

国家标准《生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备》
(征求意见稿)

编制说明

《生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备》标准起草组
2025年3月

目录

（一）工作简况.....	3
（二）国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据），修订国家标准时，还包括修订前后技术内容的对比.....	4
（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益.....	5
（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况.....	20
（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因.....	20
（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系	20
（七）重大分歧意见的处理经过和依据.....	21
（八）涉及专利的有关说明.....	21
（九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议.....	21
（十）其他应予说明的事项.....	21

国家标准《生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备》编制说明

(一) 工作简况，包括任务来源、协作单位、起草过程、国家标准主要起草人及其所做的工作等

1、任务来源

本项目根据国家标准化管理委员会于2024年3月25日下达的2024年第一批推荐性国家标准计划的通知(国标委综合(2024) 16号)，本项目计划编号为20240049-T-469，名称为生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备，本标准等同采用ISO 20397-1:2022《生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备》。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准由中国测试技术研究院生物研究所、苏州大学附属第一医院等单位联合起草。

项目完成周期是16个月，计划完成日期2025年7月。

2、目的和意义

制定《生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备》国家标准，旨在填补国内外在核酸提取和文库制备标准化方面的空白，通过统一技术规范、提高数据质量、推动技术普及和支持行业发展，促进测序技术在科研、临床和产业中的广泛应用。提升测序技术的科学性和可靠性，推动精准医疗、规范市场秩序、支持政策制定和降低技术应用成本，为测序技术的可持续发展奠定坚实基础。

3、协作单位

中国测试技术研究院生物研究所、苏州大学附属第一医院等单位共同起草。

4、标准编制过程和主要工作过程

(1) 2022年12月至2023年6月，标准起草单位组织相关技术人员对《生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备》标准项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外《生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备》标准、文献，了解了国内外相关技术动态，并且明确了工作思路和进程安排。

(2) 2023年9月10日标准起草组向全国生化检测标准化技术委员会提交了项目建议书以及国家标准草案，并于2023年9月16日会议全体委员通过评估。

(3) 2024年4月1日收到全国生化检测标准化技术委员会生检标(2024)5号文件以及该标委会转发的国标委综合(2024) 16号《国家标准委关于下达2024年第一批国家标准制修订计划的通知》立项文件，计划编号：20240049-T-469。

(4) 2024 年 11 月 17 日，起草小组对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《生物技术 大规模并行测序 第 1 部分：核酸和文库制备》标准的起草工作，与会专家就《生物技术 大规模并行测序 第 1 部分：核酸和文库制备》标准（草案）进行了讨论，提出了宝贵的意见和建议。标准起草小组根据专家意见进行了修改和完善。

(5) 2024 年 12 月至 2025 年 3 月，进行《生物技术 大规模并行测序 第 1 部分：核酸和文库制备》标准的起草研制工作。完成了《生物技术 大规模并行测序 第 1 部分：核酸和文库制备》标准的编制说明，并对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《生物技术 大规模并行测序 第 1 部分：核酸和文库制备》标准（草案）进一步完善和修改情况，向全国生化检测标准化技术委员会提交了《生物技术 大规模并行测序 第 1 部分：核酸和文库制备》标准（征求意见稿）和编制说明。

5、国家标准主要起草人及其所做的工作

中国测试技术研究院生物研究所、苏州大学附属第一医院等单位共同起草。

标准起草工作组主要成员有：。

工作组成员及其所做的工作：

(二) 国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据），修订国家标准时，还包括修订前后技术内容的对比

1、标准编制原则

本标准的编制依据GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》，并参照GB/T 6379.1-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第1部分 总则与定义》和GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第2部分 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》。

2、确定国家标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据）

本标准全文分为 8 章和 3 个附录。标准的主要内容如表 1 所示：

表 1 本标准的主要内容

章条	名称	内容简要
1	范围	规定了核酸样品质量评估的一般要求和指导原则。适用于测序和数据生成之前的文库制备和文库质量评估。
2	规范性引用文件	列举了对于本标准应用必不可少的引用文件，主要注日期的引用文件，

		<p>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。</p> <p>ISO 20395:2019 生物技术 核酸靶序列定量方法性能评估要求 qPCR 和 ddPCR 等相关标准文件。</p>
3	术语和定义	ISO 20395:2019 界定的术语和定义适用于本文件。
4	核酸样品质量评价	评估核酸样本定量、定量、纯度、完整性等。
5	核酸文库的制备	描述了核酸文库制备的关键步骤和质量控制措施，通过核酸碎片化、通用序列的添加、片段大小选择、扩增、纯化和清洗、文库定量、文库定性等步骤制备高质量的核酸文库，确保测序结果的准确性和可重复性。
6	确认	阐述了在核酸文库制备和测序工作流程中，通过系统化的验证协议的开发与实施、样本类型的选择、错误来源的评估、性能要求的验证、实验室自定义标准、质量指标的参考的验证和质量控制，确保测序结果的准确性和可靠性。
7	参考资料或对照	阐述了对照样品的分类、阳性对照、阴性对照、无模板对照、内参对照、参考物质。在核酸测序和质量控制中通过使用对照样品和参考材料，有效监测测序流程的质量，确保结果的准确性和可靠性。
8	污染	阐述了检验前、核酸与文库制备过程中的污染来源、控制措施、评估指标等。
9	附录 A	资料性附录，文库构建前样品质量评估检查表
10	附录 B	资料性附录，选定的 MPS 平台和应用程序的质量标准示例
11	附录 C	资料性附录，参考资料清单

