



团 体 标 准

T/GRHA 0002—2026

# 基于循环肿瘤 DNA 样本的非小细胞肺癌相 关基因变异高通量测序检测方法

The high-throughput sequencing method for detecting non-small cell lung cancer-associated genetic variants based on circulating tumor DNA samples

2026 - 02 - 06 发布

2026 - 02 - 07 实施

## 目 次

前言	III
引言	IV
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 技术应用	3
5.1 应用场景	3
5.2 检测范围	3
5.3 标本选择	3
6 实验原理	4
7 实验室分区、仪器设备、试剂及人员资质	4
7.1 实验室分区	4
7.2 仪器设备	4
7.3 试剂	4
7.4 人员资质	4
8 方案选择	5
8.1 使用商品化试剂盒	5
8.2 使用实验室自建程序	5
9 标本采集、保存与运输	5
9.1 血液标本	5
9.2 脑脊液、浆膜腔积液标本	5
9.3 标本信息	5
10 检测步骤	5
10.1 游离核酸提取	5
10.2 文库构建	5
10.3 高通量测序	6
10.4 数据处理和分析	6
11 性能确认或性能验证	8
11.1 方案选择	8
11.2 性能验证	8
11.3 性能确认时机	8
11.4 测序平台的性能确认	8
11.5 生物信息分析平台的性能确认	8
11.6 分析性能确认	9
12 质量控制	9
12.1 室间质量评价	9
12.2 室内质量控制	9
附录A（规范性） 实验室分区的仪器设备和试剂要求	11
附录B（规范性） 标本保存与运输要求	12
附录C（资料性） 申请单模板示例	13
附录D（资料性） 文库构建方法及技术特点	14

参考文献..... 15

全国团体标准信息平台

## 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省呼吸与健康学会提出并归口。

本文件起草单位：广州金域医学检验中心有限公司、广州呼吸健康研究院、中山大学附属第一医院、广州金域医学检验集团股份有限公司、中山大学孙逸仙纪念医院、山西省肿瘤医院、天津医科大学、广东省第二人民医院、山东省立第三医院、四川省肿瘤医院、中南大学湘雅三医院、九江市第一人民医院、威海市立医院、威海市中心医院、乳山市人民医院、海南医科大学第二附属医院、吉林省人民医院、吉林市化工医院、北华大学附属医院、吉林大学第二医院、山西白求恩医院、广州中医药大学顺德医院、延边大学附属医院、蛟河市人民医院、艾吉泰康生物科技（北京）有限公司、山东第一医科大学附属省立医院、济南市第四人民医院、山西医科大学第二医院、山东中医药大学第二附属医院、广州医科大学、江西省肿瘤医院、南昌县人民医院、大连大学附属中山医院、锦州医科大学附属第一医院、本溪市中心医院、珠海市人民医院、济南金域医学检验实验室有限公司、日照市人民医院、滨州市人民医院、山东省第二人民医院、昆明医科大学附属曲靖医院（云南省曲靖中心医院）、红河哈尼族彝族自治州第三人民医院、滨州医学院第二临床医学院、重庆市人民医院、无锡市第九人民医院、广州市第一人民医院、锦州市中心医院、上饶市中心医院、通化市中心医院、鹰潭市人民医院、鹰潭一八四医院、合肥市第三人民医院、湖南省直中医院、南方医科大学南方医院、哈尔滨医科大学附属第四医院、台州市中心医院、青海红十字医院、重庆市中医院、宁夏回族自治区人民医院、贵溪市人民医院。

本文件主要起草人：祁德波、周承志、柯尊富、叶竹佳、相科羽、李童童、刁恺媛、李慧源、马骥、程雅婷、刘向前、莫南勋、李维、成尚涛、刘欣宜、毛蕾、段朝晖、郗彦凤、申艳娜、王蓉、程远雄、庄学伟、张艳丽、杨红辉、刘彩虹、周进、段训凰、王晨亮、宋宇、谭聪慧、孙晓腾、于勇、刘成、芦小单、吴明达、李海霞、杨鑫磊、林晓燕、常哲兴、田新瑞、高晓玲、唐文军、孙平丽、冯慧晶、乔冠英、林贞花、权海燕、陈雪岩、朴龙一、屈武斌、杨菁、宫琪、刘传杰、陈涛、曲芸芸、王志刚、王立富、陈文学、涂淑芬、李小松、赵志龙、薛洪省、李昆、王学哲、张亚南、孙涛平、赵一诺、刘明涛、阚玉玲、田亮、李宏伟、张淑香、朱顺挥、张玉强、朱明松、殷剑、吴斌、耿聆、刘丹、刘莲凤、陈燕枝、王志强、吴兴业、程红平、周美秀、陶宗婷、王晖、朱一喜、赵钢艳、刘来昱、才旭、路德娟、贾丹丹、卢洪胜、曹学全、马登云、逯金海、犟伟奇、王陈、汪涛。

## 引 言

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一，其中非小细胞肺癌（NSCLC）约占85%。随着精准医疗时代的到来，基于驱动基因变异的靶向治疗已成为NSCLC患者——尤其是晚期患者的标准治疗模式。传统的基因变异检测依赖于组织活检样本，但该方法存在诸多局限性，如侵入性强、难以重复取样、部分患者无法获取足够组织以及无法全面反映肿瘤异质性问题。近年来，基于循环肿瘤DNA（ctDNA）的液体活检技术因其无创性、可重复性和实时监测肿瘤动态变化的优势，成为NSCLC诊疗领域的重要突破。ctDNA检测能克服传统组织活检的局限性，尤其适用于无法获取组织样本或需动态监测治疗反应的患者，为临床决策提供了新的技术路径。

高通量测序（NGS）技术以其高通量、高灵敏度和可同时检测多个基因及多种变异类型的优势，成为ctDNA检测的核心技术。尤其对于丰度极低的ctDNA（在血浆游离DNA中占比通常低于1%），NGS技术能够通过深度测序有效检出低频突变，为临床提供了全面而精准的分子诊断信息。

