



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

基于 RNA 捕获测序的肿瘤基因变异检测 技术指南

Technical guideline for detection of tumor gene alterations based on RNA capture
sequencing

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布

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 检测原理..... 4

6 检测环境..... 5

7 试剂、仪器与耗材..... 5

8 样本采集、运输及保存..... 6

9 检验流程..... 8

10 结果判定..... 9

参 考 文 献.....11

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。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

基于 RNA 捕获测序的肿瘤基因变异检测技术指南

1 范围

本文件规定了基于RNA捕获测序的肿瘤基因变异检测技术的检测原理、检测环境、试剂、仪器与耗材、样本采集运输及保存、检测流程和结果判定要求等。

本文件适用于使用人体来源的肿瘤样本，通过对其提取得到的RNA进行目标区域捕获后进行基因测序，检测肿瘤基因变异的方法。适用于RNA捕获测序检测产品或DNA/RNA共检产品捕获测序产品中的RNA检测部分。适用于通过探针杂交捕获或多重PCR对目标区域进行捕获的方法；适用于高通量测序（下一代测序，NGS）或单分子基因测序。

本文件不适用于非肿瘤患者样本，和/或血浆循环肿瘤RNA样本的检测；不适用于桑格（Sanger）测序为主要技术原理的第一代基因测序的检测方法。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB 19489—2008 实验室 生物安全通用要求
GB/T 27025—2019 检测和校准实验室能力的通用要求
GB/T 29859—2013 生物信息学术语
GB/T 30989—2014 高通量基因测序技术规程
GB/T 38736—2020 人类生物样本保藏伦理要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

核糖核酸 RNA

由核苷酸组成的核糖核酸聚合物，其存在形式为双链或单链形式。

[来源：ISO 22174:2005，3.1.3]

3.2

逆转录 Reverse Transcription, RT

将RNA模板通过逆转录酶合成互补DNA（cDNA）的过程，是RNA捕获测序中从RNA到可测序DNA文库的关键步骤。

3.3

互补脱氧核糖核酸 cDNA

在逆转录酶作用下合成的与给定核糖核酸互补的单链脱氧核糖核酸，用作合成脱氧核糖核酸拷贝的模板。

[来源：ISO 17822-1: 2014，3.12]

3.4

RNA 完整度 RNA integrity

评估RNA质量的指标之一。可以使用凝胶电泳、毛细管凝胶电泳和微流控分析系统，或通过基于荧光测定的分析来检测 RNA 的完整性；使用RNA 质量数值（RQN）、RNA 完整性数值（RIN）或大于200核苷酸的RNA片段百分比（DV200）数值来评估 RNA 样本的质量。

3.5

RNA 捕获测序 RNA capture sequencing

将样本提取得到的RNA逆转录成cDNA，并根据待富集的目标区域设计相应探针或PCR引物，通过探针杂交捕获或多重PCR富集的方法，针对性捕获富集待测RNA的目标区域片段、建库并测定核苷酸序列。

3.6

探针杂交捕获 Probe Hybridization Capture

使用设计好的核酸探针（通常为生物素标记的DNA或RNA寡核苷酸）与目标核酸序列特异性结合，通过链霉亲和素磁珠富集目标片段的技术。

3.7

多重PCR富集 Multiplex PCR Enrichment

针对目标区域设计多对PCR引物，通过多重扩增反应选择性富集目标核酸片段，适用于已知序列。

3.8

文库 library

加上接头（已知序列的 DNA 片段）的待测序片段分子群。单分子纳米孔测序包含马达蛋白或者穿孔结构原件。

注：通常按照是否依赖PCR扩增过程而构建，分成PCR文库（经过一定循环数的PCR扩增过程而构建的测序上机文库）和PCR-free文库（不依赖PCR扩增过程而直接构建的测序上机文库）

3.9

样本标签序列 Barcode/Index

是添加到测序文库中的一段短核苷酸序列，用于在混合测序中唯一标识不同样本，实现多样测序中的样本区分和数据拆分。

3.10

高通量测序 High-throughput sequencing

区别于传统双脱氧（Sanger）测序，一种能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术，通常一次测序反应能产生不低于100Mb的测序数据。

[来源：GB/T 40664-2021，定义3.8]

