



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX/ISO 21474-1: 2020

体外诊断医疗器械 核酸多重分子检测 第1部分：核酸质量的评价的术语和通用要求

In vitro diagnostic medical devices — Multiplex molecular testing for nucleic acids
—Part 1: Terminology and general requirements for nucleic acid quality evaluation

(ISO 21474-1:2020)

草案版次选择

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 发布
国家标准化管理委员会

目 次

1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 总则	7
4.1.1 预分析的思考	7
4.1.2 样本质量的思考	8
4.1.3 核酸质量的思考	8
4.2 多重分子检测质量核酸与评价	8
4.2.1 评价用于多重分子检测技术的核酸质量	8
4.2.2 核酸数量的评价	9
5 核酸的制备程序	9
5.1 一般原则	9
5.2 样品准备	9
5.2.1 一般原则	9
5.2.2 组织样本制备的思考	10
5.2.3 核酸的提取和纯化	11
5.2.4 质量评价方法	11
附录 A（资料性） 评价 RNA 完整性	13
附录 B（资料性） 评价 DNA 的完整性	14
附录 C（资料性） 利用 PCR 评价来源于 FFPE 样本的可扩增 DNA	15
附录 D（资料性） MicroRNA 样品	17
参考文献	18

体外诊断医疗器械 核酸多重分子检测 第1部分：核酸质量评价的术语和通用要求

1 范围

本文件提供了核酸作为分析物用于多重分子检测的质量评价术语和通用要求，多重分子检测是指可同时识别两个或更多分子靶标序列的检测手段。本文件适用于所有的多重分子检测方法，用于体外诊断医疗器械和实验室自建方法的验证，并提供核酸靶序列定性和定量检测的信息。

本文件目的为指导多重分子检测试验中定性或者定量人体临床样本中人类核酸或者微生物病原体核酸靶序列。本文件适用于医学实验室体外诊断验证中所有的分子。同时还供实验室客户、体外诊断研发人员、制造商，生物样本库、生物医学研究所和商业化组织，以及监管机构使用。本文件不适用于宏基因组学。

注意 实验室内部使用的检验方法称为“实验室自建方法”，“LDT”，或者称为“内部检验”。

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。

ISO 15189:2012，医学实验室——质量和能力要求。

3 术语和定义

……界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

ISO和IEC中使用标准化术语内容参照下面的地址：

——ISO在线浏览器平台 <http://www.iso.org/obp>

——IEC Electropedia <http://electropedia.org>

3.1

准确性

一个测量量值和一个被测量的量值之间的亲密程度。

注1：注1：应用于一组测试结果时，准确性概念涉及随机组分和系统误差或偏差成分的组合（ISO 3534-2：2006，3.3.1）。

[来源：ISO/IEC 指导原则 99:2007, 2, 13, 修改——“注释1”、“注释2”、“注释3”已被删除，增加了新的“注释1”]

3.2

算法

可用于数据生成合理解释或可报告的计算方法（）

3.3

等位基因

〈遗传学〉() 控制相同性状遗传变异的同一基因座上的一组基因 ()

注1: 一个等位基因也可以被定义为:

注2: 一个可以被替代的多态性DNA序列, 不是基因所必须的DNA序列; ()

注3: 占据同一基因座位, 可以被替代的基因 ()。

3.4

等位基因比例 (或等位基因频率)

指定类型的等位基因 (3.3) 占总等位基因数量 (3.3) 的百分比。(某种特定基因占全部基因的比例)

注1: 例如, 如果一个指定的等位基因占据了40%总等位基因的数量, 它的等位基因比例为0.4;

注2: 等位基因比例等同于等位基因频率。

3.5

分析物

被测量物质的物质。

[来源: ISO 17511: 2020, 3.1, 修订——该例子已经被删除。]

3.6

化学纯度

表示影响多重分析的化学物质的污染程度 ()

注1: 用于PCR的核酸, 经过提取步骤去除了有干扰作用的有机物质和蛋白质成分, 防止了核酸的污染。

3.7

DNA 微阵列

DNA 芯片

直接或者间接的集合了高密度的 DNA 探针, 可用于高通量筛选大规模生物物质的固态基质。

[来源: ISO 16578: 2013, 3.3]

3.8

程序文件

指定的方式完成记录、操作和维护实验室间比对的程序方法 (3.13) ()

3.9

评价方法

用于核酸质量的评价方法

3.10

有效期

截止日期

在指定条件下, 确保储存物质特征性能的时间范围上限

注1: 有效期是体外诊断试剂、校准品、质控物和其它组分稳定性的保障, 一般由制造商根据实验确定。 ()

[来源: ISO 18113-1: 2009, 3.17, 修订——“注释2”和“注释3”已被删除]

3.11

外部测量标准 ()

参考标准 ()

用来测试多重分析互换性的方法,

特征值需要多个科研单位合作共同标定，

注1：通常针对多重分子分析。

注2：参考物质可以用做外部测量标准选择。

[来源：ISO 16578: 2013, 3.9, 修订——增加“注释1”和“注释2”]

3.12

预期用途

预期目的

体外诊断制造商反映出的产品使用，操作程序或者是服务目的的客观意图，如体外诊断制造商提供的产品规格、说明和信息。

[来源：ISO 18113-1: 2009, 3.31, 修订——删除了“注释1”和“注释2”]

