目标人群特定病原微生物关联基因单核苷酸多态性（SNP）

Sanger法检测试剂的质量评价通用技术指导原则

单核苷酸多态性（SNP）为基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列的多态性。人群中特定SNP，可能与病原微生物的易感性，感染后重症化程度相关。对目标人群进行特定SNP检测，可对病原体感染的预防、被感染人群的治疗和预后，提供必要的医学指导信息。

本指导原则中的“Sanger法SNP检测试剂”，指基于Sanger测序法，对人群中与特定病原微生物相关的人基因单核苷酸多态性（SNP）进行检测的试剂（包括配套试剂）（以下简称“SNP检测试剂”，或“检测试剂”）。本指导原则，对于“Sanger法SNP检测试剂”产品的质量评价，提出通用性技术指导要求；涉及基本原则、主要原材料要求、基本检测流程及产品性能评价等方面。

本指导原则针对“检测试剂”生产企业，和检测试剂的应用方（称“检验人员”）提出，不涉及“检测试剂”注册审批相关的各行政事项，亦不作为法规强制执行；如满足相关法规和要求，也可采用其他技术和方法，但应有详细的研究及验证资料。

本指导原则的制订，是基于现行法规和标准体系及当前认知水平；随着法规和标准的完善或调整，认知的深入和科技的发展，其相关内容也将适时进行调整和完善。

一、适用范围

本指导原则适用于采用Sanger测序法，对人群中特定病原微生物易感关联基因的多态性，进行检测和质量评价。待测样本为人源血液、体液等；检测对象为人基因组脱氧核糖核酸（DNA）。进行首次注册申报的产品可参考本指导原则。

二、基本原则

特定病原微生物关联基因的多态性，应具明确的临床意义，包括但不局限于人群易感性、感染者潜在重症化趋势等；该多态性的检测结果，应能对病原体的预防和感染人群的临床管理，提供明确的医学指导信息。

SNP检测试剂的生产企业应获得《医疗器械生产许可证》。企业应对SNP检测试剂盒的研制、生产中所使用的各种原料、辅料等应制定相应的质量控制标准。

SNP检测试剂盒的生产，应符合《医疗器械生产质量管理规范》及《医疗器械生产质量管理规范附录体外诊断试剂》的要求。

三、性能评估

企业应在符合质量管理体系的生产环境下生产相应的检测试剂盒，并进行所有性能验证，包括具体研究方法、实验方案、实验数据、统计分析等详细资料，包括但不限于对以下分析性能进行研究。

1、核酸提取

核酸提取的完整性和纯度将影响检测结果，因此应对核酸提取的步骤进行质量控制。质量控制事项包括但不限于：用于核酸提取的样本质量、体积；核酸浓度及核酸定量方法；核酸纯化的质量及检测方法。

2、聚合酶链（PCR）反应

目的片段的核酸扩增效率影响检测结果，因此应对核酸扩增的步骤进行质量控制。建议的质量控制因素包括但不限于以下各项：PCR扩增体系的优化、扩增产物的鉴别方法、扩增产物胶回收的质量控制方法。

3、Sanger测序

Sanger测序的准确性影响检测结果，因此应对企业的测序能力进行评价，并对测序步骤进行质量控制。建议的质量控制因素包括但不限于以下各项：

3.1 测序能力评价

建议企业通过对质控品的测序结果，进行Sanger测序能力评价；包含但不限于质控品测序的准确性、最低检出能力及必要的干扰试验（如因含SNP的片段中，存在DNA局部二级结构、多聚碱基等，对测序结果的影响）。

3.1.1 准确性

样本测序的结果与质控品（SNP阴性标准品和SNP阳性标准品）的测序结果的对比，可用于SNP检测试剂中Sanger测序准确性的评价。

3.1.2 最低检出限

可使用梯度稀释的质控品，制备用于评价SNP检测试剂最低检出限的质控品。如混合SNP阳性质控品和阴性质控品，制备含目标SNP不同百分比的系列样品，作为检测试剂最低检出限的质控品。检测试剂声明的最低检出限，应低于检测试剂声明适用的待检样本中的SNP的最低水平。

