ICS 07.080
CCS C 04

中华人民共和国国家标准

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

General requirements for high-throughput sequencing technologies of detecting nucleic acid samples

2021-10-11 发布　　2022-05-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　发布

目　　次

前言 …… Ⅲ
引言 …… Ⅳ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　术语和定义 …… 1
4　质量控制要求 …… 2
4.1　通用要求 …… 2
4.2　基因组 DNA 核酸类样本质量要求 …… 3
4.3　总 RNA 核酸类样本质量要求 …… 3
5　质量检测方法 …… 3
5.1　主要设备和仪器 …… 3
5.2　核酸类样本质量检测方法 …… 4
附录 A（资料性）　核酸类样本完整性检测示例图 …… 5

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。

本文件由全国生物样本标准化技术委员会(SAC/TC 559)提出并归口。

本文件起草单位：深圳华大生命科学研究院、中国计量科学研究院、深圳华大智造科技股份有限公司、青岛华大基因研究院、深圳华大基因股份有限公司、上海生物芯片有限公司、广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)、湖北国际旅行卫生保健中心(武汉海关口岸门诊部)。

本文件主要起草人：祝珍珍、王晶、苏小珊、耿春雨、李倩一、陈芳、刘心、谢泽宇、陈利、牛春艳、黄翔、张小燕、许靖曼、陈曲波、龚睿、王鹏、周艳、孙静、曾璇。

引　言

随着高通量测序技术的不断发展和广泛应用，越来越多种类的核酸样本被用于高通量测序，从而在DNA和RNA的分子水平来揭示不同物种间核酸序列的差异以及特定生物学过程和疾病发生过程中的分子机理。由于核酸样本的质量会对高通量测序的数据结果产生直接影响，因此制定用于高通量测序的核酸类样本质量控制的通用要求就显得尤为紧迫和重要，从而保证高通量测序的核酸样本具备达标的质量，进而得到可靠的测序数据，避免信息错误和信息丢失等情况的出现。

本文件是基于高通量测序技术应用和验证数据而制定，规定了多种高通量测序类型的核酸样本准入要求，从而提高测序的成功率及准确性，对于规范整个高通量测序市场起到了重要作用。

用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求

1 范围

本文件规定了用于高通量测序的基因组 DNA 以及总 RNA 核酸类样本的质量控制通用要求，包括样本检测的术语和定义、质量控制要求、质量检测方法。

本文件适用于从新鲜血液、唾液、动植物组织、细胞培养液以及菌液等样本中提取的真核生物和原核生物的基因组 DNA 和总 RNA 样本。

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 30989 高通量基因测序技术规程

GB/T 35537 高通量基因测序结果评价要求

GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求

3 术语和定义

GB/T 30989 和 GB/T 35537 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脱氧核糖核酸 deoxyribonucleic acid；DNA

带有遗传信息的生物大分子。由四种主要的脱氧核苷酸(脱氧单磷酸腺嘌呤 dAMP、脱氧单磷酸鸟嘌呤 dGMP、脱氧单磷酸胞嘧啶 dCMP 和脱氧单磷酸胸腺嘧啶 dTMP)通过 3′，5′-磷酸二酯键连接而成。

注：它们的组成和排列不同，显示出不同的生物功能，如：编码功能、复制和转录的调控功能等。

3.2

核糖核酸 ribonucleic acid；RNA

核酸的一类。由核苷酸通过 3′，5′-磷酸二酯键连接而成的多聚体。

注：不同种类的 RNA 链长不同，行使各式各样的生物功能，如与蛋白质生物合成有关的 RNA 有信使 RNA(messenger RNA，mRNA)、转运 RNA(transfer RNA，tRNA)和核糖体 RNA(ribosome RNA，rRNA)；与转录后加工有关的 RNA 有核小 RNA (small nuclear RNA，snRNA)、核仁小 RNA (small nucleolar RNAs，snoRNAs)；与生物调控有关的 RNA 有微 RNA(microRNAs，miRNA)、干扰小 RNA(small interfering RNA，siRNA)等。