3.13

实验室比对

按照预先规定的条件，由两个或多个实验室对相同或相似的样品进行检测的组织、实施和评价。

[来源：ISO/IEC 17043: 2010, 3.4]

3.14

体外诊断设备

IVD 设备

制造商用于体外诊断医疗器械的设备或仪器[3.15]

[来源：ISO 18113-1: 2009, 3.26, 修订——删除了“注释1”]

3.15

体外诊断产品

体外诊断医疗器械

IVD 医疗器械

用于诊断疾病或其他疾病，包括确定健康状况以便用于治疗、减轻或预防疾病及后遗症的试剂、仪器和诊断系统

[来源：美国联邦食品药品和化妆品法案21CFR809.3]

3.16

体外诊断试剂

IVD 试剂

制造商生产的用于 IVD 医疗仪器设备的含有化学、生物或免疫特性组分的溶液或制剂（3.15）

[来源：ISO 18113-1: 2009, 3.28修订——删除“注释1”]

3.17

实验室自建方法

LDTs

实验室内部研发、确认和使用，以诊断为目的的体外诊断方法

示例1：也被称为“室内检验”

[来源：CLSI QSRLDT]

3.18

检测限**LOD**

通过给定的测量程序获得的测量值，假设存在的错误概率为 α ，假设不存在的错误概率为 β

注1：国际纯粹与应用化学联合会（IUPAC）建议 α 和 β 的默认值为0.05。

注2：这里的检测限用于评价多重分析的有和无，不用于其它类型的分子检测。

注3：检测限可以被定义为1) 在置信区间范围内，区别于不存在，可以被真实测序到的核酸的最低量值；2) 样品中最小可检测到的基因片段。

3.19

微阵列检测限**多重分子检测的检测限（）****LODP**

在 95%置信区间范围内，可以持续检测到的外部测量标准（或标准物质）的最低相对值，这个外部测量标准（或标准物质）具有已知拷贝数或浓度

注1：通常针对多重分子分析；

注2：LODP可以作为性能指标替代多重分析中的检测限指标。

[来源：ISO 16578: 2013, 3.1, 修订——增加“注释1”和“注释2”]

3.20

大规模平行测序**并行处理大量分子已实现共同量测序的方法**

注1：例如但不限于具有微型化和并行平台技术，可对数千至数百万个短片段（ ≈ 50 至400个碱基）进行测序，或基于聚合酶实时DNA测序平台可实现长片段测序（平均长度 $\approx 10000 \sim 15000$ 碱基）。

3.21

microRNA

与转录后表达调控有关的 17 至 25 个核苷酸长度的单链 RNA

3.22

多重序列分析

同时可测量样本中的多个核酸序列

注1：包括提取的核酸和基于核酸扩增之前或之后的核酸。（）

3.23

多重分子检测

可以同时评价一个或多个序列识别的体外诊断检测，换句话说就是在一次测试中可以检测两个或更多核酸靶标。例如基于多重 PCR（3.25）、多重杂交检测、微阵列和大规模平行测序（3.20）的方法。

注1：“多重”被定义为“通过统一的样本制备、目标或信号扩增、等位基因（3.3）区分和信息采集同时实现两个或更多目标的检测。（CLSI/MM17-A[24]）”

注2：检测的内标不作为多重体系中的部分。

3.24

多重分子检测核酸

能够保证多重分子检测（3.23）质量的核酸模板，如有足够的长度、数量、化学纯度（3.6）、结构完整程度（3.40）和检测序列的完整性。

3. 25

多重 PCR

在一个反应体系中应用多个引物同时产生多个扩增子的 PCR 技术。

[来源：ISO 16577: 2016, 3.117]

3. 26

多变量分子检测

使用多个变量的值组合在一起，以产生针对患者的独立结果，包括“分类”，“评分”和/或“索引”的分子检测。

注1：这类检测通常基于多重分子检测平台。

注2：旨在用于疾病的诊断，或用于治愈、缓解、治疗或预防疾病。

注3：统计词语“多变量”表示对多个结果进行评价，而不是使用多个变量对一个结果进行评价。

3. 27

病原体

在其宿主中引起疾病的传染原。

注1：病原体包括某些病毒、类病毒、病毒、细菌、真菌和寄生虫。

[来源：ISO 15714: 2019, 3.1.2, 修订]

3. 28

用于 PCR 的 DNA

具有足够长度，数量，化学纯度（3.6）和结构完整性（3.36）的 DNA 模板，可通过 PCR 进行扩增。

[来源：ISO 24276: 2006, 3.2.3, 修订——增加了“数量”]

3. 29

分析前期

预检验过程

从临床医生的要求开始，包括对患者的检查要求、准备和识别，初级样品的收集以及在实验室内外运输，分析物的分离，到分析性检查开始作为结束，按时间顺序排列的过程。

[来源：ISO 15189:2012, 3.15, 修订——增加了“分析物分离”]

3. 30

初级样本

样本

体液或组织的独立部分，用于检查，研究或分析一种或多种假定适用于整个人体的数量或特性’

注1：全球协调专责小组（GHTF）在其统一指导文件中使用“样本”一词来表示医学实验室检验的生物来源的样品。

注2：在某些ISO和CEN文件中，样本被定义为“来源与人体的生物样品”。

注3：在某些国家，“样本”一词代替初级样本（或其子样本），表示送往实验室或有实验室接收并准备进行检测的样本。

[来源：ISO 15189:2012, 3.16]

