

ICS 07.080

A 40

团 体 标 准

T/SZGIA 3-2018

植入前胚胎遗传学高通量测序检测技术规范

The Standard of High-throughout Sequencing in Preimplantation Genetic
Screening techniques

2018-12-10 发布

2018-12-11 实施

深圳基因产学研资联盟 发布

前 言

本部分编写格式遵循了 GB/T 1.1-2009 给出的规则编写。

本部分由深圳基因产学研资联盟提出并归口。

本部分负责起草单位：武汉华大医学检验所有限公司，深圳基因产学研资联盟，十堰市人民医院，湖北省妇幼保健院，湖北省标准化与质量研究院

本部分主要起草人：许振朋、唐卫江、田志坚、程征宇、程奇、李陶莎、李倩一、杜佳婷、吴昊、张昌军、郑洁、黄荣

本部分为首次发布。

植入前胚胎遗传学高通量测序检测技术规范

1 范围

本标准规定了植入前胚胎遗传学高通量测序检测技术中检测前、中、后各环节的技术要求。

本标准适用于人体胚胎植入前的样品进行高通量基因测序检测技术的机构,通过来源于人体样本来初步评估植入前胚胎遗传学筛查的结果。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 27025 检测和校准实验室能力的通用要求

GB/T 29859-2013 生物信息学术语

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 35537-2017 高通量基因测序结果评价要求

SZDB/Z 53-2012 孕妇外周血基因检测胎儿“21-三体综合征”标准

SZTT/SZGIA 2-2018 人类全基因组遗传变异解读的高通量测序数据规范

3 术语与定义

下列术语与定义适用于本标准。

3.1

测序 sequencing

测定氨基酸或者核苷酸序列的过程,即测定组成核酸分子腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、或胸腺嘧啶(T)或者是尿嘧啶(U)的排列顺序。

注1:参见 GB/T 29859-2013。

3.2

高通量基因测序 high-throughput gene sequencing

区别于传统Sanger(双脱氧法)测序,能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术,通常一次测序反应能产生不低于100Mb的测序数据。

注1:参见SZDB/Z 53-2012。

3.3

单端测序 single run sequencing

将DNA样本处理成片段后，把引物序列连接到片段的一端，然后在引物序列末端加上接头。测序时只测加了引物和接头的这一端。可分为SE50、SE90、SE100等，分别表示读长为50bp、90bp、100bp。

注：参见SZTT/SZGIA 2-2018

3.4

测序通量 sequencing throughput

测序仪单次测序可获得序列信息的基因片段数量（通常以序列数“reads”来表示）。

注：参见GB/T 35537-2017

3.5

测序质量 Q20 , Q30

高通量测序中，每测一个碱基会给出一个相应的质量值，这个质量值用来衡量测序准确度。碱基的质量值20的错误率为1%，30的错误率为0.1%。行业中Q20与Q30则表示质量值 ≥ 20 或30的碱基所占百分比。

注：参见GB/T 30989-2014

3.6

GC 含量

是在所研究对象的DNA分子中，鸟嘌呤(Guanine)和胞嘧啶(Cytosine)所占的比例。

注1:参见SZDB/Z 53-2012

3.7

DNA纯度 OD_{260}/OD_{280}

DNA纯度的判断根据 OD_{260}/OD_{280} 的比值判断，符合要求、纯度高的纯化DNA其 OD_{260}/OD_{280} 在1.8左右，低于此范围表明蛋白质含量超标，高于此范围表明样品中含有RNA。

4 缩略语

下列缩略语适合于本文件。

OD—光密度 (optical density)

bp—碱基对 (base pair) :

DNA—脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

RNA—核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

dNTP—脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleotide triphosphate)

PCR—聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

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

DNB—DNA 纳米球 (DNA nanoball)

UR—只能比对到唯一位置的 reads (unique reads)

dup—重复 (Duplication)

SE—单端测序 (single read)

CNV—全称是拷贝数变异 (Copy number variations)

