ICS 07.080
CCS 081

T/SDASTC

团体标准

T/SDASTC ××××—××××

基因测序与合成工艺技术要求

Technical requirements for gene sequencing and synthesis processes

征求意见稿

××××－××－××发布 ××××－××－××实施

山东科技咨询协会 发布

目 次

前言.....Ⅱ
引言.....Ⅲ
1 范围.....1
2 规范性引用文件.....1
3 术语和定义.....1
4 缩略语.....3
5 总则.....3
6 原理.....4
7 样本处理.....4
8 Sanger 测序工艺流程.....
5
9 高通量测序工艺流程.....5
10 基因合成工艺流程.....7
附 录 A （ 资 料 性 ） 主 要 仪 器 设 备.....9
附 录 B （ 资 料 性 ） 主 要 试 剂 及 溶 液.....10
附录C（资料性） 工艺流程示意图.....11
附 录 D （ 资 料 性 ） 主 要 实 验 方 法.....14
附 录 E （ 资 料 性 ） 二 代 测 序 仪 测 序 步 骤.....16
附 录 F （ 资 料 性 ） 寡 核 苷 酸 （ oligo ） 片 段 合 成 步 骤.....17
附 录 G （ 资 料 性 ） 引 物 纯 化 方 式 .....18 参 考 文 献.....20

前　言

本文件参照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。

本文件由山东科技咨询协会提出并归口。

本文件起草单位：丽山健康（山东）集团有限公司、山东丽山生物科技有限公司、山东丽山细胞医学发展有限公司、槿椿康养发展（山东）有限公司、山东槿椿资产运营有限公司。

本文件主要起草人：高俊、闫礼德、房路、邱学良，秦立双、杨雅娟、苏彦鑫、胡跃严、徐文强、庞庆霄、祝天成、纪元、李丹青、李伟君、杨学文、闫军燕、张文丽、孙玉桃、李冉冉、王英宗、孙镇、刘洋、窦梅杰、满耕孝。

引　言

随着基因测序与合成技术的不断发展和广泛应用，其逐渐丰富和渗透至医学、健康、环境、农业等各个领域。随着我国基因测序与合成产业相关支持政策集中出台、公共卫生防控意识升级、国民卫生支出的持续提升，市场规模有巨大的潜力和发展空间。而目前市面上的测序技术、测序仪器及设备更新迭代，因此制定标准化的基因测序与合成工艺流程并加以推广应用，各生物企业乃至整个国内行业就能获得一个绝好的技术规范，有利于推动整个行业产业链的健康发展，提升整个行业的技术实力，同时确保基因测序与合成工艺流程的质量，获得可靠的测序数据，避免信息错误和信息丢失等情况的出现。

由于基因测序与合成技术并非单一技术，涉及到不同技术领域的结合，包括生物、化学、材料、机械、数据处理等，因此本标准仅对常规使用一代测序、二代测序、基因合成的术语、技术指标以及涉及到的技术设备、检验检测方法及常规流程进行说明和规定。

基因测序与合成工艺技术要求

1 范围

本文件规定了基因测序与合成工艺流程的总则、原理、样本处理Sanger测序工艺流程、二代测序（NGS）工艺流程、基因合成工艺流程。

本文件适用于对基因测序与合成工艺流程的指导。

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 27025-2019 检测和校准实验室能力的通用要求

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 37873-2019 合成基因质量评价通则

GB/T 40664-2021 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞裂解 Cell lysis

指将细胞的结构破裂以释放其内部成分的过程。

3.2

引物 Primer

在DNA复制过程中，结合于模板链上并作为复制延伸的起始位点和/或终止位点的，具有一定长度和顺序的寡核苷酸链。

［来源：GB/T 30989-2014］

3.3

酶切 Enzyme cutting

用特定的限制性内切酶对DNA分子或载体分子在特定的位置进行切割，以获得特定的粘/平末端用于后续的连接反应。

3.4

桥式PCR Bridge polymerase chain reaction

单链文库DNA一端序列与芯片表面固定的寡核苷酸特异性结合，当连接片段的另一端弯曲，与芯片表面固定的另一条互补寡核苷酸“形成桥”，以文库DNA为模板进行扩增的反应。

