



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX

高通量基因测序结果评价要求

Requirements of the high-throughput gene sequencing result evaluation

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(报批稿)

(本稿完成日期：2017年3月)

-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

高通量基因测序结果评价要求

1 范围

本标准规定了高通量基因测序结果评价要求涉及的术语与定义、高通量基因测序结果评价的评价指标和判定依据。

本标准适用非单分子测序的基于DNA序列研究的连接酶法测序和聚合酶法测序的结果评价。

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 30989 高通量基因测序技术规程

SN/T 2497.21 进出口危险化学品安全试验方法 第21部分：琼脂糖凝胶电泳试验

3 术语和定义、缩略语

GB/T 30989中界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1 术语和定义

3.1.1

测序平均长度 average read length of sequencing

测序仪器单次测序能达到的平均读长，通常以碱基数表示。

3.1.2

测序通量 Throughput of genesequencing

测序仪器单次测序可获得的序列数量，通常以序列数（Reads）表示。

3.1.3

碱基测序准确率 Accuracy of basesequencing

对已知序列的参考品进行测序，经过碱基识别后比对到已知序列上，统计比对正确的碱基数占测序获得的总碱基数比例。

3.1.4

聚合酶法测序 Sequencing by polymerization

基于碱基互补原理，在聚合酶参与下的基因测序方法。

3.1.5

连接酶法测序 Sequencing by ligation

基于碱基互补原理，在连接酶参与下的基因测序方法。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA——脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

PCR——聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)

4 高通量基因测序结果评价指标

4.1 评价指标与分类

经过高通量测序过程中参数指标统计分析，按照测序方法的不同，对高通量基因测序结果评价分为连接酶法测序评价和聚合酶法测序评价，选择测序通量、碱基测序准确率、测序平均长度这三个能够反映单次测序结果进行评价。

4.2 连接酶法测序结果评价要求

连接酶法测序结果评价如表1所示。

表1 连接酶法测序结果评价要求

评价指标	要求
测序通量	≥ 500 M Reads
碱基测序准确率	≥ 99.0 %
测序平均长度	≥ 25 bp

4.3 聚合酶法测序结果评价要求

聚合酶法测序结果评价如表2所示。

表2 聚合酶法测序结果评价要求

评价指标	要求
测序通量	≥ 3 M Reads
碱基测序准确率	≥ 99.0 %
测序平均长度	≥ 35 bp

5 评价指标检测方法

5.1 测序通量

按照各测序仪器厂商提供的测序样品制备流程和测序操作进行待测序样品处理、质控和测序，待测序反应完成后，测序仪使用测序信号收集器（根据标记信号的不同选用相应不同的收集器，如图像信号收集器中的高精度CMOS，电信号收集器中的半导体传感器，光谱信号搜集器中的光谱成像仪等）。对测序信号完成搜集。再通过信号分析软件，对采集得到的信号进行分析，将信号图转变为核苷酸序列信息。通常以序列数表示。

5.2 碱基测序准确率

对已知序列的参考品进行测序，经过碱基识别后比对到已知序列上，统计比对正确的碱基数占测序获得的总碱基数比例，通常以百分数表示。

5.3 测序平均长度

根据测序通量所得到的序列数，统计所有序列数的碱基长度，计算序列数总长度。测序平均长度等于序列数总长度与序列数总数的比值。

6 结果评价程序

测序仪输出序列信息后，统计测序通量和测序平均长度，并对测序过程中加入的测序参考品进行分析，将测序参考品得到的原始序列比对到参考品的标准基因组序列，统计基于碱基(base)测序准确率。测序数据处理标准流程如图1所示，处理完成后输出碱基测序准确率指标。测序参考品的测序过程，参见附录A。