5 指标要求及条件

5.1 样本接收

5.1.1 样本接收

样本接收时核对样本编号、送检单及知情同意书。检查待检样本状态，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。送样要求：样本统一使用1.5mL离心管进行寄送；在样品管上贴上医院样本唯一条码，为防止条码在运输中脱落，还需在管盖上用记号笔写上样本编号。粘贴条码标签时，应使条码与样品的长轴平行，字母朝管口方向，避免以环绕管壁粘贴的方式使管周被遮挡，而无法清晰看到管内样本情况；用Parafilm膜将离心管口密封好，以防污染。样品应固定在有填充物的塑料容器中后，再埋于干冰内，并确保样品送达华大时有干冰剩余。

5.1.2 样本入、出库

检查待检样本状态，对符合要求的样本，接收并登记后进行入库。待实验开始前，检测组进行样本出库，进入检测流程。

5.2 样本要求

5.2.1 纯度和完整性

DNA检测 OD_{260}/OD_{280} 值应在1.8~2.0之间，没有蛋白、多糖和RNA污染，DNA要求没有降解。若检测纯度不够，可先对样本进行纯化，后再进行检测。

5.2.2 浓度

要求接收到的扩增产物的浓度需大于等于30ng/ul。

5.2.3 总量

要求接收到的扩增产物的总量需大于等于1ug

5.2.4 电泳条带范围

电泳条带范围需不低于250bp，且不大于2000bp，主条带在750bp左右。

5.3 文库构建要求

取检测合格后的样本总量300ng。使用酶打断方法，把DNA打断成主带为150–250bp小片段DNA。随后进行纯化，再进行末端修复、接头连接、PCR扩增及纯化，完成文库构建。

5.4 文库定量要求

文库构建完成后进行定量，文库浓度要求需大于等于2ng/ul；在上机前需要进行单链环化，单链环化完成后进行制备的DNA纳米球（DNB）浓度需要大于等于10ng/ul。

5.5 上机要求

上机测序的策略为单端测序，测序reads长度为35bp（SE35）。

5.6 测序数据要求

测序数据Q20大于等于90%，UR大于等于3M，dup比例小于10%；GC含量在[38, 46]。

5.7 生物信息分析要求

能够准确识别染色体整倍体异常及大于4M的缺失重复。

5.8 设备使用条件

附录A给出了实验过程中主要设备测序仪器的使用条件。

6 主要仪器和设备

6.1 基本要求

实验过程中使用到的每台仪器设备均需要有维护计划和相应的仪器设备档案，并定期对仪器设备开展期间核查和校准，保证仪器设备处于正常检测状态。

6.2 PCR 仪

PCR 仪器主要是用于建库过程中文库扩增。满足温度范围 0–105℃；热盖温度 30–110℃；显示精度 0.1；温度准确性±0.1@55℃；温度均一性<0.3@55℃；最大变温速率 5℃

/s; 温度梯度有; 梯度范围 30-105°C; 梯度跨度 1-42°C。在冰盒上配置反应所需要的反应液, 总体积 50ul, 然后选择以下程序进行 PCR 反应:

温度	时间	Cycles
72°C	3min	1
98°C	30s	1
98°C	10s	5
60°C	30s	
72°C	3min	
72°C	5min	1
4°C	Hold	

