

T/LTIA

团体标准

T/LTIA 17—2022

人源细胞基因组不稳定性检测指导原则

Guidelines for the detection of genomic instability in human cells

2022 - 09 - 09 发布

2022 - 09 - 30 实施

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	3
5 适用范围	4
6 检出类型	5
7 检测方法	5
8 分析评价	7
附录 A （资料性附录） 细胞基因组不稳定性检测方法简介	1
参 考 文 献	6

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这些专利的责任。

本文件由深圳华大基因细胞科技有限责任公司提出。

本文件由深圳市生命科技产学研资联盟归口。

本文件起草单位：深圳华大基因细胞科技有限责任公司、人类干细胞国家工程研究中心、上海市皮肤病医院、深圳大学总医院、深圳豪石生物科技有限公司、深圳华大生命科学研究院、青岛中德华大细胞科技有限责任公司、唐颐惠康（深圳）生物医学技术有限公司、深圳市生命科技产学研资联盟。

本文件主要起草人：邝携乐、胡双薇、卢光琇、林戈、程腊梅、孟淑芳、张可华、赖永贤、白云、于力、王立新、孟祥玉、乔静巧、于川、李宜声、张曦、岳建辉、马启旺、刘俊年、刘成龙、王丹、李国喜、曾庆想、李陶莎、武庆超、王魁星、徐凤萍、井绪忠、赵鹏、杨爽。

本文件为首次制定。

人源细胞基因组不稳定性检测指导原则

1 范围

本文件规范了人源细胞基因组不稳定性检测的适用范围、检出类型、检测方法和分析评价。

本文件适用于人源细胞基因组的不稳定性检测，包括从人体内采集和经体外操作的人源细胞基因组检测；不适用于非人源细胞基因组的检测及表观遗传不稳定性检测。

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 27025 检测和校准实验室能力的通用要求
GB/T 22576 医学实验室质量和能力的要求 第1部分：通用要求
GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求
GB/T 39766 人类生物样本库管理规范
GB/T 30989 高通量基因测序技术规程
GB/T 24353 风险管理 原则与实施指南
GB/T 27921 风险管理 风险评估技术
GB/T 15670 农药登记毒理学试验方法
GB/T 16886 医疗器械生物学评价
全国临床检验操作规程
中华人民共和国药典
药品生产质量管理规范
医疗器械生产质量管理规范
化妆品安全技术规范
化妆品生产质量管理规范
干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

基因组不稳定性 genomic instability

基因组的复制、传递或重组过程中可发生频率很低的自发突变，基因组本身的修复机制使其保持相对稳定，细胞得以稳定增殖。当存在遗传缺陷或者暴露于不利的环境因素，如生物性、理化性的有害物时，可导致基因组在不同水平上发生可持续传递的不同类型的变异，引起基因组不稳定，使细胞表型发生变化。

3.2

遗传易感性 genetic susceptibility

在相同环境下，遗传基础所决定不同个体的患病风险。即易感性完全由基因决定。

3.3

遗传毒性 genotoxicity

引起基因突变、染色体结构畸变以及其他DNA或基因变化的不良反应。

3.4

遗传多态性 genetic polymorphism

同一群体的不同个体或同一物种的不同群体存在不同基因型的现象。

3.5

染色体畸变 chromosome aberration

染色体结构和数目的异常改变。

3.6

整倍体异常 euploidy abnormality

体细胞以整个染色体组为单位的增多或减少。

3.7

非整倍体异常 aneuploidy abnormality

体细胞在二倍体基础上增加（减少）一条或几条染色体而不是成倍的增减，使体细胞数不是整倍数。

3.8

染色体结构畸变 structural aberration

在电离辐射、化学诱变剂及生物等因素的作用下，人类的染色体可发生断裂，形成无着丝粒的染色体片段，如果多条染色体发生的断裂没有原位重接，而是交换片段变位重接，重新组合，就会形成各种不同的畸形染色体，这个过程也称为染色体的重排（rearrangement）。

