



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

新型冠状病毒全基因组测序通用技术要求

General technical requirements for whole genome sequencing of SARS-CoV-2

征求意见稿

（完成时间：2024 年 7 月 30 日）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC 136）归口。

本文件起草单位：TBD

本文件主要起草人：TBD

新型冠状病毒全基因组测序通用技术要求

1 范围

本文件描述了新型冠状病毒全基因组测序方法的术语和定义、要求、试验方法等。

本文件适用于对口咽拭子、鼻咽拭子、气道抽吸液、痰液、肺泡灌洗液、其他呼吸道分泌物或病毒培养物等样本中的新型冠状病毒的全基因组测序，包括宏转录组测序法、多重聚合酶链反应（PCR）测序法及杂交捕获测序法等。

本文件适用的测序原理包括可逆末端终止测序、联合探针锚定聚合测序、纳米孔测序等。

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 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 19495.2 转基因产品检测实验室技术要求

《新型冠状病毒实验室生物安全指南》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

基因测序 gene sequencing

对核酸分子不同碱基类型的测定，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）或者尿嘧啶（U）等碱基的组成或排列顺序。

[来源：YY/T 1723—2020，3.1]

3.2

全基因组测序 whole genome sequencing

对生物体整个基因组序列进行测定，获得完整的基因组信息。

[来源：DB32/T 3762.11—2020，3.1]

3.3

宏转录组测序 metatranscriptomic sequencing

以特定环境中整个群落作为研究对象，不分离培养，直接提取得到的所有 RNA，经过逆转录合成互

补 DNA 后，进行基因测序。

[来源：GB/T 40226—2021, 3.3, 有修改]

3.4

多重聚合酶链反应 multiplex polymerase chain reaction

多重聚合酶链反应是在同一扩增反应体系中，使用两对以上引物同时扩增出多个核酸片段的扩增反应。

[来源：GB/T 19915.5—2005, 3.2]

3.5

杂交捕获 hybridization capture

对一个或多个基因的核苷酸序列定制目标基因区域特异性探针，与基因组核苷酸进行杂交，并富集目标基因片段的过程。

[来源：GB/T 37872—2019, 3.1.6, 有修改]

3.6

阈值循环数 cycle threshold , crossing point;

Ct, cp

实时监测扩增过程中，反应管内的荧光信号到达指数扩增时经历的循环周期数。主要的计算方式是以扩增过程前 3 到 15 个循环的荧光值的 10 倍标准差为阈值，当荧光值超过阈值时的循环数则为阈值循环数。

[来源：YY/T 1182—2020, 3.4]

3.7

测序读长 read length of gene sequencing

单次运行可读取的质量合格的序列片段长度，通常以碱基数表示。

[来源：YY/T 1723—2020, 3.4]

3.8

测序覆盖率 coverage rate of sequencing

待测样本核苷酸检测结果覆盖于参考序列上的比例(测序覆盖率=测序区域长度÷参考序列总长度)。

[来源：GB/T 30989—2014, 3.30]

3.9

测序深度 depth of sequencing

待测样本中某个核苷酸被检测到的次数。

[来源：GB/T 30989—2014，3.31]

3.10

标签或条码 barcode or index

一段特征性的脱氧核苷酸段片段，在多样本混合测序时，充当识别特定样本来源的唯一编号。

[来源：GA/T 1693—2020，3.10，有修改]

4 要求

4.1 生物安全

实验室仪器和设备要求应符合 GB 19489 和 GB/T 19495.2 的规定。实验室应符合《新型冠状病毒实验室生物安全指南》的要求，未经培养的感染性材料的操作在采用可靠的方法灭活前进行核酸提取及临床样本的灭活等操作，应在生物安全二级实验室（BSL-2）进行，同时采用生物安全三级实验室（BSL-3）的个人防护；感染性材料或活病毒在采用可靠方法灭活后进行的核酸检测操作应在 BSL-2 进行。提取后的核酸或反转录的 cDNA 制备后的相关操作可在生物安全一级实验室（BSL-1）进行。