6.3 多功能酶标仪

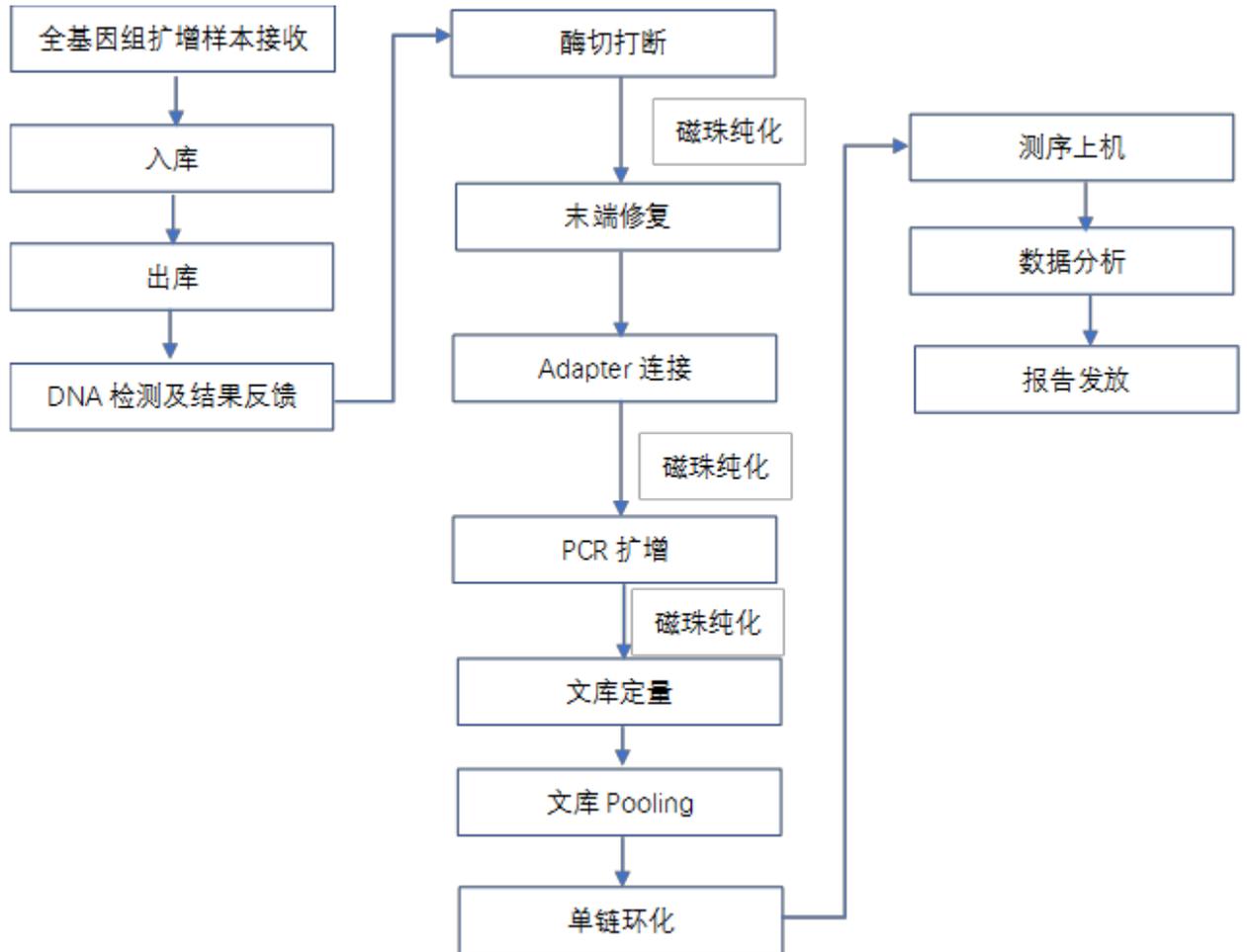
多功能酶标仪主要是用作上机前定量的设备, 灵敏度为2 ng/μL dsDNA。配置反应液, 总体积100ul, 选择“Exku”程序进行上机检测, 点击“Change layout”进行选择带检测样本的区域, 运行完成后导出吸光值进行结果的判定。

6.4 基因测序仪

基因测序仪主要是用于检测DNA序列的仪器。

首先进行测序仪器的预清洗, 预清洗结束后按照上机要求进行测序试剂的准备, 完成后按照测序仪屏幕上的提示进行上机测序。

7 胚胎植入前染色体异常检测方法



7.1 样本控制

全基因组扩增DNA产物的质控检测主要包括浓度检测和电泳检测。样品在质控检测合格后进入文库构建。

7.2 文库建构

建库起始量为300ng。目前使用NEB双链DNA片段化酶打断成主带为150-200bp小片段DNA。随后进行Axygen Beads纯化，纯化后的DNA进行末端修复、接头连接、PCR扩增及纯化，文库构建完成。文库经BMG定量检测合格后进行单链环化、制备DNA纳米球然后进行上机测序。