（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

1. DNA 提取体系的建立与评估

外周血样本提取游离 DNA；痰液、肺泡灌洗液、脑脊液、胸腹水、尿液、分泌物等提取混悬 DNA。

1.1. 血浆样本游离 DNA 提取评估

1.1.1. 血浆样本游离 DNA 提取步骤

采用 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 从血浆中提取游离 DNA。

试剂盒	货号	规格	组分	规格
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)	55114	50 次/盒	QIAgen Mini 管	50
			填充管 (20mL)	2x25
			收集管 (2mL)	50
			洗脱管 (1.5mL)	50
			真空吸尘器连接器	50
			Buffer ACL	220mL
			Buffer ACB(浓缩)	300mL
			Buffer ACW1(浓缩)	19mL
			Buffer ACW2(浓缩)	13mL
			Buffer AVE(紫色盖子)	5x2mL
			QIAgen Proteinase K	4x7mL
			Carrier RNA(红色盖子)	310µg

具体操作步骤如下：

- (1) 离心分离血浆，预冷高速低温离心机至4℃，将采血管放入离心机中，1800g，离心10min。
- (2) 转移上清血浆样本至新的1.5mL低吸附离心管中，4℃，16000g离心10min。
- (3) 水浴锅预热至60℃。取出无菌15mL离心管标记样本对应编号。
- (4) 配置Buffer ACL Mix：样本进入量体积的0.8倍的buffer ACL，加入Carrier RNA(按照每个样本10µL加入)，混匀。
- (5) 在标记好的15mL离心管中加入3mL血浆样本，加入300µL蛋白酶K（每1mL样本进入量加入100µL蛋白酶k），涡旋混匀5s。
- (6) 每个样本加入2.4mL Buffer ACL Mix，涡旋混匀5s，60℃孵育30min。孵育结束后放置于冰上冷却。
- (7) 每个样本加入5.4mL Buffer ACB(已经按照试剂盒说明加入国药异丙醇)，涡旋混匀5s，冰上孵育5min。
- (8) 真空泵上加上QIAamp vac，然后插上连接子，最后将标记好的吸附柱插在连接子上，加入延伸管，将冰浴后的样本，依次加入对应的延伸管中。
- (9) 打开真空泵，将样本缓慢匀速（2min/mL）通过吸附柱，每个样本全部通过吸附柱后，关闭QIAamp vac阀门且盖上吸附柱管盖。待所有样本全部通过吸附柱后，统一进行下一步。
- (10) 向吸附柱中加入600µL Buffer ACW1（按照试剂盒说明已经加入国药乙醇），打开真空泵，使液体缓慢匀速通过吸附柱，关闭QIAamp vac阀门。

- (11) 向吸附柱中加入750μL Buffer ACW2（按照试剂盒说明已经加入国药乙醇），打开真空泵，使液体缓慢匀速通过吸附柱，关闭QIAamp vac阀门。
- (12) 向吸附柱中加入750μL无水乙醇，打开真空泵，使液体缓慢匀速通过吸附柱，关闭真空泵，且盖上吸附柱管盖。
- (13) 将吸附柱取下转至2mL收集管上，至于离心机中16000g离心3min。
- (14) 将吸附柱取出，放置于标记好的1.5mL离心管(试剂盒提供)中，向吸附柱加入35μL 无酶水，室温静止3min，16000g离心2min洗脱DNA。
- (15) DNA混匀，Qubit定量。

1.1.2. 游离 DNA 提取质量评估

1.1.2.1. 评价方法与标准

按以上操作步骤提取的 DNA,经 Qubit 测定后,总量不少于 10ng 的样本数量应≥80%。

1.1.2.2. 实验结果与评价结论

外周血样本共计40例，游离DNA总量均高于10ng，故游离DNA提取质量的性能评估通过。

原始数据见附件1-核酸提取。

1.2. 非血浆样本 DNA 提取评估

1.2.1. 非血浆样本 DNA 提取试剂盒的选择

1.2.1.1. 样本类型

已知微生物培养结果的痰液共 5 例。

1.2.1.2. 实验原理

利用痰液液化剂，在液化痰液的同时，对细胞进行处理消化，释放大量 DNA 到上清中，利用核酸提取试剂盒对 DNA 进行回收。

1.2.1.3. 结果判断

(1) DNA提取对比结果

样本编号	DNA 提取总量 (ng)		DNA 提取总量比例 (天根/Qiagen)
	天根	Qiagen	
R1812066PSPN093	32200	35425	0.909
R1812067PSPN094	9640	9420	1.023
R1812115PSPN153	7100	5246	1.353
R1812093PSPN131	3744	3235	1.157
R1812081PSPN113	5500	5420	1.015
			<i>p</i> =0.265

采用两种试剂盒所提 DNA 经 Qubit 测定后，全部 5 例痰液 DNA 总量均大于 1 μg，DNA

提取质量合格，其中 4/5 天根组样本，其 DNA 总量高于 Qiagen 组，但无统计学差异。

(2) 文库构建对比结果

样本编号	扩增倍数		扩增倍数比例 (天根/Qiagen)
	天根	Qiagen	
R1812066PSPN093	5.03	6.23	0.807
R1812067PSPN094	3.40	3.46	0.983
R1812115PSPN153	7.31	6.98	1.047
R1812093PSPN131	6.59	5.96	1.106
R1812081PSPN113	9.46	8.34	1.134
			$p=0.798$

