

STR 遗传标记高通量测序产前诊断样本质量控制
技术指南
编制说明

复旦大学附属妇产科医院

2026 年 04 月 30 日

目 次

1. 任务来源.....	1
2. 标准制订的背景和目的.....	1
3. 标准主要编制过程.....	1
4. 标准编制的基本原则.....	2
5. 研究目标.....	2
6. 伦理要求.....	2
7. 技术方案的确定.....	2
7.1 STR 遗传标记的筛选	2
7.2 主要试剂.....	3
7.3 仪器和耗材.....	3
8. 主要检测流程.....	3
8.1 样本采集、保存与运输.....	3
8.2 样本预处理与核酸提取.....	4
8.3 文库制备.....	4
8.4 上机测序.....	4
8.5 数据分析.....	5
8.6 结果判定.....	5
9. 质量控制.....	6
9.1 起始 DNA 样本的定量	6
9.2 二代测序文库的片段分析、定量.....	7
9.3 二代测序数据的质控.....	7
9.4 胎儿游离分数.....	7
10 采用国内外标准情况.....	7
11 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系	7
12 重大分歧意见的处理经过和依据.....	7
13 标准作为团体标准发布的意见.....	7
14 其他事项说明.....	7

STR 遗传标记高通量测序产前诊断样本质量控制技术指南

编制说明

1. 任务来源

根据“十四五”国家重点研发计划专项“多种类型遗传疾病的无创产前同步式筛查新技术与临床研究”（2023YFC2705600）的项目任务，由复旦大学附属妇产科医院牵头起草制定《STR 遗传标记高通量测序产前诊断样本质量控制技术指南》草案，编制期限为 2025 年 7 月 1 日至 2026 年 6 月 30 日。2025 年 4 月 8 日，向中国遗传学会技术标准化委员会提交团体标准立项申请。

2. 标准制订的背景和目的

产前诊断在孕期至关重要，其主要作用包括：在妊娠管理方面，能够在早期发现胎儿异常，为继续或终止妊娠提供医学上的决策依据。在优生优育方面，减少遗传病和出生缺陷，提升人口素质。在医学研究方面，能够积累数据，推动产前诊断技术和遗传病研究。在法律和伦理支持方面，为医学决策提供法律和伦理依据，保障孕妇和胎儿权益。

常见的产前诊断方法有无创产前检测、羊水穿刺、绒毛取样，以及超声检查。其中羊水穿刺和绒毛取样存在一定的样本污染风险，主要污染源包括母体细胞污染（MCC）、操作污染、环境 DNA 污染，这些污染可能会引入母体或外源 DNA，从而影响检测结果的准确性。其中羊水样本 MCC 发生率高达 68%，显著污染量（MCC>5%）达 24%。即使是离心后非血性污染的羊水样本仍然可能存在 MCC，一旦发生 MCC，误诊、漏诊的可能性将大大增加。此外，特殊的亲子关系（如供卵）、样本混淆，同样会导致异常的检测结果。

临床上对于样本污染的防控和亲子关系的鉴定，通常需要对母体和胎儿来源样本分别进行短串联重复序列（STR）检测。然而该方法未对母体血浆样本进行检测，无法排除是否为样本混淆引起的结果异常。血浆样本作为混合样，同样可以进行母子亲子关系的鉴定，并且可以分别作为母体和胎儿的对照，排除样本混淆的可能性。然而血浆样本中 cfDNA 片段较短，常规的 STR 检测方法无法满足需求，因此仍需要一种适用于 cfDNA 的 STR 检测方法。

本项目建立了一种利用母体外周血浆样本进行 STR 遗传标记检测实现对产前诊断样本的质控。通过分析血浆中母体和胎儿来源 cfDNA 的 STR 数据进行亲子关系鉴定，并且可以准确反映出胎儿 cfDNA 占比。此外，还可以通过和母体、胎儿来源样本进行对比，排除样本混淆的问题。检测过程无创、快速，检测结果准确、可靠，在便利性和安全性均具有极大的优势。