3.11

单分子基因测序 single-molecule sequencing

在单分子水平上对核酸进行连续碱基序列测定。

注1：通常基于光学或电学等信号转换成碱基信息的单分子长片段测序方式，区别于依赖核酸模板扩增实现碱基序列测定的桑格测序、大规模平行高通量测序等以及基于共标签进行短序列连接的单分子基因测序方式。

注2：单分子基因测序中，根据不同的测序平台和建库方式，能实现万级或兆级连续碱基直接测量。

3.12

测序读长 read length of sequencing

单次运行可读取的质量合格的序列片段长度，通常以碱基数表示。

注：单分子基因测序评价指标包含最长读长、平均读长、读长N50等。

3.13

Q 值 Quality Score, Phred Score

衡量碱基正确识别的概率。通常以数值直接表示。

碱基识别质量与碱基识别错误率之间的关系可用式(1)表示：

$$Q = -10\lg P \dots\dots\dots (1)$$

式中：

Q——碱基识别质量；

P——碱基识别错误率。

3.14**原始序读数 Raw Reads**

直接从测序仪获得的未处理数据。

3.15**过滤后读数 Clean reads**

是指测序原始数据 (Raw reads) 经过质量控制和预处理后，保留下来的高质量、可用的测序读数。

3.16**比对率 Mapping Rate**

测序读数 (reads) 成功比对到参考基因组或基因的比例。

3.17**基因覆盖度 Gene Coverage**

目标基因被测序读长覆盖的比例。

3.18**融合基因 Fusion Gene**

通过染色体倒位(chromosomal inversion)、串联复制(tandem duplication)、缺失 (deletion)或易位(translocation)，合并不同的、独立的基因或基因片段的过程，即由于某种机制(如染色体结构重排引起基因组变异)造成两个或多个不同基因的部分序列或全部序列(编码区)首尾相连，置于同一套调控序列(包括启动子、增强子、核糖体结合序列、终止子等)控制之下，构成一个新的嵌合基因。

注：因某些基因外显子跳跃突变在RNA水平上表现为其相邻的外显子发生融合，有时此类变异也被纳入融合基因讨论。如MET基因14号外显子跳跃突变。

3.19**外显子跳跃 Exon Skipping**

在未成熟mRNA剪接为成熟mRNA的过程中，特定外显子被跳过，不包含在最终成熟mRNA中的现象。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

RNA：核糖核酸 (ribonucleic acid)

NGS：高通量测序或下一代测序 (next generation sequencing)

cDNA：互补DNA (complementary DNA)

RNase：核糖核酸酶 (ribonuclease)

FFPE：福尔马林固定石蜡包埋 (formalin fixed paraffin-embedded)

GSP：基因特异性引物 (gene-specific primer)

PCR：聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)

DV200：大于200核苷酸的RNA片段百分比 (DNA Volume > 200 nucleotides)

RIN：RNA完整性数值 (RNA integrity number)

RQN: RNA质量数值 (RNA quality number)

FFPM: 每百万条reads中融合片段的个数 (Fusion Fragments Per Million total reads)

5 检测原理

基于高通量测序技术,采用探针杂交捕获法或多重PCR扩增子捕获法,从人体来源的肿瘤组织样本中提取RNA并进行逆转录,对生成的cDNA进行捕获建库后测序,对文库测序数据进行RNA生信分析,获得样本的融合基因、外显子跳跃等基因变异的分析结果。检测中需考虑的因素:

- 1) RNA因其生化结构特点和核糖核酸酶(RNase)的广泛存在易发生降解,在对RNA进行实验操作时,宜对实验环境和耗材进行RNase污染控制,规范RNA的存储、运输条件和操作流程。
- 2) 不同类型样本提取得到的RNA在完整度上存在差异,肿瘤福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)样本是临床研究和分子病理学中重要的生物材料,但由于福尔马林固定和样本保存过程的影响,其RNA容易降解,表现为RNA片段化严重,难以获得完整的28S/18S rRNA条带。在RNA捕获测序中宜考虑片段降解程度对检测的影响,设置质控要求。不论高通量测序或单分子基因测序,均宜评估肿瘤FFPE样本所提取的RNA片段长度是否满足检测要求。
- 3) 采用探针杂交捕获法时需进行RNA文库构建,完整度高的RNA样本在高通量测序检测时宜需进行RNA片段化处理;降解程度高的FFPE样本进行高通量测序或单分子基因测序时,宜评估是否需要片段化步骤或优化适宜的片段化反应体系。
- 4) 提取得到的总RNA中核糖体RNA(rRNA)占比较高,宜结合不同的检测方法学、样本类型差异等综合考虑,评估是否需要在实验中去掉rRNA或对mRNA进行富集,以提高测序数据中有效reads比例。
- 5) 在RNA逆转录过程中,反转引物的选择直接影响cDNA的覆盖度、特异性,从而影响检测效果。常用反转引物有随机六聚体(N6)、寡聚脱氧胸苷酸(Oligo(dT))、基因特异性引物(GSP)等,宜结合不同的检测方法学、样本类型、测序读长差异等综合考虑,选定适宜的反转引物。单分子基因测序时逆转录的过程中尽量采用保留完整的RNA的逆转录方法,以获得更长的片段进行检测。
- 6) RNA捕获探针设计的考虑:与DNA捕获探针设计不同, RNA捕获探针对于内含子区域的覆盖要求较低,侧重于外显子区域的捕获。RNA层面的捕获相较于DNA层面对于融合基因或外显子跳跃检测更具优势,在探针设计时宜针对发生融合的两个基因或发生跳跃的两个外显子的剪接位点区域专门设计探针进行覆盖,以保障已知热点变异的有效检出。如需进一步强化捕获效果,宜考虑增加含有剪接位点上下游附近内含子区域的探针,或增加跨断点区域的探针覆盖度或条数,以提升对所关注热点或其前体的检出性能。
- 7) RNA多重PCR扩增子富集目标区域的考虑因素:根据高通量测序或单分子基因测序、预期扩增目标区域特征及长度、适用样本提取RNA质量情况等要求,优化引物长度、Tm值与GC含量,并确保引物不与无关基因或重复序列结合避免交叉反应、不同引物对之间不发生串扰或抑制。高通量测序时,宜针对融合上下游伴侣基因断点两侧外显子进行引物设计,避免内含子区域;针对FFPE提取得到的高度降解的RNA宜考虑引物设计时目标区域长度控制在100~200 bp,且优先覆盖断点两侧。单分子基因测序时,宜平衡测序读长(100 bp~Mbp级别)、断点覆盖与PCR扩增可行性及效率综合进行插入片段长度控制和引物设计,扩增长片段时宜跨外显子设计,避免内含子区域。针对非FFPE样本提取得到的高质量样本,可以提高引物设计跨度,如血液、冷冻或骨髓液样本:控制在300-800bp之间,以提高单分子基因测序的测序质量。
- 8) 单分子基因测序时如需保障测序读长,对于探针捕获文库,可对RNA捕获文库进行片段选择,如:磁珠分选或凝胶电泳片段选择系统筛选目标长度片段,但对于扩增子文库不宜进行片段选择。

6 检测环境

实验室环境和设施设置应符合GB 19489-2008中对生物安全二级实验室设计、设施、设备和管理的要求，医疗机构检测实验室还应符合《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则（2010）》的要求。

高通量测序实验室工作条件宜符合《临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识（2017版）》、《高通量测序技术临床规范化应用北京专家共识（第一版肿瘤部分）（2020版）》、GB/T 30989-2014附录B等共识和标准中的要求。

7 试剂、仪器与耗材

7.1 概述

检测中涉及的设备、计量溯源性、外部提供的产品和服务的要求可参考GB/T 27025-2019。除特别说明以外，本文件所用试剂均用无DNA/RNA酶污染的容器进行分装，不同批号产品的组分之间不可以混用或互换。

7.2 试剂

7.2.1 核酸提取试剂

可采用经相关药品监督管理部门备案的核酸提取试剂，或其他等效提取试剂盒，按照试剂盒操作说明进行提取。实验过程中用到的水应符合 GB/T 6682 的要求。

7.2.2 核酸定量试剂

可采用荧光定量仪（如 Qubit）、分光光度计（如 Nanodrop）配套的检测试剂，或其他等效定量试剂盒。按试剂或对应方法的操作说明对核酸进行定量。

7.2.3 核酸质控试剂

样本提取的 RNA 和构建的文库可采用微流控生物分析仪（如 Agilent 2100）配套的检测试剂，或其他等效方法进行片段长度的质量判断。按试剂或对应方法的操作说明进行质控。