3.2 测序步骤的质量控制

每批待检样本，按检测试剂操作说明制备测序样品的同时，应同时提供目标SNP的阳性质控样品(高阳性、中阳性)、阴性质控样品用于检测。待检样本的样品测序结果的判读，须在首先确认各质控样品的结果符合预期的前提下进行。

4、其他问题

4.1 不同样品类型

若产品适用的样本类型不止一种，应对所涉样本类型的适用性进行评估。

4.2 不同测序平台

为保证检测结果的准确性，企业应根据不同测序平台的特性确定合适的测序方法，并进行充分验证。

5、医学指导确定资料

医学指导确定资料主要指对申报产品对待检目标人群特定病原微生物关联基因单核苷酸多态性（SNP）的检测结果、报告解读及相应医学指导建议。检测报告的形成应有标准化操作流程。对不明确的检测结果以及非预期检测结果应有详细明确的建议处置方案。报告中应明确写明受试者特定病原微生物SNP的检测结果细节、该检测覆盖的变异位点、变异类型及相应的遗传解释。报告中建议包括但不限于明确的检测结果、检测方法及局限性等内容。原则上禁止报告中出现超出产品预期用途的检测项目及结果。报告中应明确提供医学指导建议，并与说明书一致。

四、注册检验（如适用）

应提供符合产品技术要求的、在具有相应医疗器械检验资质和承检范围的医疗器械检验机构进行的产品检验报告，应提供连续3个生产批次样品的检验合格报告。

如该项目已有国家参考品/标准品，应使用国家参考品/标准品进行注册检验。

五、主要原材料研究资料

此产品的主要原材料，包括核酸提取试剂、扩增试剂(如:引物、酶及相应的缓冲液等)、检测试剂(如测序相关的试剂、引物及其他试剂耗材等)、质控品/对照品等。企业应提供完整的研究资料，如原材料的选择与来源、功能性验证数据、原材料的质量标准、试剂盒制备工艺等。

对于主要原材料，若由企业自己生产，其生产工艺必须相对稳定，并建立相应的检验方法及质量标准；若属外购，应提供的资料包括：对供应商资质审核的相关资料、买卖合同、供货方提供的产品质量标准和出厂检定报告、原材料到货后的质量检验资料等。如原材料或其供应商发生变更，应依据国家相关法规的要求进行备案或审批。

1、核酸提取试剂及验证资料

核酸提取试剂的主要组成、工作原理及相应验证资料；采用的核酸处理方法，其适用范围须覆盖SNP检测试剂应用所涉及的各种样本类型。如生产工艺中使用磁珠，磁珠应具有高效的核酸吸附功能并符合功能性试验的要求。

2、扩增试剂及验证资料

可采用聚合酶链反应（下称“PCR”）方法，对含特定病原微生物宿主易感关联基因多态性位点的核酸序列区段进行扩增。建议企业提供PCR扩增试剂及其组分（dNTPs、引物、聚合酶等）的选择、配制、质量控制等研究资料。

对外购的混合试剂（Premix类），生产企业应提供针对混合体系原料的质检报告。作为试剂组分分别外购的原材料，亦应提供由供应商出具的质检报告。

2.1 扩增用引物

生产企业，应提供相关扩增用引物的设计原理（如引物位置的选择等），并建立相应的质量标准，包括序列、纯度、分子量等，同时符合功能性要求。

2.2 扩增用酶

采用DNA聚合酶，应具有DNA聚合酶活性和热稳定性，94℃保温1小时后仍保持50%活性，或采用其他适宜的方法评价热稳定性。应建立核酸酶的质量标准并符合要求。应分别对酶活性、功能性等进行评价和验证。