3.3

核糖体 RNA ribosome RNA；rRNA

生物细胞中主要的核糖核酸之一，是一种具有催化能力的核糖酶。

注：其单独存在时不能如其他核糖核酸那样发挥作用，仅在与多种核糖体蛋白质共同构成核糖体(一种无膜细胞器)后才能执行其功能，是含量最高的一种 RNA。原核生物的核糖体所含的 rRNA 有 5S、16S 及 23S 三种。真

核生物有 4 种 rRNA，它们分子大小分别是 5S、5.8S、18S 和 28S。

3.4

凝胶电泳　gel electrophoresis；GE

一种简便高效的分离和纯化 DNA 片段的方法。

注：由于 DNA 分子的双螺旋骨架两侧带有含负电荷的磷酸根残基，因此在电场中向正极移动。在一定的电场强度下，DNA 分子的迁移速度取决于分子筛效应，常用的分子筛有琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶等。具有不同的相对分子质量的 DNA 在分子筛中泳动速度不一样，因而可依据 DNA 分子的大小来使其分离。在电泳过程中可以通过将样品和示踪染料或相对分子质量标准参照物一起进行电泳而得到检测。通常包括自配制及商业化预制胶凝胶电泳。

3.5

微流控分析　microfluidics technology based analysis

使用微管道（尺寸为数十到数百微米）处理或操纵微小流体（体积为纳升到微升）的系统所涉及的科学和技术。

3.6

RNA 完整性分数　RNA integrity score；RIS

RNA 完整值　RNA integrity number；RIN（RIN^e）

RNA 质量分数　RNA quality score；RQS

反映 RNA 完整性的数值。

注：对 RNA 进行自动化电泳或微流控分析，其结果中 28S 和 18S（或 23S 和 16S）条带对应的 RNA 条带峰面积体现 RNA 完整性，RIS/RIN（RIN^e）/RQS 值均为 1～10，数值越大表明 RNA 完整性越好。

3.7

沉降系数　sedimentation coefficient

s

表示颗粒物质或溶质在超速离心场中的沉降速率。

注：一般用 s 表示，$s=v/a$，其中 a 为重力加速度或离心加速度，v 为沉降速度，即沉降系数为每单位离心力场的沉降速度，可间接反映相对分子质量大小。

3.8

高通量基因测序　high-throughput gene sequencing

高通量测序　high-throughput sequencing

区别于传统双脱氧（Sanger）测序，一种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 100 Mb 的测序数据。

［来源：GB/T 30989—2014，3.19，有修改］

3.9

碱基测序准确率　sequencing accuracy

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。

［来源：GB/T 35537—2017，3.1.4］

4　质量控制要求

4.1　通用要求

4.1.1　用于高通量测序的核酸类样本应根据 GB/T 35537 中的碱基测序准确率的要求进行质量控制。

4.1.2　生物样本及相关数据的使用应遵守区域、国家和国际的伦理规范。

4.1.3 生物样本的前处理过程、获取、保存、销毁、运输等操作应符合 GB/T 37864 的要求。

4.1.4 样本质量要求应通过完整性和样本浓度确定。

4.2 基因组 DNA 核酸类样本质量要求

4.2.1 基因组 DNA 完整性

基因组 DNA 是组成生物基因组的所有 DNA。其完整性应符合凝胶电泳主带单一，在 23 kb 左右有清晰条带，且样本无严重降解。如主带不清晰，弥散现象严重则为严重降解。完整性检测图谱见附录 A 中 A.1。

4.2.2 基因组 DNA 样本浓度

单位体积的液体里含核酸的量，可使用质量浓度(ng/μL)表示。基因组 DNA 浓度低于 0.5 ng/μL 时仪器检测精度不够且影响文库构建的成功率，不同文库构建类型和不同高通量测序仪对样本浓度要求不同，样本浓度应大于 0.5 ng/μL。

4.3 总 RNA 核酸类样本质量要求

4.3.1 总 RNA 完整性

总 RNA 是从基因组转录出来的所有转录产物。包括信使 RNA、核糖体 RNA 及一些与转录调控、转录后加工及转录后翻译有关的非编码 RNA。可通过总 RNA 的检测确定 RNA 的完整性。