7.2.4 RNA 捕获建库检测试剂

探针杂交捕获法主要试剂包括 RNA 打断试剂（如适用）、逆转录酶、逆转引物及反应缓冲液、二链生成反应酶和缓冲液（如适用）、rRNA 去除试剂（如适用）、末端修复酶及末端修复缓冲液、加 A 酶及加 A 缓冲液、连接酶及连接缓冲液、PCR 反应酶及反应缓冲液、接头、引物、RNA 目标区域捕获探针、杂交反应缓冲液、杂交封闭液、杂交反应洗脱液、纯化磁珠、杂交捕获磁珠、DNA 溶解液（如适用）、无核酸酶水、RNA 阴阳性质控品等。

多重 PCR 捕获法主要试剂包括逆转录酶、逆转引物及反应缓冲液、基因特异性引物池、通用和或标签引物、PCR 反应酶及反应缓冲液、纯化磁珠、DNA 溶解液、无核酸酶水、RNA 阴阳性质控品等。

如进行单分子基因测序，除上述探针杂交捕获法或多重 PCR 捕获法试剂外，还需要适配单分子基因测序平台的建库试剂，主要包括末端修复酶及末端修复缓冲液、连接酶及连接缓冲液、连接条形码及条形码测序接头（如适用）或测序接头、磁珠、短片段清洗液、长片段清洗液、洗脱缓冲液、凝胶电泳片段选择系统（如 BluePippin/PippinHT）配套的检测试剂（如适用）等。

7.2.5 测序试剂

包括体外诊断试剂制造商推荐的适配测序仪的测序及其配套试剂。

7.3 仪器与耗材

7.3.1 仪器

文库构建中使用的主要仪器包括 PCR 仪、离心机（台式或掌式离心机）、漩涡振荡器、恒温混匀仪、垂直混匀仪、浓缩仪（如适用）、磁力架、凝胶电泳片段选择系统（如 BluePippin/PippinHT）（如适用）等。

核酸和文库定量及质控使用的主要仪器包括荧光定量仪（如 Qubit）、分光光度仪（如 Nanodrop）、微流控生物分析仪（如 Agilent 2100）等。

测序使用的主要仪器包括体外诊断试剂制造商推荐适配的测序仪，及配套仪器（如适用）。

7.3.2 耗材

主要耗材包括荧光定量反应管、移液器配套吸头（10 μ L、100 μ L、1000 μ L）、离心管（1.5mL、2mL、0.2mL 及八联管）、测序仪芯片等。

8 样本采集、运输及保存

8.1 通则

样本采集应符合伦理要求，样本供方对样本捐赠的目的和研究用途等需明了和认可，供方自愿同意参与，并与检测机构共同签署知情同意书。伦理要求应符合 GB/T 38736-2020。肿瘤样本的取样宜遵循临床规范要求进行。采集完成的样本标记好样本名称（或编号），将样本条码竖直粘贴到采样管上，并且在采样管上用记号笔标记清晰患者姓名、采样时间等信息。将另一份相同标签粘贴在采集表中（可手工录入患者完整信息，并再次校对），通过扫码枪扫描样本管或信息表上的条形码，在电脑上准确录入患者详细信息。

8.2 样本采集及处理

8.2.1 肿瘤组织样本

肿瘤组织在临床实际应用场景中，又常被保存为冷冻组织样本和 FFPE 样本两种形式。需按照相应的要求对本检测技术中的样本进行采集和处理。医疗机构参考《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南（试行）（2015版）》、《二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识（2018版）》、SZDB/Z 244—2017 等规范和标准的要求对冷冻组织和 FFPE 样本进行采集和处理。FFPE 样本检测需为未经染色的白片。应满足检测项目经性能确认获得的最低肿瘤细胞含量要求，建议肿瘤细胞含量应不低于 20%。