然而，现有规范多为肿瘤组织样本NGS检测的通用性指导，或是对液体活检和ctDNA检测的原则性建议，尚未针对NSCLC这一高发疾病的特异需求，对关键环节如受检者适用范围、标本采集与处理、循环游离DNA（cfDNA）提取、文库构建、测序平台与深度要求、生物信息学分析流程、室内质量控制与外部质量评价等形成面向临床应用的成体系技术要求和质量标准。

因此，为规范基于ctDNA样本的NSCLC相关基因变异高通量测序检测全流程，保障检测质量，提升结果的准确性和一致性，推动该技术在临床的规范化应用，特制定本团体标准。本标准旨在为相关实验室提供一套科学、可行、统一的操作指南和质量评价体系，从而促进液体活检技术在我国NSCLC精准诊疗领域的健康发展，最终使广大患者受益。

# 基于循环肿瘤 DNA 样本的非小细胞肺癌 相关基因变异高通量测序检测方法

## 1 范围

本文件给出了基于高通量测序技术对非小细胞肺癌（NSCLC）患者液体活检样本中的循环肿瘤DNA（ctDNA）进行基因变异检测的技术应用、样本采集、保存与运输、检测步骤、性能确认及质量控制等内容。

本文件适用于具备资质开展实验室自建检测的医疗机构、第三方检测机构和技术研发企业等单位，进行基于NSCLC ctDNA样本相关基因变异高通量测序的技术研发和临床检测活动。

## 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 30989—2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 38576 人类血液样本采集与处理

GB/T 35890 高通量测序数据序列格式规范

WS/T 662—2020 临床体液检验技术要求

T/GRHA 0001—2024 基于FFPE样本的非小细胞肺癌相关基因突变高通量测序检测方法

CNAS-CLO2 医学实验室质量和能力认可准则

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**循环游离 DNA** circulating free DNA

来源于血液及其他体液中的肿瘤细胞或正常细胞的游离DNA片段。

### 3.2

**循环肿瘤 DNA** circulating tumor DNA

肿瘤细胞主动分泌或在肿瘤细胞凋亡或坏死过程中释放入循环系统中且携带肿瘤特异性基因变异信息的DNA片段。

### 3.3

**高通量测序** high-throughput sequencing

可一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术。

注：又称二代测序（Next-generation sequencing, NGS）。

### 3.4

**全外显子组测序** whole exome sequencing

针对人类基因组全部蛋白质编码区域（外显子组）的基因集进行高通量测序。

### 3.5

**非小细胞肺癌** non-small cell lung cancer

除小细胞肺癌以外，所有来源于肺上皮的各种类型癌症的集合体。

注1：NSCLC的发生率占肺癌总发生率的80%~85%，常见类型有鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌等。如果没有特别说明，肺癌指代非小细胞肺癌。

[来源：T/GRHA 0001—2024, 3.2]

### 3.6

**分子残留病灶 molecular residual disease**

实体肿瘤经过治疗后，传统影像学（包括PET/CT）或其他实验室方法不能发现、但通过液体活检发现的肿瘤来源。

## 3.7

**文库 library**

通过生物来源的、人工合成的或克隆技术等获得的一个重建分子群。

[来源：GB/T 30989—2014，3.5]

## 3.8

**分子标签 unique molecular identifier**

通常由随机或者固定的，长度一般为3—8个碱基的短核苷酸序列组成。

注：UMI序列具有高度随机性和多样性，可连接到每一个原始核酸分子上，用来区分不同来源的DNA模板。又称唯一分子标识符。

## 3.9

**测序深度 depth of sequencing**

待测样本中某个指定的核苷酸被测序仪检测的次数。

[来源：GB/T 30989—2014，3.31]

## 3.10

**变异 variation**

样本中与参考序列不一致的核苷酸碱基序列，包括单核苷酸变异、插入/缺失变异、拷贝数变异、融合基因变异等。

## 3.11

**单核苷酸变异 single nucleotide variation**

在基因组DNA上某一位置的单个核苷酸碱基发生改变。

## 3.12

**插入/缺失变异 insertion-deletion variation**

包括插入变异、缺失变异和插入缺失变异。

注1：插入变异指在基因组DNA的某个位置上发生的小片段序列的插入，长度在50 bp以下；

注2：缺失变异指在基因组DNA的某个位置上发生的小片段序列的缺失，片段长度在50 bp以下；

注3：插入缺失变异指在基因组DNA的某个位置上发生缺失的同时又有新的核苷酸碱基插入，发生改变的片段长度在50 bp以下。

## 3.13

**基因融合 gene fusion**

两个不同基因的部分或全部序列相连形成的新的混合基因，其编码产生的融合蛋白能够介导肿瘤的发生发展。

**4 缩略语**

下列缩略语适用于本文件。

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid）

cfDNA：循环游离DNA（Circulating Free DNA）

ctDNA：循环肿瘤DNA（Circulating Tumor DNA）

gDNA：基因组DNA（Genomic DNA）

EDTA：乙二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic Acid）

Indel：插入或缺失型变异（Insertion-Deletion Variation）

MRD：分子残留病灶（Molecular Residual Disease）

NGS：高通量测序/二代测序（High-Throughput Sequencing/Next-Generation Sequencing）

NSCLC：非小细胞肺癌（Non-Small Cell Lung Cancer）

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

SNV：单核苷酸变异（Single Nucleotide Variation）

UMI：分子标签（Unique Molecular Identifier）

WES: 全外显子组测序 (Whole Exome Sequencing)

## 5 技术应用

### 5.1 应用场景

基于ctDNA的高通量测序 (NGS) 技术检测, 贯穿了NSCLC患者从诊断到治疗结束的全周期管理, 主要包括:

- a) 伴随诊断: 靶向治疗指导和耐药检测;
- b) 疗效评估: 微小残留病灶 (MRD) 监测和复发预警。

### 5.2 检测范围

宜纳入检测的NSCLC相关基因及基因区域见表1:

表1 宜纳入 NSCLC 进行 ctDNA NGS 检测的相关基因及目标区域

分类	依据与范围	示例
核心基因	1. 药物适应征相关: 涵盖NMPA/FDA批准的靶向药物靶点、国内外指南 (CSCO、ASCO、NCCN、ESMO等) 明确指定的基因变异; 2. 诊断与预后价值: 需纳入与NSCLC发生、耐药或预后显著相关的基因。	核心基因: EGFR、ALK、ROS1、RET、BRAF、KRAS、ERBB2、MET、NTRK1/2/3、NRG1
变异类型	应覆盖以下临床治疗意义明确的变异类型: SNV/Indel、基因扩增、融合变异、耐药位点变异。	1. SNV/Indel: EGFR L858R、EGFR Ex19 del、EGFR T790M、EGFR Ex20 ins、EGFR S768I/L861Q/G719X/C797S、KRAS G12C、BRAF V600、ERBB2 Ex20 ins、MET Ex14 Skipping; 2. 基因扩增: ERBB2 Amplification、MET Amplification; 3. 融合变异: ALK、ROS1、RET、NTRK1、NTRK2、NTRK3、NRG1; 4. 耐药位点变异: ALK G1202R/L1196M、ROS1 G2032R/L2086F、NTRK1 G595R、NTRK3 F617L/G623R/G696A。
扩展内容	1. 临床试验相关靶点: 处于临床 I-III 期研究的药物靶点; 2. 跨适应征靶点: 其他肿瘤获批或指南推荐的靶点; 3. 预后与耐药标志物: 辅助诊断或预测疗效/耐药的生物标志物。	1. TP53、PIK3CA、KRAS (第2、3号外显子热点突变) 等 NSCLC 癌症通路相关基因; 2. 免疫治疗疗效预测相关基因; 3. 靶向药物耐药相关基因等。
<p>注1: NMPA (中国国家药品监督管理局); FDA (美国食品药品监督管理局); CSCO (中国临床肿瘤学会); ASCO (美国临床肿瘤学会); NCCN (美国国立综合癌症网络); ESMO (欧洲肿瘤内科学会)。</p> <p>注2: MRD (群体定制策略): 多基因检测组合 (panel) 应覆盖上述核心基因。</p> <p>注3: MRD (个性化定制策略): 初诊检测所采用的全外显子组测序 (WES) 及多基因panel应覆盖上述核心基因; 并根据初诊检测结果, 建议选取8~50个突变位点进行后续监测。</p>		

### 5.3 标本选择

#### 5.3.1 基本要求

应根据患者病情、影像学表现、转移部位、操作风险及临床需求, 选择适宜的标本类型进行检测, 并在报告中注明标本具体来源。

#### 5.3.2 浆膜腔积液标本

当NSCLC患者伴有恶性胸腔积液、腹腔积液或心包积液时, 宜采集10 mL~20 mL体腔积液标本送检。

#### 5.3.3 脑脊液标本

当NSCLC患者临床高度怀疑或已确诊为脑膜转移时, 宜采集 $\geq 5$  mL脑脊液标本送检。

### 5.3.4 血液标本

血液标本采集要求如下：

- a) 外周血血浆样本，采样体积量根据检测用途而定：
  - 1) 伴随诊断检测：外周血单次采血量体积宜为10 mL~20 mL，最低采血量建议不低于8 mL~10 mL；
  - 2) MRD检测：外周血采集量体积宜 $\geq$ 20 mL；
- b) 配对全血标本：用以筛除源自胚系的突变和克隆性造血突变的配对全血标本的建议采集体积为2~3 mL。

### 5.3.5 采样耗材

采样耗材要求如下：

- a) 浆膜腔积液和脑脊液标本采集应使用无菌、无DNA酶的专用采集管。宜采用含有循环游离DNA（cfDNA）保护剂的专用容器；
- b) 用于ctDNA检测的血液标本采集应优先使用含有cfDNA保护剂及防细胞裂解保护剂的专用常温采血管；无专用采血管，可使用含乙二胺四乙酸（EDTA）的抗凝真空采血管；
- c) 用于gDNA检测的血液标本采集应使用EDTA的抗凝真空采血管。

## 6 实验原理

本检测方法采用高通量测序技术，对NSCLC患者液体活检样本中的基因变异进行检测和分析。其实验流程包括：标本采集与预处理、cfDNA提取与质控、文库构建、目标区域捕获、高通量测序及生物信息学分析。

## 7 实验室分区、仪器设备、试剂及人员资质

### 7.1 实验室分区

NGS技术具有灵敏度高的特性，实验室运行环境应采取严格预防措施避免交叉污染，最大限度降低污染导致假阳性结果的风险。可根据不同工作内容划分独立区域，设置明显标识，各区器材（如移液器和吸头）不可混用，工作流程和空气流向按照单一方向进行设计。基因扩增检验实验室各工作区域的设置、进入方向及气流控制等要求见《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194号）。游离核酸在体液中稳定性较差，易受核酸酶等影响而降解，且含量通常较低。实验操作过程应与其他类型核酸的实验空间、仪器设备及耗材隔离开。

实验室应设置以下区域：

- a) 试剂准备区；
- b) 样本制备区；
- c) 文库构建I区（用于文库制备中PCR扩增步骤前的操作）；
- d) 文库构建II区（用于文库制备中PCR扩增步骤，探针杂交，洗脱等操作）；
- e) 质检区；
- f) 测序分析区。

注：采用自动建库仪建库时，不必分文库构建I区和文库构建II区。

### 7.2 仪器设备

仪器设备应符合《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194号）要求，宜涵盖内容见附录A。

### 7.3 试剂

试剂宜涵盖内容见附录A。

### 7.4 人员资质

人员资质要求如下：

- a) 实验应由具备分子生物学检验专业技能的人员进行操作，需获得国家要求的相应资质，NGS 实验室的技术人员需持有 PCR 上岗证；
- b) 生物信息分析应配备生物信息研发及管理人员，负责分析流程的运行、维护和更新；
- c) 结果审核应由具备临床分子病理学、高通量测序相关背景知识的专业技术人员进行；
- d) 实验相关人员须通过岗位相关的培训和考核，以确保其具备上岗资格，并定期接受能力评估，以维持和提升专业技能水平。