3. 标准主要编制过程

标准主要编制过程如下：

- 2025.7 - 2025.8 在中国遗传学会广泛征集标准起草工作组成员；
- 2025.8 - 2025.9 工作组骨干搜集相关文献资料、研究报告、论文书籍等，建立技术流程体系；
- 2025.8 - 2025.10 召开 4-6 次工作组会议，及时交流工作进展，并对问题进行研讨；
- 2025.10 - 2025.11 依托中国遗传学会向社会公开及定向征求意见；
- 2025.11 - 2025.12 根据反馈意见对标准文本进行修改，并召开专家研讨会，对争议问题进行解决；
- 2026.1 - 2026.2 修改后的文本再次征求意见，并根据意见进行修改；
- 2026.3 - 2026.4 向中国遗传学会标准化技术委员会送审，召开标准审定会；
- 2026.4 - 2026.5 根据审定专家意见修改后，报批。

4. 标准编制的基本原则

本标准的编制依据 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》，GB/T 20001.4-2001《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》，GB/T 37223-2018《亲权鉴定技术规范》，GB/T 43642-2024《法医学个体识别技术规范》，GB/T 44393-2024《序列多态 STR 等位基因命名规则》，GA/T1972-2021《法医物证检验术语》，GB/T 44322-2024《法庭科学 二代测序试剂质量基本要求》，GB/T 43636-2024《法庭科学 DNA 二代测序检验规范》，GB/T 45214-2025《人全基因组高通量测序数据质量评价方法》。本标准以促进居于母体血浆样本的 STR 遗传标记高通量测序与产前诊断样本本质控技术规范化和标准化位出发点，以技术标准必须具有广泛性、可操作性和适用性为工作目标，参考了现有无创产前诊断样本本质控技术和亲权鉴定技术相关的国内行业标准、指导文件和科研文献，通过系统的测试验证，总结出该标准方法的关键环节和参数依据，以满足标准制定的通用性、普适性和先进性要求。

5. 研究目标

本标准规定了 STR 遗传标记高通量测序产前诊断样本质量控制方法，本标准适用于对产前诊断样本进行质控，确认是否存在亲子关系异常、污染、样本混淆的情况。

6. 伦理要求

涉及人源组织取材的研究必须遵守政府法律和所有相关机构的规定，在取材和试验前应获得患者的知情同意，并仅可在已通过项目伦理审查的医院和科研机构进行。

7. 技术方案的确

7.1 STR 遗传标记的筛选

首先根据千人基因组东亚人群数据库，筛选出杂合度介于 0.3-0.7 的 STR 基因座，其次结合胎儿游离 DNA 片段长度限制因素，进一步筛选出多态性长度小于 160bp 的 STR 基因座。最后通过引物设计的难易度、扩增效率、重复性和稳定性等因素，筛选出 300 个 STR 基

因座作为最终的 STR 遗传标记位点库。

7.2 试剂

使用满足二代测序基本需求的试剂，构建基于多重 PCR 法的靶向二代测序文库和测序。

- a) 血浆 cfDNA、血液、组织 gDNA 提取试剂。
- b) 多重 STR 扩增引物，带条形码和二代测序接头序列的扩增引物。
- c) PCR 反应液。
- d) 纯化磁珠。
- e) 核酸定量荧光染料（高灵敏度）。
- d) 无核酸酶水。
- e) 无水乙醇。
- f) 二代测序芯片和配套测序试剂。

7.3 仪器和耗材

使用较为常规的设备，满足二代测序的全流程实验基本需求。对使用的设备和试剂耗材的规格进行了确认。

7.3.1 仪器设备

- a) PCR 仪。
- b) 高通量测序仪，可满足双端 150bp 测序。
- c) 基于荧光染料的核酸定量仪。
- d) 300bp 以下分辨率 \geq 3bp 的核酸片段分析仪。
- e) 微量可调移液器：0.1 μ L \sim 10 μ L，20 μ L \sim 200 μ L，100 μ L \sim 1000 μ L，符合 JJG 646 要求。
- f) 台式低温低速离心机：转速大于等于 1600g，符合 YY/T 0657 的要求。
- g) 台式低温高速离心机：转速大于等于 16000g，符合 YY/T 0657 的要求。
- h) 掌上离心机：转速大于等于 2000 g，符合 YY/T 0657 的要求。
- i) 涡旋混合器。
- j) 磁力架。