8.2.2 骨髓穿刺样本

医疗机构参考《血液肿瘤分子诊断临床应用专家共识（2022版）》和《血液肿瘤基因检测技术指南（2021版）》对骨髓穿刺样本进行采集和处理。需在治疗前进行样本采集避免治疗影响检测结果。骨髓穿刺液采集量不少于 2 mL（含 $\geq 1 \times 10^6$ 个有核细胞），宜使用经过验证的样本采集管，严格按照样本采集管说明书进行；避免使用含肝素的保存管，肝素的残留会抑制逆转录酶活性和扩增酶活性。采样后充分混匀试管内的物质，尽快转移至 2℃~8℃ 冷藏短期储存，-20℃ $\pm$ 5℃ 或 -70℃ 以下冷冻长期保存。

8.2.3 外周血

医疗机构参考《血液肿瘤分子诊断临床应用专家共识（2022版）》和《血液肿瘤基因检测技术指南（2021版）》对外周血样本进行采集和处理。需在治疗前进行样本采集避免治疗影响检测结果。外周血

采集量不少于2.5mL，宜使用经验证的骨髓血液RNA样本采集管严格按照样本采集管说明书进行；避免肝素抑制逆转录酶活性。

8.3 样本运输

8.3.1 冷冻组织样本

冷冻组织样本运输时应使用足量的干冰或干冰袋制冷，运输过程中避免挤压、跌落，以免容器破裂，样本污染。运输过程中控制温度在-70℃以下。建议运输时间不超过5天。

8.3.2 保存液保存的组织样本

采用RNA保存液（如RNAlater或RNAsecure等）保存的样本，若运输时间不超过7天，可在室温条件下运输；若在高温环境下运输或对样本稳定性有特殊要求，可采用冰袋或在2~8℃条件下运输；若运输时间超过7天或极端天气情况，可采用-70℃以下或干冰运输，尽量避免RNA保存液冻结；极端条件下可考虑采用液氮运输。

8.3.3 FFPE 样本

FFPE样本可在室温条件下运输，运输时应使用隔热包装，减少温度波动的影响，防止温度过高，运输过程中应避免挤压、跌落，以免容器破裂，样本污染。建议运输时间不超过15天。

8.3.4 骨髓穿刺样本

宜采用专用的骨髓RNA管采集骨髓穿刺样本，按照说明书的要求进行样本处理和运输，根据选择的采集管是否含有专用RNA稳定剂或其他具体要求，选择在室温或2~8℃或干冰条件下运输。运输过程中应避免挤压、跌落，以免容器破裂，样本污染。样本接收时储存容器应完好，无破裂、无开盖等情况，样本应无泄漏或外溢等情况。

8.3.5 外周血

宜采用经过验证的或RNA专用的采血管，按照验证后的条件或采血管说明书进行样本处理和运输，根据选择的采集管是否含有专用RNA稳定剂或其他具体要求，选择在室温或2~8℃或干冰条件下运输。运输过程中应避免挤压、跌落，以确保容器完好无破裂、无泄漏或样本外溢，且无溶血或凝结现象

8.4 样本保存

8.4.1 冷冻组织样本

冷冻组织样本在-70℃以下保存，长期保存宜储存在-132℃以下，如液氮中。建议使用保存24个月以内的样本进行检测。

8.4.2 保存液组织样本

RNA保存液处理的样本室温保存不超过一周，2~8℃保存不超过一个月，长期保存宜储存在-20℃（±5℃）或-70℃以下。其中，转入-20℃（±5℃）保存前将RNA保存液中的样本放置于2~8℃过夜，然后转移到-20℃（±5℃）环境中；转入-70℃以下保存前将RNA保存液中的样本放置于2~8℃过夜，然后将样本取出，尽量除净RNA保存液，然后放置于-70℃以下环境中。

8.4.3 FFPE 样本

FFPE样本置于室温条件（18℃~25℃）下保存，长期保存置于4℃~24℃条件下。建议使用保存12个月以内的样本进行检测。

8.4.4 骨髓穿刺样本

专业的骨髓RNA保存管采集的骨髓穿刺样本宜按照采样管说明书的要求进行短期保存；长期宜在-70℃以下保存，需分装以避免反复冻融（冷冻后宜只冻融1次）。

8.4.5 外周血

血液RNA采集管采集的样本宜按照专业采样管说明书的要求或验证后的条件进行短期保存，长期宜在-20℃（±5℃）或-70℃以下保存，需分装以避免反复冻融（冷冻后宜只冻融1次）。

