

团 体 标 准

T/SZAS 45—2022

基于杂交捕获测序的同源重组缺陷（HRD） 检测技术规范

Technical specification for homologous recombination deficiency (HRD) detection
based on hybridization capture high-throughput sequencing

2022 - 06 - 21 发布

2022 - 06 - 30 实施

深圳市标准化协会 发布

目 次

前言	II
引言	III
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	4
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	8
11 检测方法的局限性	12
参考文献	13

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。

本文件由深圳华大基因股份有限公司提出。

本文件由深圳市标准化协会归口。

本文件起草单位：深圳华大基因股份有限公司、天津市肿瘤医院、天津医科大学总医院、南通大学、天津市中心妇产科医院、菁良基因科技（深圳）有限公司、北京吉因加科技有限公司。

本文件主要起草人：于竞、王春丽、陈冬菊、安娜、蔡宇航、于津浦、门剑龙、闫骏、申彦、李菁华、韦良慎、管彦芳、易玉婷、吴昊、李红梅、朱师达、石太平、李倩一。

引 言

同源重组修复(Homologous Recombination Repair, HRR)功能缺陷被称为同源重组缺陷(Homologous Recombination Deficiency, HRD)。HRD的存在会使肿瘤细胞对铂类化疗药物高度敏感,应用靶向抗肿瘤药物聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂可促发肿瘤细胞合成致死。已有临床指南和共识推荐在卵巢癌、乳腺癌等癌症中检测HRD,从而为PARP抑制剂或铂类药物等的治疗提供参考依据。目前国内外已有多款PARP抑制剂获批上市或在临床研究中,覆盖多个癌种,进一步推动HRD成为PARP抑制剂的重要新型生物标志物。HRD检测对扩大PARP抑制剂在肿瘤患者中的受益人群,精准医疗延长患者生存时间、提升患者生存质量具有重要意义。

HRD发生的机制复杂,其检测方法根据分子层面的发生原因、在基因组上产生的结果及对细胞内功能的影响等角度出发,对应为HRR相关基因突变或甲基化检测、“基因组瘢痕”分析(基因组不稳定评分或基因组变异特征分析)、功能性(RAD51)检测几大类。这些方法各有特点,检测原理和流程各不相同,需要分别进行规范化。在这些方法中,目前临床应用中最为推荐“基因组瘢痕”分析,进行基因组不稳定评分,通过对特定SNPs的检测,分析相关基因组不稳定指标,综合计算出HRD分值(HRD score),从而进一步评估HRD状态。研究数据显示,使用该方法在卵巢癌患者中进行HRD检测,相比BRCA变异检测,可增加约一倍的PARP抑制剂受益患者。HRD基因组不稳定评分检测的传统技术手段为SNP-array,但因其检测精度低、易受噪音信号干扰、送样要求高等缺点,目前已逐渐被目标区域杂交捕获高通量测序法替代。相对于SNP-array,基于杂交捕获测序的HRD检测技术,通过优化的目标区域探针设计,可有效克服背景噪音的干扰,同时获得设计区域更高的覆盖深度,具有准确性高、稳定性好、性价比高等优势。

目前国内尚未建立基于杂交捕获测序检测HRD的技术标准,缺少针对该检测技术全流程开发详细的技术指导要求。因此,本团体标准编制小组在结合该领域前沿研究、临床指南和专家共识的基础上,整合该技术开发中业内同行的先进经验和临床实际应用情况,研制出基于杂交捕获测序的同源重组缺陷(HRD)检测技术规范。对该技术的检测原理、探针设计、样本要求、核心试剂组分、分析流程、阳性判断值设定等关键点进行详细描述,列明具体要求,以期为该HRD检测技术的规范化开发提供参考标准。

基于杂交捕获测序的同源重组缺陷（HRD）检测技术规范

1 范围

本文件规定了基于目标区域杂交捕获测序的同源重组缺陷（HRD）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、结果判定以及检测方法的局限性等。

本文件适用于使用人体来源的肿瘤组织样本（可能包括配对的正常对照样本），通过对基因组目标区域杂交捕获后进行高通量基因测序，分析基因组瘢痕，检测同源重组缺陷分值（HRD score）的方法。