7.3.2 耗材

a) 无核酸酶离心管，规格为 1.5mL、2.0mL、0.5mL、0.2mL。b) 无核酸酶移液器吸头，规格为 10 μ L、200 μ L、1mL。

8. 检测流程

主要检测流程分为以下五个步骤：样本的采集、保存与运输，样本预处理与核酸提取，文库制备，上机测序，数据质控，结果判定。我们对这六个关键流程逐一分析了可能对实验结果、数据质量和分析结果产生影响的步骤，并对其进行标准化，以提高对产前诊断样本质控的可靠性，达到标准化目的。

8.1 样本采集、保存与运输

母体外周血样本在 12 孕周后采集，使用游离 DNA 专用采血管，采集体积 5mL，胎儿来源样本（脐血、羊水、绒毛）根据临床标准采集方法进行采集，其中脐血体积 400 μ L，使用 EDTA 抗凝管。羊水体积 2mL，保存于无菌带盖玻璃或塑料管中。绒毛组织约 1.5cm*3cm*3cm 或 3-5mg，浸没于组织保存液中。

游离 DNA 专用采血管采集后应于室温（15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）保存和运输，并在 96 h 内完成血浆分离；分离后的血浆如 2 周内使用可于 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存，如需长期保存应置于-70 $^{\circ}$ C 及以下，避免反复冻融，运输时应采用干冰运输。母体外周血全血样本采集后应于 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存和运输，并在 24 h 内分离血浆或提取 gDNA；羊水及绒毛样本采集后应根据组织保存液类型选择室温或 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存和运输，建议 2 周内完成 gDNA 提取。提取的 gDNA 可于-20 $^{\circ}$ C 保存，长期保存建议置于-70 $^{\circ}$ C 及以下。

8.2 样本预处理与核酸提取

对于母体外周血样本，使用低温低速离心机 1600g，4 $^{\circ}$ C，离心采血管 10min，收集上清液至新的离心管。继续使用低温高速离心机 16000g，4 $^{\circ}$ C，离心上清 10min，收集上清至新的离心管，获得血浆。分离上清液后的血液样本用于母体 gDNA 提取。

8.2.1 使用 cfDNA 提取试剂提取 1mL 血浆样本，获得 cfDNA。使用 gDNA 提取试剂提取 200 μ L 母体血液样本、200 μ L 胎儿脐血样本或 2mL 胎儿羊水或 3-5mg 绒毛样本获得 gDNA。

8.2.2 使用荧光染料法对提取的 cfDNA 和 gDNA 样本进行定量，1mL 血浆样本提取的 cfDNA，40 μ L 洗脱，浓度范围在 0.1~0.4ng/ μ L 之间，总量在 4-16ng 之间。200 μ L 血液样本提取的 gDNA，总量应不低于 1 μ g。2mL 羊水、3-5mg 绒毛组织提取的 gDNA，总量应不低于 200ng。使用微量分光光度计对提取的 gDNA 样本进行纯度检测，260/280 比值在 1.8~2.0 之间，260/230 在 1.8~2.2 之间。

8.3 文库制备

8.3.1 配制第一轮多重 PCR 反应体系（27 μ L 体系：STR 引物池，3 μ L；PCR 反应液，9 μ L；gDNA x μ L，水，补至 27 μ L），gDNA 起始量 20-200ng，cfDNA 起始量 \geq 4ng。

8.3.2 设置 PCR 程序并运行（预变性，96 $^{\circ}$ C，3 min；（96 $^{\circ}$ C，30 s；60 $^{\circ}$ C，4min）22 cycles；终延伸，72 $^{\circ}$ C，4 min；低温保存，4 $^{\circ}$ C， ∞ ）。

8.3.3 使用纯化磁珠对 PCR 产物进行纯化。

8.3.4 配制第二轮多重 PCR 反应体系（10 μ L 体系：PCR 反应液，5 μ L；带有条形码序列的引物，0.5 μ L，水，4.5 μ L）。将反应体系加入上一步的纯化后磁珠内，温和混匀并短暂离心。

8.3.5 设置 PCR 程序并运行（预变性，96 $^{\circ}$ C，3 min；（96 $^{\circ}$ C，15 s；58 $^{\circ}$ C，15s；72 $^{\circ}$ C，30s）8cycles；终延伸，72 $^{\circ}$ C，5 min；低温保存，4 $^{\circ}$ C， ∞ ）。

