

肿瘤高通量基因测序技术规范

Technical regulation of next-generation gene sequencing for tumors

地方标准信息服务平台

2021 - 03 - 04 发布

2021 - 04 - 04 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 适用人群、指标要求及条件	2
5 测序流程	3
6 质量评价	8

地方标准信息服务平台

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020规则起草。

本文件由江苏省卫生健康委员会提出。

本文件由江苏省卫生标准化技术委员会归口。

本文件主要起草单位：江苏省肿瘤医院、江苏吉诺思美精准医学科技有限公司、南京世和基因生物技术有限公司、华大生物科技有限公司。

本文件主要起草人：冯继锋、吴建中、井昶雯、马蓉、曹海霞、王卓、刘思文、陈丹、张君莹、吴旸、张圆。

地方标准信息服务平台

肿瘤高通量基因测序技术规范

1 范围

本文件规定了肿瘤高通量基因测序适用人群、指标要求及条件、测序流程、肿瘤高通量基因测序实验室质量评价。

本文件适用于肿瘤患者的高通量基因测序检测。

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（包括所有的修改版）适用于本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 30989 高通量基因测序技术规程

医疗机构临床基因扩增管理办法 卫办医政发〔2010〕194号

医疗器械监督管理条例 国务院令276号

医疗器械注册管理办法 国家食品药品监管总局令4号

ISO 15189 医学实验室质量和能力的专用要求

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1

高通量基因测序 next-generation gene sequencing; NGS

区别于传统的双脱氧法测序，能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术，通过一次测序反应能产生不低于100Mb的测序数据。

3.2

文库 library

通过生物来源的、人工合成的或者克隆技术等所得到的一个重建分子群，如基因组文库、互补文库、噬菌体展示肽文库等。

3.3

测序通量 throughput of gene sequencing

单次测序可获得序列信息的基因片段数量或可测定的脱氧核糖核酸和核糖核酸（以碱基表示）的数量。

3.4

有效通量 valid throughput

单次测序质量合格的基因片段数或碱基数。

3.5

测序准确率 accuracy of gene sequencing

对已知序列的基因进行测序，计算正确的碱基数占可识别的碱基数比例。

3.6

测序深度 depth of sequencing

待测样本中某个指定的核苷酸被检测的次数。

3.7

碱基识别质量 quality of base calling

测序过程中从荧光信号或者其他信号转换成序列，衡量碱基正确识别的概率。通常以数字值直接表示。

4 适用人群、指标要求及条件

4.1 适用人群

能获取肿瘤细胞的肿瘤患者。

4.2 测序设备使用条件

4.2.1 环境温度：(18±5)℃，24小时温度变化不超过2℃，目标温度以各个仪器设备性能参数中的要求而定。

4.2.2 环境湿度：根据以各个仪器设备性能参数中的要求而定。

4.2.3 工作电压：220 V。

4.2.4 电源保护：带有不间断1500 W电源器。

4.2.5 支撑平台：气压式缓冲系统的防震平台，防震效果达到1 Hz级别。

4.3 实验室要求

4.3.1 资质要求

开展肿瘤高通量测序医疗机构应该具备国家级卫生计生行政部门审批许可，并具备省级技术审核的临床基因扩增实验室资质，相关工作开展符合《医疗机构临床基因扩增管理办法》的规定。

4.3.2 设置要求

4.3.2.1 参照 GB/T 30989 中规范性目录 B 的要求。实验室的安全工作制度或安全标准操作程序，所有操作符合 GB 19489 中的要求。

4.3.2.2 区域分区可分为：样本前处理区、试剂储存和准备区、样本制备区、文库制备区、杂交捕获区 / 多重 PCR 区域（第一扩增区）、文库扩增区（第二扩增区）、文库检测与质控区、测序区、数据存贮区。