RNA 样本的完整性宜通过微流控或自动化凝胶电泳分析总 RNA 的 RIN 值以及 rRNA 的 28S/18S 或 23S/16S 比值进行判断(其中原核生物应使用 23S/16S 数值进行判断，真核生物应使用 28S/18S 数值进行判断)，真核生物又分为人、动物，植物、真菌和昆虫这三类作不同要求。不同物种的总 RNA 完整性要求见表 1。微流控分析检测图谱见 A.2～A.5。

表 1 总 RNA 样本质量要求

完整性要求	样本类型			
	原核生物总 RNA	植物、真菌总 RNA	昆虫总 RNA	人、动物(不含昆虫)总 RNA
RIN 值	≥6	≥5	—	≥7
23S/16S 或 28S/18S	23S/16S≥0.8	28S/18S≥0.8	18S 主带清晰	28S/18S≥0.8
微流控检测图谱基线	基线呈直线	基线呈直线	基线呈直线	基线呈直线

4.3.2 总 RNA 核酸类样本浓度

总 RNA 样本浓度低于 1 ng/μL 时仪器检测精度不够且影响 RNA 文库构建的成功率，不同文库构建类型和不同高通量测序仪对样本浓度有不同要求，样本浓度应大于 1 ng/μL。

5 质量检测方法

5.1 主要设备和仪器

5.1.1 凝胶电泳仪。琼脂糖凝胶电泳相关设备及仪器。

5.1.2 微流控电泳分析仪。

5.1.3 定量荧光计：可配合荧光染料检测试剂快速完成核酸浓度的读取，最低应能检测 0.2 ng/μL 的核酸样本。

5.2 核酸类样本质量检测方法

5.2.1 基因组 DNA 核酸类样本的检测方法

采用凝胶电泳法检测 DNA 核酸样本的完整性，宜使用 1%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳，电压 120 V，电泳时间 30 min；采用荧光染料法进行核酸浓度的检测，按照对应的荧光染料检测试剂流程进行操作。

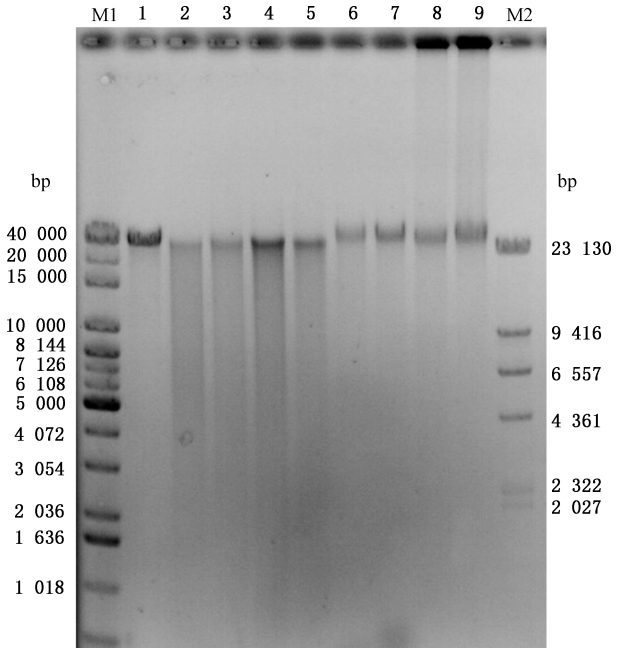
5.2.2 总 RNA 核酸类样本的检测方法

采用微流控电泳或自动化凝胶电泳分析法检测总 RNA 核酸样本的完整性，具体操作参考微流控电泳或自动化凝胶电泳的操作说明；常规样本宜采用荧光染料法进行总 RNA 浓度的检测，微量样本宜采用微流控电泳或自动化凝胶电泳分析法检测总 RNA 的浓度。