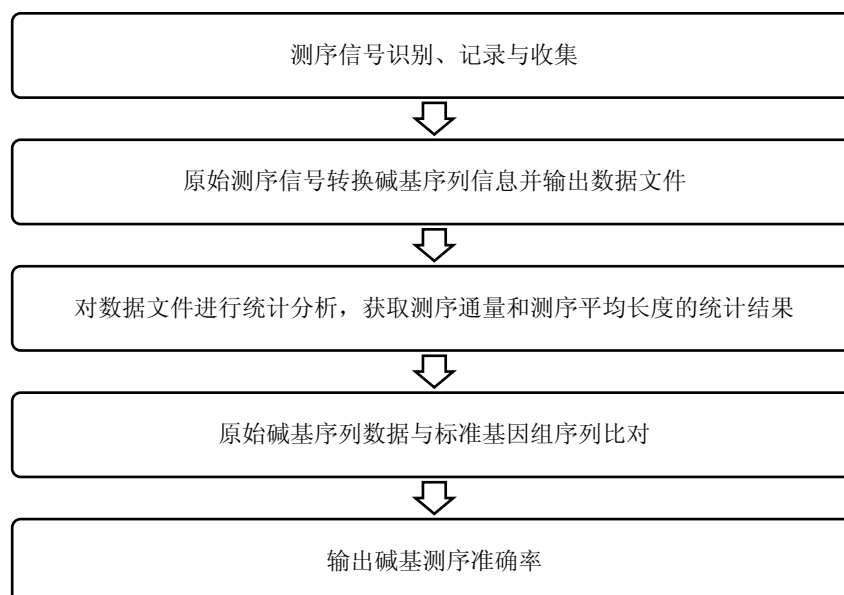


图1 高通量基因测序仪测序数据处理流程图

附 录 A
(资料性附录)
测序参考品测序过程

A.1 测序参考品的选择

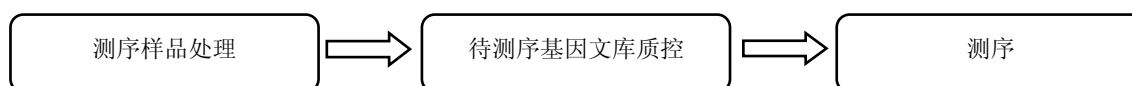
宜采用来源稳定、溯源信息完备和参考序列信息已知的核酸样本, 样例如表A.1所示。

表A.1 国家药品标准物质参考品样例

品种编号	品种名称	成分序号	成分名称	来源
360007	测序仪性能评价用脱氧核糖核酸国家参考品	1	人全基因组 DNA	正常男性外周血白细胞构建永生细胞系
		2	大肠杆菌基因组DNA	DH5 α 感受态培养细胞
		3	高 GC 含量细菌基因组 DNA	人肠道中分离筛选鉴定后培养厌氧菌
		4	11 型 HPV 基因组DNA	11 型 HPV 病毒重组质粒

A.2 参考品测序流程

按照各测序仪器厂商提供的测序样品制备流程和测序操作进行测序参考品样品处理、质控和测序。基本的流程如下：



图A.1 高通量基因测序基本流程图

A.2.1 测序样品处理

A.2.1.1 核酸提取

对待测序的生物样本进行核酸提取，并对提取的核酸进行质控检测。

A.2.1.2 DNA样品打断

对预处理好的DNA样品，采用物理或者酶切的方法将待测序的核酸DNA打断到1kb以内的DNA片段大小。

A.2.1.3 接头连接

将打断成1kb以内的DNA片段制备成两端连有接头（含有与扩增及测序引物互补的序列），中间有短序列标签结构的文库或者标签文库。

A.2.1.4 文库扩增

将接头连接后的文库进行扩增放大得到待测序文库或者标签文库。

A. 2.2 待测序基因文库质量控制

将待测序文库或者标签文库进行质量控制检测。宜按照SN/T 2497.21方法或者Q-PCR方法进行文库质控，建库过程中宜设置阴性对照与阳性对照。

A. 2.3 测序

按照测序仪厂商提供的标准测序流程进行测序操作。
