

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 124-2015

基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型 检测标准

2015-02 -05 发布

2015-03 -01 实施

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 缩略语	1
3 术语和定义	1
4 检测工作程序	2
5 实验室工作程序	4
6 检测报告	5
7 受检者资料和样本的保存	5
8 质量控制	5
附录 A（资料性附录）基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测送检单	6
附录 B（资料性附录）基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测报告单	8
参 考 文 献	9

前 言

本标准按照 GB/T1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由深圳市卫生和人口计划生育委员会归口。

本标准负责起草单位：深圳华大基因医学有限公司、深圳华大临床检验中心。

本标准主要起草人：姜丹、陈仕平、李云、陈李鑫。

本标准为首次发布。

基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测标准

1 范围

本标准规定了基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型的检测对象、受检者资料和样本的采集、实验室工作程序、检测报告、受检者资料和样本的保存、质量控制的要求。

本标准适用于使用第二代测序技术进行 HLA 高分辨分型检测的机构，对外周血、脐血、口腔拭子或全基因组 DNA 进行基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测。

2 缩略语

下列缩略语适合于本标准。

bp: 碱基对 (base pair)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

HLA: 人类白细胞抗原 (Human Leukocyte Antigen)

HTS: 高通量测序 (High-throughput sequencing)

NGS: 第二代基因测序技术 (Next Generation Sequencing)

PCR: 聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction)

Q-PCR: 定量聚合酶链反应 (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

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

SBT: 基于基因测序的分型法 (Sequencing Based Typing)

SNP: 单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphisms)

SSP: 特异性序列引物 (Specific Sequence Primer)

A: 腺嘌呤 (Adenine)

T: 胸腺嘧啶 (Thymine)

G: 鸟嘌呤 (Guanine)

C: 胞嘧啶 (Cytosine)

U: 尿嘧啶 (Uracil)

Sanger: 双脱氧链终止法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 HLA 基因

人类白细胞抗原基因，其编码基因位于人类 16 号染色体短臂，长约 3600KB，根据功能和产物结构的不同，分成 3 组：经典 HLA 基因、免疫功能相关基因和免疫无关基因。其中经典 HLA 基因与输血和移植急性排斥反应密切相关。因此，对于经典的 HLA 基因进行分型在临床上具有重要意义。

3.2 HLA 高分辨分型

即从基因序列水平对 HLA 进行分型的技术，其结果精确到血清学水平后的亚型。HLA 高分辨分型与过去的低分辨分型相比配型速度更快，配型更精确，使得移植排斥反应更小，手术成功率和术后存活率更高。

3.3 第二代测序技术

基于第一代 sanger 测序技术、利用边合成边测序原理，通过捕捉新合成的末端的标记来确定 DNA 序列的一种新的测序技术，在 Sanger 等测序方法的基础上，通过技术创新，用不同颜色的荧光标记四种不同的 dNTP，当 DNA 聚合酶合成互补链时，每添加一种 dNTP 就会释放出不同的荧光，根据捕捉的荧光信号并经过特定的计算机软件处理，从而获得待测 DNA 的序列信息。第二代测序技术具有通量高、成本低等特点，能一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定。

3.4 碱基对

碱基对是一对相互匹配的碱基，被氢键连接起来，组成碱基对的碱基包括 A、T、G、C、U；是形成 DNA、RNA 单体以及编码遗传信息的化学结构。

3.5 覆盖深度值

用来衡量来源于特定染色体的 DNA 量的值。如 16 号染色体上的覆盖深度值为样本定位到 16 号染色体的 DNA 分子数目与人类基因组上的 16 号染色体上的有效片段数的比值。

4 检测工作程序

4.1 检测对象

临床具有造血干细胞移植、器官移植 HLA 配型需求的供患者，骨髓库、脐血库等有造血干细胞 HLA 配型数据入库需求的机构的样本。

4.2 受检者资料和样本的采集、运输与保存

4.2.1 资料收集

4.2.1.1 受检者基本资料：包括受检者个人信息、送检单位信息和受检者当前临床诊断结果。见附录 A

4.2.1.2 供患关系：亲缘或非亲缘供患关系。

4.2.1.3 检测项目：根据临床需要选择需检测位点。

4.2.1.4 受检者既往病史：包括免疫治疗史和输血史。

4.2.2 样本采集、运输与保存

4.2.2.1 外周血样本

4.2.2.1.1 抽血前，除必须服用的药物外不得服用其他药物（例如化疗药物），以避免或减轻因白细胞的数量较少影响实验结果。

4.2.2.1.2 严格按照无菌操作常规，用静脉穿刺术抽取患者外周血 4mL(2mL/管×2 管)注入于 EDTA（乙二胺四乙酸）或枸橼酸钠抗凝管中，并缓慢翻转抗凝管让血液与抗凝剂混合。

注：若受检者为血液病患者，且白细胞计数 $<0.5 \times 10^9/L$ ，至少采集外周血 8mL，无凝血、溶血及污染现象；外周血采集须在输血至少 10 天后方可进行。