3.9

端粒 telomere

真核染色体两臂末端由特定的DNA重复序列构成的结构，使正常染色体端部间不发生融合，保证每条染色体的完整性。

3.10

微卫星DNA microsatellite DNA

2~6个核苷酸组成的重复单元串联重复（10~60次）而成的简单重复序列，又称短串联重复。

3.11

微卫星DNA多态性 microsatellite DNA polymorphism

头尾衔接的短串联重复序列由于重复单元的重复数目不同而造成的DNA多态现象，又称短串联重复序列多态性。

3.12

点突变 point mutation

基因内一个或少数几个核苷酸对的增加、缺失或置换所造成的结构改变。

3.13

拷贝数变异 copy number variation, CNV

基因组发生的亚显微水平的重复和缺失，一般为长度1kb以上的核苷酸片段增加或者减少。

3.14

限制性片段长度多态性 restriction fragment length polymorphism, RFLP

同一物种的亚种、品系或个体间基因组DNA受同一种限制性内切酶作用而形成不同酶切图谱的现象。

3.15

单链构象多态性 single-strand conformation polymorphism, SSCP

DNA单链分子因碱基差异而使其构象不同的多态现象。

3.16

单核苷酸多态性 single-nucleotide polymorphism, SNP

同一物种不同个体基因组DNA的等位序列上单个核苷酸存在差异的现象。

3.17

微核 micronucleus

由于基因组DNA损伤形成染色体断片，在细胞分裂后期这种滞后的染色体断片不能随有丝分裂进入子细胞，而在细胞质中形成直径小于主核1/3、完全与主核分开的圆形或椭圆形微小核。其染色同主核，但比主核淡。

3.18

关键工艺参数 Critical Process Parameter, CPP

指其波动会影响到产品关键质量属性而应该被监测或控制的工艺参数，以确保能生产出预期质量的产品。

3.19

关键质量属性 Critical Quality Attribute, CQA

指产品的物理、化学、生物或微生物性质或特征，应在适当的限度、范围或分布之内，以确保预期的产品质量。

4 缩略语

下列缩略语适合于本标准。

aCGH——比较基因组杂交微阵列 (array-based comparative genomic hybridization)
 ARMS——扩增受阻突变系统 (amplification refractory mutation system)
 ASO——等位基因特异性寡核苷酸 (allele-specific oligonucleotide)
 bp——碱基对 (base pair)
 CMA——染色体微阵列分析 (chromosomal microarray analysis)
 CNV-seq——基因组拷贝数变异测序 (copy number variation sequencing)
 CNV——拷贝数变异 (copy number variation)
 CPP——关键工艺参数 (Critical Process Parameter)
 CQA——关键质量属性 (Critical Quality Attribute)
 ddNTP——双脱氧核苷三磷酸 (dideoxyribonucleoside triphosphate)
 DHPLC——变性高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography)
 DNA——脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)
 dUTP——脱氧尿苷三磷酸 (deoxyuridine triphosphate)
 FACS——荧光激活细胞分选法 (fluorescence-activated cell sorting)
 FCM——流式细胞术 (flow cytometry)
 FISH——荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization)
 HRM——高分辨率融解曲线分析 (high-resolution melting curve analysis)
 kb——千碱基对 (kilobase)
 Mb——兆碱基 (megabase)
 mtDNA——线粒体基因组 (mitochondrial genome DNA)
 PCR——聚合酶链反应 (polymerase chain reaction)
 qPCR——实时定量PCR (real-time quantitative PCR)
 RFLP——限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism)
 SCGE——单细胞凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis)
 SNP array——单核苷酸多态性微阵列 (single nucleotide polymorphism array)
 SNP——单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism)
 SNV——单核苷酸变异 (single nucleotide variations)
 SSCP——单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism)

STR——短串联重复 (short tandem repeat)
SV——结构变异 (structure variation)
UPD——单亲二倍体 (uniparental disomy)
WES——全外显子组测序 (whole exome sequencing)
WGS——全基因组重测序 (whole genome sequencing)

5 适用范围

5.1 疾病筛查及诊断

5.1.1 遗传性疾病筛查及诊断

遗传性疾病 (简称遗传病) 的发生都直接或间接与遗传物质 (基因或染色体) 的改变相关。通过细胞基因组不稳定性检测, 对基因或染色体的改变进行分析与鉴定, 从而筛查及诊断特定疾病, 揭示疾病的发病原因。

5.1.2 肿瘤筛查及诊断

就分子层面而言, 肿瘤也属于一种基因病, 所有肿瘤细胞均是细胞内基因变异或表观遗传变异的结果。传统的病理形态学检查仅观察疾病的发展结果 (瘤体形态与其细胞来源), 不能完全满足肿瘤诊断的需要。通过综合使用细胞基因组不稳定性检测的技术, 可打破传统病理形态筛查及诊断时相限制。

5.1.3 其他与遗传易感性相关的疾病预防及诊断

疾病基因参与疾病发生的过程, 是其基因型在一定的遗传背景和环境因素 (如物理性、化学性、放射性、生物性等) 影响下进行的, 与个体对特定疾病的遗传易感性程度相关。运用基因组不稳定性检测技术, 可提前评估个体是否存在遗传易感性较高的基因型, 从而预防疾病发生, 也能为疾病诊断提供依据。