3.5

二代测序 Next-generation sequencing

区别于传统Sanger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出不低于100Mb的测序数据。

3.6

接头 Adapter

用于标记和固定待测序片段的一小段已知序列的DNA片段。

3.7

基因测序 Gene sequencing

对核酸分子的核苷酸排列顺序的测定，即测定组成核酸分子的腺嘌呤（A）、鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）和胸腺嘧啶（T）或者是尿嘧啶（U）的排列顺序。

[来源：GB/T 30989-2014]

3.8

基因 Gene

位于染色体上编码一个特定功能产物（如蛋白质或RNA分子）的一段核苷酸序列，是遗传信息的基本单位。

［来源：GB/T 30989-2014］

3.9

合成基因 Synthesized gene

用生物化学的方法，按照设定的核苷酸序列人工合成的双链DNA。

[来源：GB/T 37873-2019]

3.10

文库 Library

通过生物来源的、人工合成的或克隆技术所得到的一个重建分子群。例如基因组文库、互补DNA文库、噬菌体展示肽文库等。

[来源：GB/T 43636]

3.11

寡核苷酸 Oligonucleotide

一类短链核苷酸的总称，常用作探针确定DNA或RNA的序列。

[来源：GB/T 30989-2014]

4 缩略语

下列缩略词适用于本文件。

ddNTP 双脱氧核苷核苷三磷酸（Double Deoxy-ribonucleoside Triphosphate）
DNA 脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid）
dNTP 脱氧核糖核苷三磷酸（Deoxy-ribonucleoside Triphosphate）
HPLC 高效液相色谱仪（High Performance Liquid Chromatography）
NGS 二代测序（Next Generation Sequencing）
OPC 寡核苷酸纯化柱（Oligonucleotide Purification Cartridge）
PCR 聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）
RNA 核糖核酸（Ribonucleic Acid）

5 总则

5.1 Sanger测序

首先利用测序样品通过测序PCR反应获得待测序产物，然后对待测序产物进行纯化与变性后，将变性产物上样至基因测序仪中电泳，获得电泳图谱，经基因测序仪配套的数据分析系统对图谱进行分析后，获得所测序列信息，并形成碱基序列输出。

5.2 二代测序

5.2.1 形成测序文库：将生物样本处理形成待测样品，对待测序的核酸片段两端连上接头，通过测序扩增反应，形成测序核酸样品的测序文库。
5.2.2 进行测序反应，同步收集测序信号：加入底物核苷酸，在测序酶的作用下使底物核苷酸与测序文库中的待测样品进行结合，同时收集该过程中产生的信号，包括但不限于荧光信号、电信号或离子信号。
5.2.3 测序信号分析：对得到的测序信号进行处理分析，将信号图转变为核苷酸碱基序列信息。

5.3 基因合成

合成基因的DNA序列，在符合国际基因合成联盟（IGSC）生物安全要求条件下，其质量要求，包括DNA纯度、总量、完整性与序列一致性。合成的基因应符合GB/T 37873-2019的质量评价要求。

5.4 实验人员操作要求

实验室的人员应按照GB/T 27025-2019的要求，实验操作人员应具备良好的分子生物学专业技术操作规范。

5.5 仪器设备要求

各实验区域应有专用的仪器设备，同一区域内的仪器设备、物品和工作服应有明显标记，避免与其他区域的物品混用。仪器设备的校准应符合GB/T 27025-2019的规定，主要仪器设备参见附录A。

5.6 其他要求

所有实验使用的试剂等级应为不含DNA和DNase的分析纯或生化试剂。试剂的选购、验收、贮存应符合GB/T 27025-2019规定。实验用水应符合GB/T 6682-2008中一级水的规格。去离子水的电阻应达到