3.31

可靠的信号范围

提供的与外部测量标准品（3.10）（或参考材料）的浓度和/或拷贝数成比例的结果的能力（在给定范围内）

注1：主要用于定量测试，但不用于定性测试。

注2：也可用于线性范围或分析可测量范围。

[来源：ISO 16578:2013, 3.2, 修订——增加了“注释1”和“注释2”]

3.32

可报告范围

实验室检测覆盖的可信序列范围。

示例1：可报告范围也被定义为“仪器、试剂盒或系统的测量结果的有效测试值范围”（US CFR 493）。

3.33

参考范围

可报告的序列变异

注1：参考范围也被定义为基于健康状况人体的一组涵盖实验室检测上限和下限的值。

3.34

RT**逆转录**

逆转录酶与 RT 引物、脱氧核糖核苷三磷酸结合，从 RNA 模板合成 DNA 的过程。

[来源：ISO 22174:2005, 3.3.1]

3.35

RT-PCR

由两部分组成的方法：RNA 逆转录为 DNA 的逆转录过程（3.32）和聚合酶链式反应扩增。

[来源：ISO 22174:2005, 3.4.2]

3.36

RT-PCR RNA 质量

具有足够长度，数量，化学纯度和结构完整性的 RNA 模板，适用于逆转录（3.32）和 PCR 反应。

[来源：ISO 22174:2005, 3.4.2, 修订]

3.37

样本

从原始样品中取出一个或多个部分

[来源：ISO 15189:2012, 3.24, 修订——该示例已被删除][来源：]

3.38

稳定性

IVD 医疗设备（3.15）在其规定的范围内保持其性能特征的能力

注1：稳定性也可以是：

——在制造商规定的条件下储存，运输和使用 IVD 试剂（3.15），校准品和对照品；

——冻干重组材料，工作溶液以及从密封容器中取出的材料（根据制造商的使用说明进行准备，使用和存储）。

[来源：ISO18113-1:2009, 3.68, 修订——在校准后的测量仪器或测量系统，注释1和注释3已被删除]

3.39

临床样本稳定性

长期保存过程中，样品的抗变化能力。

[来源：ISO23833:2013, 5.5.10, 修订——文中“电子轰击过程中化学成分的变化，例如，样品暴露于电子束期间观察到的相关特征X射线强度变化的抵抗力”已被“长期存放期间的质量变化”取代]

3.40

结构完整性

核酸保存的原始状态

3.41

确认

通过提供客观证据确认已满足特定预期用途（3.11）或应用程序的要求

注1：“已确认”一词用于指定相应的状态

[来源：ISO9000:2015, 3.8.13, 修订——注释1和注释3已被删除]

3.42

验证

通过提供客观证据确认已满足指定要求

示例1：单词“已验证”用于指定相应的状态。

示例2：确认可以包括以下活动：

- 执行替代计算
- 将新的设计规范与类似的经过验证的设计规范进行比较
- 进行测试和演示，以及
- 签发前审查文件

[来源：ISO 9000:2015, 3.8.12, 修订——注释1和注释2已被改写]

4 总则

通用原则

4.1.1 预分析的思考

有关医学实验室质量管理体系的一般说明，尤其是标本的采集和处理，请参见ISO 15189:2012中4.2、5.4.4、5.4.7和ISO / TS 20658^[3]。对实验室设备，试剂和消耗品的要求应遵循ISO 15189:2012, 5.3。另外，ISO 15189:2012、5.5.1.2和5.5.1.3也可适用。

分析前阶段通常由以下工作流程组成：

——样品的采集、储藏和运输；

——样品的预处理；

——核酸的提取和纯化。

这些分析前的因素很大程度上影响了样品的质量和随后的测试结果。分子检测有关的实验室分析前的细节在这里介绍^{[6][7][8][25][26][27][28][29][30]}。

由于生物学原因导致分析物采集后的形态变化（DNA、RNA），如基因诱导，基因下调，细胞凋亡等，导致分析前的变异可严重影响分析结果。例如，这些影响取决于福尔马林固定前的温暖（温暖缺血）和寒冷缺血的持续时间以及环境温度。这些通常在分析测试中仍然无法识别，但却是错误或不可信的检测结果的主要来源^{[6][7][8][30]}。因此，在福尔马林中储存或固定之前的组织运输应在最短时间内进行，尽可能在低温或真空下进行。

多重分子检测是可同时测量两个或多个目标核酸序列的IVD检测或医疗设备。多重分子测试应当使用高质量的样品进行，以确保合适。

4.1.2 样本质量的思考

标本的来源，收集，制备，提取和纯化应经过验证和确认（如有必要），以确保核酸质量适合要检测的所有分析物或靶标。多重分析用的靶标盘既包括高水平又包括低水平的靶标。

样本中生物、物理和化学性质的不同影响获得核酸的质量，从而影响不同样本之间的多重分子分析的性能。然而，评估每个样本中的此类影响是现实的。因此，实验室应确保获得的每个临床样本，以避免此类影响。当无法避免时，应通过恰当的方法评估变异的影响，例如在检测中加入内部对照。

4.1.3 核酸质量的思考

多重分子检测核酸的质量定义为具有适当属性的核酸模板，可确保通过多重分子检测。尽管单重和多重检测的核酸质量评估可作为一般考虑因素，但多重分子检测还存在独特的考虑因素，如多靶标和/或检测组分之间可能存在干扰或相互作用。