5.2 产品研发及生产

5.2.1 生物制品研发及生产

生物制品如生物技术药物、细胞治疗产品和基因治疗产品等, 其研发和生产的過程涉及到生产用细胞、检定用细胞的构建筛选、生产制备和质量控制。运用细胞基因组不稳定性检测技术, 进行细胞鉴别、细胞纯度分析、细胞安全性评价, 检验细胞是否能够稳定、高效地表达结构正确且具有生物活性的目的产物, 评价细胞的成瘤性、致病性、功能异常等风险。

5.2.2 产品遗传毒性研究及检验

药品、医疗器械、化妆品、农药、化学品、电离辐射等产品有关遗传毒性的研究及检验, 如细胞染色体畸变试验, 可利用人源的外周血淋巴细胞或其他细胞进行试验。运用细胞基因组不稳定性检测技术, 可评价这些产品对细胞致突变的可能性, 保证安全。

5.2.3 细胞库建立和管理

细胞库的建立和管理，需保证细胞储存、复苏、传代、扩增等过程的稳定性。细胞基因组不稳定性检测为细胞鉴别与遗传稳定性评估提供评价手段。

5.3 遗传多样性

检测遗传多样性的方法不管是在形态学水平、细胞学水平、生理生化水平，还是分子水平的层次上，其宗旨都在于揭示遗传物质的变异。通过分子水平层面的细胞基因组不稳定性检测有助于认识遗传多样性及其中的生物学意义。

6 检出类型

基因组不稳定性可以发生在不同水平，细胞基因组不稳定性检测主要检出如下类型的异常改变：

6.1 染色体畸变

6.1.1 染色体数目异常包括整倍体异常和非整倍体异常两大类。整倍体异常，可形成单倍体、三倍体和四倍体及以上的多倍体；非整倍体异常，则包括单体型、三体型和多体型几种情况。

6.2.2 染色体结构畸变包括缺失、重复、插入、易位、倒位等。

6.2 端粒长度

人类端粒长度约为15kb，细胞每分裂一次约缩短50个至200个核苷酸。随着细胞分裂次数的增加，端粒进行性缩短，缩短到一定程度则失去其染色体稳定作用，细胞因而发生增殖性衰老。

6.3 微卫星DNA不稳定性

同一个体的正常组织和异常组织之间，或细胞经体外操作的前后，微卫星DNA（短串联重复，STR）不稳定性表现在微卫星DNA位点的重复单位数目不同，相差很大，这种差异形成微卫星DNA多态性。

6.4 点突变

点突变的方式是多样的，在人类基因组中最常见的点突变是碱基替换（base substitution）和插入缺失（insertion-deletion, indel）。碱基替换包括转换（transition）和颠换（transversion），在人类基因组中，转换比颠换更为常见。点突变也可由DNA片段的插入（insertion）、缺失（deletion）倒位（inversion）或融合（fusion）所致，在人类基因组中插入、缺失比较常见。

6.5 DNA链断裂

DNA链断裂（DNA strand break）是DNA损伤的一种类型，包括DNA单链断裂（single-strand breakage），即DNA双螺旋结构中有一条链断裂；DNA双链断裂（double-strand breakage），即DNA双螺旋结构中两条互补链于同一对应处或紧密相邻处同时断裂。

7 检测方法

7.1 细胞基因组不稳定性的检测方法主要有基因测序技术、聚合酶链式反应相关技术、分子杂交技术、染色体核型分析、流式细胞术及单细胞凝胶电泳等。各检测方法简介见附录A。

7.2 不同的检测技术，各自有其技术适用性，同时也具有一定的技术局限性。应针对不同的细胞基因组不稳定性类型，结合技术的适用性和局限性，选择适合的技术进行检测，可参考表1、表2、表3、表4，表中“●”表示该检测方法可检出的基因组不稳定性类型。

表1 基因测序技术方法适用性

检出类型		基因测序技术					单分子实时测序技术和纳米孔单分子测序
		双脱氧链终止法测序	高通量测序				
			全基因组重测序	基因组拷贝数变异测序	全外显子组测序	单细胞测序	
染色体数目异常	整倍体异常						
	非整倍体异常	●	●			●	●
染色体结构畸变	缺失	●	●	●	●	●	●
	重复	●	●	●	●	●	●
	插入	●	●	●			●
	易位	●	●				●
	倒位	●	●				●
端粒长度		●	●				●
微卫星 DNA 不稳定性		●	●				●
点突变		●	●		●	●	●
DNA 链断裂		●	●				●