9 检验流程

9.1 样本总 RNA 提取

在样本制备区进行，参照对应样本类型的核酸提取试剂盒说明书取相应量的待检样本进行RNA提取，或DNA及RNA共提取。所提取的RNA浓度、总量、纯度及完整度要求宜满足建库试剂要求。使用分光光度计判断提取的RNA的纯度，其OD260/OD280宜在1.8~2.3范围内、OD260/OD230宜在2.0~2.5范围内（如适用）。RNA完整度（或降解程度）宜使用DV200或RIN值进行评估。针对FFPE样本，DV200宜不低于30%；针对非FFPE类高度降解的样本，DV200不宜低于40%，RIN值宜不低于7（不满足宜评估检测风险）。

9.2 RNA 捕获文库构建

在文库制备区进行，参照RNA捕获建库检测试剂（探针杂交捕获法或多重PCR捕获法）的说明书进行目标RNA捕获，需满足具体检测试剂的文库质控要求。

针对高通量测序，上述文库需满足后续适配机型的上机要求。

针对单分子基因测序，参考单分子基因测序建库试剂起始量要求，使用上述RNA捕获建库检测试剂得到的RNA捕获产物（探针杂交捕获后的Post-PCR文库或多重PCR捕获后的扩增文库），参照单分子基因测序建库试剂的说明书进行后续上机文库构建。需满足具体单分子基因测序建库试剂的文库质控要求，以及满足后续适配机型的上机要求。

9.3 上机测序

按照测序试剂盒的要求进行高通量测序或单分子基因测序反应。上步文库经上机前处理后，按上机要求开展测序反应。

高通量测序的上机测序读长宜不小于100bp。

单分子基因测序的测序读长宜符合测序文库的片段长度范围。

9.4 信息分析

- 9) 将测序得到的原始数据进行质控及标签序列（Barcode或Index）拆分；
- 10) 去除低质量值、接头污染、未知N碱基含量过高的序列，过滤后的序列（Clean reads）比对到参考基因组上，得到基因组比对率；数据中可能包含建库时引入的外源序列，分析时需过滤去除。
- 11) 分析目标区域富集效率、基因组比对率、基因比对率、基因覆盖度、均一性、插入片段长度等质控指标（如适用）；
- 12) 基于序列比对的方法分析Clean reads，对应PE两端reads关系，寻找不一致序列和覆盖断裂点的序列，从而识别出融合事件，得到RNA层面的融合信息、外显子跳跃等信息，计算FFPM（如

适用)。单分子基因测序通过覆盖基因断裂点来判断融合事件,无需进行“对应PE两端reads关系”步骤。

注: 针对基于RNA捕获测序的肿瘤基因变异分析, 不论使用生信分析流程或集成后的分析软件进行, 均应包含以上分析内容。

10 结果判定

10.1 结果分析条件设定

10.1.1 基本要求

根据数据质控情况, 以及阴性和阳性对照品的检测情况来判断整体实验与信息分析结果是否达到预期要求。对通过质控的样本进行结果输出。

10.1.2 阳性判断值(cutoff)设定

通过信息分析得到支持融合基因或外显子跳跃事件的跨断点reads和或双端reads (仅高通量测序中双端测序时考虑双端reads) 检出情况, 以及FFPM值(如适用), 综合上述指标并与对比方法或标准结果进行对比, 通过受试者工作特征曲线(ROC)设定阳性判断值并进行验证, 如采用其他cutoff设定方法需进行充分的说明和验证。

注1: 双端测序(pair end sequencing), 也叫双向测序。将DNA样本处理成片段后, 把引物序列连接到片段的两端, 然后在引物序列末端加上接头。对加了引物序列和接头的两端都进行测序。两端序列成对存在, 中间的距离叫插入长度(insert length)。可分为PE50、PE90、PE100等, 分别表示每一端的读长均为50bp、90bp、100bp(参考T/SZGIA 2—2018, 3.9.2)。

注2: 热点和非热点宜设置不同的过滤规则和阈值条件, 均需经过充分验证。

阳性判断值需经检测项目试剂及其配套的数据分析流程(或软件)共同验证得到, 并使用临床样本进行确认。在后续应用实践中, 需始终确保经验证的试剂和分析流程(或软件)的配套使用, 否则需重新进行阳性判断值的验证。