4.2 样本

应对样本的采集、包装、运送、储存、灭活方式和前处理方式等进行验证。

4.3 核酸提取及纯化

应对核酸提取及纯化效率，如产量、纯度及完整性等进行验证。

4.4 病毒核酸质量控制

4.4.1 核酸定量

应对样本中新型冠状病毒的核酸载量进行测定，具体如下：

a) 应对病毒核酸定量方法，如实时荧光定量 PCR 等方法进行验证。

b) 应对符合要求的核酸浓度有明确的规定。使用实时荧光定量 PCR 测定样本中的病毒载量，在 Ct 值 ≤ 32 时，开展全基因组测序；Ct 值 > 32 时，不一定满足高通量测序的核酸浓度要求，但可优化实验条件后进行测序。

4.4.2 片段分析

宜对病毒核酸片段分析方法进行验证（可选）。

4.5 测序文库制备

文库制备方法包括但不限于宏转录组测序法、多重PCR测序法、杂交捕获测序法和纳米孔测序建库法等，具体如下：

a) 宏转录组测序法：主要步骤包括对去除宿主/其他病原体 RNA（可选），逆转录，添加接头、文库扩增（可选）、文库产物纯化和核酸定量、文库产物均一化混合等。

b) 多重 PCR 测序法的主要步骤包括：对样本核酸的 RNA 进行逆转录，采用覆盖新型冠状病毒基因组的扩增引物进行富集扩增，添加接头、文库扩增（可选）、文库产物纯化和核酸定量、文库产物均一化混合等。应根据新冠变异位点的变化，及时对靶向扩增引物池进行更新。

c) 杂交捕获测序法的主要步骤包括：对样本核酸中的 RNA 进行逆转录，添加接头、文库扩增（可选）、采用新型冠状病毒基因组特异的杂交探针进行富集捕获，文库扩增（可选）、文库产物纯化和核酸定量、文库产物均一化混合等。

d) 纳米孔测序建库法：对样本核酸中的 RNA 进行逆转录，片段化或片段筛选（可选）、文库扩增（可选）、损伤修复和末端修复、添加接头等。

应对测序文库制备方法进行验证。

4.6 测序文库质量控制

应对测序文库进行质量控制，包括但不限于标签跳转污染率，文库扩增均匀性，文库产物纯化效率、片段长度、核酸浓度以及均一化混合的数量等。

4.7 测序

对测序文库进行测序，测序方法包括可逆末端终止测序、联合探针锚定聚合测序和纳米孔测序等。

应对测序方法进行验证。

4.8 测序数据质量控制

4.8.1 测序读长和有效数据量

应对测序文库的测序读长及数据量进行验证。在规定的测序读长模式下，测序有效数据量应符合实验室用户规定的要求。

4.8.2 碱基识别质量百分比

单次测序，统计碱基识别质量在规定阈值以上的比例，碱基识别质量百分比平均值应不低于实验室用户规定的要求。

4.9 病毒基因组比对

4.9.1 病毒参考基因组

应以 NC_045512.2 作为新型冠状病毒参考基因组。

4.9.2 测序覆盖率和测序深度

新型冠状病毒全基因组的测序覆盖率应 $\geq 96\%$ 且 S 基因完整，平均测序深度应 $\geq 10\times$ 。SNV 过滤阈值应符合实验室用户规定的要求。

4.10 病毒基因组组装和分型

4.10.1 病毒基因组组装

在规定的测序覆盖率和测序深度下，对新型冠状病毒的测序结果进行组装，包括基于参考基因组的组装或从头组装。

应对病毒基因组组装方法进行验证。

4.10.2 病毒基因组分型

对组装得到的新型冠状病毒基因组进行分型，可采用“Pangolin 法”、“GISAID 法”和“Nextstrain 法”等分型方法。

应对病毒基因组分型方法进行验证。

4.10.3 分型准确性

应对分型准确性进行验证。在规定的测序覆盖率和测序深度下，对新型冠状病毒国家标准品的分型结果应与预期型别一致。

4.10.4 变异情况分析

应对单核苷酸位点变异（SNV）和插入/缺失（Indel）等变异类型进行分析，并注释其对应氨基酸的变化。

5 试验方法

5.1 生物安全

应不同工作内容对实验室进行分区，避免交叉污染，包括试剂储存和准备区、样本制备区、核酸扩增区、文库制备区、高通量测序区、生信分析区等。集中布置形式的实验室设置应遵循“各区独立，单向流动（注意风向，压力梯度走向），因地制宜，方便工作”的原则。