表2 聚合酶链式反应相关技术方法适用性

检出类型		聚合酶链式反应相关技术							
		PCR	qPCR	RFLP	STR	SSCP	HRM	DHPLC	ARMS
染色体数目异常	整倍体异常				●				
	非整倍体异常				●				
染色体结构畸变	缺失	●	●	●			●	●	
	重复	●	●	●			●	●	
	插入	●	●	●			●	●	
	易位			●					
	倒位			●					
端粒长度			●						
微卫星 DNA 不稳定性			●		●			●	
点突变		●	●	●		●	●	●	●
DNA 链断裂									

表3 分子杂交技术方法适用性

检出类型	分子杂交技术			
	FISH	CMA	ASO	DNA 印迹法

			aCGH	SNP array		
染色体数目异常	整倍体异常	●		●		
	非整倍体异常	●	●	●		
染色体结构畸变	缺失	●	●	●	●	●
	重复	●	●	●	●	●
	插入	●	●	●	●	●
	易位	●				
	倒位	●				
端粒长度		●				●
微卫星 DNA 不稳定性						
点突变			●	●	●	●
DNA 链断裂		●				●

表4 染色体核型分析、流式细胞术及单细胞凝胶电泳方法适用性

检出类型		染色体核型分析		流式细胞术	单细胞凝胶电泳
		显带核型分析技术	微核试验		
染色体数目异常	整倍体异常	●		●	
	非整倍体异常	●	●	●	
染色体结构畸变	缺失	●			
	重复	●			
	插入	●			
	易位	●			
	倒位	●			
端粒长度				●	
微卫星 DNA 不稳定性					
点突变					
DNA 链断裂				●	●

7.3 根据检测目的，建议采取一种或多种互补的方法进行检测，也可采取快速方法和确证方法相结合的方式，以全面的评价细胞基因组不稳定性。

8 分析评价

8.1 运用各种细胞基因组不稳定性检测方法，对多代体内生长或体外操作后的细胞样本进行检测，将检测结果、数据与人源细胞基因组的标准参考值进行比较，分析两者的基因组差异，从而评价细胞基因组的不稳定程度。

8.2 人源细胞基因组标准参考值

8.2.1 对人体内细胞进行检测的标准参考值

对人体内细胞进行检测，一般采用正常（健康）人群的标准参考值。包括正常人群的核型图谱、通用人类参考基因组、遗传多态性图谱、标准数据库等。这种标准参考值普遍适用于各种细胞基因组不稳定性检测，以评价细胞样本与正常细胞的基因组差异。

8.2.2 对体外操作细胞进行检测的标准参考值

对体外操作细胞进行检测，除了可使用上述正常人群的标准参考值外，还可根据研究和应用的实际需求，构建用于比对的参考值，如核型图谱、基因组序列、遗传多态性图谱、数据库等。用于构建参考值的体外操作细胞主要来源有：传代扩增培养前的细胞、诱导培养的目的细胞、经基因转导或修饰的目的细胞等。这种参考值更适用于产品研发及生产，以评价产品相关细胞样本与目的细胞的基因组差异。

8.3 应根据检测目的和细胞基因组不稳定性的评价要求，拟定细胞样本检测结果与人源细胞基因组标准参考值之间差异的可接受范围，即定性或定量的限度要求。疾病筛查及诊断的限度要求一般为正常（健康）人群的参考值范围；对于产品研发及生产，则应基于风险评估和关键工艺参数（CPP）设定限度要求，该限度要求可作为产品的关键质量属性（CQA）。

附录 A (资料性附录) 细胞基因组不稳定性检测方法简介

A.1 基因测序技术

A.1.1 双脱氧链终止法测序

双脱氧链终止法测序（Sanger测序）以待测DNA为模板复制出大量DNA片段，同时用一种“终止核苷酸” ddNTP干涉此复制过程。ddNTP可以随机地附着在任意一个延伸中的片段端口并终止它继续伸长，从而造成大批具有相同起点但却有不同终点的DNA片段。使用电泳技术可以让这些片段按长度排列，并依次通过一个激光窗口。由于ddNTP按其所截断的端口不同而产生不同的荧光，计算机可以根据荧光的颜色和片段的长度逐个“读出”该DNA的核苷酸序列。

A.1.2 高通量测序

高通量测序（high-throughput sequencing）区别于双脱氧链终止法测序，能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定。高通量测序的步骤一般为核酸提取、文库构建、基因测序、数据分析。

