

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

YY

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

引言 错误!未定义书签。

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 2

5 检测原理 2

6 检测环境 2

7 试剂、仪器与耗材 2

8 样本采集、运输及保存 3

9 检验流程 4

10 结果判定 5

11 测方法的局限性 错误!未定义书签。

参考文献 7

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组织样本，通过对其提取得到的RNA进行目标区域捕获后进行高通量基因测序，检测肿瘤基因变异的方法。适用于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。

本文件不适用于非肿瘤患者样本，或血浆循环肿瘤RNA样本的检测；不适用于一代和三代测序的检测方法。

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 35537—2017 高通量基因测序结果评价要求

GB/T 38736—2020 人类生物样本保藏伦理要求

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

医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则（2010版）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

RNA 捕获 RNA capture

将样本提取得到的RNA反转成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，从而针对性捕获富集待测RNA的目标区域片段。

3.2

测序 sequencing

测定核苷酸序列的过程。

3.3

融合基因 Fusion Gene

通过染色体反转(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。发生基因融合的两个基因被称为融合基因。

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。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

RNA：核糖核酸（ribonucleic acid）

cDNA：互补DNA（complementary DNA）

5 检测原理

基于二代高通量测序法，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提取得到RNA并进行反转录，对得到并生成二链后的cDNA进行捕获建库，文库测序数据通过RNA生信分析流程，得到融合基因、外显子跳跃等基因变异分析结果。

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对FFPE样本、冷冻组织样本进行提取。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、反转录酶及反应缓冲液、二链生成反应酶和缓冲液、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、无核酸酶水、RNA 阴阳性质控品等。在 DNA 和 RNA 共检产品中，因 DNA 中含有内含子区域，而 RNA 中该区域已被剪切，若 DNA 与 RNA 捕获同时用于融合基因检测，RNA 目标区域捕获探针宜另外设计，不宜直接使用 DNA 检测设计的探针；若使用同一份捕获探针，则需在设计时考虑并在最终探针池中包含适用于 RNA 捕获的探针。

多重 PCR 捕获法主要试剂包括 RNA 打断试剂、反转录酶及反应缓冲液、二链生成反应酶和缓冲液、rRNA 去除试剂（如适用）、基因特异性引物池、通用引物、PCR 反应液、纯化磁珠、DNA 溶解液、无核酸酶水、RNA 阴阳性质控品等。

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、磁力架等。

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。

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 及八连管）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（癌）组织的取样建议参考《肿瘤组织标本库常用实验技术手册》等临床规范要求进行。样本的采集、保存及运输建议参考 GB/T 37864—2019 等的要求。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

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%。

8.3 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，运输过程中控制温度在-70℃以下。建议运输时间不超过5天。

8.3.2 FFPE 样本

FFPE样本可在室温运输，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。建议运输时间不超过15天。

8.4 样本保存

8.4.1 冷冻组织样本

冷冻组织样本长期保存应储存在-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 FFPE 样本

FFPE样本置于4℃~24℃条件下保存。建议使用保存36个月以内（12个月之内更好）的样本进行检测。

9 检验流程

9.1 样本总 RNA 提取

在样本制备区进行，参照核酸提取试剂盒的说明书取相应量的待检样本进行RNA提取，或DNA及RNA共提取。建议所提取的基因组RNA浓度 $\geq 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，总量大于400ng。

9.2 文库构建

在文库制备区进行，参照RNA捕获建库检测试剂（RNA单独检测或DNA/RNA共检）的说明书进行文库构建。需满足具体检测试剂的文库质控要求，以及满足后续上机要求。

9.3 上机测序

按照测序试剂盒的要求进行高通量基因测序反应。上步文库经上机前处理后加载至测序芯片上，按上机要求开展测序反应。上机测序的策略为双端测序，测序读长不小于100bp（PE100）。

注：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）。

9.4 信息分析

将测序得到的原始数据进行质控及标签序列（barcode）拆分后，与人类参考基因组进行序列比对。人类参考基因组建议采用NCBI来源的GRCh37.p13、UCSC来源的hg19或以上版本。基于比对结果，分别分析测序数据，基于序列比对的方法，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。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检测也提供融合和外显子跳跃等信息，此时DNA和RNA融合检测结果一致时即为最终结果，若两者结果不一致，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。

10 结果判定

10.1 结果分析条件设定

10.1.1 基本要求

根据质控标准是否达到，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

通过信息分析得到跨断点reads(SC)及双端reads(PE)检出情况，以及FFPM值(如适用)。针对热点和非热点宜设置不同的过滤规则和阈值条件，但均需经过充分验证。

注1: FFPM(fusion fragments per million total reads)，指每百万条reads中融合片段的个数。

注2: 不同检测项目因检测限(LoD)和生信分析方法逻辑不同，可自行设定适宜的cutoff。如：热点融合 $SC \geq 1$ ；非热点融合 $SC+PE \geq 2$ ， $FFPM \geq 0.03$ 。

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。

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：

a) 测序数据应满足样本测序质量值 Q30(%) $\geq 80\%$ 。

b) 基因组比对率 $\geq 95\%$ 。

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。

c) Saturation 率 $\geq 90\%$ 。

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，每次检测结果应满足阴性质控品检测结果为阴性，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，每次检测结果应满足阳性质控品检测结果为阳性，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（仅 RNA 捕获测序检测）

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（仅 RNA 捕获测序检测）

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。

10.3.3 结果判定（DNA 和 RNA 共同捕获测序检测）

若检测项目为DNA和RNA共检，且DNA检测也提供融合和外显子跳跃等信息，首先通过DNA检测和RNA检测的阳性判断值分别得到DNA和RNA层面检测结果。此时DNA和RNA融合检测结果一致时即为最终结果。若两者结果不一致，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）
-