**国家市场监督管理总局**

**中国国家标准化管理委员会**

GB/T XXXXX—201X

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

超低频突变检测双重测序法

Ultra-rare mutation detection

Duplex Sequencing

（征求意见稿）



发布

发布

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

微生物超低频突变测定 双重测序法

1 范围

本标准规定了微生物超低频突变测定双重测序法的原理、试剂或材料、仪器设备、测定步骤和结果分析。

本标准适用于超低频突变的基因組DNA序列检测。

2 规范性引用文件

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

标签 barcode

接在DNA待测片段两侧的核苷酸片段，用以标示同一扩增家族的DNA，协助进行变异位点的确认。

3.2

互补标签家族 tag family

源自同一互补标签的片段。

3.3

单链同源序列 single-strand consensus sequences，SSCSs

带有相同标签的序列，不考虑反向互补。

3.4

双链同源序列 double-strand consensus sequences，DCSs

带有相同标签的序列，包含反向互补链。

4 原理

通过DNA双链体的两条链进行独立标记和测序。在双螺旋DNA片段的两条链，接上一段12nt随机且互补的双链核苷酸序列。。因为DNA双链体的两股练是互补的，突变会同时存在互补家族的同一个位置上，排除掉制备过程中所造成的变异，可正确检测实际的突变位点。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T6682二级。

5.2 接头链的合成序列

5′-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3′

5′-TCTTCTACAGTCANNNNNNNNNNNNAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-3′

N为A、T、C或G，由12个随机碱基组成标签片段。将寡核苷酸溶解于TE或ddH2O中至终浓度100μM，并放置于-20℃保存。

5.3 接头链的引物序列

5′-AATGATACGGCGACCACCGAG-3′

5′-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGC-3′

X按样品需求设计文库标记序列。将寡核苷酸溶解于TE或ddH2O中至终浓度20μM，并放置于-20℃保存。

5.4 高通量测序建库试剂盒

5.5 TE缓冲液

低浓度EDTA的1TE缓冲液，由10 mM超纯Tris和0.1 mM的EDTA配置，调整pH值至8.0。

6 仪器设备及器具

6.1 数字PCR扩增仪.

6.2 96孔板磁性分离器。

6.3 离心机。

6.4 高通量测序仪。

6.5 生物芯片分析系统。

6.6 电子天平：精度为0.01 g。

7 测定步骤

7.1 样品准备

宜根据文献等资料，从目标细胞中提取DNA。须有两种（含）以上基因样品（样品A、样品B，且样品A与样品B之间存在点突变差异。

7.2 双重测序接头的合成

按以下步骤进行操作：

a) 退火：将浓度100μM的两个寡核苷酸片段各取100μl在95℃下将试管加热5分钟后，将仪器关掉静置1小时，此时需确保仪器不是设定为自动降温。

b) 延伸：将步骤a.的产物按试剂说明与dNTP和核酸外切酶混和均匀，分装至两个0.2 ml的PCR管中并在37℃下孵育1小时。

c) DNA回收：使用乙醇沉淀DNA，并加入200 μl的 ddH2O溶解。注意两股不可被熔解。若沉淀后过度干燥有可能造成DNA的熔解。

e) 酶切：以限制性内切酶对步骤c的产物进行酶切。将混和物分装至4个0.2 ml的PCR管中，并在37℃孵育16小时。

f) 纯化：加入并均匀混和50μl的3M乙酸钠，最终体积应为550μl。将混和溶液平分到1.5 ml的管内，每管275μl，总共约为2管，并加入675μl室温的100%乙醇到各管中。倒置试管以混和均匀，并以10,000g在4℃下离心30分钟。移除上清液后，加入1 ml的75%(vol/vol)乙醇至各管中。倒置试管以混和均匀，并立即地以10,000g在4℃下离心30分钟。移除上清液后，在纸巾上倒置试管10分钟以干燥，接着正置5分钟。对于DNA下清液干燥的时间须非常准确，过度干燥DNA将导致股的熔化。加入100μl的TE缓冲液至下清液并混合均匀，将所有试管集在一起，最终体积为200μl，终浓度约为50μM，放入-80℃的冰箱中保存。

7.3 样品DNA的处理

按高通量测序建库试剂盒说明操作，最终获得带有A尾的样品文库。

7.4 双重测序法接头与待测文库DNA的连接和扩增

按以下步骤进行操作：

a) 将接头与处理后的DNA文库样品按总浓度20:1混合后，按照T4 DNA连接酶说明混合连接，中以25℃下培育15分钟。

b) 依照DNA分选磁珠试剂盒指示，分选排除< 150 bp的DNA片段，并以高灵敏度DNA分析试剂盒计算200-900 bp的DNA总量。

c) 按每800万读数数据量取40 amol的DNA样品量(已连接接头)进行PCR扩增，上下游引物序列分别使用接头链的引物序列，按照所选用之高保真DNA聚合酶指示设定扩增程序，定量200-900 bp的DNA后以高通量测序仪测序。

8 结果分析

按二代测序数据处理标准程序进行数据清理后按下列指标获得实际突变率：

a) 做标签家族分类时，需包含双向的互补序列，且当双向序列皆在同一位点辨识出突变才视为真正的突变位点；

b) 突变率的定义为每单核苷酸含多少突变位点，即以突变位点的读数除以总读数。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_