## 8 方案选择

### 8.1 使用商品化试剂盒

使用商品化试剂盒时，应遵循相关检测标准及制造商的使用说明。

### 8.2 使用实验室自建程序

根据是否使用商品化试剂盒的自建程序分为以下情况：

- a) 如果在商品化试剂盒的基础上开发新的方法具有新的用途，经确认符合用户自定义的用途，应制定说明并遵守；
- b) 如果实验使用不同于商品化试剂盒的自建程序，则应确认它符合目的，应编写说明并遵守。使用不同制造商的产品可能影响结果，产品可能不兼容。只有在组件经过配套测试并经过确认检测性能要求时，它们才宜应用于诊断测试。

## 9 标本采集、保存与运输

### 9.1 血液标本

血液标本采集应符合GB/T 38576的规定。标本保存与运输详见附录B。

### 9.2 脑脊液、浆膜腔积液标本

脑脊液和浆膜腔积液标本的采集应符合WS/T 662—2020中2.1和3.1的规定。标本保存与运输要求见附录B。

### 9.3 标本信息

送检方提供的标本信息应包括但不限于受检者姓名、年龄、性别、标本类型、采样时间、送检时间、初步诊断等。送检申请单模板可参考附录C。

## 10 检测步骤

### 10.1 游离核酸提取

应选用适用于cfDNA的核酸提取试剂盒，通过手工操作或全自动核酸提取仪完成样本核酸提取。提取过程中应最大限度去除血浆中可能抑制DNA聚合反应的各类干扰物质（如血红蛋白、细胞碎片等）。

提取的cfDNA宜保存于含Tris-HCl的缓冲液中：2℃~8℃环境下可短期保存（<1个月）；-20℃条件下可保存数月至数年；-80℃条件下可长期保存。

提取后的cfDNA应进行质量评估：使用核酸定量仪测定cfDNA浓度并记录；若浓度过低，可采用实时荧光定量PCR技术定量检测。通过片段分析仪分析cfDNA的片段长度分布，评估其完整性并检测是否存在血细胞gDNA污染。

### 10.2 文库构建

#### 10.2.1 选择文库构建方法

文库构建可选择基于液相杂交捕获法和基于扩增子法，选择原则如下：

- a) 液相杂交捕获法文库宜用于基因数目多和较大范围基因检测（如：包含数百个基因的 panel，

WES 等)，多种变异类型检测（如：SNV、Indel、CNV 和基因重排等多种变异），以及未知基因变异检测（如：未知的基因融合变异等）；

- b) 扩增子法文库宜用于已知热点突变检测、小 Panel 基因检测和个性化定制策略的 MRD；
- c) 宜根据实验需求及技术特点（如：建库流程、适用范围、可检测变异类型、样本核酸质量、操作难易程度、成本等）选择合适方法。文库构建方法及技术特点可参考附录 D；
- d) 关于文库构建起始 cfDNA 投入量要求如下：
  - 1) 伴随诊断检测，宜  $\geq 20$  ng；
  - 2) 群体策略 MRD 检测，宜  $\geq 20$  ng；
  - 3) 个体化定制策略 MRD 检测，宜  $\geq 33$  ng（推荐  $\geq 66$  ng）。

### 10.2.2 分子标签（UMI）技术

针对 ctDNA 此类低起始量且易降解样本的低频突变检测，宜采用 UMI 技术，去纠正建库过程中 PCR 扩增及测序产生的错误，从而提升低丰度变异的检测准确性。实验注意事项如下：

- a) 采用探针捕获法进行建库，宜在双端随机引入或使用长度为 3 bp~8 bp 的 UMI 序列；
- b) 采用单端锚定多重 PCR 建库，宜在 3' 端添加 6 bp~8 bp 的 UMI 序列；
- c) 同一 UMI 标签至少应对应  $\geq 3$  条测序读段（Reads），方可将其所代表的变异认定为阳性，以确保检测结果的可靠性。

### 10.2.3 文库质量控制

文库质量控制要求如下：

- a) 文库构建完成后，应实施质量控制，经质控合格后方可进行测序；
- b) 文库质控的核心指标应至少涵盖文库浓度（摩尔浓度或质量浓度）与文库片段分布评估；
- c) 宜纳入文库转化率、文库复杂度等参数作为补充评估项目；
- d) 应依据所采用的测序仪器、检测技术路线及建库方法等关键因素确定质控标准；
- e) 应遵循厂商提供的建议与标准操作流程，以确保测序数据的可靠性与准确性。

## 10.3 高通量测序

测序过程中，应选择合格的文库、适宜的高通量测序试剂和测序平台，并遵循测序仪厂商提供的标准测序流程进行测序操作。不同平台在成本、运行周期和数据准确性上存在差异，实验室可依据样本通量、目标数据量、时效性及性能指标等核心参数选择适配平台和技术配置，包括单端/双端测序模式和读长设定。

## 10.4 数据处理和分析

### 10.4.1 生物信息学分析流程选择

下机测序得到的序列数据通过预处理后，应根据不同建库方法，采用图1的生物信息学分析流程。如果使用 UMI 分子标签技术，应先采用提取双端分子标签信息、单/双链一致性分析数据处理过程，后进行变异检测、变异注释和质量控制分析。

