



中华人民共和国国家标准

GB/T 38481—2020

微生物超低频突变测定 双重测序法

Determination of ultralow-frequency mutations for microorganisms—
Duplex sequencing

2020-11-19 发布

2020-11-19 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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：清华大学、洛阳华清天木生物科技有限公司、江汉大学、中国标准化研究院。

本标准主要起草人：张翀、邢新会、李梅、剪兴金、王立言、郭肖杰、张乐乐、彭海、马爱进。



微生物超低频突变测定 双重测序法

1 范围

本标准规定了用双重测序法测定微生物超低频突变的方法。
本标准适用于微生物基因组或基因片段超低频突变的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

超低频突变 **ultralow-frequency mutations**

化学、物理或生物因素导致微生物 DNA 发生的频率低于 1×10^{-5} 的永久性改变。

3.2

条形码标签 **barcode label**

接在待测 DNA 片段两侧的核苷酸片段,用以标示同一扩增家族的 DNA,协助进行突变位点的确认。

3.3

互补标签家族 **complementary tag family**

所有含两端互补条形码标签的 DNA 片段。

3.4

双链同源序列 **double-strand consensus sequences; DCSs**

带有相同条形码标签的双链 DNA 序列,包含反向互补链。

4 原理

在待测 DNA 片段两端接上一段 12 nt 随机且互补的双链核苷酸条形码标签,然后对所有带有条形码标签的序列进行双重的高通量测序。利用 12 nt 随机互补标签,排除掉测序文库制备过程中所引入的突变,进而准确检测突变位点和突变率。

5 试剂

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水。GB/T 6682,一级。

5.2 接头链标签序列:

- a) 5'-AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3';
 - b) 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 Tris-EDTA 缓冲液(5.8)或纯水中至终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$,并放置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

5.3 接头链扩增引物序列:

- a) 5'-AATGATACGGCGACCAACCGAG-3';
- b) 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGTC-3'。

X 为按样品需求设计的文库标记序列。

将寡核苷酸溶解于 Tris-EDTA 缓冲液(5.8)或纯水中至终浓度 20 $\mu\text{mol/L}$,并放置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

5.4 基因提取试剂盒。

5.5 高通量测序建库试剂盒。

5.6 DNA 分选磁珠试剂盒。

5.7 DNA 分析试剂盒。

5.8 三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA)缓冲液,pH 8.0。由 10 mmol/L 的分析纯 Tris 和 0.1 mmol/L 的 EDTA 配制,调整 pH 值至 8.0。

6 仪器设备及器具

6.1 PCR 扩增仪。

6.2 磁性分离器。

6.3 高通量测序仪。

6.4 核酸分析系统。

6.5 电子天平:精度为 0.01 g。

7 样品制备

7.1 DNA 提取

利用微生物基因组或质粒提取试剂盒对待测样本进行基因组或质粒 DNA 提取操作,最后使用 50 μL 的无菌双蒸水进行 DNA 洗脱。提取得到的 DNA 样品使用核酸定量仪检测核酸的浓度和纯度。

7.2 DNA 片段化和末端修复

利用高通量基因测序建库试剂盒,将待测样品 DNA 片段化至 100 bp~1 000 bp,将末端修复为 A 尾。

8 接头条形码标签的合成

8.1 退火

将浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 的两个接头链寡核苷酸片段各取 100 μL 进行退火,在 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下加热 5 min 后,自然降温,并静置 1 h。

8.2 延伸

将 8.1 中得到的产物按试剂说明与脱氧核糖核苷三磷酸混合物(dNTPs)和克列诺酶混合均匀,分装至两个 0.2 mL 的 PCR 管中并在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h。

8.3 DNA 回收

使用无水乙醇沉淀 DNA, 并加入 200 μL 纯水溶解。

8.4 酶切

用限制性内切酶 HpyCH4 III 对 DNA 产物进行酶切。将混合物分装至 4 个 0.2 mL 的 PCR 管中, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h。

8.5 纯化

加入并均匀混合 50 μL 的 3 mol/L 乙酸钠溶液(pH 5.2), 最终体积为 550 μL 。将混合溶液平分到 1.5 mL 的具塞离心管内, 每管 275 μL , 并加入 625 μL 室温的无水乙醇到各管中。充分混匀, 并以大于 10 000 r/min 的转速在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 min。

移除上清液后, 加入 1 mL 的 75%(体积分数)乙醇至各管中。充分混匀, 并立即以大于 10 000 r/min 的转速在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 min。

移除上清液后, 在纸巾上倒置试管 10 min 以干燥, 接着正置 5 min。

加入 100 μL 的 Tris-EDTA 缓冲液至上一步骤产物中并混合均匀。将所有试管集在一起, 最终体积为 200 μL , 终浓度约为 50 $\mu\text{mol/L}$, 放入 -20°C 的冰箱中保存。

9 接头条形码标签与待测样本 DNA 的连接和扩增

9.1 连接

将互补条形码标签与 DNA 片段化和末端修复产物按总浓度 20 : 1 混合后, 利用 T4 DNA 连接酶连接, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。

9.2 分选

利用 DNA 分选磁珠试剂盒分选得到的产物, 获得长度为 200 bp~900 bp 的 DNA 片段, 并以 DNA 试剂盒定量 DNA 浓度。

9.3 PCR 扩增

以分选产物为模板, 接头链扩增引物序列为引物, 按每 20 万读数数据量取 1 amol DNA 样量进行 PCR 扩增, 扩增程序根据所选用高保真 DNA 聚合酶的要求设定。

10 高通量测序

利用高通量测序试剂盒对扩增得到的 PCR 产物进行高通量测序, 每个待测样品测序碱基数量设置为大于或等于 10 Gb。

11 结果分析

对高通量测序数据进行清理, 然后按下列程序进行数据分析:

- a) 根据随机标签进行互补标签分类, 每一个家族需包含双向互补序列。互补标签家族大小分布在排除 1 之后, 最大峰值分布应于 6~12 之间。
- b) 双链同源序列在同一位点识别出突变才视为真正的突变位点。

12 结果计算与表述

12.1 结果计算

突变率按式(1)计算:

$$M = \frac{N_m}{N_t}$$

.....(1)

式中:

- M ——突变率;
- N_m ——双链同源序列突变位点数;
- N_t ——不含标签的测序核苷酸总数。

12.2 结果表述

结果表述为待测样本的突变率 M 。