本文件不适用于以下检测：

- a) 非肿瘤患者样本或肿瘤患者血浆循环肿瘤 DNA 样本的检测；
- b) 全基因组高通量测序法（WGS）、HRR 相关基因突变或甲基化水平改变检测、基因组特征分析、功能性检测的方法检测 HRD；
- c) BRCA 基因失活状态的检测。

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（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB 19489—2008 实验室 生物安全通用要求
- 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 37872—2019 目标基因区域捕获质量评价通则
- GB/T 38736—2020 人类生物样本保藏伦理要求
- 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

目标区域 target region

对于提供给用户的结果里的特征（如某基因或某表型）、以及用户诉求且获得承诺的特征（如某基因或某表型），其在基因组上的关联区域。即这些区域的变异与上述特征存在已知的相关性。

注：HRD检测的目标区域包含可供HRD分析使用的特定SNPs位点的集合。

[来源：T/SZGIA 2—2018，3.28，有修改]

3.2

杂交捕获 hybridization capture

目标基因区域捕获 target region capture

根据待富集的目标区域设计相应探针，通过探针与待测基因组 DNA 进行杂交反应，从而针对性捕获富集待测样本中的目标区域基因片段。

[来源：GB/T 37872—2019，3.1.6，有修改]

3.3

测序 sequencing

测定氨基酸或核苷酸序列的过程。

[来源: GB/T 29859—2013, 2.4.13]

3.4

高通量基因测序 high-throughput gene sequencing

区别于传统Sanger（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，通常一次测序反应能产出不低于100Mb的测序数据。

[来源: GB/T 30989—2014, 3.19]

3.5

同源重组修复 homologous recombination repair (HRR)

DNA重组的一种形式，通常用于修复DNA双链断裂(Double Strand Breaks, DSBs)。

注：HRR主要作用于细胞周期的S期和G2期，是一个保守的过程，在损伤部位恢复原来的DNA序列。在HRR过程中，DSB周围的部分DNA序列被移除(切除)，显示出单链DNA(ssDNA)区域。DNA重组酶RAD51与ssDNA结合，侵入同源姐妹染色单体的DNA序列，以此作为模板在DSB位点合成新DNA。参与介导HRR的关键蛋白包括BRCA1、BRCA2、RAD51、RAD51C、RAD51D和PALB2编码的蛋白。

3.6

同源重组缺陷 homologous recombination deficiency (HRD)

细胞水平上的HRR功能障碍状态。

注：HRD会产生特定的、量化的、稳定的基因组改变，其中包含可被鉴别的基因突变、插入/缺失模式，以及染色体结构异常、基因拷贝数变异等。

3.7

聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂 poly ADP-ribose polymerase inhibitor (PARPi)

PARP家族蛋白的小分子抑制剂。PARP家族蛋白通过多种DNA损伤应答通路在DNA修复中发挥关键作用，HRD细胞更依赖PARP活性来维持细胞生存。

注：单药PARP抑制剂选择性杀伤BRCA缺陷细胞，是开拓肿瘤学中合成致死方法的一个关键发现。PARP抑制剂在单链DNA断裂的位点捕捉PARP1蛋白，在DNA复制机制中，这个被捕捉的PARP1会导致复制叉的停止、瓦解并产生双链断裂，这在具有HRD的细胞中无法修复，比如BRCA突变的细胞。

3.8

基因组瘢痕 genomic scars

具有已知起源的基因组异常，可作为同源重组缺陷和药物反应的报告标志。

3.9

杂合性缺失 loss of heterozygosity (LOH)

等位基因不平衡的一种常见形式，杂合体细胞由于两个等位基因中的一个缺失而无法具有杂合性。

注：杂合性缺失包括等位基因拷贝数中性杂合性缺失(Copy-neutral loss of heterozygosity)。HRD一般检测大于15Mb且小于整个染色体长度的杂合性缺失。

3.10

端粒等位基因不平衡 telomeric allelic imbalance (TAI)

延伸到其中一个亚端粒但不超过着丝粒且大于11Mb的等位基因不平衡的染色体片段。

3.11

大片段迁移 large-scale state transition (LST)

