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

4.5.4 上机测序

根据文库定量结果和样本上机数据要求进行文库混合,混合样本间的特异性引物(接头)不能重复。然后严格按照高通量测序试剂说明书进行上机操作,在基因测序仪上进行测序反应。

4.6 结果分析

通过配套生物信息学软件进行数据分析。利用生物信息学技术把测序得到的碱基序列定位到人基因组参考序列上,在全基因组范围内进行SNP分析,结合家系亲缘关系筛选出有效信息SNP位点,完成家系单体型图谱构建。最后对易位断点上下游紧密连锁的区域进行分析,鉴别出易位携带胚胎和正常胚胎。

根据构建的单体型结果,判断胚胎染色体来源,如果胚胎遗传到一条父亲易位单体型和一条母亲正常单体型(或者遗传到一条父亲正常单体型和一条母亲易位单体型),则该胚胎判定为易位携带型胚胎;如果胚胎遗传到父亲和母亲正常单体型,则该胚胎判定为正常型胚胎。

若样本的测序结果显示所捕获到的SNP位点测序深度、数据质量均达标,但无有效可区分单体型的位点,可能导致无法构建该样本单体型,需选择其他检测方法。

5 方法二:基因芯片法

5.1 原理

对基因组DNA或胚胎活检样本的单细胞全基因组扩增产物进行片段化,在全基因组范围内进行SNP分析,结合家系亲缘关系筛选出有效信息SNP位点,完成家系单体型图谱构建。最后对易位断点上下游紧密连锁的区域进行分析,鉴别出易位携带胚胎和正常胚胎。

5.2 试剂和材料

5.2.1 核酸提取或纯化试剂；

核酸提取或纯化试剂用于对外周血或组织细胞样本进行核酸提取、富集、纯化等。所提取的基因组DNA，提取产量应 $\geq 1\mu\text{g}$ ，核酸完整性好（主条带清晰，无降解），OD₂₆₀/OD₂₈₀为1.4~2.0。

5.2.2 全基因组扩增试剂；

全基因组扩增试剂基于恒温扩增体系，可以以单个细胞或者微量样本为模板实现全基因组的无差别扩增。单细胞基因组经扩增后可达到95%以上的覆盖度，扩增产物大小在2-100kb之间，平均产物长度大于10kb，扩增产物浓度大于200ng/ μL 。

5.2.3 基因芯片检测试剂。

基因芯片检测试剂主要由微阵列芯片、相应功能的酶及缓冲液等组成，对DNA样本进行扩增、片段化，然后沉淀重悬后杂交，最后进行荧光染色和芯片扫描，适用于基因组DNA及全基因组扩增产物。

5.3 适用仪器

基因芯片扫描仪。基因测序仪主要由主机、基因芯片扫描仪控制软件组成，支持对微阵列芯片的快速、灵敏和准确成像，获得高质量的检测结果。基因芯片扫描仪对每个样本的平均扫描时间不高于30分钟，每天至少能完成48个样本的扫描，基因组DNA样本的SNP检出率应不低于80%，全基因组扩增产物的SNP检出率应不低于70%。

5.4 样本要求

外周血和囊胚滋养层细胞。囊胚滋养层细胞是在胚胎体外受精发育至囊胚期，从囊胚期胚胎滋养外胚层分离至少5个细胞作为待检样本。

采集平衡易位患者及其配偶的外周血以及所有待检胚胎。当有平衡易位患者父亲、母亲（父母核型已知，其一为易位携带）或子代样本（已知核型）时，则额外采集其父亲、母亲或子代之一的外周血；当无平衡易位患者父亲、母亲或子代样本时，需有邻位分离的不平衡易位胚胎。

5.5 检测方法

5.5.1 模板 DNA 准备

外周血样本采用核酸提取或纯化试剂，按照说明书操作进行DNA提取。所提DNA总量不低于200ng，提取后的DNA溶液，若不立即进行实验，应保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，保存时间不长于12个月。

囊胚滋养层细胞样本，按照说明书操作制备全基因组扩增产物，扩增产物浓度应不低于200ng/ μL 。

5.5.2 基因芯片检测

DNA样本（包括外周血提取的DNA，以及胚胎活检细胞全基因组扩增产物），使用基因芯片检测试剂，按照说明书操作，完成检测。

5.6 结果分析

通过配套生物信息学软件进行数据分析，获得芯片上每个位点的碱基信息，基于孟德尔遗传定律对

家系样本全基因组范围内 SNP 进行分析，结合家系亲缘关系筛选出有效信息 SNP 位点，完成家系单体型图谱构建。最后对易位断点上下游紧密连锁的区域进行分析，鉴别出易位携带胚胎和正常胚胎。

根据构建的单体型结果，判断胚胎染色体来源，如果胚胎遗传到一条父亲易位单体型和一条母亲正常单体型(或者遗传到一条父亲正常单体型和一条母亲易位单体型)，则该胚胎判定为易位携带型胚胎；如果胚胎遗传到父亲和母亲正常单体型，则该胚胎判定为正常型胚胎。