2.3 脱氧三磷酸核苷dNTPs

脱氧三磷酸核苷包括：dATP、dGTP、dCTP、dTTP，纯度应大于95%并符合功能性试验要求。应提供对其纯度、浓度、功能性等的详细验证资料。

3、PCR扩增体系及验证资料

生产企业应提交PCR扩增体系的研究资料，包括：扩增体系的组成和设置、反应参数和功能验证等资料。

六、Sanger测序及验证资料

Sanger测序，又称“双脱氧链终止法”，是SNP检测的经典方法，也是测序准确性的金标准。

1、Sanger测序的工作流程及验证资料

Sanger测序的基本流程包括：PCR产物的纯化；循环测序；测序产物的纯化；毛细管电泳、测序数据处理、和测序结果输出。Sanger测序工作，可能由SNP测序试剂生产厂家、提供Sanger测序委托服务的供应商、SNP测序试剂应用方进行。标本处理、模板扩增、PCR产物纯化等步骤，应由SNP检测试剂开发方，或检测试剂应用方完成。

2、SNP检测试剂相关验证资料

SNP检测试剂相关验证资料包括：SNP检测试剂盒验证资料和数据，包括SNP位点、引物选择、反应体系研讨、使用检测试剂和体系对参考品或标准品的测序数据等。

3、Sanger测序数据及验证资料

数据分析包括Sanger法测序图谱、生物信息学分析数据等。数据分析原材料与检测结果直接相关，企业应提供完整的研究数据，如生物信息学分析原始文件及对检测结果的溯源等。

对于数据分析原材料，如数据获取过程由试剂生产企业自己完成，应明确所使用仪器平台型号和所涉及生物信息学数据处理和分析的软件；如数据获取过程委托他方进行，则应由受托方提供如上信息。如原材料发生变更，应重新对产品进行性能验证，并依据国家相关法规的要求进行变更申请。

4、SNP检测试剂的包装材料和配套耗材的相关资料

SNP检测试剂的组分，试剂盒溶液管和配套反应管，和检测试剂包装材料等，应为无脱氧核糖核酸酶（DNase）和核糖核酸酶（RNase）材料。建议提交相应检测报告。

5、Sanger测序数据的相关资料

Sanger测序原始文件，用于待测目标基因的核酸序列分析。建议企业提交参考序列（质控品）的溯源信息、质控品的测序原始文件、测序原始文件的打印版（测序图谱）等数据。

6、生物信息学软件及分析结果的相关资料

生物信息学软件，用于对原始测序结果进行分析、对比。建议企业提交分析软件的名称、版本、算法说明等资料；使用软件对样品测序结果的分析，及与质控序列的对比结果等。

七、试剂盒内质控品

试剂盒内质控品用于使用SNP检测试剂进行Sanger测序的结果的质量评价。质控品可为人源样本（如全血、组织、基因组）或核酸模拟样本（如假病毒、核酸片段、质粒等）；质控品所含模板序列，应包括：目标SNP阴性标准序列（SNP野生型序列）、目标SNP阳性标准序列（SNP杂合型序列）。企业应提交质控品的原料选择、制备细节、定值过程、稳定性评价及性能验证等资料。

目标SNP阴性标准序列，为包含待检SNP位点的野生型序列，即SNP位置碱基为野生型基因的相应碱基。

目标SNP阳性标准序列，同时包含特定SNP位点野生型和突变型序列，即SNP位置为野生型和突变型基因在SNP位置杂合的基因。

八、企业参考品

应根据产品性能验证的实际需要自行设定企业内部参考品，包括SNP野生型参考品、SNP杂合型参考品、检测限参考品、重复性参考品。

SNP野生型参考品应为样本中目标SNP为确定的单一野生型样本，应至少选取不同来源的5个人源样本。

SNP杂合型参考品应为样本中目标SNP为确定含有野生型及突变型，应至少选取不同来源的5个人源样本。

检测限参考品的浓度水平可采用90～95%阳性检出水平或略高于最低检测限的水平，如100%阳性检出水平。检测限参考品的浓度确定应科学合理。

重复性参考品建议包括高、低两个浓度的样本，其中高浓度样本应为最低检出限的10倍量样本，低浓度样本应为最低检出限约2.5倍量样本。

申请人应对内部参考品的来源、SNP型别鉴定等信息进行精确的试验验证，并提交详细的验证资料。

九、医学指导建议

基于SNP测序结果，给予被检测者相应的报告解读及医学指导。建议企业提供特定病原微生物易感性SNP或SNPs临床诊断意义的依据，及以此为依据可提供的明确的医学指导意见或建议。