两个相邻区域之间的染色体断裂位点(breakpoint)的数量。

注：两个区域长度均大于等于10 Mb，且区域间距小于3Mb。

3.12

读长 read length

测序的下机数据里，每一条序列的平均长度，以碱基(bp)为单位。

注1：常见的读长有50bp、90bp、100bp、150bp等。

注2：HRD检测中常用的读长为100bp或150bp。

[来源：T/SZGIA 2—2018，3.8，有修改]

3.13

测序质量 Q20, Q30

高通量测序中，每测一个碱基会给出一个相应的质量值，这个质量值用来衡量测序准确度。碱基的质量值20的错误率为1%，30的错误率为0.1%。行业中Q20与Q30则表示质量值 ≥ 20 或30的碱基所占百分比。

[来源：T/SZGIA 3—2018，3.5]

3.14

序列比对 sequence alignment

比较两个或两个以上核苷酸或氨基酸序列间的相似性的过程。

[来源：GB/T 29859—2013，2.2.1]

3.15

阳性判断值 cutoff value

用作被测量对象阳性和阴性结果之间决定点的定量值。

注：根据试验设计选择一定的实验个体，经过对一定数量参考个体的观测和观察获得检验结果。通过对检验结果的统计，评估样本数据参考值的分布。通过方法或模型的建立，阳性判断值来源于参考值的分布，采用统计学方法如受试者工作特征曲线(ROC)划定并确定灰区(如适用)。临床上应用时用于描述认识疾病程度及决定处理措施时的某一检验项目的分界值。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BAM: 二进制比对文件(binary alignment map)

BRCA 1/2: 乳腺癌易感(breast cancer)基因

bp: 碱基对(base pair)

CNV: 拷贝数变异(copy number variation)

DNA: 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dbSNP: 单核苷酸多态性数据库(single nucleotide polymorphism database)

EDTA: 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

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

GIS: 基因组不稳定评分(genomic instability score)

HRD: 同源重组缺陷(homologous recombination deficiency)

HRR: 同源重组修复(homologous recombination repair)

LDT: 实验室自建项目(laboratory developed test)

LOH: 杂合性缺失(loss of heterozygosity)

LST: 大片段迁移(large-scale state transition)

NCBI: 美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)

PARP: 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase)

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

Post-PCR: 杂交后PCR(post-hybridization PCR)

Pre-PCR: 杂交前PCR (pre-hybridization PCR)

SNPs: 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms)

TAI: 端粒等位基因不平衡 (telomeric allelic imbalance)

UCSC: 加州大学圣克鲁兹分校 (University of California, Santa Cruz)

WES: 全外显子测序 (whole exome sequencing)

5 检测原理

设计HRD目标区域探针对基因组相关区域进行杂交捕获测序。因HRD的肿瘤会存在大规模拷贝数变异 (CNV)，基于优化设计的SNPs位点检测CNV，从而进一步分析基因组不稳定相关指标，得到HRD分值。其中包括的特定SNPs区域应综合考虑SNP位点检出频率和覆盖度，并且依赖相邻点间关系进行统计分析，以确定设计区间间隔点位置并消除测试偏差。探针设计应综合考虑多种因素，总体原则主要包括：

- a) 人群高频 SNPs 位点，应符合我国人群的分子遗传学特征；
- b) 根据预期的 CNV 分辨率确定探针覆盖区域所包含的最少 SNPs 位点的数量；
- c) 尽可能均匀分布于每条染色体上 (Y 染色体和线粒体除外)；
- d) 能有效合成，对于部分因结构复杂或不具备良好特异性的区域等应不包含。

宜使用符合上述设计原则的HRD目标区域探针，也可采用“全外显子测序 (WES)+骨架SNPs”、“大Panel+骨架SNPs”的探针设计原则，均应保证探针捕获区域在基因组上均匀分布且覆盖足够数量的SNPs位点。

使用人体来源的肿瘤组织样本进行“单样本”检测，或同时使用远离癌组织的正常组织样本或外周血样本进行配对“双样本”检测，通过对HRD目标区域杂交捕获后进行高通量基因测序的方法，检测HRD分值。采用“双样本”检测分析时使用配对样本作为对照，而“单样本”检测分析时应使用正常样本构建的参考集作为对照。