A.1.2.1 全基因组重测序

全基因组重测序（whole genome sequencing, WGS）是对已知基因组序列的物种进行不同个体的基因组测序。WGS覆盖区域广，不仅覆盖了几乎全部基因的外显子序列，也覆盖了内含子序列和基因间序列。可以检出单核苷酸变异（single nucleotide variations, SNV），还可以对结构变异（structure variation, SV）和线粒体基因组（mitochondrial genome DNA, mtDNA）进行分析。

A.1.2.2 基因组拷贝数变异测序

基因组拷贝数变异测序（copy number variation sequencing, CNV-seq）对DNA进行低深度全基因组重测序，将测序结果与人类参考基因组序列进行比对，通过生物信息分析以发现受检样本存在的CNVs。其检测范围可覆盖全染色体的大片段缺失、重复、插入，以及全基因组CNVs，并可检测低至5%的染色体非整倍体嵌合。

A.1.2.3 全外显子组测序

全外显子组测序（whole exome sequencing, WES）是利用序列捕获技术将全基因组中所有外显子区域DNA序列捕获，富集后进行高通量测序的方法。可用于检测已知基因的单核苷酸多态性位点、插入缺失位点等，不适合用于检测基因组结构的变异。

A.1.2.4 单细胞测序

单细胞测序（single cell sequencing）是利用单细胞基因组扩增技术，通过高通量测序得到单个细胞中所有的基因组、转录组等序列的技术。能够反映细胞间的异质性。

A.1.3 单分子实时测序技术和纳米孔单分子测序

单分子实时测序技术和纳米孔单分子测序均为高通量、单分子测序，不需要经过聚合酶链反应扩增一种可使DNA片段大量增殖的技术，实现对每一条DNA分子的单独测序。

A.2 聚合酶链式反应相关技术

A.2.1 聚合酶链式反应

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是最基本、最为广泛应用的DNA突变检测技术。原理是用一对能分别与靶DNA双链序列配对的人工合成的寡聚核苷酸引物，在耐热DNA聚合酶 (Taq) 的作用下扩增目的DNA片段。重复热变性、退火及延伸的循环，靶序列的拷贝数会按指数成倍增长。反应结束后，取反应液进行琼脂糖凝胶电泳，确认是否有目的PCR产物，估算大致的DNA量。

A.2.2 实时定量PCR

实时定量PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 是一种定量测定样品中特定DNA序列的聚合酶链反应，可推导出样品中被扩增模板DNA的原始含量。根据所用荧光技术的不同，可分为两类：根据寡核苷酸探针与PCR产物结合后所释放出的荧光进行检测，如TaqMan系统；通过双链DNA亲和性荧光素与PCR产物结合后所释放出的荧光进行检测，如SYBR Green系统。若使用适宜的PCR引物，还可测量端粒长度。

A.2.3 限制性片段长度多态性

限制性内切酶 (restriction endonuclease) 是能识别特定的DNA双链序列并能在识别序列或其邻近处进行双链切割的酶。不同个体或种群间的基因组DNA经同一种或几种限制性内切酶消化后所产生的DNA片段的长度数量各不相同。各自有其独特的电泳图谱，反映出基因组DNA序列的差异。

A.2.4 微卫星DNA多态性

设计引物，用PCR扩增微卫星DNA，即PCR扩增短串联重复 (short tandem repeat, STR)，所得产物再用限制性内切酶消化，电泳分析可以得到含不同长度DNA的图谱，从而分析基因组中微卫星DNA拷贝数和核苷酸序列的差异。该方法还可检测染色体数目异常。

A.2.5 单链构象多态性

单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP) 常用的检测方法是将PCR扩增后的DNA产物经变性解开成单链，单链DNA由于碱基不同而有不同的三维构象，在凝胶电泳时其迁移率就显出差别，从而反映出DNA序列是否发生突变。

该方法可检测各种点突变。随着片段长度的增加，灵敏度逐渐下降，对大于300bp的DNA片段，不推荐使用此法进行检测。

A.2.6 高分辨率融解曲线分析

高分辨率融解曲线分析 (high-resolution melting curve analysis, HRM) 的基本原理是通过对PCR反应的融解曲线分析，来进行分型。PCR扩增的融解曲线取决于其扩增序列，序列中一个碱基的突变都可以导致双链DNA的解链温度发生变化，通过使用实时定量PCR仪监测这种细微的温度变化，可以知道扩增的序列中是否有突变发生，从而对其进行基因分型。