4.3.2.3 工作区空气及人员流向需严格按照《医疗机构临床基因扩增管理办法》配置。分区可根据实际情况合并，但是在前处理和建库时，血液样本与组织样本分开。

4.4 设备试剂要求

4.4.1 设备包括：高通量基因测序仪、DNA 提取相关设备、PCR 仪等，设备的种类、数量与试剂开展的项目与检测标本的数量相匹配。

4.4.2 检测实验室应该做好仪器设备维护及保养，建立仪器设备标签管理、档案管理，按设备要求定期进行计量校准及维护管理。

4.4.3 开展高通量基因测序的诊断机构和医院需严格按照《医疗器械监督管理条例》和《医疗器械注册管理办法》使用国家食品药品管理局（CFDA）获批注册的设备和试剂开展高通量基因测序工作。

4.4.4 涉及实验室自配试剂（LDT），需有严格的试剂制备标准操作规程（SOP），需经过临床实验室自建项目验证合格才可使用。LDT 基于不同样本类型的性能验证的指标包括：精密度（批内、批间）、准确度、分析灵敏度、分析特异性、可测量范围、样本稳定性、试剂稳定性、携带污染、参考范围、临床诊断灵敏度、临床诊断特异性。

4.5 检测项目管控

4.5.1 检测项目验证因素包括：建库方法、测序平台和分析工具以及不同的突变类型（包括单碱基突变（single nucleotide variant, SNV）、小片段插入或者缺失（ins, del）、基因拷贝数变异（copy number variations, CNV）、染色体结构变异（structural variation, SV））以及不同的样本类型（如 FFPE 组织、新鲜组织、全血、胸水等）。

4.5.2 验证参数包括：目标区域测序（panel）的准确性、精确性、敏感性、特异性。

4.6 人员要求

4.6.1 高通量测序检测技术人员需具备临床病理学、分子生物学的相关专业大专以上学历，需接受省级卫生计生行政部门组织的高通量基因测序技术培训，或者省级卫生计生行政部门颁发的培训合格证；需具有临检中心《临床基因扩增实验室技术人员培训合格证》。

4.6.2 数据分析人员需具有临床医学、分子生物学或遗传学知识背景并经生物信息学培训。

4.6.3 实验室需依照《医学实验室质量和能力的专用要求》（ISO 15189）进行内部人员周期性培训和考核机制并制定文件化程序，保留相关记录。

5 测序流程

5.1 测序前准备

5.1.1 医师须自觉维护患者的权利，尊重患者的知情同意权和选择权，保护患者隐私。

5.1.2 全面客观宣教高通量测序在肿瘤中的应用价值，优缺点及可供选择的高通量测序方案等。

5.1.3 告知要点主要包括：

- a) 检出率、假阳性率。
- b) 该检测有失败的风险，可能会重新检测，检测周期变长。

- c) 告知该检测的局限性。
- d) 检测的种类、费用和技术流程。

5.2 标本采集

5.2.1 样本类型

5.2.1.1 新鲜组织

在显微镜下确认肿瘤细胞所占比例应 $\geq 30\%$ ，坏死细胞所占比例应 $\leq 10\%$ ，相关的病理检测结果保存备查。样本采集后立即放入液氮完全冷冻， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存，干冰运输。

5.2.1.2 石蜡组织/切片组织

10%中性福尔马林固定手术标本，按病理学操作规范进行取材。5 ~ 10张石蜡包埋标本切片，厚度为 $5\text{ }\mu\text{m}$ ~ $10\text{ }\mu\text{m}$ ，用载玻片片盒或者离心管保存，常温保存、运输。其中一片进行HE染色，确认肿瘤细胞含量。活检材料的固定时间一般是24小时以内。

5.2.1.3 体液

体液中的肿瘤细胞用于基因检测时，需确认肿瘤细胞，穿刺获得胸腹水样本提交给细胞病理检查之后，剩余液体冷藏/冷冻保存，或在含有细胞成分的离心沉淀中加入含有蛋白质变性剂的缓冲液室温保存。