十、主要检测体系、生产工艺的要点建议

目标人群特定病原微生物关联基因（SNP）检测试剂使用的操作流程，可以分为目标人群样本的收集、样本核酸提取、SNP序列测定及医学指导建议等四个环节。企业在设计开发过程中应对每个环节进行质量控制和验证。

1、样本收集

样本为目标人群人源样本（如血液、体液、组织等）。样本的获取及预处理方式、保存条件及期限（短期、长期）、运输条件等，遵循通用的技术规范或指南；如没有通用的技术规范或指南，或通用的技术规范或指南不完全适用，则企业应指定和设立适用的标准操作流程。原则上，样品收集流程，应能保证待测样本的质量，并有效防止样本间的混淆和可能的交叉污染。不同类型的样本所抽提的核酸的质量可能有所差异；对于每一种类型的样本，应当明确检测所需样本的用量和预处理方式。

生产企业产品说明资料，需明确标识出以下内容：SNP检测试剂产品适用的样本类型、采集时间、采集部位、采集方式、样本采集量、样本短期和长期保存条件和运输条件等内容。样本采集时间的选择，应考虑是否受临床症状、既往用药情况等因素的影响；采集部位应考虑样本的代表性、操作的难易程度及生物安全等因素；对采集方式的描述，应包括具体的操作方法，注明或列出相关操作指南文件，样品采集指导图示等；企业应根据产品预期用途，设置具体的样品采集量标准，并明确所设采集量的判断标准及依据；所采用的样本保存和运输条件，应致力于最大程度保护样本所含的核酸，企业应明确样本的保存条件（温度、湿度等）及期限（短期、长期）、运输条件（温度、湿度等）及反复冻融次数的上限。

2、样本处理

2.1 核酸提取、分离及纯化

样本中核酸的提取、分离及纯化的主要目的，是富集样本中的核酸，同时保证核酸序列的完整性。企业应在SNP检测试剂的设计开发过程中对配套使用的核酸提取、分离及纯化试剂进行匹配性验证，以确保其性能和适用可以满足需要。企业应明确检测所需核酸样品的最小使用量。

生产企业应该制定核酸抽提及抽提后，对其质量控制的书面标准操作流程，并依据功能性能验证结果给出用于扩增试验的核酸溶液浓度范围。生产企业应对研发和生产质控中，每次核酸样本的各种质控参数有详细记录，建议包括但不限于：核酸体积、质量、浓度、纯度及完整性等。核酸浓度、纯度检测方法包括但不限于分光光度法、荧光法等；核酸完整性检测方法包括但不限于琼脂糖凝胶法。

2.2 待检序列扩增

待检序列扩增，是指采用PCR方法扩增含有待测SNP序列的一定大小的核酸片段。检测试剂生产企业应对PCR方法进行详细描述，制定标准操作流程和质量控制方案。试剂生产企业和试剂应用企业，应记录扩增序列片段的浓度、纯度及扩增片段大小等参数。

3、待检序列测序

3.1 PCR产物的Sanger法测序

Sanger测序是采用毛细管电泳技术进行DNA测序的方法，是DNA测序技术的金标准。建议试剂生产企业采用相应标准序列（标准品、参考品）对其测序系统进行质量评价。在对待检样品的测序中，建议试剂生产企业应对测序方法进行详细描述，制定标准操作流程及质量控制方案，并对待检序列的测序图谱予以保存。

3.2 生物信息学分析

不同生物信息学分析软件的准确性、特异性及比对速度等方面均有差异，试剂生产企业需根据具体需要进行选择。企业需要评估序列比对的质量，若比对质量有通用的标准，则应遵循，并引用；若没有通用的标准，则企业应当设立自己内部的标准，以保证比对结果的准确性。