HRM的PCR产物无需后处理（如酶切、电泳等），可实现闭管操作从而降低污染风险。但由于一个碱基的突变导致DNA解链温度变化很小，因此该方法对仪器的灵敏度和分辨率有较高要求。

A. 2. 7 变性高效液相色谱

变性高效液相色谱（denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC）是通过检测在部分变性和完全变性的情况下，DNA分子的移动情况进行SNP分型。DHPLC在变性情况下检测PCR扩增所得双链DNA的SNP。待检的PCR产物变性后重新退火，形成同源和异源双链，通过色谱柱进行分离。异源双链的稳定性较差，在层析柱子中保留的时间较短，因此比同源双链洗脱得更快，在色谱图中出现相应的峰。而完全变性条件下的DHPLC可以区分单链DNA中的单个碱基突变。

该方法整个过程可以实现自动化操作，所检测的DNA长度变动范围较广，可从点突变到大片段插入、缺失和微卫星DNA分析，但不能确定SNP的位置和具体类型。

A. 2. 8 扩增受阻突变系统

扩增受阻突变系统（amplification refractory mutation system, ARMS）又称等位基因特异性PCR（allele specific PCR, AS-PCR），将突变碱基设计于突变引物的3'端，利用Taq酶缺乏3'→5'外切酶活性，延伸反应因磷酸酯键形成困难而受阻，扩增反应后，根据电泳谱即可确定样品的基因型。该方法可进行小样本，低突变比例的SNP位点检测。

A. 3 分子杂交技术

A. 3. 1 荧光原位杂交

荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization, FISH）是一种非放射性原位杂交技术。将标记了荧光素的核苷酸探针与核酸按照碱基互补配对原则进行杂交，通过荧光显微镜观测荧光信号位置、大小及数量来判断基因的变异情况。

FISH主要鉴别已知基因的50kb以上的拷贝数变异，不适用于发现新的拷贝数变异。将核苷酸探针标记在端粒序列上还可测量端粒长度。

A. 3. 2 染色体微阵列分析技术

染色体微阵列分析技术（chromosomal microarray analysis, CMA）是将待测DNA与全基因组DNA芯片或SNP芯片进行杂交，杂交后的芯片经扫描，所得的数据再用计算机进行分析，最高可检测1kb以上的非平衡染色体拷贝数变异。

根据芯片设计与检测原理的不同，CMA技术分为两大类：基于微阵列的比较基因组杂交微阵列技术（array-based comparative genomic hybridization, aCGH）和单核苷酸多态性微阵列技术（single nucleotide polymorphism array, SNP array）。aCGH可检出染色体缺失、重复、插入的拷贝数变异和点突变；不能检出染色体易位、倒位等平衡结构畸变；受限于芯片探针覆盖范围，有可能导致部分拷贝数变异无法被检出。SNP array除可检出上述拷贝数变异外，还能检测单亲二倍体（uniparental disomy, UPD）和三倍体，及一定水平的嵌合体。

A. 3. 3 等位基因特异性寡核苷酸杂交

等位基因特异性寡核苷酸（allele-specific oligonucleotide, ASO）是设计合成的，可以在适当的条件下与特异序列杂交而不与其相关的序列杂交的寡核苷酸。用针对每一个等位基因序列设计的等位基因特异性寡核苷酸可以检出单个核苷酸的变异。

A. 3. 4 DNA印迹法

DNA印迹法又称Southern印迹法 (Southern blotting)，是将经过凝胶电泳分离的DNA转移到适当的膜（如硝酸纤维素膜、尼龙膜等）上的技术。可以采用毛细管作用或电泳法转移，转移到膜上的DNA再与标记的特异核酸探针杂交等进行分析。DNA印迹法可对特定基因中的DNA片段进行分析，还可分析端粒DNA。

A. 4 染色体核型分析

A. 4. 1 显带核型分析技术

显带核型分析技术又称核型分析 (karyotype analysis)，是按照染色体的数目、大小和着丝粒位置、臂比、副缢痕、随体等形态特征，对细胞内的染色体进行配对、分组、归类、编号和分析的过程。常规核型分析可检测DNA片段大于5Mb的染色体畸变。常见的核型分析方法有G显带 (G-banding)、Q显带 (Q-banding)、C显带 (C-banding)、N显带 (N-banding) 等。