从样本中分离出的核酸的质量取决于多种因素，包括但不限于核酸的数量，化学纯度，长度和结构完整性，以及靶标的丰度。这些都可作影响的试剂参数，如LOD和每种分析方法的线性范围。

多重分子检测的核酸质量应该使用基于计量的正确方法予以评价。质量的评价应包括核酸的数量、化学纯度、结构完整性、检测或者定量有代表性的基因（如内部质控基因）。

在合理的步骤使用内部质控物来检查分析前和分析过程，如检查核酸提取和纯化的步骤。内部质控应该考虑到每一个靶序列的核酸质量。

注1：CLSI MM17-A指导原则提供了多重检测的各种验证和确认建议。

4.2 多重分子检测质量核酸与评价

4.2.1 评价用于多重分子检测技术的核酸质量

ISO 22174，ISO 16577和ISO 20395中描述了“用于PCR的DNA质量”。在ISO 16577中，DNA模板应具3量”，RNA模板应具有足够长度和数量，适用于逆转录和PCR过程。这些不能应用于多重分子检测的各种测量方法，包括基于PCR或RT-PCR，微阵列和大规模并行测序。

考虑到多重分子检测是一种能够同时检测多个核酸序列甚至是长度较短的核酸的分子生物学技术，应开发适用于每个测量系统的多重分子检测核酸质量的评价方法。

核酸的质量应该在多重分子检测前被确定。确定核酸分子质量的方法依赖于很多因素，如多重方法，样品中核酸的已知或预期数量，以及要分析的核酸（DNA或RNA）。用户应根据随后要使用的多重分子检测选择最合适的方法。

为了确定样品中核酸的数量，浓度，纯度和潜在降解，可以使用通过分光光度法和/或荧光法和/或凝胶电泳或毛细管电泳进行评估。核酸质量可以使用显示的大小分布的核酸电泳，代表性基因（例如内部控制基因，包括持家基因）的检测或数量进行估算。掺入的内部对照（准确已知的目标样品）可用于确定每个靶序列的核酸质量，从而确定过程控制。附件A至D中的方法可用于评估溶液中存在的核酸的质量。

示例1：RNA 的质量可以通过电泳图评价，如总 RNA 的样品的 28s: 18s 核糖体 RNA 的比率，RNA 完整性数（RIN 值）或 RNA 完整性（RIS）^{[31][32]}

尽管核糖体 RNA 分析用于 RNA 质量的分析比较常见，但不常用来评价信使 RNA 的质量^[33]。

示例2：A260/A280 和 A260/A230 的比值可以用来评价 RNA 的纯度。

当设计多重分子检测来测定不同长度的靶标时，应确保核酸模板具有足够的质量，可在靶标范围内扩增。这一过程可以通过将PCR与引物组一起反应，产生片段。然后，可以使用毛细管电泳或凝胶电泳，基于所得PCR片段的大小分布，评估适合该测定的核酸模板的质量。然后，可以使用毛细管电泳或凝胶电泳，基于所得PCR片段的大小分布，评估适合该测定的核酸模板的质量。

对于某些多重分子测试，确保核酸样品质量的关键方面是确定目标核酸是否存在。例如，对特定来源组织或生物体的低丰度核酸靶标的多重分析应确保样品包含来自该组织/生物体的核酸。该确认可以是多重检测设计中包含的一个成分，也可以是在将核酸样品用于多重检测之前进行的外部测定。

注：为了改善检测活病原体，核糖体RNA或信使RNA可以同时测量。另一种方法，可以考虑用DNA嵌入剂处理细菌，该嵌入剂可穿透灭活细胞并抑制PCR扩增，但活细胞中不存在。

核酸样本应该具有足够数量的目标核酸序列，核酸序列由群体大小和种类有关。多重分子检测检测或定量的目标序列，应确保给定的足够数量以满足要求。应确保检测靶标相对其他靶标有较低的相关度。

示例：例如，对于多重连接依赖性探针扩增（MLPA），两个变性片段（D 片段）说明 DNA 样品中的盐浓度导致的 DNA 变性差。

4.2.2 核酸数量的评价

根据多重分子检测的目的应该选择合适的方法来评价核酸数量。

多重分子检测中分析纯化核酸的定量应该测量目标遗传元件的数量，相关的特定区域，合适的校准和质控，以达到比较多个变量的相对值。在这种情况下，定量的原理是确定两个DNA或RNA靶序列的比率（以百分比表示）。如，目标序列和质控基因或材料（例如内部质控基因，参考材料）。该确认可以是多重检测设计中包含的一个成分，也可以是核酸样本多重试验前的外部试验。

5 核酸的制备程序

5.1 一般原则

所采用的核酸提取方法应适合于下一步分析的核酸的质量和数量。

应评估核酸是否适合最终的多重分子检测体系，而不是适用于包含多重检测的单独单重反应。

5.2 样品准备

5.2.1 一般原则

在分析前阶段，标本处理有很多阶段，包括收集，固定，存储，运输，准备和处理。由于这些分析前因素很大程度上影响样品质量和随后的检测结果，因此应确保对样品的适当处理。

随着多重分析中目标靶标数量的增加，某些序列的假阴性结果可能带来更多问题。因此，应评估核酸样品中丰度最低的靶标的质量，因为竞争效应对稀有靶标的影响比高丰度靶标的影响要大。