采用两种试剂盒所提 DNA 经建库步骤，文库经 5 个循环的 PCR 扩增后，全部 5 例痰液文库扩增倍数均大于 3，文库构建质量合格，其中 3/5 天根组样本，其文库扩增倍数高于 Qiagen 组，但无统计学差异。

(3) 上机质量对比结果

样本编号	数据量		数据量比例 (天根/Qiagen)
	天根	Qiagen	
R1812066PSPN093	23992688	17214237	1.394
R1812067PSPN094	34935978	34854317	1.002
R1812115PSPN153	30983386	30010380	1.032
R1812093PSPN131	31912980	30086580	1.061
R1812081PSPN113	15370826	16152330	0.952
			$p=0.294$

样本编号	Q30	
	天根	Qiagen
R1812066PSPN093	80.47	80.80
R1812067PSPN094	93.32	94.03
R1812115PSPN153	94.11	92.22
R1812093PSPN131	93.67	92.88
R1812081PSPN113	92.45	91.48

采用两种试剂盒所提 DNA 经建库、上机步骤，所得下机数据全部符合 Raw reads $\geq 8M$ 且 Q30 $\geq 75\%$ 。其中 4/5 天根组样本，其 Raw reads 高于 Qiagen 组，但无统计学差异。

(4) 准确性对比结果

样本编号	微生物培养结果	高通量病原体检测结果	
		天根	Qiagen
R1812066PSPN093	纹带棒状杆菌多；洋葱伯克霍尔德菌较少	纹带棒状杆菌多；洋葱伯克霍尔德菌较少	纹带棒状杆菌多
R1812067PSPN094	嗜麦芽窄食单胞菌多	嗜麦芽窄食单胞	嗜麦芽窄食单胞

		菌多	菌多
R1812115PSPN153	阴沟肠杆菌多	阴沟肠杆菌多	阴沟肠杆菌多
R1812093PSPN131	尿肠球菌多；嗜麦芽窄食单胞菌较多；鲍曼不动杆菌少；溶血葡萄球菌少	尿肠球菌多；嗜麦芽窄食单胞菌较多；鲍曼不动杆菌少；溶血葡萄球菌少	尿肠球菌多；嗜麦芽窄食单胞菌较多；鲍曼不动杆菌少
R1812081PSPN113	念珠菌多；路邓葡萄球菌多；结核硬脂酸棒状杆菌多	念珠菌多；路邓葡萄球菌多；结核硬脂酸棒状杆菌多	念珠菌多；路邓葡萄球菌多；结核硬脂酸棒状杆菌多

全部天根组样本，高通量病原体检测结果与微生物培养结果一致；Qiagen 组，3/5 样本部分漏检，1 例洋葱伯克霍尔德菌和 1 例溶血葡萄球菌，故在准确性评估方面，天根优于 Qiagen。

(5) 精密度对比结果

序号	样本编号	实验批次	微生物培养结果	匹配物种检出个数		精确度	
				天根	Qiagen	天根	Qiagen
1	R1812066 PSPN093	批内重复性	纹带棒状杆菌多；洋葱伯克霍尔德菌较少	2	1	100%	100%
		批间重复性		2	1	100%	100%
2	R1812067 PSPN094	批内重复性	嗜麦芽窄食单胞菌多	1	1	100%	100%
		批间重复性		1	1	100%	100%
3	R1812115 PSPN153	批内重复性	阴沟肠杆菌多	1	1	100%	100%
		批间重复性		1	1	100%	100%
4	R1812093 PSPN131	批内重复性	尿肠球菌多；嗜麦芽窄食单胞菌较多；鲍曼不动杆菌少；溶血葡萄球菌少	4	3	100%	100%
		批间重复性		4	3	100%	100%
5	R1812081 PSPN113	批内重复性	念珠菌多；路邓葡萄球菌多；结核硬脂酸棒状杆菌多	3	3	100%	100%
		批间重复性		3	3	100%	100%

全部天根组样本，批内/间重复性 100%，且与微生物培养结果一致；Qiagen 组样本，

批内/间重复性 100%，但与微生物培养结果相比，2/5 漏检。

1.2.1.4. 结论

采用已知微生物培养结果的 5 例痰液样本，分别选取天根磁珠法大体积游离核酸提取试剂盒（DP710, Tiangen）与 QIAamp UCP Pathogen 提取试剂盒（50214, Qiagen）进行核酸提取，后续高通量病原体检测步骤一致。结果显示：

- （1）DNA 提取总量、建库质量及上机质量方面，天根组略优于 Qiagen 组，但无统计学差异。
- （2）准确性评估方面，天根组检测结果与培养结果一致，精密度 100%；但 Qiagen 组 2/5 样本存在部分漏检情况。

综上，选取天根磁珠法大体积游离核酸提取试剂盒（DP710, Tiangen）进行痰液等体液样本 DNA 的提取适用于高通量病原体的检测。

1.2.2. DNA 提取质量评估

1.2.2.1. 评价方法与标准

按以上操作步骤提取的 DNA，经 Qubit 测定后，痰液 DNA 总量不少于 1 μg 的样本数量应 ≥80%；其他样本 DNA 总量不少于 10ng 的样本数量应 ≥80%。