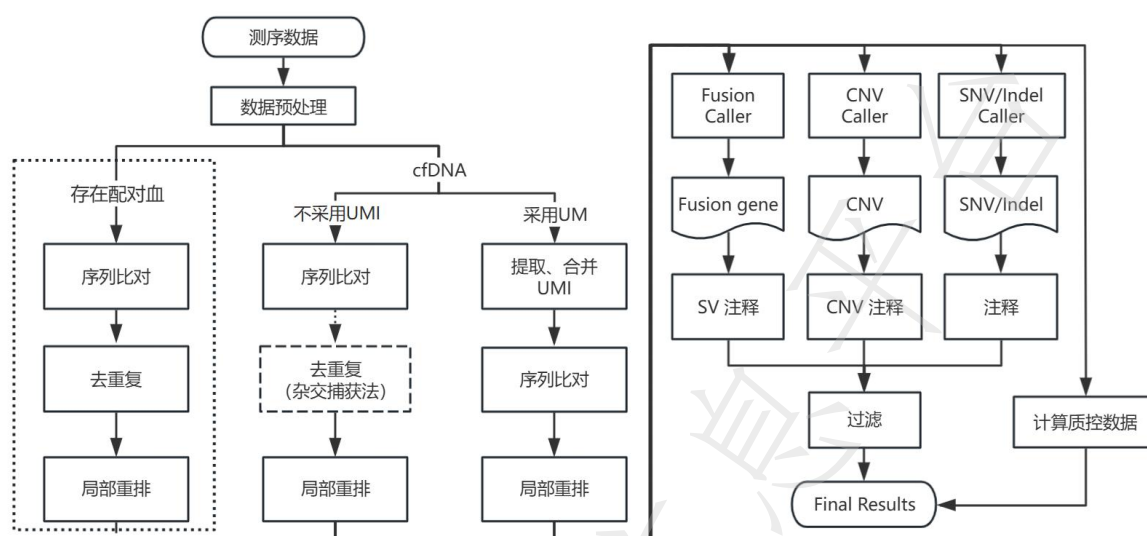


图1. 生物信息学分析流程

#### 10.4.2 测序噪音控制

在可用样本较为充足的情况下，固定panel应使用多个患者的正常样本，使用相同测序流程建立背景库和本地变异数据库。宜采用假设检验等统计方法，比较目标样本对应基因坐标的突变频率是否显著高于测序错误率过滤噪声。

#### 10.4.3 克隆性造血变异过滤

宜通过配对的白细胞样本，或通过整合检测到的克隆性造血突变构建背景库，去除克隆性造血造成的假阳性。

#### 10.4.4 测序数据质量控制参数

应依据性能确认阶段确定的检测性能参数（如Q30值、测序深度、捕获效率、重复率等）基础上，对生信分析的质量报告实施质量控制，待质量确认达标后，方可进行后续的医学分析与报告。测序下机的数据，应根据测序仪厂商为特定测序平台提供的质量控制指标进行质量控制。对于应用于NSCLC伴随诊断与疗效评估的ctDNA NGS检测，宜采用表2中的质量控制指标。

表2 用于 NSCLC 伴随诊断与疗效评估的 ctDNA NGS 检测质量控制指标

质控类别	质控指标	参考阈值	说明	
伴随诊断	ctDNA	去冗余前平均测序深度	$\geq 8000X$	去除重复序列前目标区域的平均测序深度
		去冗余后平均测序深度	$\geq 1000X$	去除重复序列后目标区域的平均测序深度，应在80%以上的目标捕获区域达到这个深度
		碱基质量值Q30 (%)	$\geq 85\%$	碱基的测序质量值超过30的比例
		序列比对率	$\geq 95\%$	能够比对到参考基因组上的序列数目及其在净序列总数中的占比
伴随诊断	配对血gDNA	去冗余后平均测序深度	$\geq 200X$	去除重复序列后目标区域的平均测序深度
		去冗余后 $\geq 50X$ 的碱基比例	$\geq 85\%$	目标区域中测序深度不低于50X的区域所占的比例
		序列比对率	$\geq 95\%$	能够比对到参考基因组上的序列数目及其在净序列总数中的占比
		碱基质量值Q30 (%)	$\geq 85\%$	碱基的测序质量值超过30的比例
疗效评估	杂交捕获法	去冗余前平均测序深度	$\geq 10万X$	去除重复序列前目标区域的平均测序深度
		去冗余后平均测序深度	$\geq 2500X$	去除重复序列后目标区域的平均测序深度
		数据重复率	$\geq 95\%$	具有相同的起始和结束位置且碱基排列完全相同的序列，即重复序列所占的比例
		捕获效率	$\geq 30\%$	比对到探针捕获区域的序列占比

质控类别	质控指标	参考阈值	说明
	碱基质量值Q30 (%)	≥85%	碱基的测序质量值 (Phred score, Qphred) 超过30的比例
扩增子法	平均测序深度	≥10万X	目标区域的理想平均测序深度
	单位点测序深度	≥5000X	监测的单个突变位点最低测序深度
注1: 表格中伴随诊断场景主要指采用探针法建库的检测; 注2: 表格中疗效评估场景主要指应用于MRD个性化定制策略的后续监测; 注3: 扩增子法建库暂无去冗余后平均测序深度、数据重复率、捕获效率等参数要求; 注4: MRD个性化定制策略扩增子法测序所建议的最低测序深度需≥8 个追踪位点; 注5: 参考阈值中“X”代表测序深度, 指基因组中每个碱基位置被测序读取的平均次数。			

#### 10.4.5 数据的储存与管理

数据的储存与管理要求如下:

- 应配备相应的基础设施, 确保数据的有效、安全存储与长期可用性;
- 应制定完善的数据管理策略, 包括数据备份和恢复方案;
- 应妥善保存原始文件、日志文件等重要数据, 并在技术人员的支持下确保数据存储系统的稳定运行;
- 下机的 fastq 或 bam 原始文件、vcf 结果文件应进行标准化存储, 并符合 GB/T35890 规定;
- 诊断实验室应保存相关数据至少 3 年。对于涉及临床诊断和治疗决策的数据, 宜根据相关法规和标准延长保存期限。

### 11 性能确认或性能验证

#### 11.1 方案选择

临床实验室可参考CNAS-CL02选择性性能验证方案或性能确认方案。

#### 11.2 性能验证

按照相关标准、制造商说明书或作业指导书规定的方法对实验方法进行性能验证。

#### 11.3 性能确认时机

应在以下情况下进行:

- 仪器在投入使用前应通过性能确认, 仪器搬迁、仪器故障维修后、仪器更新升级, 应重新进行确认;
- 核酸提取试剂、PCR 产物纯化试剂、文库构建试剂、二代测序试剂等在使用前应通过性能确认, 更换试剂品牌前, 应重新进行确认;
- 核酸提取、文库制备等方案流程确定前应通过性能确认。更换方案前, 应重新进行确认;
- 数据库建立和生信分析流程应用前应通过性能确认。数据库更新以及在原有检测基因和变异类型基础上增加新的基因和变异类型并扩大检测范围后, 应重新进行性能确认。