示例1：示例 1 在用于检测宫颈感染中人乳头瘤病毒亚型的多重检测中，标本采集过程中可能会碰到子宫颈质量较低的样本，例如粘液，没有足够数量的人细胞。由于样本量不足，可能导致假阴性检测结果。为了验证质量较差样本的阴性检测结果，可以同时检测人基因组序列作为内部对照。

示例2：示例 2 在癌症的体细胞变异多重检测中，当非肿瘤细胞（如炎症浸润或内皮细胞）的比例大于肿瘤细胞的比例时，目标靶点可能会相对减少，从而导致检测失败或假阴性结果。

示例3：示例 3 用于检测呼吸道感染中微生物病原体的多重检测中，由于呼吸道样本的收集和制备会因为样本的高粘度而导致较差的核酸质量，从而导致对低丰度的假病原微生物阴性检测结果。为了最小化这一现象的发生，可以在样品中溶解 NALC（N-乙酰基-L-半胱氨酸）和半碱性蛋白酶解决。

随着靶标的数量增加，没有临床相关性的假阳性结果变成了问题。因此，避免的污染而导致的假阳性结果的方式来收集和处理临床标本。因此，临床样本在手机和处理的时候应避免由于污染造成的假阳性结果。当不可避免时，该影响应该被评估，如使用定量的方法设施合理的阈值。

示例 1 多重检测用于血液感染中的细菌病原体鉴定，血液采集过程中可能会发生污染，如正常人的皮肤菌群（如凝固酶阴性葡萄球菌），从而导致假阳性结果。可通过采血时的无菌技术（包括皮肤防腐，手卫生和预包装的试剂盒）来减少这种情况。抗菌剂处理后，血液中也可能会存在非活菌，从而检测到细菌阳性。因此，可以通过在施用抗菌药物之前或之后避免采血来减少这种情况。

示例 2 在呼吸道感染中分枝杆菌种类鉴定的多重检测中，收集呼吸道样本过程中可能会发生污染，从而导致正常环境（如戈登氏支原体，开氏支原体或形支原体）的阳性测试。可以通过使用无菌收集设备（如支气管镜检查）减少这种情况。

5.2.2 组织样本制备的思考

当使用基于酶促扩增反应的方法进行多重分子检测时，存在于组织样本中的抑制剂可能会干扰靶标的检测或定量，对低水平靶标的影响要比高丰度的更为明显。因此，应尽可能减少抑制剂的含量，以确保对每个目标序列得到正确结果。

应评估肿瘤细胞的存在和比例，以确保解释结果的正确性。并且，确定是否需要富集肿瘤细胞，以确保检测到每个目标序列。

对于FFPE样本，福尔马林固定处理会伴随核酸的断裂和化学修饰。因此，使用合适的固定剂（即标准缓冲福尔马林溶液）时，需要在低温和低温条件下进行，并尽可能缩短时间^{[2][6][30]}。

注：ISO 20166, ISO 20184和ISO 20186中介绍了各种样品类型（例如FFPE，冷冻组织和血液）的操作工作流程^{[6][7][8]}。

注：中性缓冲福尔马林（NBF）通常用于固定过程

注：从时间较长的福尔马林固定石蜡包埋块（例如大于3年）中获得的DNA通常会有胞嘧啶脱氨成尿嘧啶的现象，这导致DNA序列从C: G转换为T: A。用尿嘧啶-N-糖基化酶处理可以消除这类样品中的含尿嘧啶的DNA分子。也可以使用来自大规模平行测序来检测的序列数据中的转换和颠换的比例来评估显著的脱氨作用。

当处理少量组织样本时，例如通过穿刺抽吸获得的样本，应考虑随机偏倚性。样品中存在的基因组数量可能不足以一致地检测低丰度的变异、等位基因或变异组织。

在福尔马林固定和用于体细胞癌的多重检测组织的制备过程中，可能发生组织污染，如从一个患者进入另一位患者的情况。虽然核酸序列来自不同的患者，但是这可以导致患者的阳性检测结果。因此，主动清理表面，或使用一次性使用的设备或耗材（例如刀片，垫子和容器），以将这种风险降到最低。如果交叉污染不可避免，那么应设计多重检测方法，并采用适当的对照来检测检测组织的交叉污染。

注：利用大规模平行测序鉴定目标区域内包含多态性基因组区域（例如法医测定中使用的区域），可用于评估被测

序样品中是否为同一个患者基因组。

5.2.3 核酸的提取和纯化

选择核酸提取或纯化方法时应考虑样本类型和基质，确认提取或纯化的核酸会对多重产生的影响。

使用某些高灵敏度多重方法进行检测时，试剂、层析柱和塑料制品中可能存在核酸的污染，导致假阳性结果。在实验时，应考虑使用适当设计和生产的材料，以最大程度地减少核酸污染。同样，样品可能的交叉污染也会导致假阳性结果。应建立处理样本/样品的标准操作规程，并形成文件并予以遵循，以最大程度地减少交叉污染的影响。

当预期从样品中获得低核酸产量时，应使用特殊的塑料制品来减少核酸吸附，以最大程度地减少样品损失，例如通过使用低吸附性塑料制品。

注：一些试管材料吸附核酸，聚丙烯微量管作为试剂容器要比标准聚丙烯管吸附的DNA量少，要小于100 ngDNA。

在每步反应中加入0.02%的吐温-20会有效减少DNA的管壁吸附^[30]。

当进行多重分子检测用于检测或定量目标核酸时，提取效率降低可能会导致某些核酸靶标的丢失，从而导致假阴性结果。因此，确保在多重检测中的所有核酸靶标的提取效率具有可重复性非常重要。