7.3 上机测序

利用联合探针锚定聚合测序（测序时当每个dNTP掺入时，对荧光标记的可逆终止子进行成像，随后切割以利于下一个碱基的合成。在每个测序循环中，所有四种可逆终止子结合的dNTP都存在，这种天然竞争最大限度减少了掺入偏向。最终结果是逐个碱基的测序，获得了准确的结果）的原理，统计每轮收集到的荧光信号结果，得到每个模板DNA片段的序列。

7.4 信息分析

将样本数据与人类参考基因组进行比对,根据CNV区域和正常区域落入的reads数量差异寻找CNV断点,输出样本CNV信息。

8 质量控制

8.1 检测前质量控制

包括样本采集、样本采集后处理、样本运输方式、样本收录标准以及过程中的生物安全防护措施等内容。

8.1.1 样本采集

必须保证样本信息(包括患者准备、患者识别等信息)准确性和样本保存完整性。样本准备时将囊胚期滋养层细胞进行全基因组DNA扩增,建议使用NEB公司的PicoPLEXTM WGA kit(货号E2620S, E2620L)或Sigma公司的GenomePlex® Single Cell WGA kit(货号WGA4-50RXN, WGA4-10RXN)试剂盒,严格按照试剂盒说明书完成胚胎细胞全基因组扩增提取DNA。

8.1.2 样本运输

根据样本运输要求,采用规定的外包装样式,使得样本运输达到规定标准,处于受控状态,并符合相关法规及生物安全要求。DNA扩增产物建议要在干冰条件下运输,并确保样本送达时有干冰剩余(根据寄送时间长短建议干冰用量:运输1天到达实验室,建议干冰用量为8kg;运输两天到达实验室,建议干冰用量为12kg;运输3天到达实验室,建议干冰用量为15kg)。

8.1.3 样本接收

样本到达实验室后,与样本接收人员进行样本交接,检查样本数量、核查样本状态,发现样本质量问题(无编号条码、无干冰剩余、样本散落邮寄包裹内、样本管子破碎、无知情同意和送检单、信息不全等)立即反馈,并将每个样本信息录入到信息系统。

每个样本在实验室流转中,采用唯一的条形码进行识别和区分,最大限度避免样本的混淆和保护客户或患者的个人信息。

8.2 检测中质量控制

实验过程中，均需要达到指标要求及条件中要求的数值，指标要求及条件中要求的是最低值，不满足该数据建议停止实验。

8.3 检测后质量控制

所有检测数据结果的分析均由双人复核出具，然后由专人负责审核出报告（具有检验副高资质的人员），采用“双人复核+专人审核”的机制，确保每个检测结果的正确性。保证提供报告结果100%与检测结果一致，患者信息100%与临床信息一致，所有的报告在信息系统或者原始记录中均可查询。

8.4 辅助检测过程的质控

8.4.1 人员

开展此项技术的实验室需对每个员工建立相应的人员档案，并建立健全的人员培训与评估体系。每个工作人员均接受相应的生物安全、检测技术、工作能力的专门培训，并定期对每个员工进行工作能力的评估，对不合格工作人员进行再培训和再评估，确保检测工作人员资质和能力满足所从事的检测项目。

8.4.2 仪器设备

实验室在实验过程中使用的仪器均有相应的标准操作指导书，贵重或精密仪器操作人员需经过相应的培训，获得上岗证并授权后方可操作。每台仪器均需有维护计划和相应的档案，需定期对仪器设备开展期间核查和校准，保证仪器设备处于正常检测状态。

8.4.3 实验耗材

选择合格的供应商，并定期对供应商进行评价。建立供应品的检验、接收和保存的程序及标准。对所有影响检测质量的服务商和供应品进行管理，验证合格后方可用于检测活动。

8.4.4 方法验证

此实验过程是经过严格的方法学评估和临床试验验证的，能够确保检测方法和质量指标满足检测要求。

8.4.5 环境

实验室设置需要严格遵照卫生部对临床基因扩增实验室的要求以及生物安全管理要求，实行严格分区、单一流向，需要对温、湿度以及气溶胶等环境要素进行实时跟踪定期监控，以保证实验活动在合格的环境中进行。

附录A

(资料性附录)