8.3.6 PCR 产物纯化，使用纯化磁珠对 PCR 产物进行纯化，使用 30 μ L 水洗脱获得 DNA 文库。

8.3.7 使用荧光染料法对 DNA 文库进行定量，文库总量 \geq 50ng；使用核酸片段分析仪确认文库片段主峰介于 250-300bp 之间，无杂带。

8.4 上机测序

使用双端150bp测序模式进行测序，gDNA文库测序数据量200Mb，cfDNA测序数据量600Mb。

8.5 数据分析

8.5.1 使用 FASTX-Toolkit 0.0.14 软件 FASTQ-Quality-Filter 工具，参数选择-p 80 -q 20，使用去除低质量 reads 软件默认参数，去除低质量的 bases。

8.5.2 筛选总有效基因座：使用 MISA 软件进行 STR 分型，保留 gDNA 和 cfDNA 共有的基因座，且 cfDNA 测序深度 $>500\times$ ，gDNA 测序深度 $>100\times$ ，统计出的总有效基因座记为 A， $A\geq 250$ 。计算胎儿游离分数，确认游离分数 $\geq 5\%$ 。

8.5.3 筛选 cfDNA 中 FSA：孕妇游离 DNA 中母体背景比较高，约 90%，而胎儿比例常低于 10%，根据占比高低，可以将孕妇游离 DNA 等位基因分为主要等位基因和次要等位基因；主要等位基因即母体等位基因，而次要等位基因往往为胎儿特有的等位基因，即 FSA；针对每个 STR 基因座，保留包含次要等位基因（变异等位基因频率为 0.02-0.15）的 STR 基因座，为降低 STR 滑移峰的干扰，去除次要等位基因中与主要等位基因重复数相差 ± 1 个的等位基因，最后保留下来的次要等位基因即为 FSA，这些含 FSA 的 STR 基因座成为有效 STR 基因座，把有效 STR 基因座的数量记为 S，把包含 1 个 FSA 的有效 STR 基因座数记为 S1，包含 2 个 FSA 的有效 STR 基因座数记为 S2，包含 3 个及以上 FSA 的有效 STR 基因座数记为 S3，则 $S=S1+S2+S3$ 。

8.6 结果判定

8.6.1 单胎/同卵双胞胎的结果判定

8.6.1.1 亲子关系判定：理论上，若孕妇为胎儿生物学母亲，对于单胎或同卵双胞胎下的孕妇游离 DNA，每个 STR 基因座的 FSA 数不超过一个，即 $S2=0$ ，否则，该基因座不符合孟德尔遗传定律，即 S2 为不符合孟德尔遗传定律的总基因座数，而 S1 为符合孟德尔遗传定律的基因座数。根据 GB/T 37223-2018 中对排除标准的相关定义，即“累积亲权指数小于 0.0001”时支持排除亲权关系，结合实践过程当中出现 3 个以上矛盾 STR 基因座时，累积亲权指数必然趋近于 0，将 S2 的数量是否 ≥ 3 作为排除胎儿与孕妇的亲亲子关系的依据。

8.6.1.2 样本混淆判定：将孕妇游离 DNA 与胎儿来源样本（脐血、羊水或绒毛）的基因型进行比较，依据 GB/T 43642-2024 判断胎儿（脐血、羊水或绒毛）与游离 DNA 中的胎儿是否为同一个体，如不为同一个体，则判定为样本混淆。

8.6.1.3 母源污染判定：若胎儿来源样本（脐血、羊水或绒毛）中存在痕量等位基因，且所有痕量等位基因与母本基因型符合孟德尔遗传，判定为母源污染。以母本特有等位基因的测序深度占比计算污染比例。

8.6.1.4 外源污染判定：若胎儿来源样本（脐血、羊水或绒毛）中存在痕量等位基因，且痕量等位基因与母本基因型存在不符合孟德尔遗传等情况，判定为外源污染。以非胎儿等位基因测序深度占比计算污染比例。