#### 11.4 测序平台的性能确认

依据检测项目及临床预期用途, 综合考虑测序读长和通量、测序准确率、运行时间、测序成本等选择测序平台。安装时, 由厂方工程师按照说明书所注明的仪器性能指标逐项验证, 达到厂方声称的指标并满足临床预期用途为合格。

#### 11.5 生物信息分析平台的性能确认

实验室可根据检测项目和预期用途选择合适的算法和软件, 搭建本实验室的生物信息学分析流程, 并进行必要的性能确认(最低测序数据量、准确度、灵敏度、特异性、精密度、最低检测限等), 以保证对相关基因和突变类型的检测准确性。应使用阳性和阴性参考品, 以及适量例数的临床样本进行全流程检测, 并结合计算机数据模拟变异的方式, 进行生物信息分析平台的性能确认。分析流程应明确所用人类参考基因组版本, 并在整个分析流程中使用基因组版本一致的数据库或数据文件。分析流程所包含的工具和参数应与性能确认流程保持一致, 确保分析结果的可重复性。

## 11.6 分析性能确认

### 11.6.1 准确度、灵敏度、特异性

宜同时采用以下样本进行准确度、灵敏度、特异性的性能确认：

- a) 标准参考品：使用已知突变信息（基因、变异、变异比例）的商业化标准参考品进行分析性能确认，评价检测的准确度、灵敏度和特异性；
- b) 阳性和阴性临床样本：应选取经参比方法验证的阳性和阴性临床样本，参比方法可采用金标准方法、行业公认方法，或经验证性能达标且能满足临床预期用途的方法等；样本数量需具备统计学意义，需将检测结果与参比方法结果进行对比，若存在差异，应采用其他方法进一步验证；通过阳性符合率与阴性符合率，对检测的准确度、灵敏度及特异性进行评价。

### 11.6.2 最低检测限

实验室应针对不同样本类型与基因变异类型，分别建立对应的最低检测限。通过选用混合参考品（定值标准物质），经梯度稀释与检测后，计算得出最低检测限值。

最低检出限应满足以下要求：

- a) 伴随诊断应用应达到 0.1%；
- b) 疗效评估应用：
  - 1) 群体定制策略的 MRD 检测：应达到 0.02%；
  - 2) 个体化定制策略的 MRD 检测：应达到 0.01%，宜达到 0.005%。

### 11.6.3 精密度

应使用变异比例范围在2倍~4倍LOD之间的阳性样本进行精密度实验。不同基因变异类型应使用至少1例样本进行精密度验证。

### 11.6.4 稳定性

试剂稳定性应参考试剂说明书要求，将同批次试剂组分反复冻融、长期保存到试剂说明书声称的次数或时间，之后对弱阳性标本和阴性标本进行检测。试剂稳定性符合率应为100%。

## 12 质量控制

### 12.1 室间质量评价

检测机构应参加相应的实验室室间质评项目，当无实验室室间质评项目可利用时，可通过与其他实验室比对（即室间比对）的方式确定检验结果的可接受性。实验室应规定比对实验室的选择原则（如已获认可的实验室、使用相同检测方法的实验室）、样品数量（应包括正常和异常水平）、频率、判定标准等。实验室负责人或指定人员应监控室间比对活动及其结果，并在结果报告上签字。

### 12.2 室内质量控制

#### 12.2.1 基本要求

每次实验应设置阴性质控物和阳性质控物。

#### 12.2.2 质控物

质控物要求如下：

- a) 阴性质控物：应采用无核酸或明确无目标突变的样本作为检测模板，去识别外部污染、试剂污染或样本间交叉污染；
- a) 阳性质控物：应优先采用包含检测范围为一种或多种基因及变异类型的国家标准品，监测检测过程是否正常及是否满足质控要求。若无可选用有证参考物质、公认标准品或经赋值的临床样本，实验室宜采用已知突变信息的，带有多个突变类型和突变频率的混合样本，以模拟真实样本的复杂性。

注：鉴于肿瘤突变的独特性，MRD检测无法为每位患者的每个位点单独设置质控品。可在突变数量与测序深度质控

的基础上，建立通用质控体系，例如通过阳性/阴性质控物监控流程稳定性与准确性，借助突变标准品验证检测性能。

### 12.2.3 环境质控

实验室应每月至少1次对室内环境和设备进行采样，采用荧光定量PCR或实验室正在开展的NGS检测方法检测进行污染物检测。如发现环境内、设备上存在污染物，应立即对实验室进行彻底清洁，包括但不限于地板、桌面、墙壁、天花板、设备表面、设备与实验耗材或试剂接触的部位等。

全国团体标准信息平台

附 录 A  
(规范性)