在多重分析中，核酸中可能会携带抑制剂的污染，也可能导致假阴性结果。因此，应有效去除抑制剂污染，防止这种情况的发生。

注：当使用珠子破碎真菌细胞壁或组织时，剧烈的提取会导致核酸片段化。

5.2.4 质量评价方法

评价核酸的质量的方法有多种，如使用吸收光谱法确定数量，用260 nm (A₂₆₀)至280 nm (A₂₈₀)的吸收率评价纯度，以及通过凝胶电泳评价片段长度或完整性^[31]。但是，这些值不能正确评价用于多重分子检测的样品质量，比使用A₂₆₀ / A₂₈₀比值去如评价测序用的样品质量一样，没有意义。

注：用于大规模平行测序的所有样品的制备操作流程中，起始材料必须是DNA，如独立的基因组DNA，逆转录的cDNA或免疫沉淀的染色质。通过DNA片段化，修饰，选择大小，连接并定量，将其转化为可测序的文库，此时使用A₂₆₀ / A₂₈₀比值（如2.00）作为样品纯度的指标进行测序的DNA浓度和片段质量的评价是不合适的。因为剩余的引物，游离核苷酸和不合适的片段与测序文库没有区别。取而代之的是，需要其他方法（例如使用嵌入荧光染料）来特异性地测量双链DNA含量。

A₂₆₀ / A₂₈₀比率可以提供有价值的信息。如果A₂₆₀ / A₂₈₀的比例超出分析测试规定的范围，则应丢弃样品。例如，值<1.60可以强烈表明该样品中存在潜在的干扰化合物，例如蛋白质，苯酚，胍或其他试剂。A₂₆₀/A₂₈₀的比值也可以用于确定清除多余的引物/ ssDNA等后的PCR产物的纯度。

注：A₂₆₀值也用于测量总核酸的产率。当该值极高时，可将其用于确定基因组DNA的污染。例如，当从血浆中检测HIV病毒时，高的A₂₆₀值可以说明有来自白细胞基因组DNA的污染。

直接评价DNA片段状态的方法包括直接通过电泳确认，评价已知长度的DNA片段（例如内部控制基因β-球蛋白或维生素D受体或掺入的参考物质）的PCR扩增反应，或者利用扩增反应评价，使用ΔC_q（定量循环，也称为循环阈值，C_t或交叉点，C_p）值进行扩增反应的方法。

测序的片段长度可通过毛细管电泳或克隆和Sanger测序的片段的大小分离来估算。

评价RNA片段化的方法，包括使用变性的琼脂糖凝胶电泳直接测量RNA构象。此外，提取的RNA的完整性可以通过核糖体RNA（rRNA）和内部质控基因的表达进行评价，例如糖醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）或β-肌动蛋白基因。当这些基因用于均一化目的时，应对它们进行验证，以确保它们适用于特定检测。对于RNA质量评价，可以提供RIN值或RIS和/或是电泳图中核糖体RNA的18S与28S的比率。

注：基于RIN和核糖体RNA的分析是不能作为信使RNA自然降解的指标，尤其是在FFPE样品中。对于来自FFPE的RNA，

建议使用基于公式的石蜡包埋RNA（PERM）算法，该算法近似于提取RNA的电泳图的加权曲线下面积分析。

注：RNA测序的目标是确定定量准确样品中RNA的内容。通过分离目标RNA片段（或选择性去除不重要的片段），转化为双链cDNA来实现RNA测序。

在提取，扩增和检测阶段使用内部控制是一个有力的工具，可用于评估核酸的质量，评价抑制剂的作用以及提取效率。内部质控可以设计成针对检测每个目标。具有此类内部对照的多重分子检测可用于评估样品中特定模板的量，用于病原体鉴定，基因分型或多重突变分析。

注：在PCR中，使用多重内部扩增对照，该对照应包含多个目标靶的正向和反向引物结合区。

附 录 A
(资料性)
评价 RNA 完整性

评估RNA完整性的方法,可以使用毛细管电泳的方式,包括RNA完整性系数RIN值和RNA完整性评分RIS值^{[2][31][32]}。RIN是通过电泳获得RNA片段分布大小图谱详细评价RNA完整性^{[2][35]}。这是一种开发的软件算法,可以比核糖体比率更好地评价RNA质量。结合微流控芯片,电压驱动不同大小片段的分离和荧光检测的已广泛应用的电泳自动化系统。RNA分子用嵌入染料染色,并通过系统进行检测。RIN数据也可以通过系统中的电泳图进行分析。在电泳图和凝胶样图像中,降解的rRNA以较小的片段迁移率反映出来。样品的RIN范围从10(完整)到1(完全降解)。在电泳图和凝胶样图像中,rRNA的降解通过向更短片段大小的转变反映出来。另一个评价RNA完整性的方法,就是QIAxcel(Qiagen)系统,它通过使用高分辨率毛细管电泳以及与RIN不同的软件算法得出RIS值。