5.2.1.4 外周血

采集外周血提取血浆游离DNA进行检测，取样时需使用一次性密闭EDTA抗凝真空采血管，采集6ml~10ml全血，冷藏运输，6小时内分离血浆，提取游离DNA，保存到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，并避免反复冻融。如外周血需长时间运输，建议用商品化的游离DNA样本保存管，在常温条件下，cfDNA在全血中可稳定保存7天。

5.2.2 采样质量评价

5.2.2.1 评价内容

细胞组成、肿瘤细胞的数量，是否按照要求进行处理与运输。

5.2.2.2 评价方法

5.2.2.2.1 包括肉眼观察、显微镜下观察和浓度分析等。

5.2.2.2.2 需经病理医师审阅，取一张切片HE染色后显微镜下观察，确保肿瘤细胞存在，并记录肿瘤组织含量，标注肿瘤细胞密集区域。肿瘤细胞比例在20%以上。

5.2.3 样本采集中的防污染

5.2.3.1 样本采集需采用一次性材料。

5.2.3.2 采集中需注意防止污染，防止混入操作者的毛发、表皮细胞、痰液等。

5.2.3.3 玻璃器皿需高压灭菌，以使可能存在的DNase失活。

5.2.3.4 制备不同患者病理切片样本时，需更换新刀片。

5.2.3.5 提取RNA样品，需采用RNase抑制剂措施和无RNase材料。

5.2.4 样本运送和保存

5.2.4.1 采用唯一编号对样本进行编号。该编号应当与检测报告中的样本编号一致。

5.2.4.2 实验室应建立详细的样本运送标准操作规程，对临床医生提供样本采集手册，要求物流人员填写相关运送记录表，确保运送过程中样本的安全性和过程的可控性。

5.2.4.3 样本运送和保存：用于 DNA 扩增检测的 EDTA 抗凝全血样本及 RNA 检测的样本，需稳定化处理常温运送，或速冻后，置干冰中运送。

5.2.5 样本提取

5.2.5.1 新鲜和冻存的手术组织样本

采用常规的商品化DNA提取试剂盒。

5.2.5.2 活检样本

推荐使用能提取石蜡包埋组织微量DNA的试剂盒。

5.2.5.3 RNA 提取

胍盐提取结合酚-氯仿抽提，石蜡样本或活检样本可使用商品化RNA提取试剂盒。细胞或组织的彻底匀浆

5.2.6 核酸纯度评价

可用凝胶电泳将样本的核酸提取物与核酸标准品比较测定；

a) DNA 浓度控制在 50 ng/ul ~ 100ng/ul，总量 20 μg ~ 40 μg 或以上；A260/280 在 1.8 ~ 2.0 之间；

b) RNA 溶于无 RNase 的纯水中，建议浓度在 100 ng/ul 以上，总量达 30 μg 以上。

5.3 测序流程

5.3.1 文库制备

5.3.1.1 文库制备方法主要有杂交捕获和扩增子建库，应对检测基因、区域或突变热点进行描述，并建立实验室检测 SOP。

5.3.1.2 上机测序前需对文库进行质量分析。每个检测项目应设定其文库质量的要求，明确接受或拒绝的标准。

5.3.2 测序仪上机检测

5.3.2.1 测序主要有检测氢离子释放和荧光信号两大技术平台。

5.3.2.2 测序时根据检测样本量和质量要求确定适当的芯片，以保证测序质量和靶区覆盖深度。

5.3.2.3 录入样本编号、检测内容、设定参数等信息，按仪器操作流程进行测序。

5.4 生物信息分析

5.4.1 分为两个主要步骤：一是对测序数据进行质控分析及过滤；二是对通过质控的序列进行变异位点鉴定分析并注释。

5.4.2 所用各种生物信息分析软件，均需通过适量标准品测序数据进行验证，证明所用软件及参数可达到临床报告的要求。

5.4.3 所有数据分析的软件均需版本号，版本更新后需要在 SOP 中进行更新。

5.5 检测报告内容

5.5.1 检测报告内容

检测报告内容包括：

- a) 患者姓名、年龄、住院号、病区床号、送检单位及送检日期、临床诊断等基本信息。
- b) 样本编号、样本种类、采样日期和接收日期、样本处理过程。
- c) 检测项目、检测方法、检测设备、检测结果及报告版本号。
- c) 检测者、审核者及检测时间。