18.2mΩ。商品试剂盒应注明到货日期，对所收到的试剂盒应按规定的贮存条件存放，主要试剂及溶液参见附录B。

6 原理

6.1 碱基互补配对原理

在DNA分子结构中，碱基之间的氢键具有固定的数目，且DNA两条链之间的距离保持不变。DNA分子结构的4种碱基之间的配对遵循一定的规律，即A仅与T配对，G仅与C配对，反之亦然。腺嘌呤与胸腺嘧啶之间有两个氢键，鸟嘌呤与胞嘧啶之间有三个氢键，即A=T、G≡C。根据碱基互补配对的原则，一条链上的A的数量等于互补链上的T的数量；一条链上的G的数量等于互补链上的C的数量，反之亦然。

6.2 亚磷酰胺三酯法原理

亚磷酰胺三酯法合成DNA片段，具有高效、快速的偶联以及起始反应物比较稳定的特点。亚磷酰胺三酯法是将DNA固定在固相载体上完成DNA链的合成，合成的方向是由待合成引物的3'端向5'端合成，相邻的核苷酸通过3'→5'磷酸二酯键连接。具体流程见附录C.1。

6.3 Sanger 法测序原理

每一轮序列测定由一套四个单独的反应构成，每个反应含有所有的四种 dNTP，并混入少量一种 ddNTP。由于 ddNTP 缺乏延伸所需要的 3′-OH 基团，在 DNA 合成反应中不能形成磷酸二酯键，用来中端 DNA 合成反应，使延长的寡聚核苷酸选择性地在 G、A、T 或 C 处终止。在 4 个 DNA 合成反应体系中分别加入一定比例的带有荧光同位素标记的某种 ddNTP，通过凝胶电泳和放射自显影，就可以根据电泳带的位置确定待测分子的 DNA 序列。具体流程见附录 C.2。

6.4 一代测序仪

在强电场的作用下，荧光标记的 DNA 片段通过毛细管中的高分子聚合物从负极向正极移动；片段越短，移动速度越快，长度不同的 DNA 片段依次通过检测窗口；荧光分子在检测窗口被激光激发产生荧光信号，荧光信号被 CCD 相机扫描，传递给计算机测序数据实时收集软件并转换成原始数据信号，分析软件分析原始数据信号呈现出最终的测序峰图。

6.5 边合成边测序原理

将生物样本制备成待测样品，通过桥式PCR扩增技术，将待测样品量放大，并收集成文库，然后进行平行循环测序。利用边合成边测序的策略，加入一种或多种带标记的底物核苷酸，在聚合酶的作用下，按照碱基互补配对原则，进行DNA链的延伸，延伸一轮测取一轮底物与模板结合后发出的荧光信号，收集该信号并确定所测位点的碱基信息；当上轮测序完成后，利用可逆技术，继续进行下一轮反应，重复测序过程，即可实现高通量基因测序。

7 样本处理

7.1 样本提取

7.1.1 样本前处理

根据不同生物样本选择的不同处理方式，动植物组织使用液氮研磨；哺乳动物血液样本使用红细胞裂解液对红细胞去除；细胞样本/贴壁细胞经胰酶消化处理再做收集；细菌样本溶菌酶破壁处理；真菌样本经酶解破壁或液氮冻融或超声裂解；FFPE样本使用二甲苯或矿物油类的物质进行脱蜡处理方式。

7.1.2 样本裂解

根据生物样本的不同，参照附录D.1和附录D.2方法进行裂解。

7.1.3 核酸分离纯化

根据实验室具体情况，选择附录D.3和附录D.4方法进行DNA和RNA的分离纯化。

7.2 样本质量检测评估

对常规样本的核酸提取纯化方法的一般性评价，具体见GB/T 37874-2019和GB/T 40664-2021。

8 Sanger 测序工艺流程

8.1 核酸提取及质量评估

具体见第 7 章样本处理。

8.2 引物设计

使用引物设计软件根据待测基因序列设计所需的引物。引物长度一般在17 bp～25 bp；G+C含量在40%～60%之间，45%～55%最佳；引物所对应的模板序列的Tm值在55℃～80℃之间，最好为72℃左右；引物的延伸是从3'端开始的，不能进行任何修饰，且3'端的碱基一般不用A；碱基随机分布，尽量均匀，不能有连续4个碱基的互补。