附 录 B
(资料性)
评价 DNA 的完整性

DNA完整值(DIN)算法的开发, 目的在于提供一个评价DNA完整性的客观和标准化的工具。DIN通过信号在整个大小范围内的分布来确定基因组DNA样品的片段, 并提供最终的评价数值。为了提供数字化的结果, DIN值根据信号分布将样本按1至10的等级进行分类。高DIN值表示高度完整的基因组DNA, 低DIN值表示显著降解的基因组DNA样本。

附录 C

(资料性)

利用 PCR 评价来源于 FFPE 样本的可扩增 DNA

从福尔马林固定的组织中提取的DNA是片段化，并且还包含人为原因带来的DNA损伤。因此，显著减少了可用于PCR扩增的模板的数量。第二个主要问题是FFPE来源的DNA中人为序列变异的出现，即原始样品中不存在的序列的变化。

DNA片段化在福尔马林固定的组织中常见的DNA损伤形式。福尔马林固定的组织中DNA的断裂程度随着组织固定的储存时间和pH值降低逐渐加剧。因此，含有相同数量DNA的不同来源的FFPE样本中包含显著不同数量的可扩增模板，这主要依赖于片段的损伤程度。

甲醛诱导的DNA交联降低了双链DNA的稳定性，导致DNA的部分变性。已经显示，福尔马林固定的组织中DNA的断裂程度随着保存时间的延长和组织固定的pH值的降低而增加[37]。与大气中的氧气反应，甲醛很容易被氧化成甲酸。甲酸的形成会降低福尔马林的pH值。因此福尔马林被缓冲以维持中性pH值。嘌呤碱基与糖主链的N-糖苷键在低pH值下易水解，从而在DNA中产生脱碱基位点。

在FFPE来源的DNA中检测到的人为序列变异中，C:G>T:A转换是最常见的SNV变化类型。低拷贝数的FFPE来源的DNA检测是，基于扩增子的检测方法，人为序列变异更容易被检测到。在PCR扩增之前，使用UDG处理后，C:G>T:A转换可以显著地减少，这进一步表明尿嘧啶损伤是FFPE来源的DNA中人为序列变异的主要形式。在FFPE样本的DNA中CpG二核苷酸位点发现了高水平的C:G>T:A转换的SNV变异，这明显的说明了5-甲基胞嘧啶碱基的脱氨基现象。

分析FFPE样本中的DNA的质量可以通过使用引物对进行PCR反应来评价，可以对特定基因(例如GAPDH)的非重叠靶位点产生短片段和长片段(100、200、300和400 bp)来实现。可以根据检测到的最大PCR产物对样品进行分类，即100、200、300和400 bp。

最小化人为序列变异对于在福尔马林固定的临床组织中准确检测至关重要。表C总结了最小化人为序列变异的建议和策略。

图C.1 最小化 FFPE 样本中 DNA 的人为序列变异的策略

步骤	策略
DNA 的提取	由病理学家评估肿瘤纯度并鉴定肿瘤富集区域。 肿瘤富集区域的取样或富集。 尽可能使用足够的组织，以确保分离出足够量的 DNA 用于后续分子检测。 热处理去除甲醛诱导的交联并促进随后的组织被蛋白酶消化。 延长蛋白酶 K 处理可消化组织时间并去除与 DNA 交联的蛋白质。
DNA 的评价	使用荧光法评价双链 DNA 的量。 使用 qPCR 或数字 PCR 对可扩增模板进行定量，尤其是用于大规模并行测序时。使用与测序时的平均扩增子大小相对应的大小的扩增子评价。
样本文库的制备	在 PCR 扩增 FFPE 样本的 DNA 之前先体外去除尿嘧啶。 使扩增子的检测方式来增加用于 PCR 的模板的数量。 基于捕获的靶标富集允许使用特异的起始和终止位点来识别初始模板。 为每一条 DNA 模板使用特异引物进行扩增子富集。 分子标签标记 DNA 模板以鉴定人为序列变异。
PCR 扩增	使用特异的 DNA 聚合酶（如 Pfu 和 KAPA），对于有 DNA 损伤的部位（如尿嘧啶和无碱基位点）具有较低的扩增效率。 使用高保真 DNA 聚合酶减少聚合酶错误
基于 MPS 扩增子的序列变异确认	重复运行每个测试，以便使用单独的模板。 对于临床突变分析可使用正交方法。

附 录 D
(资料性)
MicroRNA 样品

可通过分光光度计测量浓度并通过电泳分析纯度来评价用于microRNA分析的RNA样品的质量。

可以根据附件A分析完整性，将其作为附加质量值。通常microRNA的量很小，例如，从300 μ L血浆或血清中能提取的RNA大约1ng或者更少^{[39][40]}。根据附件A的完整性不适用于表示从血浆中提取的RNA样品的质量，因为它不包含rRNA。特别地，在使用血清作为小RNA提取的材料将导致较小RNA谱图，该谱图与患者的谱图非常不同，因为在凝血过程中血小板的激活会诱导显著地改变RNA谱图。

质量评价的过程必不可少，但microRNA样品对RNase高度敏感，而RNase难以灭活。即使是微量也足以使样品降解，因此在检测之前进行评价过程有助于保证结果的正确性。