10.2 质控要求

10.2.1~10.2.4的质控要求应在同一次检测中同时满足, 否则本次检测为无效, 应重新进行检测。满足质控要求, 则进行分析融合基因、外显子跳跃等变异情况。

10.2.1 数据质控

预处理后得到的BAM文件, 需要进行质控。其主要指标如下:

- 1) 样本测序数据质量值应满足高通量测序 $Q30(\%) \geq 75\%$; 单分子基因测序 $Q7(\%) \geq 90\%$ 。
- 2) 基因组比对率 $\geq 85\%$ (如适用)。
注: 比对率(mapping ratio), 指样本测序结果中, 比对上参考基因组的reads数占该样本总测序reads数的比例。
- 3) 有效数据量(clean reads)达到检测技术开发要求的指标。
- 4) 目标区域捕获效率 $\geq 80\%$ (如适用)。
- 5) 基因覆盖度(1X) $\geq 95\%$ (如适用)。

若不满足以上数据质控要求, 应考虑重新建库或重新测序。

10.2.2 阴性质控品

满足数据质控要求, 阴性质控品检测结果应为阴性, 否则检测结果为无效, 应重新检测。

10.2.3 阳性质控品

满足数据质控要求，阳性质控品检测结果应为阳性，否则检测结果为无效，应重新检测。

10.2.4 待测样本

满足数据质控要求，分析融合基因、外显子跳跃等变异情况。

10.3 结果描述及判定

根据设定的阳性判断值进行检测项目的结果判定。

10.3.1 阴性判定

对于通过质控的待测样本，若分析结果 $< \text{cutoff}$ ，则判定为阴性。

10.3.2 阳性判定

对于通过质控的待测样本，若分析结果 $\geq \text{cutoff}$ ，则判定为阳性。

10.4 结果解读与报告

阴性检测结果在报告中体现为项目报告范围内相应基因检测“阴性”或“未检出变异”。

阳性检测结果宜参考相关临床解读指南和/或标准，如：《癌症序列变异解读指南（2015版）》、《肿瘤二代测序临床报告解读共识（2022版）》等，进行肿瘤体细胞变异解读，将变异分为I类变异(具有强临床意义)、II类变异(具有潜在临床意义)、III类变异(临床意义不明变异)和IV类变异(良性和可能良性变异)。其中I-III类变异宜在报告中报出。

若检测项目仅为RNA捕获测序，检测结果即为最终结果。若检测项目为DNA和RNA共检，且DNA检测也提供RNA检测项目中相同基因的融合和外显子跳跃等变异信息，宜考虑并设定最终结果报出规则。

注：DNA和RNA共检时融合基因报出规则示例：DNA和RNA检测变异结果一致时即为最终结果，若两者变异检测结果不一致，可考虑分别判断DNA层面或RNA层面分别检测的融合基因是否为公共数据库中已知的融合基因，若是则判断为阳性融合结果，若判断结果都为非已知融合基因，则以RNA层面检测出的融合基因为阳性融合结果；并需在报告中分别注明DNA和RNA融合检测的情况和判定依据，以供临床医生综合考虑。

参 考 文 献

- [1] 基于RNA-based NGS检测非小细胞肺癌融合基因临床实践中国专家共识（2023年版）
 - [2] 医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则（2010版）
 - [3] 临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识（2017版）
 - [4] 高通量测序技术临床规范化应用北京专家共识（第一版肿瘤部分）（2020版）
 - [5] SZDB/Z 244—2017 生物样本库中人类组织样本收集、处理、运输和储存规范
 - [6] 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南（试行）（2015版）
 - [7] 二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识（2018版）
 - [8] 血液肿瘤分子诊断临床应用专家共识（2022版）
 - [9] 血液肿瘤基因检测技术指南（2021版）
 - [10] Li, M. M., Datto, M., Duncavage, E. J., et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: A joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2015,17(2):251-264.
 - [11] 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会, 中国临床肿瘤学会(CSCO)肿瘤标志物专家委员会.肿瘤二代测序临床报告解读共识(2022版)[J]. 中华病理学杂志, 2022, 51(6):505-513.
-