使用相应的核酸提取试剂从上述肿瘤组织或配对对照样本中提取DNA，对提取得到的DNA样本进行打断，获得片段大小相对集中的随机基因组片段。对片段化后的基因组DNA进行末端修复、加“A”、接头连接，再经PCR扩增获得杂交前文库 (即pre-PCR文库)。文库中的DNA片段和带有生物素标记的HRD目标区域探针进行杂交捕获，通过生物素-亲和素反应使目标DNA片段结合在亲和素磁珠上，洗脱去除非目标区域DNA后，特异性捕获富集的目标区域DNA经PCR扩增获得杂交后文库 (post-PCR文库)。杂交后文库经过上机前处理，通过基因测序仪进行高通量基因测序。下机数据经过过滤、比对、去重、质控后输出SNPs结果，用于分析杂合性缺失 (LOH)、端粒等位基因不平衡 (TAI) 和大片段迁移 (LST) 的数量，从而获得HRD分值结果。LOH、TAI和LST三个指标在一定程度上都能表示细胞HRD的程度，但相较单个指标描述，三者组合综合计算分值能更全面反映基因组瘢痕状态，进而评估基因组不稳定状态。

注1: 基因拷贝数变异检测的传统方法有SNPs基因芯片技术 (SNP-array) 和比较基因组杂交技术等。从技术的发展历程来看，与SNP-array技术相比，基于均匀设计的SNPs位点探针，并基于杂交捕获高通量测序的检测方法能更好更全面的覆盖全基因组范围，同时相比WGS检测减少了冗余位点，降低了检测成本。此外，探针设计覆盖的基因组区间 (bed区间) 较长，减少了背景噪音对结果的影响，稳定性更好，与WGS检测结果也有良好的一致性。在全基因组范围设计覆盖特定SNPs位点的目标区域探针，相比WES区域或只包含基因组部分区域的大panel而言，检测拷贝数变异以及基因组不稳定情况更具科学性和准确性。

注2: 正常组织 (normal tissue)，也称非癌组织，手术切除组织中距离癌灶边缘最远端或者5 cm之外的组织 (见SZDB/Z 91—2014, 3.21)。

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的要求。

7 试剂、仪器与耗材

7.1 通则

检测中涉及的设备、计量溯源性、外部提供的产品和服务宜符合GB/T 27025—2019的要求。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、冷冻组织样本或外周血样本进行提取。实验过程中用到的水宜符合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

样本提取的核酸可采用凝胶电泳法检测DNA条带分布及RNA污染情况。

构建的DNA文库可采用微流控生物分析仪（如Agilent 2100、Caliper或Qsep）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对DNA文库进行质控。

7.2.4 HRD 检测试剂

主要试剂包括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、HRD目标区域探针、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、无核酸酶水等。

其中，HRD目标区域探针的优良设计和良好性能是关键影响因素。HRD探针设计时应考虑以下因素：

- a) 探针区域应包含人群高频 SNPs 位点：宜使用 dbSNP 数据库，SNPs 位点初筛的人群频率阈值不宜低于 5%。应符合我国人群的分子遗传学特征；
- b) 根据预期的 CNV 分辨率确定探针区域所包含的最少 SNPs 位点的数量。宜从步骤 a) 中初筛的 SNPs 位点，进行不同梯度抽提，观察检测结果是否满足预期要求，应确保选取到满足预期要求的最低 SNPs 位点数量，保证覆盖区域在全基因组上具有一定密度；

注：全基因组测序的SNPs位点抽提的数据显示，在SNPs位点数量在100,000左右时，可基本保证变异事件的准确检出；在50,000时，变异检出的数量明显减少。

- c) 特别的，HRD 检测要求探针尽可能均匀分布于每条染色体上（Y 染色体和线粒体除外）。根据预期位点总数，计算预期的设计区间间隔长度（WGS/预期位点数）。在实际设计中，应综合考虑区域位点的复杂性（如串联重复序列、GC 含量异常区域的影响），对于覆盖度差或探针无法设计的区域应进行舍弃或移动。实际区间间隔长度不宜大于预期区间间隔的 1.5 倍；