5.5.2 突变位点命名

5.5.2.1 基因突变命名

5.5.2.1.1 人类基因组突变学会（HGVS）已建立系统的基因突变命名方法。具体基因突变命名方法可查阅网站 <http://www.hgvs.org/mutnomen/index.html>。以最新版本为准。

5.5.2.1.2 描述某一序列改变时，前缀表明其参考序列类型。例如“g.”表示基因组序列，“c.”表示 cDNA 序列，“m.”表示线粒体 DNA 序列，“r.”表示 RNA 序列，“p.”表示蛋白序列。

5.5.2.1.3 在数据库中的收录号以及版本号应在实验报告中列出。

5.5.2.2 参考序列

5.5.2.2.1 序列参考美国国立生物技术信息中心（NCBI）收录的参考序列编码。

5.5.2.2.2 前缀“NM_”表示为 mRNA 序列，“NP_”表示多肽序列，“NG_”表示基因组序列。

5.5.2.2.3 基因组参考序列应列出完整基因序列，包括 5' 以及 3' 非编码区（UTR）。

5.5.2.2.4 应选择合适的转录体，如最常见的转录体，或已知的最大转录体，或具有组织特异性的编辑转录体，且明确起始转录点。

5.5.2.2.5 当某一参考序列具有多种转录方式时，选择 NCBI 数据库里注释最全面的版本。

5.5.2.3 DNA 序列变异术语

5.5.2.3.1 DNA 核苷酸用大写字母 A（腺嘌呤）、C（胞嘧啶）、G（鸟嘌呤）以及 T（胸腺嘧啶）来表示。

5.5.2.3.2 用正链表示 DNA 序列。

5.5.2.3.3 当 DNA 序列改变时，以相应核苷酸所在位置及相应字母来描述。“>”符号表示“从某一变化至另一”。

5.5.2.3.4 在描述突变方式时，数字、字母、箭头、上标以及下标之间不应出现空格。

5.5.2.4 RNA 序列变异术语

5.5.2.4.1 RNA 序列以小写字母 a（腺嘌呤）、c（胞嘧啶）、g（鸟嘌呤）、u（尿嘧啶）进行描述。

5.5.2.4.2 RNA 序列改变描述方式与 DNA 相类似。

5.5.2.5 蛋白质序列变异术语

蛋白质序列改变通常以单个字母或三个字母（第一个字母大写）来描述。

5.5.2.6 错义突变及无义变异术语

5.5.2.6.1 由于三联体密码子的简并性，多个位点核苷酸的改变可能不影响最终氨基酸序列。因此，应分别从DNA水平和氨基酸水平描述突变。

5.5.2.6.2 从DNA水平对某一突变位点的描述方式包括碱基位点，正常碱基，“>”符号，突变碱基。例如，某一蛋白第551号氨基酸残基由G(甘氨酸)突变为D(天冬氨酸)，从DNA水平描述即c.1652G>A。

5.5.2.6.3 在氨基酸水平，由于错义突变的产物以氨基酸残基位点以及表示氨基酸的单字母或三联体密码子来描述。表示方法是野生型的氨基酸、位点、突变氨基酸，三者之间不要有空格。无义突变表示方法与之相类似。