1.2.2.2. 实验结果与评价结论

- （1）临床样本类型检测数量、DNA 提取合格数量及对应合格率如下：

样本类型	总数	合格数量	合格率 (%)
痰液	156	138	88.46
肺泡灌洗液	62	62	100.00
阴道分泌物	45	43	95.56
脑脊液	18	18	100.00
腹水	7	6	85.71
尿液	5	5	100.00
胸水	5	5	100.00
肺组织	2	2	100.00
眼角膜	2	2	100.00
尿道分泌物	1	1	100.00
总计	303	282	93.10

共计检测303例临床样本，DNA提取质量合格样本282例，占比93.10%，DNA提取质量的性能确认合格。

- （2）非临床样本类型检测数量、DNA 提取合格数量及对应合格率如下：

样本类型	总数	合格数量	合格率 (%)
菌液	7	1	14.29

总计	7	1	14.29
----	---	---	-------

共计检测7例非临床样本，为临床样本分离所得菌液，DNA提取质量合格样本1例，占比14.29%。非临床样本DNA提取质量低可能由于临床样本DNA提取质量的评估标准不适用于非临床样本，且非临床样本DNA浓度低于Qubit检测下限。

原始数据见附件1-核酸提取。

2. 核酸破碎评估

除游离 DNA 外（直接取 25ng 建库），均需进入核酸破碎步骤。

2.1. 核酸破碎条件的确定

2.1.1. 样本类型

痰液、灌洗液、胸腹水、分泌物、脑脊液。

2.1.2. 实验原理

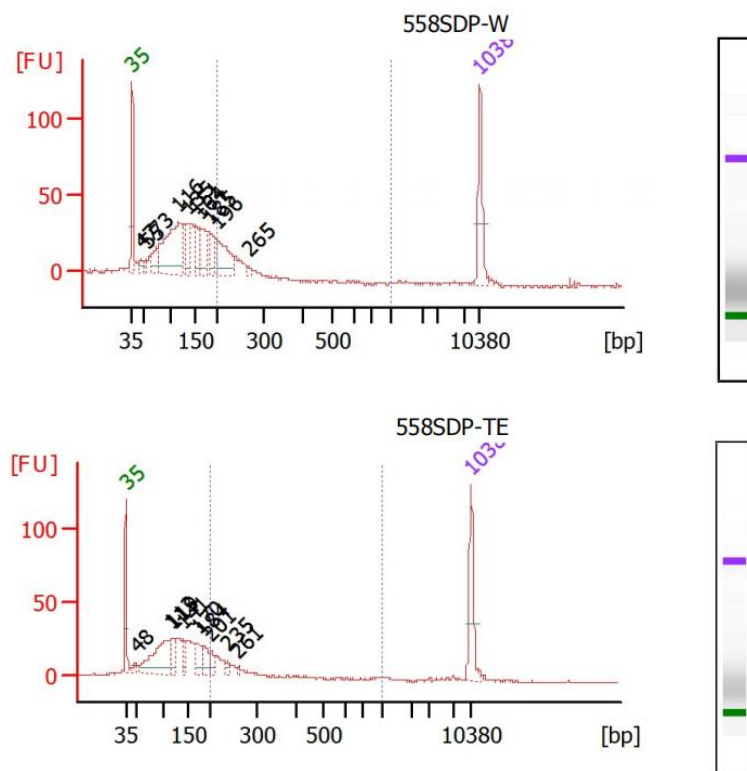
超声波细胞破碎仪就是将电能通过换能器转换为声能，这种能量通过液体介质而变成一个密集的小气泡，这些小气泡迅速炸裂，产生像小炸弹一样的能量，从而起到破碎细胞等物质的作用。为了有效地排热降温，保证每个循环的超声时间小于等于暂停时间，Bioruptor 默认的是 30s on, 30s off。本实验通过设置不同循环数来达到最适的破碎效果。

2.1.3. 流程步骤

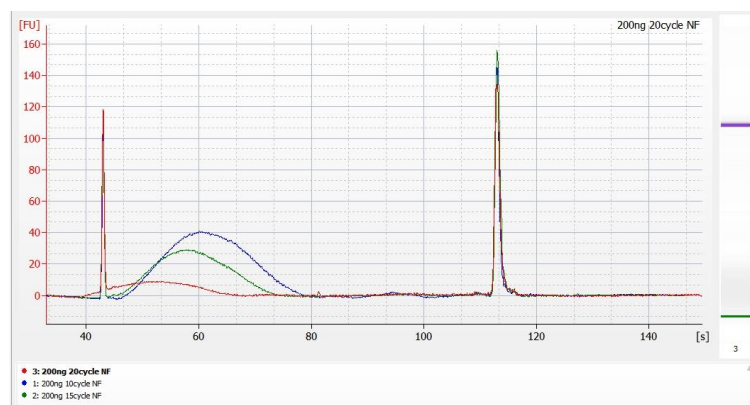
- （1）确保Bioruptor核酸破碎仪的水箱水位在两条刻度范围内，使用纯水（非去离子水），每周更换一次。
- （2）提前半小时打开仪器开关和水箱开关，使水箱水温降低至4℃左右。
- （3）使用0.65mL离心管配制100 μL破碎体系。样本破碎投入量为200ng，后续所需建库进入量为25ng，样本量不足200ng的酌情分配投入；不足25ng的全部投入。
- （4）打开样本适配器，将样本对称摆放，使用纯水管将其它位置摆满配平。
- （5）设置打断程序。
- （6）将样本适配器放入水槽上方，与水槽盖上的步进电机齿轮啮合。按下开始键，盖上消音盖。
- （7）取出破碎后样本混匀，使用2100进行长度质检。