实验过程中所用测序仪的使用条件

基因测序仪进行高通量基因测序的正常工作条件如下：

- a) 运行环境温度： $(18 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ ，建议恒温 18°C ；
- b) 运行环境湿度：湿度不大于 80%，不低于 20%。
- c) 工作电压：220V，具有 $\pm 10\%$ 的相对误差，频率为 50Hz；
- d) 电路电流：电流要求不高于 2.5A；
- e) 电池保护：带有不间断 1500W 电源 UPS；
- f) 支撑平台：气压式缓冲系统的防震平台；防震效果达到 1Hz 级别。

附录B

(规范性附录)

一、送样规范

1、样本保存及运输

1.1 胚胎细胞扩增 DNA 样本要求干冰运输，运输不能超过 3 天，运到时保证有干冰剩余。

1.2 运输过程中容器应包装于有缓冲填充物的硬纸盒或硬塑箱内，以起到保护作用。

1.3 运输过程中避免挤压、跌落，以免容器破裂，样本污染。

1.4 快递跟踪

样本寄送后对快递单号进行跟踪，保证样本在规定时间内到达检测实验室。如快递出现异常，需立即联系快递公司查明原因并尽快解决，同时反馈技术负责人及质量负责人确定样本解决办法。

1.5 样本信息录入与入库

样本外观正常及信息完整的需进行信息录入，录入严格按照《项目信息录入规则》，采取双人复核方式，由一人录入，另一人进行复核。质量管理组定期核查记录。来样入库后储存于-20℃暂存。

2、PGS 扩增产物检测综合 DNA 检测浓度，体积以及电泳条带，进行等级判断：

样品等级	判断标准
A 类	样本量满足 2 次或以上检测，电泳条带大小正常
B 类	样本量满足 1 次但不足 2 次检测，电泳条带大小正常
C 类	样本量满足 1 次或以上检测，但电泳条带大小偏小或偏大
D 类	样本量不能满足 1 次检测或无明显电泳条带，无法检测