A. 4. 1. 1 G显带

将染色体标本用热、碱、胰酶、尿素、去垢剂或某些盐溶液预先处理，再用Giemsa染液染色，所显示的带纹称为G带。G显带是最常用的核型分析方法。

A. 4. 1. 2 Q显带

用易于结合富含A、T碱基的DNA序列的荧光染料（如喹吖因）处理染色体标本，在荧光显微镜下染色体出现独特的带型，这种带纹称为Q带。

A. 4. 1. 3 C显带

C显带是从染色体臂选择性地抽取DNA，而C带区DNA对抽取有较大抗性，从而保留一部分DNA，使用染料显示出DNA的不同分布。C显带专门显示着丝粒及第1、9、16号与Y染色体长臂的DNA高度重复序列区域。

A. 4. 1. 4 N显带

N显带是用硝酸银染色，使染色体的随体及核仁组织区呈现出特异性的黑色银染物。

A. 4. 2 微核试验

微核试验是检测哺乳动物染色体或有丝分裂器是否损伤，评价诱导微核细胞发生率的试验。使用Giemsa染液或DNA特异性染料（如吖啶橙等）对细胞染色体染色后进行观察分析。

A. 5 流式细胞术

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 又称荧光激活细胞分选法 (fluorescence-activated cell sorting, FACS)，系将细胞或颗粒载体上的抗原-抗体特异性反应与荧光标记技术相结合而对供试品中待测物进行定性或定量分析的方法。人源细胞在细胞周期的G₀期和G₁期时含有二倍体量的DNA，利用

核酸荧光染料与细胞内的DNA结合，通过流式细胞术检测，与正常人源细胞G0期和G1期的检测值进行比较，可分析染色体数目异常。

运用脱氧核苷酸末端转移酶（terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT）介导的dUTP缺口末端标记法（TdT mediated-dUTP nick end labelling, TUNEL），即原位末端标记法，可以分析细胞凋亡所致的DNA链断裂。

流式细胞术结合定量荧光原位杂交，还可对细胞端粒长度进行分析。

A.6 单细胞凝胶电泳

单细胞凝胶电泳（single cell gel electrophoresis, SCGE）又称彗星试验（comet assay），在载玻片上用少量琼脂糖凝胶包埋单个分散细胞，细胞经裂解、解旋和电泳后，断裂的DNA在电场力作用下向阳极移动，经荧光染料染色，在荧光显微镜下观察彗星样图像。如果DNA受损，其断裂的碎片将向阳极迁移，形成拖尾，荧光染色后能看见彗星样尾；如果DNA没有损伤，则将停留在原位，无拖尾形成。

参 考 文 献

- 【1】 全国科学技术名词审定委员会. 生物物理学名词[M]. 北京: 科学出版社, 2018
- 【2】 全国科学技术名词审定委员会. 感染病学名词[M]. 北京: 科学出版社, 2019
- 【3】 全国科学技术名词审定委员会. 医学遗传学名词[M]. 北京: 科学出版社, 2021
- 【4】 全国科学技术名词审定委员会. 遗传学名词[M]. 北京: 科学出版社, 2006
- 【5】 全国科学技术名词审定委员会. 核医学名词[M]. 北京: 科学出版社, 2018
- 【6】 全国科学技术名词审定委员会. 放射医学与防护名词[M]. 北京: 科学出版社, 2014
- 【7】 全国科学技术名词审定委员会. 材料科学技术名词[M]. 北京: 科学出版社, 2011
- 【8】 全国科学技术名词审定委员会. 血液学名词[M]. 北京: 科学出版社, 2022
- 【9】 全国科学技术名词审定委员会. 运动医学名词[M]. 北京: 科学出版社, 2019
- 【10】 全国科学技术名词审定委员会. 生物化学与分子生物学名词[M]. 北京: 科学出版社, 2008
- 【11】 全国科学技术名词审定委员会. 计算机科学技术名词[M]. 北京: 科学出版社, 2018
- 【12】 傅松滨. 医学遗传学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2018
- 【13】 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 第3版. 上海: 复旦大学出版社, 2011
- 【14】 郭玲仟、张学. 医学遗传学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015
- 【15】 阳国平、郭成贤. 药物基因组学与个体化治疗用药决策[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016
- 【16】 李金明. 高通量测序技术[M]. 北京: 科学出版社, 2018
- 【17】 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2018
- 【18】 季维智、宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法[M]. 浙江: 浙江科学技术出版社, 1999
- 【19】 陈朱波、曹雪涛. 流式细胞术——原理、操作及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2014
- 【20】 GB/T 35533-2017 染色体异常检测基因芯片通用技术要求
- 【21】 GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程
- 【22】 GB/T 21794-2008 化学品 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法
- 【23】 GB/T 28646-2012 化学品 体外哺乳动物细胞微核试验方法
- 【24】 GB/T 15670.19-2017 农药登记毒理学试验方法 第19部分: 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验
- 【25】 GB/T 16886.1-2022 医疗器械生物学评价 第1部分: 风险管理过程中的评价与试验
- 【26】 GB/T 16886.3-2019 医疗器械生物学评价 第3部分: 遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验
- 【27】 GB/T 24353 风险管理 原则与实施指南
- 【28】 GB/T 27921 风险管理 风险评估技术
- 【29】 WS/T 187-1999 淋巴细胞微核估算受照剂量方法
- 【30】 YY/T 0870.2-2019 医疗器械遗传毒性试验 第2部分: 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验
- 【31】 YY/T 0870.4-2014 医疗器械遗传毒性试验 第4部分: 哺乳动物骨髓红细胞微核试验
- 【32】 YY/T 0870.5-2014 医疗器械遗传毒性试验 第5部分: 哺乳动物骨髓染色体畸变试验
- 【33】 YY/T 0870.6-2019 医疗器械遗传毒性试验 第6部分: 体外哺乳动物细胞微核试验
- 【34】 全国临床检验操作规程, 第4版
- 【35】 化妆品安全技术规范, 2015年版
- 【36】 中华人民共和国药典, 2020年版
- 【37】 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行), 国家药品监督管理局药品审评中心2022年5月26日发布
- 【38】 体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则(试行), 国家药品监督管理局药品审评中心2022年5月26日发布