2.1.4. 结果判断

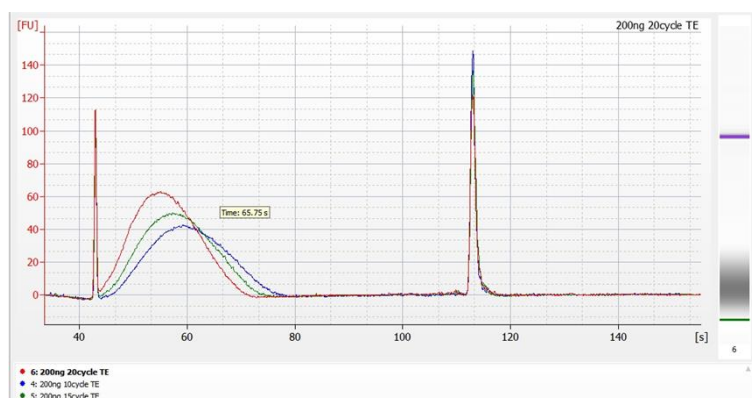
- （1）破碎体系确定



30 个循环时，150-300bp 占比不足 50%，样本破碎长度过短，10%TE 保护作用不明显。



200ng 无酶水体系，30 个循环以内破碎循环数越少，破碎后片段越长。



200ng 10%TE 体系，30 个循环以内破碎循环数越少，破碎后片段越长。10%TE 在信号强度及打断效果上有保护作用，且循环数越高保护作用越明显。200ng 破碎时，10 个循环

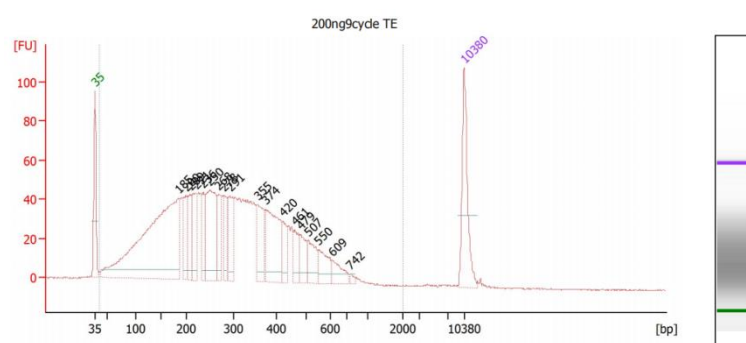
达到目标长度范围。150-300bp 占比 \geq 50%。



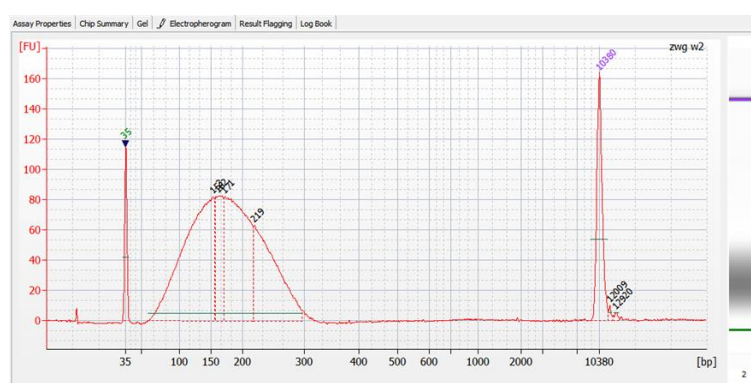
25ng 破碎时，10%TE 保护作用明显。10 个循环达到目标长度范围。150-300bp 占比 \geq 50%。

综上，破碎体系定为 10%TE，破碎循环数以 10 为基础进行调整。

(2) 痰液破碎条件的确定：10%TE，破碎 10 个循环。



200ng 10%TE 破碎体系破碎 9 个循环所得破碎长度未达标。150-300bp 占比不足 50%。



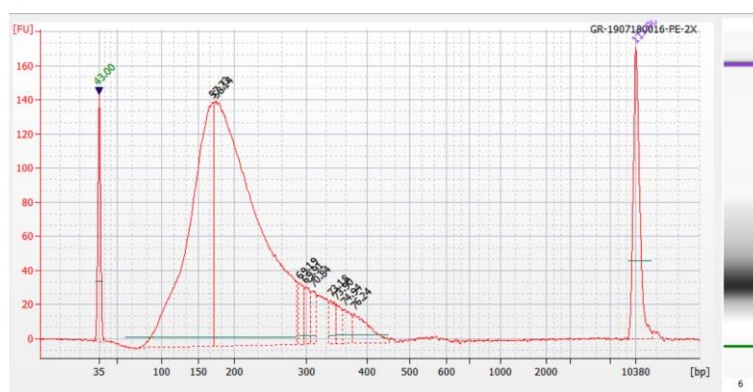
10%TE，破碎 10 个循环，达到目标片段范围，150-300bp 占比 \geq 50%，故 10 个循环最优。