试剂生产企业和应用企业，应对生物信息学分析流程有完整的记录。试剂生产企业应建立生物信息学分析流程标准操作流程及质量控制方案，保证测序数据的分析、解读及报告的准确性与严谨性。

3.3 格式文件

试剂生产企业，应对生物信息学分析的测序结果输出格式进行说明。建议使用业内流行的文件格式。如果企业采用自己内部的标准格式文件，应建立该标准格式的详细说明，并注明该文件格式与其它格式的兼容性及相互转换的方法。

4、检测报告及解读

检测报告中建议包括但不限于：检测结果、报告解读及相应医学指导建议。检测报告的形成应有标准化操作流程。报告中应明确写明受试者特定病原微生物SNP的检测结果细节、该检测覆盖的变异位点、变异类型及相应的遗传解释。

十一、稳定性研究资料

稳定性研究资料主要涉及两部分内容，试剂的稳定性和适用样本的稳定性研究。

1、试剂的稳定性

试剂的稳定性主要包括实时稳定性（有效期）、开瓶稳定性及冻融次数限制等研究，申请人可根据实际需要选择合理的稳定性研究方案。稳定性研究资料应包括研究方法的确定依据、具体的实施方案、详细的研究数据以及结论。对于实时稳定性研究，应提供至少三批样品在实际储存条件下保存至成品有效期后的研究资料。

2、适用样本的稳定性

考虑到人源基因组样本有缓慢降解的特性，企业也应对样本稳定性进行研究，包括采集后未经处理的样本，加入裂解液/保存液的样本，保存条件包括冷藏和冷冻两种条件。如产品适用血液、拭子等不同的样本类型，因其中干扰物质存在较大差异，可能对人源基因组的降解影响不同，建议对每种样本类型均进行研究。适于冷冻保存的样本还应对冻融次数进行评价。

对于此类试剂，如核酸提取液不能立即进行检测，则还需对核酸提取液的保存条件和稳定性进行研究。

十二、临床证据

申报单位应对检测的目标单核苷酸多态性（SNP）的指导意义进行临床证据的确认。目标人群特定病原微生物关联基因单核苷酸多态性（SNP）Sanger法检测试剂临床试验应按要求在三家以上临床试验机构进行（含各级疾病预防控制中心），如临床试验机构条件允许，推荐多家生产企业的试剂盒在相同的临床试验机构共同验证。

1、临床试验对比方法

临床试验应根据申报单位目标单核苷酸多态性（SNP）的指导意义，选择相应的特定人群进行入组，，通过考核入组人群的实际病例情况与目标SNP的试剂盒检测结果的统计学分析比较，以验证产品临床性能。不建议采用某一试验地点的单次试验结果作为确认结果。

2、临床试验入组人群

根据申报单位目标单核苷酸多态性（SNP）的指导意义，如目标SNP为易感性指标，则临床试验的入组人群应：已有感染史或处感染期人群；如目标SNP为重症化指标，临床试验的入组人群应：1、具有感染史且无重症史人群，2、具有感染史且具有重症史人群。

3、临床试验样本类型

临床试验过程中，如临床试验过程中样本确实难以获得，经提取后的核酸提取液亦可作为样本进行临床试验。如采用核酸提取液进行临床试验，建议临床试验中明确该核酸提取液对应的样本类型及样本保存液/采样液（如适用），同时明确核酸提取试剂盒，临床前应对临床试验中所涉及的样本类型、样本保存液及核酸提取试剂进行充分的性能评估，临床试验中所用样本保存液及核酸提取试剂应严格满足考核试剂及对比试剂要求。