8.6.2 异卵双胞胎的结果判定

8.6.2.1 亲子关系判定：理论上，对于异卵双胞胎下的孕妇游离 DNA，每个 STR 基因座的 FSA 数不超过 2 个，否则，该基因座不符合孟德尔遗传定律，即 $S3=0$ ，S3 为不符合孟德尔遗传定律的总基因座数，而 S1 和 S2 为符合孟德尔遗传定律的基因座数。根据 GB/T 37223-2018 中对排除标准的相关定义，即“累积亲权指数小于 0.0001”时支持排除亲权关系，结合实践过程当中出现 3 个以上矛盾 STR 基因座时，累积亲权指数必然趋近于 0，将 S3 的数量是否 ≥ 3 作为排除胎儿与孕妇的亲亲子关系的依据。

8.6.2.2 样本混淆判定：将孕妇游离 DNA 与 2 个胎儿来源样本（脐血、羊水或绒毛）的基

因座分别进行比较，依据 GB/T 43642-2024 判断胎儿（脐血、羊水或绒毛）与游离 DNA 中的胎儿是否为同一个体，如不为同一个体，则判定为样本混淆。

8.6.2.3 母源污染判定：若 2 个胎儿来源样本（脐血、羊水或绒毛）中某个存在痕量等位基因座，且所有痕量等位基因座与母本基因座符合孟德尔遗传，判定为母源污染。以母本特有等位基因座的测序深度占比计算污染比例。

8.6.2.4 外源污染判定（异卵双胞胎）：若胎儿来源样本（羊水或绒毛）中存在痕量等位基因座，且痕量等位基因座与母本基因座存在不符合符合孟德尔遗传等情况，判定为外源污染。以非胎儿等位基因座测序深度占比计算污染比例。

胎儿来源样本以羊水为例，亲子关系和样本混淆的判定方法如下表所示：

	羊水包含胎儿特异性等位基因	羊水不包含胎儿特异性等位基因	羊水包含胎儿特异性等位基因	羊水不包含胎儿特异性等位基因
S2≤3	质控合格	样本混淆	/	/
S2>3	供卵	供卵和/或样本混淆	/	/
S3≤3	/	/	质控合格	样本混淆
S3>3	/	/	供卵	供卵+样本混淆
	单胎/同卵双胞胎	单胎/同卵双胞胎	异卵双胞胎	异卵双胞胎

S2：含 2 个胎儿特异性等位基因的 STR 基因座数。

S3：含 3 个及以上胎儿特异性等位基因的 STR 基因座数。

胎儿来源样本以羊水为例，母源、外源污染的判定方法如下表所示：

	羊水存在痕量等位基因	
羊水痕量等位基因座与母亲基因座符合孟德尔遗传定律	母源污染	
羊水痕量等位基因座与母亲基因座不符合孟德尔遗传定律	外源污染	

9. 质量控制

9.1 起始 DNA 样本的定量

健康人 1mL 血浆样本提取的 cfDNA，以 40μL 洗脱体积为例，浓度范围在 0.1~0.4ng/μL 之间，投入检测的总量应大于 4ng。若浓度大于 1ng/μL，应考虑存在 gDNA 污染，可使用琼脂糖凝胶电泳鉴定是否存在大片段 gDNA 条带。宜对血浆样本重新进行高速离心并分离上清液，或重新采样。其它样本类型提取的 gDNA，应保证投入检测的总量大于 20ng。

9.2 二代测序文库的片段分析、定量

成功构建的二代测序文库，使用核酸片段分析仪确认片段长度介于250-300bp之间，无其它杂带。使用荧光染料定量的文库总量不低于50ng。

9.3 二代测序数据的质控

gDNA样本的平均测序深度应不小于100×，cfDNA的平均测序深度应不小于500×，总有效STR基因座数应不少于250个。

9.4 胎儿游离 DNA 比例

胎儿游离 DNA 比例应 $\geq 5\%$ ，若不满足 5%的要求，应在距上一次采样的至少一周后重新采样。

10 采用国内外标准情况

本标准没有规范性引用文件。

11 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准符合现行法律、法规和强制性标准的规定。

12 重大分歧意见的处理经过和依据

无。

13 标准作为团体标准发布的意见

目前，我国还没有采用母体血浆样本的 STR 遗传标记高通量测序进行产前诊断样本质控的国家、行业等标准方法，建议将本标准作为团体推荐性标准，并逐步向行业内推广使用。

14 其他事项说明

无。