附 录 A
（资料性）
核酸类样本完整性检测示例图

A.1 基因组 DNA 样本完整性检测

凝胶电泳检测基因组 DNA 样本完整性结果见图 A.1。泳道 2、泳道 3 的样本降解严重，高通量测序结果碱基测序准确率低于 99%。



说明：

M ——marker，参照标准，用于指示核酸分子大小的一系列核酸分子；

bp ——base pair，碱基对，用于表示 DNA 核酸类样本分子大小的单位。

注 1：泳道 1、4、5、6、7、8、9：样本 DNA 在 23 kb 左右主带清晰，无严重降解现象。

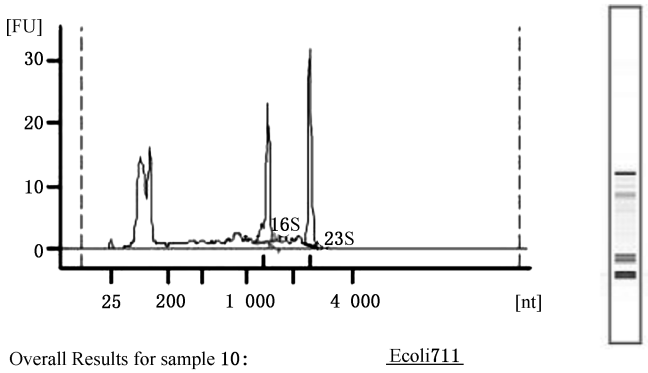
注 2：泳道 2、泳道 3：样本 DNA 主带不清晰，有弥散，降解严重。

图 A.1 凝胶电泳检测结果

A.2 原核总 RNA 样本完整性检测

微流控电泳检测原核总 RNA 样本完整性结果见图 A.2。

注：RIN>7，23S/16S>1，图谱基线呈直线。



Overall Results for sample 10:	Ecoli711
RNA Area:	201.8
RNA Concentration:	403 ng/μL
rRNA Ratio[23S/16S]:	1.2
RNA Integrity Number(RIN):	7.9 [B.02.07,Anomaly Threshold(s) manually adapted]

说明：

FU ——荧光单位，荧光的大小反映了核酸类样本的浓度；

nt ——核苷酸，用于表示 RNA 核酸类样本分子大小的单位；

Overall Results for sample 10 ——样本 10 的总结果；

Ecoli711 ——样本名称，可以自主设置，若没有设置，此处会显示 sample 10；

RNA Area ——RNA 的面积，指图中峰型覆盖的总面积；

RNA Concentration ——RNA 的浓度；

rRNA Ratio[23S/16S] ——23S 和 16S 的 rRNA 比值；

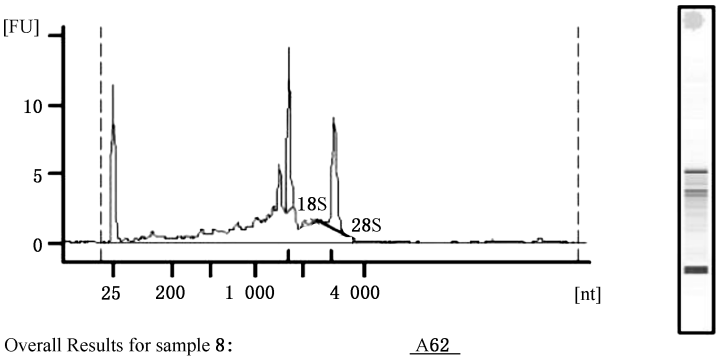
RNA Integrity Number(RIN) ——仪器自己计算出的一个数值，代表了 RNA 的完整性。

图 A.2 原核样本微流控电泳检测结果

A.3 植物总 RNA 样本完整性检测

微流控电泳检测植物总 RNA 样本完整性结果见图 A.3。

注：RIN＞6，28S/18S≥1，图谱基线呈直线。



Overall Results for sample 8:	A62
RNA Area:	90.2
RNA Concentration:	60 ng/μL
rRNA Ratio[28S/18S]:	1.0
RNA Integrity Number(RIN):	6.8 (B.02.07)