4.2.2.1.3 在采血管上粘贴唯一编号标签。

4.2.2.1.4 外周血样本在常温下运输保存不超过 7 天，2℃~8℃条件下保存不超过 15 天，-20℃可长期储存。样本保存管应完好，无裂管、开盖等泄漏或样本外溢情况。

4.2.2.2 口腔拭子

4.2.2.2.1 当外周血样本检测出现异常或无法解释的结果时，建议将外周血与口腔拭子一并采样检测。对骨髓移植受检者或近期有输血史的受检者，因外周血及其提取的 DNA 样本均可能存在不同程度的干扰，故推荐采集口腔拭子样本对此类受检者进行检测。

4.2.2.2.2 口腔拭子采集前半小时请勿进食、吸烟或嚼口香糖，采样之前先用清水漱口。

4.2.2.2.3 采集时一手持采样拭子/消毒棉签伸入左上部口腔，在口腔侧壁与牙龈交汇处旋转擦拭约 15 次后取出采样拭子/消毒棉签。同样的方法在左下、右上、右下颊粘膜处各采集 1 根，清洁通风处风干，每人至少采集 4 根。采集过程中避免用手触及棉签头，以免造成样本污染；勿用力过猛划破内颊粘到血迹，棉签头如有轻微血迹应重新采样。

4.2.2.2.4 将风干后的拭子/棉签装进一次性清洁密封袋，置于洁净容器中，添加干燥剂后密封包装，并于外容器壁上粘贴唯一编号标签。

注：干燥剂不可接触拭子/棉签。

4.2.2.2.5 口腔拭子样本置于常温下运输保存不超过 3 天。

4.2.2.2.6 置于 2℃~8℃条件下可保存 15 天，干燥的拭子长期储存则需置于-20℃冻存。

4.2.2.3 DNA 样本

4.2.2.3.1 样本质量要求：DNA 总量应 $\geq 10\mu\text{g}$ ，浓度 $\geq 50\text{ng}/\mu\text{L}$ ，OD260/280 值在 1.7-1.9 之间。

4.2.2.3.2 样本包装：保存于 1.5mL EP 管，用封口膜密封，于管壁上粘贴唯一编号标签。保存管应完好，无裂管、开盖等泄漏或样本外溢情况。

注：提取过程应无污染，DNA 储存液成分中不应含有 SDS(十二烷基硫酸钠)等活性剂成份。

4.2.2.3.3 样本运输及保存：采用冰袋或干冰进行低温（低于 4℃）运输，运输时间不超过 7 天。样本在 2℃~8℃存放 15 天，-20℃可长期保存。

4.2.2.4 脐带血样本

4.2.2.4.1 脐带血样本的采集、运输与保存参见 4.2.2.1 外周血样本的采集、运输和保存。

4.2.2.4.2 脐带血样本量不得低于 1.5mL。

4.2.2.5 其他样本

滤纸样本应保证含有等同于 75 μ L 血样的样本量，一般视为 2-6 斑点/样本。

5 实验室工作程序

5.1 样本接收

5.1.1 接收样本时核对样本编号及送检单。

5.1.2 检查待检样本状态，根据 4.2.2 要求，对符合要求的样本，接收并登记；对不符合要求的样本，拒收、登记并通知重新采样。

5.2 DNA 提取

5.2.1 使用 DNA 提取试剂盒，按照试剂盒说明书操作，提取样本中游离的人类全基因组 DNA。

5.2.2 提取过程中，设置阴性对照和重复对照。

5.2.3 提取后的 DNA 置于-20 $^{\circ}$ C 条件下保存 6 个月，或-70 $^{\circ}$ C 长期保存，避免反复冻融。

5.2.4 DNA 浓度要求：DNA 量 \geq 4 μ g，浓度 \geq 20ng/ μ L，OD_{260/280} 值在 1.7-1.9 之间。

5.3 目的片段 PCR 扩增

5.3.1 HLA-A、B、C 位点扩增 1-7 号外显子，DRB1 位点扩增 2 号外显子，DQB1 扩增 2-3 号外显子。

5.3.2 PCR 扩增后利用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物条带。条带应该明亮清晰，片段大小正确。

5.3.3 PCR 产物混合：按照 A、B、C、DRB1、DQB1 位点所需数据量将合格的 PCR 扩增产物混合。产物混合后进行 Q-PCR 定量检测，符合要求即为合格。

5.4 文库构建与 DNA 测序

5.4.1 用超声波将 PCR 产物打断成大小均一的片段，再将 DNA 片段修复成平末端；通过 3' 端加碱基“A”使得 DNA 片段与 5' 端带有“T”碱基的特殊接头连接，并对连接产物进行纯化。