参 考 文 献

- [1] ISO 22174:2005, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions*
- [2] ISO 20395:2019, *Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR*
- [3] ISO/TS 20658, *Medical laboratories — Requirements for collection, transport, receipt, and handling of samples*
- [4] Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards. An Approved Guideline for the Quality Management of Specimens for Molecular Methods: The Procurement, Transport, and Preparation of Specimens. 2012. <http://jccls.org/english/preview.html>
- [5] Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards. An Approved Guideline for the Quality Management of Specimens for Molecular Methods (Part 2) New Technologies and Sample Quality Control. 2017. <http://jccls.org/english/preview.html>
- [6] ISO 20166, *Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue*
- [7] ISO 20184, *Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for frozen tissue*
- [8] ISO 20186, *Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for venous whole blood*
- [9] ISO 3534-1, *Statistics — Vocabulary and symbols — Part 1: General statistical terms and terms used in probability*
- [10] ISO/IEC Guide 99:2007
- [11] ISO 17511:2003 (en), *In vitro diagnostic medical devices — Measurement of quantities in biological samples — Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials*
- [12] ISO 18113-1, *In vitro diagnostic medical devices — Information supplied by the manufacturer (labelling) — Part 1: Terms, definitions and general requirements*
- [13] ISO 16578:2013, *Molecular biomarker analysis — General definitions and requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences*
- [14] ISO/IEC 17043, *Conformity assessment — General requirements for proficiency testing*
- [15] 21CFR CFR — Code of Federal Regulations Title 21: In vitro diagnostic products for the for human use 809.3; 2018

- [16] CLSI *Quality System Regulations for Laboratory Developed Tests: A Practical Guide for the Laboratory*, CLSI document QSRLDT. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015
- [17] CLSI *Nucleic Acid Sequencing Methods in Diagnostic Laboratory Medicine Approved Guideline — Second Edition*. CLSI document MM09-A2. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2014
- [18] ISO 16577:2016, *Molecular biomarker analysis — Terms and definitions*
- [19] ISO 24276:2006/Amd.1:2013, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions/ — Amendment 1
- [20] 42 CFR CFR — Code of Federal Regulations Title 42: Establishment and verification of performance specifications. 494. 1253; 2018
- [21] ISO 15714:2019 (en), *Method of evaluating the UV dose to airborne microorganisms transiting in-duct ultraviolet germicidal irradiation devices*
- [22] ISO 23833:2013 (en), *Microbeam analysis — Electron probe microanalysis (EPMA) — Vocabulary*
- [23] ISO 9000:2015, *Quality management systems — Fundamentals and vocabulary*
- [24] CLSI, *Verification and Validation of Multiplex Nucleic Acid assays*, 2nd Edition; CLSI guideline MM17. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018
- [25] ISO 20837:2006, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Requirements for sample preparation for qualitative detection*
- [26] Matsuda Y, Fujii T, Suzuki T, Yamahatsu K, Kawahara K, Teduka K, Kawamoto Y, Yamamoto T, Ishiwata T, Naito Z, Comparison of fixation methods for preservation of morphology, RNAs, and proteins from paraffin-embedded human cancer cell-implanted mouse models. *J Histochem Cytochem.* **59**(1), 2011, pp. 68-75
- [27] Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S, Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* **161**, 2002, pp. 1961-71
- [28] Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, Mareninov S, Lou JJ, Vinters HV, Singer EJ, Cloughesy TF, Yong WH, The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem.*, **47**(4-5), 2014, pp. 258-66
- [29] Linnarsson S., Recent advances in DNA sequencing methods — General principles of sample preparation. *Exp Cell Res.*, **316**(8), 2010, pp. 1339-43

- [30] Compton CC, Robb JA, Anderson MW, Berry AB, Birdsong GG, Bloom KJ, Branton PA, Crothers JW, Cushman-Vokoun AM, Hicks DG, Khoury JD, Laser J, Marshall CB, Misialek MJ, Natale KE, Nowak JA, Olson D, Pfeifer JD, Schade A, Vance GH, Walk EE, Yohe SL, Preanalytics and Precision Pathology: Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine. *Arch Pathol Lab Med*. 2019 Nov; **143**(11):1346-1363
- [31] Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T., The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006 Jan 31; **7**:3
- [32] Kanani P., Shukla Y.M., Modi A.R., Subhash N., Kumar S., Standardization of an efficient protocol for isolation of RNA from Cuminum cyminum. *Journal of King Saud University* — **31**(4), 2019, 1202-1207
- [33] Vermeulen J, De Preter K, Lefever S, Nuytens J, De Vloed F, Derveaux S, Hellemans J, Speleman F, Vandesompele J., Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2011 May; **39**(9):e63. doi: 10.1093/nar/gkr065
- [34] Chung JY, Cho H, Hewitt SM, The paraffin-embedded RNA metric (PERM) for RNA isolated from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Biotechniques*. 2016; **60**(5) :239-44
- [35] Integrity Number R.N.A. (RIN) — Standardization of RNA Quality Control <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf>
- [36] Integrity Number D.N.A. (DIN) with the Agilent 2200 TapeStation System and the Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay. <https://www.agilent.com>
- [37] Groelz D, Viertler C., Pabst D., Dettmann D, Zatloukal K., Impact of storage conditions on the quality of nucleic acids in paraffin embedded tissues. *PLoS One*. 2018; **13**(9): e0203608
- [38] Do H, Dobrovic A., Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem*. 2015, **61**(1):64-71
- [39] Kosaka N., Yoshioka Y., Hagiwara K., Tominaga N., Ochiya T.(2013) , Circulating MicroRNAs: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology* vol. **1024**, pp1-9
- [40] Ichikawa M., Akiyama H.(2013) , Circulating MicroRNAs: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology* vol. 1024, pp247-253