(3) 肺泡灌洗液破碎条件的确定：10%TE，破碎 10 个循环。



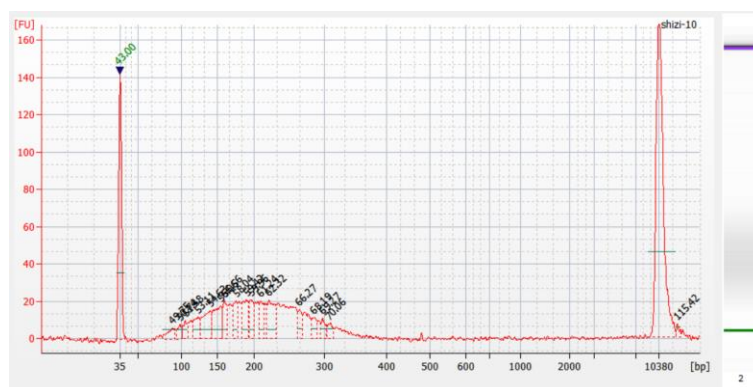
150-300bp 占比 \geq 50%。

(4) 胸腹水破碎条件的确定：10%TE，破碎 10 个循环。



150-300bp 占比 \geq 50%。

(5) 分泌物破碎条件的确定：10%TE，破碎 10 个循环。



150-300bp 占比 \geq 50%。

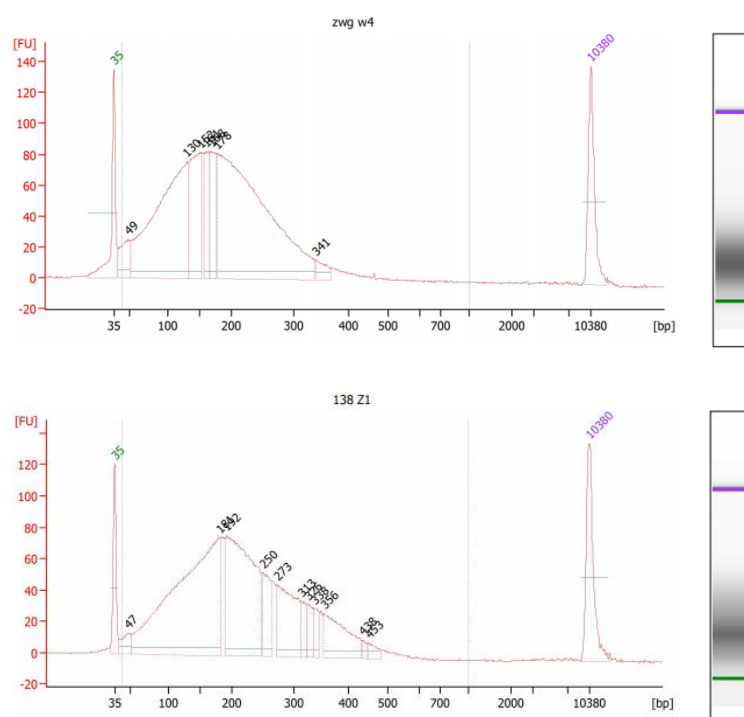
(6) 脑脊液破碎条件的确定：10%TE，破碎 15 个循环。



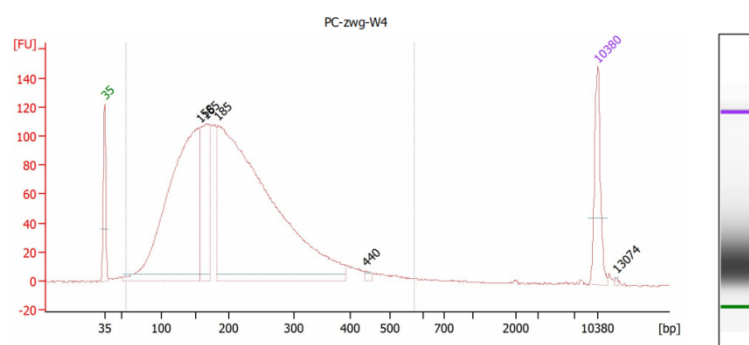
150-300bp 占比 \geq 50%。

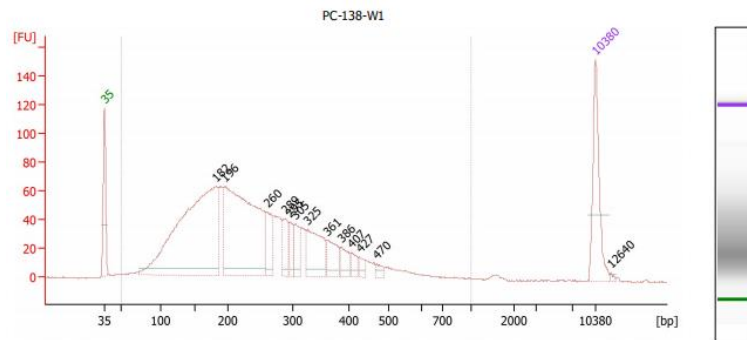
(7) 破碎后 2x 纯化验证

纯化前:



纯化后:





综上，2x 纯化可有效减少非目标区域的小片段，有利于后续 PCR 反应的实验及测序结果。

2.1.5. 结论

- (1) 痰液、肺泡灌洗液、胸腹水、分泌物的破碎程序设置为 30s on、30s off 、10 cycles；
脑脊液样本程序设置为 30s on、30s off 、15 cycles。
- (2) 样本破碎时需添加 10%TE 保护液。
- (3) 破碎后建库前需进行 2x 纯化。

2.2. 核酸破碎步骤

- (1) 确保Bioruptor核酸破碎仪的水箱水位在两条刻度范围内，使用纯水（非去离子水），每周更换一次。
- (2) 提前半小时打开仪器开关和水箱开关，使水箱水温降低至4℃左右。
- (3) 打开样本适配器，将样本对称摆放，使用纯水管将其它位置摆满配平。
- (4) 脑脊液样本程序设置为30s on、30s off 、15 cycles；其他样本程序设置为30s on、30s off 、10 cycles。
- (5) 样本投入量为200ng，样本量不足的全部投入。
- (6) 加入10 μL 1×TE后加水补至100 μL，使用0.65mL离心管。
- (7) 将样本适配器放入水槽上方，与水槽盖上的步进电机齿轮啮合。按下开始键，盖上消音盖。
- (8) 取50 μL样本进行2×纯化（加100 μL磁珠），用33 μL无酶水洗脱，测Qubit后取25ng进入建库。浓度低的样本若需要全部投入建库则取全部样本进行纯化。

2.3. 核酸破碎质量评估

2.3.1. 评价方法与标准

破碎后 DNA 每月随机选取 5 例，抽检用安捷伦 2100，150-300bp 占比≥50%的样本数量应≥80%。

2.3.2. 实验结果与评价结论

各样本类型抽检数量、核酸破碎合格数量及对应合格率如下：

样本类型	总数	合格数量	合格率 (%)
痰液	9	8	88.89
肺泡灌洗液	9	8	88.89
脑脊液	3	3	100.00
外周血	5	5	100.00
总计	26	24	92.31

破碎样本共抽检 26 例，150–300bp 占比 \geq 50%的样本数量 24 例，占比 92.31%，故核酸破碎质量的性能确认合格。

原始数据见附件2-核酸破碎抽检。

3. 文库构建评估

采用 KAPA 建库试剂盒进行文库构建。

试剂盒	货号	规格	组分	规格
KAPA 建库试剂盒 (KAPA BIOSYSTEM)	KK8504	96rxn/套	End Repair & A-Tailing Buffer	680 μ L
			End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	290 μ L
			Ligation Buffer	2.88mL
			DNA Ligase	960 μ L
			2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	3mL
			10x Library Amplification Primer Mix/P5&P7	600 μ L

3.1. 文库构建步骤

3.1.1. 末端修复，加 A

- (1) 对破碎总量200ng的样本取25ng (12.5 μ L)，进入建库。
- (2) 破碎总量小于200ng的样本需要浓缩，保证最后建库进入量25ng (12.5 μ L)。
- (3) 血浆样本建库进入量25ng，最少6ng。
- (4) 按下表配制末端修复Mix，充分混匀后瞬时离心。

Component	Volume	配___MIX
Fragmented double-stranded DNA	12.5 μ L	——
End Repair & A-Tailing Buffer†	1.75 μ L	
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix†	0.75 μ L	
Total volume	15 μ L	——

- (5) PCR程序：PCR仪上，热盖温度85℃，到达4℃后立即进行后续步骤。

Step	Temp	Time
END Repair & A-Tailing	20°C	30min
	65°C	30min
HOLD	4°C	∞

3.1.2. 连接接头

(1) 按下表配制接头连接Mix，充分混匀后瞬时离心。

Component	Volume	配____Mix
End Repair & A-Tailing reaction product	15μL	——
PCR-grade water	1.25μL	
Ligation Buffer†	7.5μL	
DNA Ligase†	2.5μL	
Adaptors	1.25μL	单独加
Total volume	27.5μL	——

(2) 在PCR仪上，热盖温度85°C，模块温度20°C，15min。结束后立刻进行下一步骤。

3.1.3. 纯化

- (1) 加入22 μL重悬纯化Beads。用移液枪上下混匀10次。
- (2) 室温静置5min后置于96孔磁力架上5min至上清澄清。小心移去并遗弃上清。
- (3) 置于磁力架上，取200 μL新鲜配制的80%乙醇洗2遍，并用移液枪去除所有残留乙醇溶液。
- (4) 置于磁力架上，室温晾干约5min。
- (5) 加7 μL无酶水，用移液枪上下混匀10次。室温孵育5min。
- (6) 置于磁力架上约5min至澄清，移取1 μL Qubit测量浓度。
- (7) 剩余的样本取5 μL至八连管中进入PCR。

3.1.4. PCR 扩增

(1) 按下表配制 PCR 扩增 Mix，充分混匀后瞬时离心。

Component	Volume	配____Mix
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	6.25μL	
10x Library Amplification Primer Mix/P5&P7	1.25μL	
Adapter-ligated library	5μL	——
Total volume	12.5μL	——