5.4.2 使用 Agilent 2100 电泳检测文库的片段大小及产量，使用 Q-PCR 仪检测文库产量；根据 Q-PCR 结果，对样本进行等物质的量混合。

5.4.3 混合后的文库与光学透明玻璃芯片上的接头杂交，使用第二代高通量测序仪进行 DNA 测序，获得样本碱基序列信息。

5.5 数据分析

HLA 型别数据库采用国际 IMGT/HLA 数据库，通过对测序获得的小片段核酸片段数据进行过滤、组装和比对，获得 HLA 唯一型别。

5.6 实验室要求

5.6.1 基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测实验室应符合临床基因扩增检验实验室的硬件要求，原则上分为四个单独的工作区域：试剂储存和准备区、样本制备区、扩增区、扩增产物分析区，进入各工作区域应严格遵循从试剂储存和准备区、样本制备区、扩增区至扩增产物分析区的单一方向顺序，避免交叉污染。

5.6.2 数据分析对硬件的要求应满足：数据分析有不低于 32G 的内存（12CPU）节点。

6 检测报告

6.1 检测报告包含受检者基本信息和送检单位信息。

6.2 检测报告内容包含 HLA-A、B、C、DQB1、DRB1 五位点 4 位数字高分辨型别。

6.3 检测报告注明实验检测方法，并告知结果仅供临床参考。基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测标准报告单参见附录 B。

7 受检者资料和样本的保存

7.1 受检者资料包括送检单、实验数据记录和实验检测结果，均保存 5 年以上，另有规定的除外。

7.2 受检者样本包括外周血、脐带血和 DNA 样本，可按要求保存期限在 3 年以上。

8 质量控制

8.1 相关人员应接受生物安全、检测技术等专业培训，持证上岗。

8.2 配备必要的基础设施和适宜的检测环境，对设施和环境进行监控。

8.3 设立阴性和重复对照，确保每次检测的质量。如阴性对照与预期结果不相符时，进行原因分析并采取纠正措施，形成书面记录。

8.4 数据分析结果中各位点纯合子采用其他方法，如双脱氧链终止测序法(Sanger 法)或特异性序列引物法（SSP 法），进行方法学复核。

附 录 A
(资料性附录)

基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测送检单

基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测送检单见表 A.1。

表 A.1 基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测送检单

基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测送检单									
*送检信息									
*送检医师 _____			*送检医师联系方式 _____				*采样日期 _____		
*送检单位名称 _____									
*检测项目									
<input type="checkbox"/> HLA 高分 5 位点 (A、B、C、DRB1、DQB1) <input type="checkbox"/> HLA 高分 <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> DRB1 <input type="checkbox"/> DQB1									
<input type="checkbox"/> HLA 其他 _____									
*姓名	性别 1.男 2.女	*民族	电话	*临床诊断	* 供受者 1.受者 2.供者	亲缘关系	*送检样本类型 1.外周血 2.口腔拭子 3.脐血 4.DNA 5.其他 (需注明)	关联的受者姓名 (注: 仅限只有供者样本的情况)	贴条码处

表 A.1 (续)

基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测送检单		
*检测结果发送至	*检测机构人员填写	既往史
姓名_____	样本接收日期_____	1. 免疫治疗史 <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 最近一次免疫治疗日期_____
传真_____	接 收 人_____	<input type="checkbox"/> 放疗 <input type="checkbox"/> 化疗 <input type="checkbox"/> 其他_____
地址_____	备 注（对不符合接收标准的样本的描述）	2. 有无输血 <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无
_____	_____	3. 首次移植 <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 最近移植日期_____
<p>本样本用途已由样本提供方告知患者或供者，并已得到患者或供者同意。</p> <p>1. 请如实清楚地填写所需信息：</p> <p>a. *项为必填项；b. **项表示当所送样本仅为供者样本时，须填写相关患者的姓名；c. 对于骨髓库或脐血库样本，请填写入库编号；d. 请在□处打“√”。</p> <p>2. 血样、DNA 样本须在 7 天内送达；口腔拭子须在 3 天内送达。</p>		

附录B
(资料性附录)

基于第二代测序技术的HLA高分辨分型检测报告单

基于第二代测序技术的 HLA 高分辨分型检测报告单见表 B.1。

表B.1 基于第二代测序技术的HLA高分辨分型检测报告单

报告单编号:	送检医院:					
受检者 ID:	送检医师:					
送检日期:						
样本编号	姓名	性别	年龄	诊断	关系	ABO/RH
样本编号	HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*	
注:						
检测者:						
审核者:						
报告日期:						
注: 实验方法为 PCR-SBT-NGS, 结果仅供临床参考。						

参 考 文 献

- [1] U. Shankarkumar. The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. *Int J Hum Genet*, 4(2): 91-103 (2004)
 - [2] G. Bentley, R. Higuchi, B. Hoglund. High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue Antigens*, 2009, 3-403
 - [3] Chunlin Wang. et al. High-throughput, high-fidelity HLA genotyping with deep sequencing
 - [4] C. L. Holcomb. et al. A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing. *Tissue Antigens*. 77, 206-217(2011)
 - [5] Steven G.E.Marsh. Peter Parham.Linda D.Barber HLA factsbook
-