5.5.2.6.4 “X”符号代表终止密码子。

5.5.2.7 缺失和插入术语

缺失和插入突变分别用前缀“del”和“ins”来表示，并注明突变位点以及碱基。“delins”则表示该段序列缺失的同时有片段插入。

5.5.2.8 移码突变术语

移码突变用“fs”符号表示。

5.5.2.9 碱基重复序列

重复突变用“dup”符号表示。

5.5.2.10 其他

对于其他突变，可参考HGVS建议的命名规则。

5.5.3 报告临床意义的解读和批注

对于肿瘤体细胞突变，根据突变的类型和已有的报道及指南，基因变异提倡分级的处理方式。

A级：美国食品药品监督管理局FDA或CFDA批准的用药治疗靶点；写入中外诊疗指南有明确诊断/治疗/预后意义的变异。在报告中注释该变异位点的临床诊断/治疗/预后意义的权威指南来源。

B级：尚未进入诊疗指南，但已经写入该领域的专家共识的变异位点。注释时要批注研究报告及专家共识的来源，明确其药物及其临床意义、正在开展的状态等信息。

C级：FDA或CFDA批准用于其他肿瘤可预测疗效的基因变异，或者正在进行中的临床试验变异位点。注释时要批注用于其他肿瘤的权威指南，研究文献及临床试验正在开展的状态等信息。

D级：处于学术争议或临床意义不明确的基因变异。同一实验室应该有统一的政策用来应对检测过程中出现的临床意义不明变异情况。

5.6 检测报告的审核发放

5.6.1 规定相关检测报告的周期；

5.6.2 最终报告应由具备高级职称人员审核；

5.6.3 检测报告应当以书面报告形式告知受检者，应通知受检者或其家属获取该报告的地点和时间。

5.7 资料与标本的保存

5.7.1 肿瘤高通量基因测序患者相关资料以及相关的数据信息均应当在医疗机构保存 3 年以上。

5.7.2 实验室应当建立完整质量文件体系，包括质量手册、程序文件及标准操作程序（SOP）文件体系，以保证检测各环节的标准、有序进行，确保检测结果的真实性、准确性和可重复性。

6 质量评价

6.1 质控品的使用管理

6.1.1 肿瘤高通量测序实验室应该包括阴性质控品、阳性质控品及空白对照。

6.1.2 若无适用于高通量测序检测的第三方商业化阴阳性质控品，各实验室可在遵循法律法规的要求前提下，通过以下途径获得：使用试剂盒自带的阴阳性质控品、使用已知突变的患者组织作为阳性质控品或使用正常体细胞 DNA 作为阴性质控品。

6.2 室内质量控制

6.2.1 一般室内质量控制要求

通常情况下在检测中一次检测至少添加一个阳性质控、一个阴性质控或者一个空白对照质控与常规标本同时检测，并设定质控标准，保留质控记录。

6.2.2 定期针对检验质量的内部评价

检测实验室应有计划地采用留样复测、相同样本的人员比对、不同方法相同样本比对、设备期间核查等方式定期对检测系统的稳定性、仪器设备、新进人员等环节进行内部质控。

6.2.3 生物信息分析流程质量管理

6.2.3.1 实验室应建立生物信息学程序的书面质量管理计划文件。需包含每次运行时监测和评估运行性能的指标和质控参数，以及定期监测的指标和质控参数。

6.2.3.2 指标和质控参数可包括但不限于标准品的突变类型及百分比。

6.2.3.3 实验室需要建立一个异常记录文档，用来记录偏离高通量测序生物信息分析标准分析流程的检测。

6.2.4 应对方案和替代方法

各个质量控制步骤中如出现异常或失败，实验室应有应对措施或备选方案；对于测序结果质量差或有问题的区域应建立替代方法。

6.3 室间质量评价

开展肿瘤高通量基因测序的实验室应每年参加由卫生部临检中心组织的室间质量评价活动。室间质量评价结果不合格的应该分析原因，并采取相应的预防/纠正措施。