由于样本的芯片结果位点数量限制，可能无有效可区分单体型的位点，可能导致无法构建该样本单体型，需选择其他检测方法。

6 方法三：单分子测序法

6.1 原理

对易位携带患者基因组DNA构建长片段文库，进行单分子测序，通过生物信息学分析，直接获得易位断点。然后针对易位断点区域设计长链PCR引物，或设计断点上下游紧密连锁SNP位点捕获引物。最后通过对胚胎扩增产物进行长链PCR验证或单体型连锁分析，鉴别出易位携带胚胎和正常胚胎。

6.2 试剂和材料

6.2.1 高质量核酸提取或纯化试剂；

高质量核酸提取或纯化试剂用于核酸的提取、富集、纯化等步骤。用该试剂提取外周血样本基因组DNA，所提DNA总量需大于10 μ g，超过90%的DNA片段大于10Kb，超过50%的DNA片段大于30Kb，OD260/OD280为1.6~2.0。

6.2.2 全基因组扩增试剂；

全基因组扩增试剂基于恒温扩增体系，可以以单个细胞或者微量样本为模板实现全基因组的无差别扩增。单细胞基因组经扩增后可达到95%以上的覆盖度，扩增产物大小在2-100kb之间，平均产物长度大于10kb，扩增产物浓度大于200ng/ μ L。

6.2.3 三代测序检测试剂；

文库构建试剂主要由相应功能的酶（如DNA损伤修复酶、末端修复酶、DNA连接酶、DNA聚合酶等）、核苷酸序列（如引物、接头序列、标签序列等）、缓冲液及dNTP组成。适用于对外周血提取的高质量基因组DNA进行文库构建，所建文库平均片段在10Kb~25Kb之间，文库浓度>20ng/ μ L。

6.2.4 长链 PCR 试剂；

由跨断点的特异性引物和PCR扩增试剂组成。

6.2.5 SNP 捕获测序试剂；

由断点上下游的特异性扩增引物池、PCR扩增试剂和磁珠纯化试剂等组成。

6.3 适用仪器

三代基因测序仪。三代基因测序仪主要由主机、基因测序仪控制软件组成，对DNA样本进行测序，以检测基因序列。使用标准文库，测序通量不低于20G，高精度测序平均读长不低于10Kb，测序准确率应不低于99.0%。

6.4 样本要求

外周血和囊胚滋养层细胞。囊胚滋养层细胞是在胚胎体外受精发育至囊胚期，从囊胚期胚胎滋养外胚层分离至少5个细胞作为待检样本。

6.5 检测方法

6.5.1 模板 DNA 准备

外周血样本采用高质量（HMW）核酸提取或纯化试剂，按照说明书操作进行 DNA 提取。所提 DNA 总量需大于 10 微克，超过 90% 的 DNA 片段大于 10 Kb，超过 50% 的 DNA 片段大于 30 Kb。

囊胚滋养层细胞样本，按照说明书操作制备全基因组扩增产物，扩增产物浓度应不低于 200 ng/ μ L。

6.5.2 单分子测序检测

提取的高质量 DNA 样本，将基因组片段化至合适大小，将测序接头连接至双链 DNA 末端，构建长链文库，通过测序平台检测获得长链 DNA 结果。

通过配套生物信息学软件进行数据分析。对下机数据进行参考基因组比对，得到序列比对结果。采用结构变异识别软件分析结构变异，得到目标易位的断点信息。

6.5.3 易位的断点区域检测

针对易位断点区域设计长链 PCR 引物，并设计断点上下游紧密连锁 SNP 位点捕获引物。

对囊胚滋养层细胞全基因组扩增产物进行检测，通过跨断点引物设计，PCR 扩增出胚胎上可能的跨易位断点条带，然后扩增产物进行一代测序，直接获知胚胎是否携带易位断点。

对断点上下游 SNP 捕获检测，通过设计断点上下游紧密连锁 SNP 位点捕获引物，构建单体型，根据连锁关系进行胚胎易位鉴别。

6.6 结果分析

通过配套生物信息学软件进行数据分析。对下机数据进行参考基因组比对，得到序列比对结果。采用结构变异识别软件分析结构变异，识别易位断点，并构建断点上下游的单体型。通过对胚胎扩增产物进行长链 PCR 验证和单体型连锁分析，鉴别出易位携带胚胎和正常胚胎。

如果胚胎含有易位断点则判定为易位携带型胚胎；如果胚胎不含易位断点，则该胚胎判定为正常型胚胎。根据构建的单体型结果，判断胚胎染色体来源，如果胚胎遗传到一条父亲易位单体型和一条母亲正常单体型（或者遗传到一条父亲正常单体型和一条母亲易位单体型），则该胚胎判定为易位携带型胚胎；如果胚胎遗传到父亲和母亲正常单体型，则该胚胎判定为正常型胚胎。

若样本的单分子测序结果没有直接获得准确断点位置，可能导致无法进行后续的胚胎易位携带检测，需选择其他检测方法。

参 考 文 献

- [1] YY/T 0316-2016 医疗器械 风险管理对医疗器械的应用.
- [2] YY/T 0466.1-2016 医疗器械 用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号 第1部分：通用要求.
- [3] Nussbaum R, McInnes R R, Willard H F. Thompson & Thompson genetics in medicine e-book[M]. Elsevier Health Sciences, 2015.
- [4] LisaG.Shaffer,MarilynL.Slovak,LyndaJ. Campbell. 《人类细胞遗传学国际命名体制 ISCN2016》（中文版）.
- [5] 邬玲仟,张学. 医学遗传学, 人民卫生出版社.