说明：

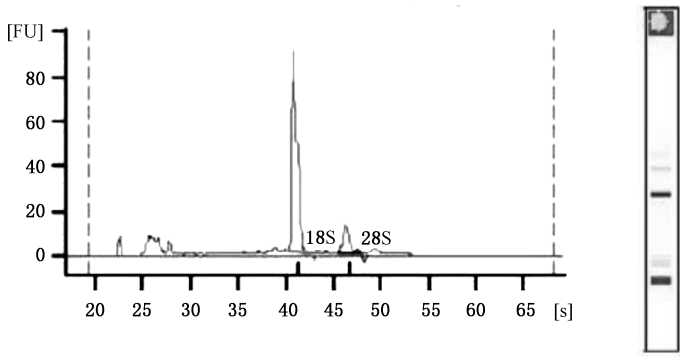
FU	——荧光单位，荧光的大小反映了核酸类样本的浓度；
nt	——核苷酸，用于表示 RNA 核酸类样本分子大小的单位；
Overall Results for sample 8	——样本 8 的总结果；
A62	——样本名称，可以自主设置，若没有设置，此处会显示 sample 8；
RNA Area	——RNA 的面积，指图中峰型覆盖的总面积；
RNA Concentration	——RNA 的浓度；
rRNA Ratio[28S/18S]	——28S 和 18S 的 rRNA 比值；
RNA Integrity Number(RIN)	——仪器自己计算出的一个数值，代表了 RNA 的完整性。

图 A.3 植物样本微流控电泳检测结果

A.4 昆虫总 RNA 样本完整性检测

微流控电泳检测昆虫总 RNA 样本完整性结果见图 A.4。

注： 18S 主带清晰，图谱基线呈直线。



Overall Results for sample 8:	Ld-1
RNA Area:	298.0
RNA Concentration:	244 ng/μL
rRNA Ratio[28S/18S]:	0.1
RNA Integrity Number(RIN):	N/A (B.02.07)

说明：

FU ——荧光单位，荧光的大小反映了核酸类样本的浓度；

s ——秒，表示 RNA 电泳迁移的时间；

Overall Results for sample 8 ——样本 8 的总结果；

Ld－1 ——样本名称，可以自主设置，若没有设置，此处会显示 sample 8；

RNA Area ——RNA 的面积，指图中峰型覆盖的总面积；

RNA Concentration ——RNA 的浓度；

rRNA Ratio[28S/18S] ——28S 和 18S 的 rRNA 比值；

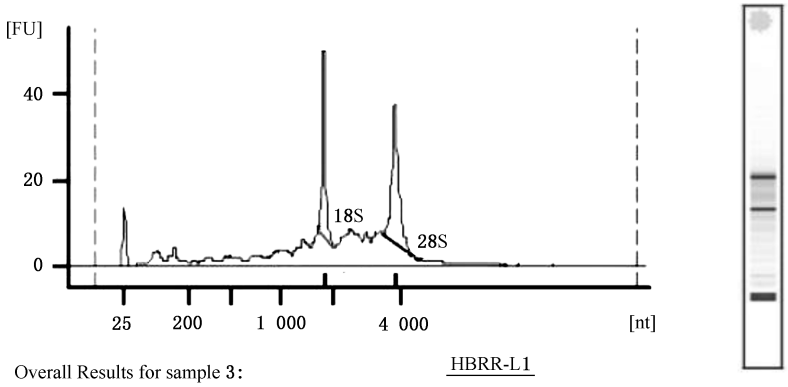
RNA Integrity Number(RIN) ——仪器自己计算出的一个数值，代表了 RNA 的完整性。昆虫样本没有此数值，所以显示 N/A。

图 A.4 昆虫样本微流控电泳检测结果

A.5 动物总 RNA 样本完整性检测

微流控电泳检测动物总 RNA 样本完整性结果见图 A.5。

注：RIN＞7，28S/18S＞1，图谱基线呈直线。



HBRR-L1	
Overall Results for sample 3:	
RNA Area:	345.5
RNA Concentration:	228 ng/μL
rRNA Ratio[28S/18S]:	1.3
RNA Integrity Number(RIN):	7.5 (B.02.07)

说明：

FU ——荧光单位，荧光的大小反映了核酸类样本的浓度；

nt ——核苷酸，用于表示 RNA 核酸类样本分子大小的单位；

Overall Results for sample 3 ——样本 3 的总结果；

HBRR-L1 ——样本名称，可以自主设置，若没有设置，此处会显示 sample 3；

RNA Area ——RNA 的面积，指图中峰型覆盖的总面积；

RNA Concentration ——RNA 的浓度；

rRNA Ratio[28S/18S] ——28S 和 18S 的 rRNA 比值；

RNA Integrity Number(RIN) ——仪器自己计算出的一个数值，代表了 RNA 的完整性。

图 A.5 动物样本微流控电泳检测结果