临床试验不同样本类型及核酸提取液稳定性应满足考核试剂及对比试剂的要求。

4、临床试验样本量

某一特定的样品类型至少300例，三个验证单位都应具有统计学意义。

其他类型，可以做同一病例的多样品类型比较，选择病例数量要求具有统计学意义。

5、临床试验结果的统计分析

此类产品的临床试验目的在于验证申报产品与临床病例的对应性。对于易感性SNP的申报产品，临床感染人群中的SNP型别检测结果，是否与申报资料中的研究结果一致，感染人群中的不同型别SNP应具有统计学差异，且该统计学差异应满足临床试验的要求。对于重症化SNP的申报产品，临床感染人群与其中重症化人群的SNP型别检测结果，是否与申报资料中的研究结果一致，并应具有统计学差异，且该统计学差异应满足临床试验的要求。

临床试验中所有不一致结果均应结合患者的流行病学背景、临床症状、疾病转归等信息进行充分的分析。

6、临床证据的形式要求

申请人应按照《体外诊断试剂注册管理办法》、《关于公布体外诊断试剂注册申报资料要求和批准证明文件格式的公告》等法规文件要求提交各机构伦理审查意见、临床试验方案和临床试验报告以及临床试验总结报告。

参考文献

[1] Darbeheshti F, Mahdiannasser M, Uhal B D, et al. Interindividual immunogenic variants: Susceptibility to coronavirus, respiratory syncytial virus and influenza virus[J]. Reviews in Medical Virology, 2021: e2189.

[2] COVID-19 Host Genetics Initiative. Mapping the human genetic architecture of COVID-19[J]. Nature, 2021.

[3] Pouladi N, Abdolahi S. Investigating the ACE2 polymorphisms in COVID‐19 susceptibility: An in silico analysis[J]. Molecular Genetics & Genomic Medicine, 2021: e1672.

[4] Xiao-Ai, Zhang, Chen-Tao, et al. The platelet derived growth factor-B polymorphism is associated with risk of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Chinese individuals[J]. Oncotarget, 2016, 7(22).

[5] Santos C , Ribeiro D R , Juliana C A , et al. Association between Zika virus microcephaly in the newborn with the rs3775291 variant in Toll-Like receptor 3 and rs1799964 variant at TNFα gene[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2019.

[6] Kloek A T, Brouwer M C, van de Beek D. Host genetic variability and pneumococcal disease: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC medical genomics, 2019, 12(1): 1-23.（肺炎）

[7] Ma X, Lu L, Tang Y, et al. Association between Toll-like receptor gene polymorphisms and risk of Helicobacter pylori infection: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2021, 100(18).

[8] Migliorini F, Torsiello E, Spiezia F, et al. Association between HLA genotypes and COVID-19 susceptibility, severity and progression: a comprehensive review of the literature[J]. European Journal of Medical Research, 2021, 26(1): 1-9.

[9] Kuo C L, Pilling L C, Atkins J L, et al. APOE e4 genotype predicts severe COVID-19 in the UK Biobank community cohort[J]. The Journals of Gerontology: Series A, 2020, 75(11): 2231-2232.

[10] Randolph A G, Yip W K, Allen E K, et al. Evaluation of IFITM3 rs12252 association with severe pediatric influenza infection[J]. The Journal of infectious diseases, 2017, 216(1): 14-21.

[11] Pan Y , Yang P , Dong T , et al. IFITM3 Rs12252-C Variant Increases Potential Risk for Severe Influenza Virus Infection in Chinese Population[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7:294.

[12] Chen T, Xiao M, Yang J, et al. Association between rs12252 and influenza susceptibility and severity: an updated meta-analysis[J]. Epidemiology & Infection, 2019, 147.

[13] Redlberger-Fritz M , Vietzen H , Puchhammer-Stckl E . Association of Severe Influenza Virus Infections With CD226 (DNAM-1) Variants[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2019, 220(7).

[14] Zhou J , Wang D , Wong, Bosco Ho‐Yin, et al. Identification and characterization of GLDC as host susceptibility gene to severe influenza[J]. EMBO Molecular Medicine, 2018.

[15] Li Y P , Deng H L , Xu L H , et al. Association of polymorphisms in the vitamin D receptor gene with severity of hand, foot and mouth disease caused by enterovirus 71[J]. Journal of medical virology, 2019.