注：GC含量是在所研究对象的DNA分子中，鸟嘌呤(Guanine)和胞嘧啶(Cytosine)所占的比例（见T/SZGIA 2—2018 3.12）。

d) 应保证目标区域探针是可合成并可确保合成质量的；

注：部分区域因结构复杂或不能确保良好的特异性等原因，供应商无法合成。

e) 应保证区域具有良好的捕获效率和覆盖度，不具有明显的偏好性。

宜使用符合上述设计原则的HRD目标区域探针，也可采用“WES+骨架SNPs”、“大Panel+骨架SNPs”的探针设计原则，均应保证探针在基因组上均匀分布且覆盖足够数量的SNPs位点。

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。

若文库构建采用物理超声打断法还需要超声打断仪。

核酸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）、琼脂糖凝胶电泳系统、凝胶成像及分析系统、微流控生物分析仪（如Agilent 2100、Caliper或Qsep）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应明了和认可，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、远离肿瘤组织的正常组织或外周血样本的取样宜符合《肿瘤组织标本库常用实验技术手册》等临床规范的要求。样本的采集、保存及运输宜符合GB/T 37864—2019、SZDB/Z 91—2014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。

本检测技术涉及“单样本”和“双样本”两种检测原理，“单样本”检测仪使用肿瘤组织样本，“双样本”检测还需要同时使用配对的正常组织样本或外周血样本。在临床实际应用场景中，组织样本常以冷冻组织样本和/或FFPE样本形式保存。应按照相应的要求对本检测技术中可能使用的一种或多种类型的样本进行采集和处理、运输和保存。

8.2 样本采集及处理

8.2.1 冷冻组织样本

医疗机构采集和处理冷冻组织样本宜符合《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。

本检测技术对冷冻组织样本的需求量为手术样本不小于米粒大小(≥ 10 mg)，穿刺样本不少于肉眼可见的1条。手术获取的冷冻组织样本（肿瘤组织及如需配对使用的正常组织）按上述要求提取得到的

基因组DNA一般可满足检测项目起始量要求，否则应考虑样本质量或取样过程中是否存在问题。活检穿刺组织宜对不同规格的活组织检查针的样本取样量进行估算，其基因组DNA提取量应满足检测项目的最低起始量要求，否则应在检测前充分说明微量样本可能的检测失败风险。

冷冻组织样本应确定含有肿瘤病变细胞，可采用冷冻切片染色评估肿瘤细胞含量。应满足检测项目经分析性能确认获得的最低肿瘤细胞含量要求，肿瘤细胞含量不宜低于20%、坏死细胞比例不宜高于10%。

注：活检穿刺样本采集使用的活组织检查针的要求见GB/T 18457—2015和YY/T 0980.1—2016。

8.2.2 FFPE 样本

医疗机构采集和处理FFPE样本宜符合《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。

用于HRD检测的石蜡切片应为未经HE染色的白片，样本采集量根据包埋组织体积大小而异，以满足检测项目起始量要求为准，宜送检3年以内（1年之内为最佳）的石蜡切片，厚度4~5 μm，10张左右；应由病理医师确定肿瘤类型；对于使用穿刺样本包埋得到的FFPE样本切片，宜提高切片数量以满足项目检测最低起始量需求。

制备白片的同时，应制备一片与送检样本相应的HE染色切片，便于对病理情况进行判断和回溯性分析，宜同时提供病理检测报告。

福尔马林固定石蜡包埋病理组织或切片样本应确定含有肿瘤病变细胞。应满足检测项目经分析性能确认获得的最低肿瘤细胞含量要求，肿瘤细胞含量宜不低于20%、坏死细胞比例宜不高于10%。

8.2.3 外周血样本

医疗机构采集和处理外周血样本宜符合《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南（试行）（2015版）》、GB/T 38576—2020、SZDB/Z 186—2016等规范和标准的要求。

全血样本检测核酸时不应使用肝素钠采血管，宜采集血液样本于EDTA抗凝管中，采集量应满足检测项目起始量的要求，宜为2mL。采集后轻轻颠倒5~8次，充分混匀，避免血液凝固及溶血。