实验室分区的仪器设备和试剂要求

表A.1规定了实验室各分区的仪器设备和试剂要求。

表A.1 实验室分区的仪器设备和试剂要求

分区	设备	试剂
试剂准备区	1) 生物安全柜 (II级或II级以上) ; 2) 冰箱 (2℃~8℃冷藏、-25℃~-15℃低温、-60℃以下超低温) ; 3) 微量移液器; 4) 涡旋混匀器; 5) 微型掌上离心机。	以下各分区提到的试剂宜在试剂准备区长期保存
样本制备区	1) 生物安全柜 (II级或II级以上) ; 2) 医用冰箱 (2℃~8℃冷藏、-25℃~-15℃低温、-60℃以下超低温) ; 3) 微量移液器; 4) 涡旋混匀器; 5) 微型掌上离心机; 6) 冷冻离心机 (最大离心力12000g以上) ; 7) 微量移液器; 8) 孵育器; 9) 荧光定量仪; 10) 自动核酸提取仪。	核酸提取试剂, 宜包括以下试剂: 1) 石蜡样本核酸 (DNA和/或RNA) 提取试剂; 2) 液体活检提取试剂; 3) 外周血gDNA提取试剂
文库制备I区	1) 生物安全柜 (II级或II级以上) ; 2) 医用冰箱 (2℃~8℃冷藏、-25℃~-15℃低温、-60℃以下超低温) ; 3) 微量移液器; 4) 涡旋混匀器; 5) 微型掌上离心机; 6) 微量移液器; 7) 荧光定量仪; 8) 自动建库仪。	文库制备试剂: 试剂盒内至少应包含脱氧三磷酸核苷, 带有UMI序列的连接接头, 连接酶, 聚合酶, 缓冲液。
文库制备II区	1) 生物安全柜 (II级或II级以上) ; 2) 医用冰箱 (2℃~8℃冷藏、-25℃~-15℃低温、-60℃以下超低温) ; 3) 微量移液器; 4) 涡旋混匀器; 5) 微型掌上离心机; 6) 微量移液器; 7) 荧光定量仪; 8) PCR仪; 9) 自动建库仪。	1) PCR扩增引物; 2) PCR产物纯化试剂; 3) 捕获探针; 4) 杂交捕获试剂。
质检区	1) 生物安全柜 (II级或II级以上) ; 2) 医用冰箱 (2℃~8℃冷藏、-25℃~-15℃低温、-60℃以下超低温) ; 3) 微量移液器; 4) 涡旋混匀器; 5) 微型掌上离心机; 6) 微量移液器; 7) 荧光定量仪; 8) 微量分光光度计; 9) 全自动核酸蛋白分析仪。	1) 核酸定量试剂; 2) 核酸片段分析试剂。
测序分析区	1) 二代测序仪 2) 高性能生物信息学分析服务器。	1) 二代测序试剂: 试剂盒内至少应包含测序引物、高效测序反应酶、缓冲液; 2) 测序芯片。

附 录 B  
(规范性)  
标本保存与运输要求

表B.1规定了标本保存与运输要求。

表B.1 标本保存与运输要求

标本类型	采集容器/要求	保存与运输
血液标本	用于cfDNA: EDTA抗凝管(紫盖管), 应在规定时间内快速处理。	应冷藏(2℃~8℃)运输, 宜在2小时内分离血浆; 如果不能即时提取, 应在离心去除细胞成分后, 于-80℃冻存; 如需长时间运输, 宜分离血浆后干冰运输, 或采用cfDNA专用保存管。
	用于cfDNA: cfDNA专用保存管, 内含细胞稳定剂, 可延长保存时限。	应遵循相应保存管的厂商说明书。通常可在室温(18℃~25℃)条件下稳定保存与运输3~7天, 分离血浆时间不宜超过7天。
	用于gDNA: EDTA抗凝管(紫盖管), 避免使用肝素抗凝剂。	需要冷藏(2℃~8℃)下保存与运输, 不宜超过72小时; 禁止使用干冰运输。
脑脊液/浆膜腔积液(如胸腔积液、腹水等)	使用无菌、无DNA酶的专用采集管。宜采用含有cfDNA保护剂的专用容器	室温(18℃~25℃)下放置时间不宜超过2小时。若无法立即提取, 应在离心去除细胞成分后, 取上清液于-80℃冻存, 并避免反复冻融; 宜采用干冰冷链运输。

**附录 C**  
(资料性)  
申请单模板示例

表C.1给出申请单模板示例。

**表 C.1 申请单模板示例**

<p>1. 本检测只适用于检测指定肿瘤基因DNA和/或RNA水平的基因变异。</p> <p>2. 根据检测项目不同，可用于辅助临床进行肿瘤风险分层、诊断、治疗、预后评估或动态监测。</p> <p>3. 科学数据表明，部分患者不存在明确的基因变异，因此未检测到基因变异的检测结果是客观存在的。但该结果并不是完全无用的信息，并不能证明所有的治疗方法有效或无效。它能够证明在本次样本中不存在检测范围内基因的突变，这同样可以辅助医生制定治疗方案。</p> <p>4. 检测报告根据基因变异情况提示用药相关性，检测结果仅供医生参考，并由医生根据临床实际情况制定治疗方案。</p> <p>5. 由于不可抗拒因素（包括但不限于病人不良的身体状况、采血量不达标、采血管破裂、自然灾害等）所致的检测无法顺利进行，受检者需配合检测机构再次取样（如果因样本运输或其他非检测原因造成的延误不计算在检测周期内）。</p> <p>6. 受检者的个人身份信息、健康信息及检测数据在检测过程中将按照中国相关法律法规及政策规范相关要求进行了严格保护及慎重使用。签署本知情同意书即表明您同意授权检测机构将您的样本及数据在匿名状态下用于后续独立或合作性的研究及教育目的，以推动该领域医学进展。</p> <p>7. 本检测不承诺、不保证进入医疗保险或其他商业保险报销目录。</p> <p>8. 本次基因检测报告仅对此次送检样本负责。</p> <p>我已经知晓本次检测相关的《知情同意书》的所有内容，完全自愿慎重进行肿瘤分子检测，承担检测带来的相关风险，并承诺提供的个人信息真实有效，包括但不限于身份信息、病历病理、诊断报告、检测报告和其他必要资料。</p> <p style="text-align: center;">受检者或代理人签字 _____ 代理人与受检者关系 _____ 签字日期 _____</p>							
患者基本就诊信息							
患者	*姓名 _____ *性别 _____ *年龄 _____ *联系方式 _____ *门诊/住院号 _____ 病房/床号 _____ 身份证号 _____						
医院	*医院 _____ *科室 _____ *医生 _____ *电话 _____						
疾病	*肿瘤类型 _____ *临床分期 _____ 期 *初次确诊时间 _____ 年 _____ 月						
临床病理诊断							
样本信息	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 5px;">样本时间</td> <td style="padding: 5px;">*采样时间 _____ 年 _____ 月 _____ 日 *送检时间 _____ 年 _____ 月 _____ 日</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">样本来源</td> <td style="padding: 5px;">*<input type="checkbox"/> 原发灶 <input type="checkbox"/> 复发灶 <input type="checkbox"/> 转移灶 <input type="checkbox"/> 外周血 (ctDNA) <input type="checkbox"/> 其他</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">样本类型</td> <td style="padding: 5px;">           *外周血: _____ mL, EDTA抗凝 _____ 管, BCT无创 _____ 管            *胸腹水 _____ mL (不少于100mL): <input type="checkbox"/> 细胞蜡块            *浆膜腔积液: _____ mL            *脑脊液: _____ mL         </td> </tr> </table>	样本时间	*采样时间 _____ 年 _____ 月 _____ 日 *送检时间 _____ 年 _____ 月 _____ 日	样本来源	* <input type="checkbox"/> 原发灶 <input type="checkbox"/> 复发灶 <input type="checkbox"/> 转移灶 <input type="checkbox"/> 外周血 (ctDNA) <input type="checkbox"/> 其他	样本类型	*外周血: _____ mL, EDTA抗凝 _____ 管, BCT无创 _____ 管 *胸腹水 _____ mL (不少于100mL): <input type="checkbox"/> 细胞蜡块 *浆膜腔积液: _____ mL *脑脊液: _____ mL
	样本时间	*采样时间 _____ 年 _____ 月 _____ 日 *送检时间 _____ 年 _____ 月 _____ 日					
	样本来源	* <input type="checkbox"/> 原发灶 <input type="checkbox"/> 复发灶 <input type="checkbox"/> 转移灶 <input type="checkbox"/> 外周血 (ctDNA) <input type="checkbox"/> 其他					
样本类型	*外周血: _____ mL, EDTA抗凝 _____ 管, BCT无创 _____ 管 *胸腹水 _____ mL (不少于100mL): <input type="checkbox"/> 细胞蜡块 *浆膜腔积液: _____ mL *脑脊液: _____ mL						