5.2 样本

样本的采集、包装、运送、储存、灭活方式和前处理方式等应符合《新冠病毒标本采集和检测技术指南》的要求。

5.3 核酸提取及纯化

核酸提取及纯化方法包括 Trizol 法、离心柱纯化、磁珠法等，应按照提取试剂说明书的方法进行试验。

5.4 病毒核酸质量控制

病毒核酸的质量控制方法包括核酸浓度的测定及片段分析，具体如下：

a) 病毒核酸定量方法包括实时荧光定量 PCR 方法、荧光染料法等，应按照检测试剂说明书的方法步骤法进行试验。

b) 片段分析可使用片段分析仪、毛细管电泳等进行分析（可选）。

5.5 测序文库制备

文库制备方法包括不限于宏转录组测序法、多重PCR测序法、杂交捕获测序法和纳米孔测序建库法等，应按照文库制备说明书的方法进行试验。对新型冠状病毒标准品进行文库制备，结果应符合4.5的要求。

5.6 测序文库质量控制

文库质控包括清晰标记添加的标签接头，检测文库浓度、检测文库片段大小等，应按照文库制备说明书中指定或推荐的方法进行试验。符合要求的文库产物进行均一化混合，浓度应依据测序试剂及测序仪器的要求。对新型冠状病毒标准品进行文库质控，判定结果是否符合4.6的要求。

5.7 测序

测序方法包括可逆末端终止测序、联合探针锚定聚合测序和纳米孔测序等，应按照测序试剂说明书、测序仪器说明书的方法进行试验。对新型冠状病毒标准品进行测序，判定结果是否符合4.7的要求。

5.8 测序数据质量控制

测序数据质控包括去除含接头或质量低的序列、宿主基因组序列等，多重 PCR 测序法的数据应去除引物序列。测序完成后，应进行碱基的质量值进行分析和统计。对新型冠状病毒标准品进行测序数据质控，判定结果是否符合 4.8 的要求。

5.9 病毒基因组比对

将质控后的数据与参考序列进行基因组比对，获得测序数据与参考序列比对的 bam 文件。根据式（2）和式（3）分别计算测序覆盖率值和测序平均深度值。判定结果是否 4.9.2 的要求。

$$CVR = \frac{CVB}{GB} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

CVR——测序覆盖率

CVB——覆盖到的基因组序列碱基数

GB——基因组全部碱基数

$$DP = \frac{MB}{CVB} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

DP——测序平均深度

MB——总比对碱基数

CVB——覆盖到的基因组序列碱基数

5.10 病毒基因组组装和分型

根据与参考序列比对的 bam 文件检出突变位点，对不符合 5.10.4 要求的 SNV 过滤，使用生物信息学工具和算法对病毒基因组进行组装、修正，获得一致性序列；使用“Pangolin 法”、“GISAID 法”和“Nextstrain 法”等对组装后的基因组序列进行分型鉴定。判定新型冠状病毒标准品的分型准确性是否符合 4.10 的要求。使用生物信息学工具通过与参考基因组比对、与分型参考株比对确定新增突变位点，并注释其对应氨基酸的变化等。

参 考 文 献

- [1] YY/T 1723—2020 高通量测序仪
- [2] DB32/T 3762.11—2020 新型冠状病毒检测技术规范 第11部分：全基因组高通量测序
- [3] GB/T 40226—2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法
- [4] GB/T 19915.5—2005 猪链球菌2型多重PCR检测方法
- [5] GB/T 37872—2019 目标基因区域捕获质量评价通则
- [6] YY/T 1182—2020 核酸扩增检测用试剂(盒)
- [7] GB/T 30989—2014 高通量基因测序技术规程
- [8] GA/T 1693—2020 法庭科学 DNA二代测序检验规范
- [9] GB/T 35537—2017 高通量基因测序结果评价要求
- [10] GB/T 40982—2021 新型冠状病毒核酸检测试剂盒质量评价要求
- [11] T/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