近期有输血或移植操作，以及化疗后严重骨髓抑制等情况的患者不应进行本检测的血液样本采集。

8.3 样本运输

8.3.1 冷冻组织样本

冷冻组织样本运输应满足以下要求：

- a) 运输时应使用足量的干冰或干冰袋制冷；
- b) 运输过程中控制温度在-70℃以下；
- c) 运输时间不宜超过5天。

8.3.2 FFPE 样本

FFPE样本运输应满足以下要求：

- a) 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；
- b) 运输时间不宜超过15天。

8.3.3 外周血样本

EDTA抗凝管采集的外周血样本运输应满足以下要求：

- a) 使用冰袋或其它制冷剂在2℃~8℃条件下密封运输；
- b) 运输时间不宜超过5天。

若使用其他采血管，则按照相应采血管的要求条件进行运输。

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的温度应低于 -132°C ，如液氮中。
检测样本的保存期不宜超过36个月。

8.4.2 FFPE 样本

FFPE样本的保存温度宜为 $4^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$ 。
检测样本的保存期不宜超过36个月，以12个月之内为最佳。

8.4.3 外周血样本

外周血待测样本的暂存温度为 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ ，储存前处理的时间不宜超过12个小时。
外周血样本长期保存的温度应低于 -80°C ，应避免反复冻融（冻融次数不宜超过5次）。

9 检验流程

9.1 样本 DNA 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DNA提取。所提取的基因组DNA浓度不宜低于 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ ，总量不宜低于400ng。

9.2 文库构建

在文库制备区进行，参照HRD检测试剂的说明书进行文库构建。应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。所构建的pre-PCR文库浓度不宜低于 $16\text{ ng}/\mu\text{L}$ ，产量不宜低于500ng；post-PCR文库浓度不宜低于 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ ，产量不宜低于320ng。

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（见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。人类参考基因组宜采用NCBI来源的GRCh37.p13版本，或UCSC来源的hg19版本。基于比对结果，分别分析每个染色体上发生的杂合性缺失（LOH），端粒等位基因不平衡（TAI）和大片段迁移（LST）的情况并评估打分，再综合这三个指标的分值计算得出HRD分值。