附 录 D  
(资料性)  
文库构建方法及技术特点

表D.1给出文库构建方法及技术特点。

表D.1 文库构建方法及技术特点

维度	液相杂交捕获法文库	扩增子法文库
建库流程	以cfDNA为模板，通过DNA末端修复和接头连接构建文库；随后用生物素探针进行杂交捕获，经目标区域富集，最终获得测序文库	以cfDNA为模板，通过多重特异性引物扩增目标区域，再经二次PCR或连接引入二代测序仪适配的测序通用序列，最终获得目标区域测序文库
目标片段富集原理	基于碱基互补配对，使用DNA/RNA探针与目标区域杂交，进行富集捕获	设计多重特异性引物，对目标区域进行PCR扩增富集
适用范围/通量	适用于基因数目多、较大基因组范围的分析	适用于几十到数千个位点，或数万个碱基对以内的较小基因组区域
可检测的变异类型	全面：点突变、小片段插入缺失、拷贝数变异（CNV）和基因重排	有限：主要检测已知序列的点突变、小片段插入缺失、CNV和RNA层面已知融合基因
对未知序列的检测	适用于鉴定未知的基因融合和其它变异	无法检测未知基因变异
样本核酸要求	对核酸用量、质量和完整性要求高	对核酸用量和质量的耐受度更高
操作流程	相对复杂和耗时	简便快捷
成本	高	低

## 参 考 文 献

- [1] 中华医学会病理学分会, 国家病理质控中心. 实体瘤分子残留病灶检测共识[J]. 中华病理学杂志, 2024, 53(11):1088-1096.
- [2] 国家病理质控中心, 中华医学会病理学分会, 中华医学会肿瘤学分会肺癌学组, 等. 非小细胞肺癌分子病理检测临床实践指南(2024版)[J]. 中华病理学杂志, 2024, 53(10):981-995.
- [3] 中华医学会肿瘤学分会. 中华医学会肺癌临床诊疗指南(2024版)[J]. 中华医学杂志, 2024, 104(34):3175-3213.
- [4] 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会. ctDNA高通量测序临床实践专家共识(2022年版)[J]. 中国癌症防治杂志, 2022, 14(3):240-252.
- [5] 国家卫生健康委肿瘤和血液病相关病种诊疗指南(2022年版)
- [6] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床基因扩增检验工作导则(卫办医政发[2010] 194号)[EB/OL]. 2010-12-06.
- [7] 非小细胞肺癌融合基因检测临床实践中国专家共识(2023版), 中华病理学杂志, 2023, 52(6):565-573.
- [8] 二代测序技术在NSCLC中的临床应用中国专家共识(2020版), 中国肺癌杂志, 2020, 23(9):741-761.
- [9] 临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识, 中华病理学杂志, 2017, 46(3):145-148.
- [10] 分子病理诊断实验室建设指南(试行)[J]. 中华病理学杂志, 2015(6):369-371.
- [11] 二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识, 中华医学杂志, 2018, 98(26):2057-2065.
- [12] 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), 中华医学杂志, 2020, 100(09):648-659.
- [13] 高通量测序技术临床检测规范化应用北京专家共识(第一版通用部分), 中华医学杂志, 2019, 99(43):3393-3397.
- [14] 肿瘤二代测序生物信息学分析规范化管理江苏专家共识, 临床检验杂志, 2023, 41(8):561-569.
- [15] 江苏省医学会病理学分会, 江苏省医学会检验学分会, 江苏省临床检验中心, 等. 肿瘤二代测序生物信息学分析规范化管理江苏专家共识[J]. 临床检验杂志, 2023, 41(8):561-568, 596.
- [16] 实验室自建肿瘤全景变异检测性能确认中国专家共识(2024版), 中华肿瘤杂志, 2024, 46(04):274-284.
- [17] 中国非小细胞肺癌患者EGFR T790M基因突变检测专家共识, 中华医学杂志, 2018, 98(32):2544-2551.
- [18] The web-based multiplex PCR primer design software Ultiplex and the associated experimental workflow: up to 100-plex multiplicity. BMC Genomics. 2021, 22(1):835.
- [19] Validity of Targeted Next-Generation Sequencing in Routine Care for Identifying Clinically Relevant Molecular Profiles in Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a 2-Year Experience on 1343 Samples. J Mol Diagn. 2018, 20(4):550-564.
- [20] Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. Arch Pathol Lab Med. 2018, 142(3):321-346.
- [21] Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2018, 29(Suppl 4):iv192-iv237.
- [22] Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. Thorax. 2016, 71(2):177-84.
- [23] Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology

Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018, 36(9):911-919.

[24] Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2018;20(1):4-27.

[25] Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(3):341-365.

[26] Merker J D, Oxnard G R, Compton C, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(16):1631-1641.

[27] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-Small Cell Lung Cancer Version 3.2025.

---