[16] Sharma S , Hagbom M , Svensson L , et al. The Impact of Human Genetic Polymorphisms on Rotavirus Susceptibility, Epidemiology, and Vaccine Take[J]. Viruses, 2020, 12(3).

[17] Zhang M, Wang S, Wilffert B, et al. The association between the NAT2 genetic polymorphisms and risk of DILI during anti‐TB treatment: a systematic review and meta‐analysis[J]. British journal of clinical pharmacology, 2018, 84(12): 2747-2760.

[18] Sebastian M, Hsiao C J, Futch H S, et al. Obesity and STING1 genotype associate with 23-valent pneumococcal vaccination efficacy[J]. JCI insight, 2020, 5(9).

[19] Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. World Wide Web URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/

[20] Crossley B M, Bai J, Glaser A, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2020, 32(6): 767-775.

[21] Wayne P A. Nucleic acid sequencing methods in diagnostic laboratory medicine: approved guideline[J]. CLSI document MM09-A2.[Google Scholar], 2014.

[22] Kluesner M G, Nedveck D A, Lahr W S, et al. EditR: a method to quantify base editing from Sanger sequencing[J]. The CRISPR journal, 2018, 1(3): 239-250.

[23] Cheng T L, Li S, Yuan B, et al. Expanding C–T base editing toolkit with diversified cytidine deaminases[J]. Nature communications, 2019, 10(1): 1-10.

[24] Pandey A K, Saxena A, Dey S K, et al. Correlation between an intronic SNP genotype and ARL15 level in rheumatoid arthritis[J]. Journal of Genetics, 2021, 100(2): 1-6.

[25] Smyth L J, Maxwell A P, Benson K A, et al. Validation of differentially methylated microRNAs identified from an epigenome-wide association study; Sanger and next generation sequencing approaches[J]. BMC research notes, 2018, 11(1): 1-8.

[26] He F, Zhou W, Cai R, et al. Systematic assessment of the performance of whole-genome amplification for SNP/CNV detection and β-thalassemia genotyping[J]. Journal of human genetics, 2018, 63(4): 407-416.

[27] Lu Y, Chen S, Wei L, et al. A Microfluidic-Based SNP Genotyping Method for Hereditary Hearing-Loss Detection[J]. Analytical chemistry, 2019, 91(9): 6111-6117.

[28] Verkuil L, Danford I, Pistilli M, et al. SNP located in an AluJb repeat downstream of TMCO1, rs4657473, is protective for POAG in African Americans[J]. British Journal of Ophthalmology, 2019, 103(10): 1530-1536.

[29] Single nucleotide polymorphisms: methods and protocols[M]. Springer Science & Business Media, 2003.

[30] 《中华人民共和国药典三部》(2020年版)，中国医药科技出版社.

[31] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. WS/T 640-2018临床微生物学检验标本的采集和转运[S/OL].2018-12-11.

[32] 中华人民共和国卫生部.WS 233-2002　微生物和生物医学实验室生物安全通用准则[S/OL].2002-12-03.

[33] 中华人民共和国卫生部.医疗机构临床基因扩增检验工作导则（卫办医政发[2010] 194号）[S/OL].2010.

[34] 《测序技术的个体化医学检测应用技术指南（试行）》，中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，2015年3月31日

[35] 《感染性疾病相关个体化医学分子检测技术指南》,中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，2017年12月5日.

[36] 国家质量监督检验检疫总局.GB 19489-2008实验室生物安全通用要求[S/OL]. 2008-12-06.

[37] 《体外诊断试剂注册管理办法修正案》，国家食品药品监督管理总局令第30号，2017年1月25日.

[38] 《2019新型冠状病毒核酸检测试剂注册技术审评要点》，国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心，2020年2月12日.

[39] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].4版.北京：人民卫生出版社, 2015.

[40] 国际民用航空组织.Doc9284-AN/905　危险品航空安全运输技术细则[S/OL].2013.