注：标签序列（barcode），指高通量测序文库制备过程中，引入的一段已知碱基排布情况的外源核苷酸序列，通过这段序列区分不同的文库或样本。

10 结果判定

10.1 结果分析条件设定

10.1.1 基本要求

按数据分析要求完成信息分析，判断是否满足质控要求。对通过质控的待测样本进行HRD分值输出，根据阳性判断值进行结果判定。

10.1.2 数据分析要求

基于杂交捕获测序的HRD检测技术的数据分析流程图，如图1所示。

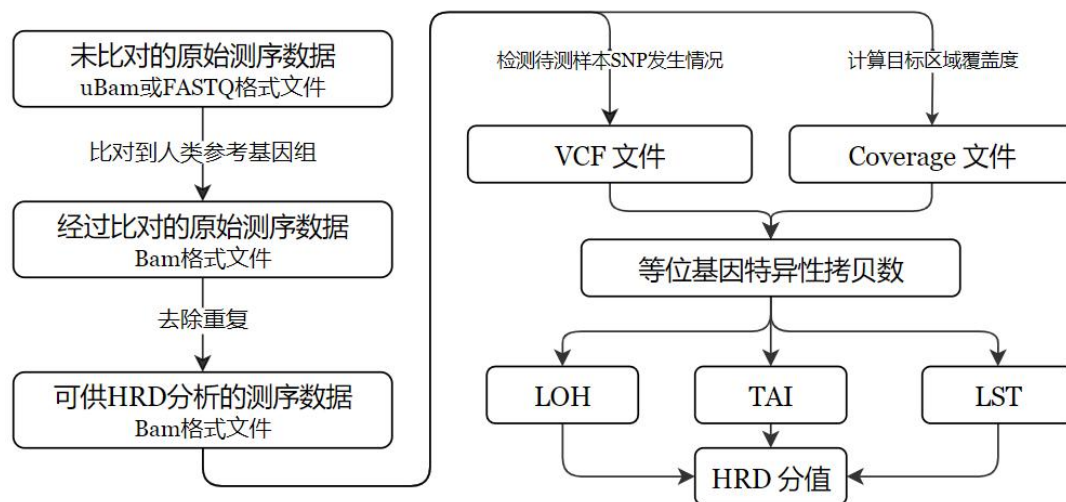


图1 基于杂交捕获测序的HRD检测技术的数据分析流程图

数据分析流程如下：

- 将原始下机数据比对到人类参考基因组（宜为 GRCh37.p13 或 hg19），得到比对后的 BAM 文件；
- 标记由于 PCR 过程中产生的过量扩增重复序列，得到用于后续分析的 BAM 文件；

注：也可以在标注重复序列后加入重比对、碱基质量值校正（Base Quality Score Recalibration, BQSR）等步骤。碱基质量值校正（BQSR），指建立统计模型，通过校准测序仪的系统误差来调整每个碱基的质量分数。
- 用变异检测软件（如 Mutect2、VarScan 等），对变异进行检测，得到样本的 SNPs 信息；

注：一般通过 SNP 位点实测突变频率，计算 B 等位基因频率（B allele frequency, BAF）。B 等位基因频率（BAF）表示每个捕获区域的中位 SNP 基因型频率。
- 一般情况下，在进行捕获区间覆盖度（Coverage）计算时，应考虑数据量偏差、探针捕获偏好性、序列 GC 含量等因素的影响，宜针对以上因素进行矫正（如归一化处理等）；
- 通过肿瘤样本覆盖度与正常样本覆盖度的比值信息，可以获得肿瘤细胞总拷贝数（total copy number）。在有/无配对的对照样本时，“正常样本覆盖度”的计算方法不同。在有对照样本，即“双样本”检测模式下，直接计算其对照样本的覆盖度；在无对照样本，即“单样本”模式下，应使用一定数量的正常样本建立参考集，构建覆盖度的基线（baseline），来代替其自身对照；

注：一般来说，肿瘤细胞总拷贝数（total copy number），通常以 LRR（Log R ratio）的形式来表达。LRR 表示肿瘤与正常对照样本中每个捕获区域中的归一化深度比，表征相对于正常对照样本的拷贝数变化情况。
- 根据步骤 c)~e) 得到的信息，计算肿瘤样本的等位基因特异性拷贝数（allele-specific copy number, nA 和 nB）；

注1：nA 表示 A 等位基因的拷贝数，nB 表示 B 等位基因的拷贝数。即，考虑肿瘤细胞的非整倍性和非抗体细胞浸润的影响，评估每个 SNP 位点上两个等位基因可能的缺失和重复的相对频率。

注2：nA 和 nB 的计算，会受肿瘤细胞含量的影响。例如，50% 的肿瘤细胞（假设 4 拷贝）与 50% 正常细胞（2 拷贝）混

合后，在数据层面，实际观察到的是一个3拷贝的信号。根据肿瘤样本基因组拷贝数和体细胞变异的等位基因频率，可以计算出肿瘤细胞和正常细胞混合的组织样本中，肿瘤样本的纯度和倍性。如，纯度计算可先根据BAF和LRR值进行基因组染色体的分段以及等位基因特异性拷贝数计算基因型；将整个基因组的染色体进行分段，属于相同基因型的片段进行聚类，即可确定准确的基因型簇，由此得到某个确定基因型的实际BAF；再根据某个确定基因型的理论拷贝数、理论BAF去校正计算肿瘤纯度。肿瘤样本整个基因组的倍性可以通过染色体每个片段的拷贝数的加权平均值计算。