- 【39】 免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行），国家药品监督管理局药品审评中心2022年5月26日发布
- 【40】 人源性干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（征求意见稿），国家药品监督管理局药品审评中心2021年8月17日发布
- 【41】 Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications, February 2010, FDA
- 【42】 Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products, Q5D ICH
- 【43】 Pharmaceutical Development, Q8(R2) ICH
- 【44】 徐丽霞. 染色体核型分析技术的发展[J], 医学综述, 2009, 15 (2) : 188-190
- 【45】 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用协作组. 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用专家共识[J], 中华妇产科杂志, 2014, 49 (8) : 570-572
- 【46】 中国医师协会医学遗传医师分会, 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组, 中国医师协会青春期医学专业委员会临床遗传学组, 上海市医学会分子诊断专科分会. 全基因组测序在遗传病检测中的临床应用专家共识[J], 中华儿科杂志, 2019, 57 (6) : 419-423
- 【47】 中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组, 中国医师协会医学遗传医师分会遗传病产前诊断专业委员会, 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组. 低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识[J], 中华医学遗传学杂志, 2019, 36 (4) : 293-296
- 【48】 卢仁泉、郭林. 基因组不稳定性及其相关检测在肿瘤诊疗中的应用进展[J], 中华检验医学杂志, 2016, 39 (4) : 311-313
- 【49】 陈传德、吴中亮、雷毅雄. 基因组的不稳定性与肿瘤[J], 疾病控制杂志, 2001, 5 (4) : 332-334
- 【50】 刘义、汉丽梅、潘永荣、金勇. 端粒长度测量方法的研究进展[J], 世界华人消化杂志, 2007, 15 (28) : 3025-3028
- 【51】 夏璐、丘冠英. DNA链断裂检测技术的进展[J], 生物化学与生物物理进展, 1997, 24 (1) : 31-35
- 【52】 邓爽、徐克前. DNA损伤检测技术[J], 生命的化学, 2013, 33 (6) : 700-705
- 【53】 马云彤、齐浩、罗志明. 细胞 DNA 单链断裂检测技术[J], 西安文理学院学报（自然科学版）, 2005, 8 (3) : 22-25
- 【54】 Andrés Aguilera and Tatiana García-Muse .Causes of Genome Instability[J], Annual Review of Genetics, 2013, 47: 1-32
- 【55】 Larissa Pikor, Kelsie Thu, Emily Vucic, Wan Lam .The detection and implication of genome instability in cancer[J], Cancer Metastasis, 2013, 32: 341-352
- 【56】 Alison J. Montpetit, et al. Telomere length: a review of methods for measurement[J], Nurs Res 2014, 63 (4) : 289-99
- 【57】 Sarah Killcoyne, Aisha Yusuf, Rebecca C. Fitzgerald. Genomic instability signals offer diagnostic possibility in early cancer detection[J], Trends in Genetics, 2021, 1834: 7
- 【58】 SeyedAhmad SeyedAlinaghi , Mohammad Mehrtak , Mehrzad MohsseniPour , Pegah Mirzapour, et al. Genetic susceptibility of COVID-19 a systematic review of current evidence[J], European Journal of Medical Research, 2021, 26: 46