(2) PCR 仪热盖温度 105°C。

Step	Temp	Time	Cycle
预变性	98 °C	45sec	1
变性	98 °C	15sec	5

退火	60℃	30sec	
延伸	72℃	30sec	
终延伸	72℃	1min	1
保存	4℃	∞	1

3.1.5. 纯化

- (1) 补水至25 μL，进行纯化。
- (2) 加入25 μL Beads重悬。用移液枪上下混匀10次。
- (3) 室温静置5min后置于磁力架上约5min，至上清澄清。小心移去并遗弃上清。
- (4) 置于磁力架上，排枪吸取200 μL新鲜配制的80%乙醇洗2遍，并用移液枪去除所有残留乙醇溶液。
- (5) 置于磁力架上，室温晾干5min。
- (6) 加23 μL无酶水，用移液枪上下混匀10次，室温孵育5min。
- (7) 置于磁力架上5min，移取1 μL测量浓度，移取20 μL澄清液至新的1.5mLEP管中。

3.2. 文库构建质量评估

3.2.1. 评价方法与标准

5个循环的PCR扩增后，文库扩增倍数 ≥ 3 的样本数量应 $\geq 80\%$ 。

3.2.2. 实验结果与评价结论

- (1) 临床样本类型文库构建合格率如下：

样本类型	总数	合格数量	合格率 (%)
痰液	138	118	85.51
肺泡灌洗液	29	28	96.55
外周血	29	26	89.66
阴道分泌物	28	16	57.14
脑脊液	4	3	75.00
腹水	5	4	80.00
尿液	3	1	33.33
胸水	1	1	100.00
肺组织	2	2	100.00
眼角膜	1	1	100.00
尿道分泌物	1	1	100.00
总计	241	201	83.40

共计241例临床样本经PCR扩增构建文库，合格样本201例，占比83.40%，除阴道分泌物、脑脊液和尿液，其他样本类型文库构建质量的性能确认合格。

- (2) 非临床样本类型文库构建合格率如下：1例非临床样本，为临床样本分离所得菌液，文库构建合格率100.00%。

4.方法验证

根据标准要求，标准起草小组对血浆样本游离DNA核酸提取、非血浆样本游离DNA核酸提取、核酸破碎条件、核酸破碎步骤、核酸破碎质量、文库构建步骤、文库构建质量等关键指标参数进行了验证，实验验证样品由本标准起草单位提供，由苏州大学附属第一医院使用本文件规定的方法进行检测，验证结果符合本文件技术要求。

5、经济与社会效益

标准化大规模并行测序的核酸和文库制备流程，能够减少实验误差和重复工作，提高测序数据的准确性和可靠性，从而降低测序成本。标准化的核酸和文库流程有助于推动测序技术的规模化应用，促进测序仪器、试剂和相关服务的商业化发展，形成完整的产业链。为科研机构和企业提供统一的制备标准，减少因方法不一致导致的重复验证和优化成本，加速新技术的研发和应用，降低研发成本。标准化核酸和文库制备流程为临床基因检测提供可靠的技术支持，促进精准医疗和精准诊断的发展，提高疾病早期筛查和治疗效果。通过提高测序数据的准确性和可靠性，为疾病预防、诊断和治疗提供更可靠的依据，提升公共卫生服务水平。统一的核酸和文库制备标准有助于不同实验室之间的数据共享和结果比对，推动多中心研究和国际合作，加速科学发现和技术创新。标准化流程降低了技术门槛，使更多中小型实验室和医疗机构能够应用大规模并行测序技术，推动技术的普及和普惠。

为测序行业提供统一的技术规范，减少低质量产品和服务进入市场，促进行业健康发展。为国家相关政策的制定和实施提供技术依据，推动测序技术在医疗、农业、环境等领域的规范化应用。通过标准化流程和对照样品的使用，加强质量控制，提高测序数据的可重复性和可比性，为监管机构提供科学依据。大规模并行测序的核酸和文库制备标准化能为相关领域的教育和培训提供统一的技术框架，促进高素质专业人才的培养。通过标准化流程的推广，帮助更多从业者掌握大规模并行测序技术，推动技术的广泛应用。

（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本标准等同采用 ISO 20397-1-2022-03《生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备》，与 ISO 20397-1-2022-03 无技术差异。

（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

等同采用 ISO 20397-1:2022《生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备》。

（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系

本标准与现行相关法律、法规、规章及相关标准协调一致。

本标准与现行有效的标准没有冲突，配套使用。

（七）重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

（八）涉及专利的有关说明

本标准不涉及专利问题。

（九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议

1）首先应在实施前保证标准文本的充足供应，使每个大规模并行测序中核酸和文库制备相关试剂生产厂商、研究单位以及检测机构等都能及时获得本标准文本，这是保证新标准贯彻实施的基础。

2）本次制定的标准，不仅与大规模并行测序中核酸和文库制备相关产品研制企业有关，而且与研究院所、检测机构、医药生产等相关。对于标准使用过程中容易出现的疑问，起草单位有义务进行必要的解释。

3）可以针对标准使用的不同对象，如生产企业、质量监管等相关部门，有侧重点地进行标准的培训和宣贯，以保证标准的有效贯彻执行。

4）建议本标准批准发布即实施。

（十）其他应予说明的事项

无。

《生物技术 大规模并行测序 第1部分：核酸和文库制备》标准起草组

2025年3月