注：

使用 1%琼脂糖凝胶电泳，加入试剂盒 Control lane 进行判断。

电泳仪参数：135V，40min；

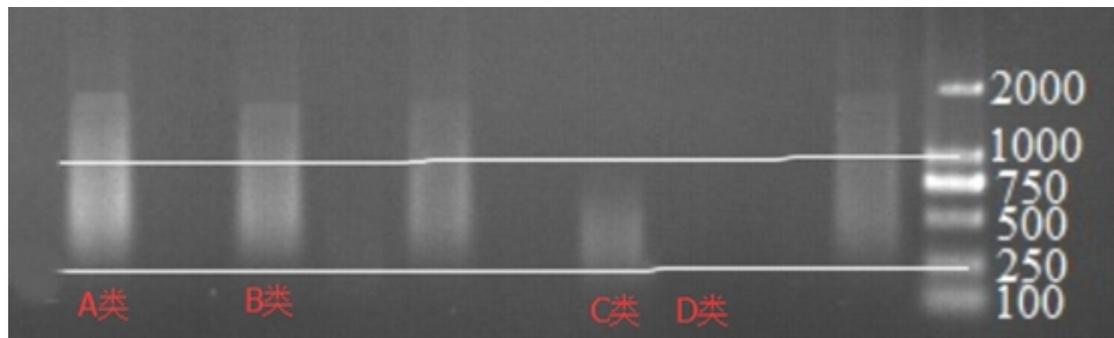
电泳后用 EB 染胶时间：15mins；

凝胶成像系统参数：调整光圈、变焦、焦距、曝光四个按钮直到画面清晰，图片大小合适即可；

观察样本电泳条带大小范围（电泳条带范围在 250bp-2000bp 之间）。

根据华大以往数据统计，对于 A 类、B 类样本，一次建库成功率达到 95%以上。

参考电泳胶图如下：



二、 Sigma WGA kit 的单细胞扩增操作参考流程

1、样本扩增前处理

所有试剂使用前需震荡（酶除外），保证充分混匀。

2、扩增过程中阴阳性对照的选择

阴性对照：水或 PBS 及至少一例清洗液对照；

阳性对照：试剂盒内 Control DNA 或者挑取的单细胞样本（例如培养的炎黄细胞）。

3、PGS-单细胞扩增流程——Sigma 试剂盒操作步骤

3.1 单细胞裂解

- 预估送检细胞体积，可以在空管加入水对照来预估，将细胞管加水至终体积 9ul。
- 准备细胞裂解缓冲液：蛋白酶 K：10*单细胞裂解液=1：16，如 2 ul 蛋白酶 K 溶于 32 ul 10*单细胞裂解液中，振荡至彻底混匀。
- 向步骤 1) 单细胞样品中加入 1 ul 新鲜制备好的细胞裂解缓冲液，混匀。
- 上一步骤得到的混合液孵育：50°C 1h, 99°C 4min（需精确），置冰上冷却，离心。

3.2 文库制备

- 孵育后的产物中加入 2 ul 1*single cell Library Preparation Buffer。
- 再加入 1 ul library stabilization solution。
- 混匀，95°C 2min。
- 置冰上冷却，离心，再置于冰上。
- 加入 1 ul library Preparation Enzyme，混匀并短暂离心。
- 加热样品：16°C 20min, 24°C 20min, 37°C 20min, 75°C 5min, 4°C hold。
- 从加热仪上取下样品，立即扩增或者-20°C保存 3 天。

3.3 扩增

- 向以上反应产物中加入以下试剂：

7.5 ul of 10*Amplification Master Mix; 48.5 ul of Water, Molecular Biology Reagent;

5.0 ul of WGA DNA Polymerase

- 混合均匀，离心，然后开始热循环：

95°C 3min; 94°C 30s ; 65°C 5min ; 4°C forever, 25 cycles 反应完成后，-20°C 保存。

4、实验室清洁

4.1 用 75%酒精擦洗实验台及使用过的移液器，并将移液器刻度调整到最大量程后置于移液器架上。

4.2 填写实验相关记录。

4.3 将垃圾分类处理。

4.4 超净工作台灭菌 30-45min 后，通风 2-5min 关机。

三、建库任务单

文件编号：						
版本号：						
建库任务单						
建库批次：			建库日期：			
序号	样品编号	文库号	浓度 (ng/ul)	取样量 (ul)	ddH2O(ul)	备注
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
子工序名	试剂名称	批号	单管用量 (ul)	样品个数	确认 (√)	
打断						
操作人：			复核人：			
纯化操作人：			复核人：			
子工序名	试剂名称	批号	单管用量 (ul)	样品个数	试剂用量	
PCR						
操作人：			复核人：			
纯化操作人：			复核人：			

四、建库流程单

文件编号：							
版本号：							
建库流程单							
任务单编号：				建库日期：			
负责人：				孔板号			
孔位号	样品编号	文库号	浓度 (ng/ul)	取样量(ul)	H ₂ O(ul)	barcode	barcode 位置
A1							
B1							
C1							
D1							
E1							
F1							
G1							
H1							
取样人：				复核人：			
子工序名	试剂名称	批号	单管用量 (ul)	样品个数	试剂用量	试剂加入确认	
样本打断							
MIX 操作人：		复核人：		仪器编号：			
取样人：				复核人：			
子工序名	试剂名称	批号	单管用量 (ul)	样品个数	试剂用量	试剂加入确认	
末端修复							
MIX 操作人：		复核人：		仪器编号：			
子工序名	试剂名称	批号	单管用量 (ul)	样品个数	试剂用量	试剂加入确认	
Adapter 的连接							
MIX 操作人：		复核人：		纯化操作人：		仪器编号：	
子工序名	试剂名称	批号	单管用量 (ul)	样品个数	试剂用量	试剂加入确认	
PCR 扩增							
MIX 操作人：		复核人：		纯化操作人：		仪器编号：	

参考文献

胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂的质量控制技术评价指南（高通量测序法）

GB/T 27025 检测和校准实验室能力的通用要求

GB/T 29859-2013生物信息学术语

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 35537-2017 高通量基因测序结果评价要求

SZDB/Z 53-2012孕妇外周血基因检测胎儿“21-三体综合征”标准

SZTT/SZGIA 2-2018 人类全基因组遗传变异解读的高通量测序数据规范

高通量基因测序植入前胚胎遗传学诊断技术规范（试行）