8.3 测序 PCR 模板扩增

在模板中加入设计引物，DNA聚合酶、dNTP，通过PCR仪的温度变化控制DNA的变性和复性，完成特定基因的体外扩增，得到充足的模板。

8.4 PCR 产物纯化

去除PCR反应液残留的引物、dNTPs、盐成分、非特异PCR产物等，以防止后期测序PCR反应中出现多重测序，抑制测序酶活性，扩增出同源性区域。

8.5 测序 PCR 反应

使用 Sanger 测序试剂盒，加入 PCR 产物及引物进行测序 PCR 反应。

8.6 测序反应产物纯化

对测序 PCR 产物进行纯化，过滤混合物，去除 ddNTP 等其他杂质，只留下长短不一的目的 PCR 片段。

8.7 上机测序

制备凝胶后，对一代测序仪仪器通道排除气泡后，开始测序，通过激光照射，读取荧光基团，得到一代测序结果。

9 二代测序工艺流程

9.1 样本制备和质量评估

样本制备和质量评估按照第 7 章样本处理要求执行。

9.2 构建文库

文库制备对于成功进行二代测序工作流程至关重要。该步骤会制备出兼容测序仪的 DNA 样本。本流程包括常用的 DNA 建库和 mRNA 建库流程，具体建库流程图参见附录 C.3、C.4、C.5。

9.2.1 DNA文库构建

9.2.1.1 一般规定

根据待测目的基因性质，特定基因需设计所需的引物（见8.2），再经过目的片段DNA的扩增（见8.3），获得足够浓度和纯度的目标DNA片段；非特定基因按9.1的要求获得足够浓度和纯度的DNA。DNA文库使用建库试剂盒构建。

9.2.1.2 片段化

将目标DNA片段使用限制性内切酶或超声波打断进行片段化处理。

9.2.1.3 末端修复

将随机打断、末端不平的片段化DNA通过末端修复酶进行末端补齐和5’端磷酸修饰。

9.2.1.4 添加接头

经过末端修饰后的DNA片段3'末端具有突出的A尾，而接头具有突出的T尾，使用连接酶将接头添加到DNA片段两端，形成“Y”形接头。

9.2.1.5 PCR扩增纯化

添加了接头的DNA片段，可通过与接头互补的引物来扩增，富集文库，再通过磁珠法对文库纯化，以去除杂质和未连接的接头或接头二聚体。

9.2.2 常规mRNA文库构建

不论真核生物还是原核生物，其RNA中最多的是rRNA，其占比高达80%。如果直接对样本的总RNA进行测序，测序数据中绝大部分将为rRNA的相关数据，因此通过RNA富集的方法去除rRNA，得到纯化的mRNA。然后再进行文库构建。

9.2.2.1 mRNA纯化

9.2.2.1.1 poly(A)纯化：真核生物的mRNA的3'端具有poly(A)尾结构，用带有Poly(T)探针的磁珠与总RNA进行杂交。然后Poly(T)探针就和带Poly(A)尾巴的mRNA结合在一起，通过回收磁珠，去除其他RNA，见附录C.4。

9.2.2.1.2 去除rRNA：通过使用与 rRNA 互补的寡核苷酸探针与总RNA样品杂交去除16S和23S rRNA，见附录C.5。

9.2.2.2 片段化处理

将含有金属离子（Mg^{2+}、Zn^{2+}）的打断buffer，对RNA进行打断。根据需要的文库片段大小选择合适的打断温度和时间。

9.2.2.3 合成cDNA

被打断的这些mRNA片段，通过随机六聚体引物，逆转录酶以mRNA为模版合成cDNA。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：

https://d.book118.com/798101062116006126