- g) 基于步骤 f) 得到的信息，根据拷贝数信息对染色体进行分段，并根据其片段长度和等位基因信息，按如下要求，分别计算 LOH、TAI、LST 的分值：
- 1) LOH：长于一定阈值，短于整个染色体长度的、发生杂合性缺失的片段数量，宜选择大于 15 Mb 且小于整个染色体长度的杂合性缺失。应注意的是，杂合性缺失包括等位基因拷贝数中性杂合性缺失 (Copy-neutral loss of heterozygosity)；
 - 2) TAI：跨端粒、不跨着丝粒，长度满足一定阈值的等位基因不平衡区域数量，宜选择延伸到其中一个亚端粒但不超过着丝粒且大于 11 Mb 的等位基因不平衡的染色体片段；
 - 3) LST：两个相邻区域（一般情况下，两个区域长度均宜大于等于 10 Mb，且区域间距宜小于 3 Mb）之间的染色体断裂位点 (breakpoint) 的数量。
- h) 最终的 HRD 分值 (HRD score, 又称为 GIS) 取决于上述 LOH、TAI、LST 三个指标的结果。

注：LOH、TAI和LST等三个指标都有独特的定义，在一定程度上都能表示细胞HRD的程度。但相较单个指标，三者组合综合计算能更全面反映基因组瘢痕状态。FDA批准的HRD检测试剂Myriad myChoice® CDx中，通过三个指标相加的方式得到基因组不稳定评分 (genomic instability score, GIS)，并结合BRCA 1/2的致病性变异状态进一步评价HRD状态。

10.1.3 阳性判断值 (cutoff value) 设定

通过信息分析测定样本的LOH、TAI、LST这三个指标，再综合计算得到HRD分值。根据HRD分值的阳性判断值对结果进行阴阳性判定。HRD分值的阳性判断值应进行充分的研究，由HRD检测试剂及其配套的数据分析流程（或软件）共同验证得到，使用临床样本进行确认；并通过药效学临床试验，进一步验证其在不同癌种中的适用性。在后续应用实践中，应始终确保经验证的试剂和分析流程（或软件）的配套使用，否则应重新进行阳性判断值的验证。本HRD检测技术中的HRD分值阳性判断值设定，分为以下两个层面：

- a) 生物学层面的阳性判断值的确认：使用一定数量的已知 BRCA 基因失活状态的临床样本作为训练集，进行 BRCA 失活状态与 HRD 分值对应关系模型构建，BRCA 失活检测灵敏性宜至少达到 95%，划定对应的 HRD 分值，作为初步的生物学阳性判断值 (技术层面)，并对该模型进行验证；
- b) 临床药效学层面的阳性判断值的验证：以特定癌种中，有 PARP 抑制剂或铂类药物临床疗效信息的真实世界临床样本作为验证集（其中必须包括 PARP 抑制剂验证集），验证上述生物学阳性判断值能带来的药物反应预测效果，从而得到经临床疗效层面验证的阳性判断值。评价指标应依据相关药物临床试验的评价终点确定，药效学相关的主要评价指标、次要评价指标以及临床获益统计分析方法应与药物临床试验中的指标和统计分析方法保持一致。若使用 PARP 抑制剂药物临床试验剩余样本进行验证，检测项目的分层人群疗效应与药物临床试验结果不存在显著差异；若新收集样本进行药物疗效的观察性研究，则 HRD 阳性人群应能够从 PARP 抑制剂治疗中获益显著。若生物学阳性判断值通过验证，则可作为检测项目针对该特定癌种的最终阳性判断值；若需通过临床疗效结果进行调试，得到新的阳性判断值，则应在该特定癌种的新的临床疗效验证集中再次验证。

理论上，最终的阳性判断值经过上述两个步骤产生，但鉴于目前临床实践中PARP抑制剂使用的实际情况，在检测项目技术开发阶段，可能难以获得足够数量且符合要求的用药样本完成临床药效学层面的

阳性判断值验证。故在技术开发时，应首先完成生物学层面的阳性判断值研究，后期逐步完善临床药效学层面的验证，如与PARP抑制剂共同开展临床试验，按医疗器械监管要求完成伴随诊断试剂注册申报等。

10.2 质控要求

10.2.1 通则

本文件10.2.2~10.2.5应在同一次检测中同时满足，否则结果视为无效，应重新检测。

10.2.2 数据质控

检测样本的测序数据预处理后得到的BAM文件应满足以下数据质控指标要求：

a) 测序质量值 Q30 (%) 不低于 80%；

b) 基因组比对率不低于 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) HRD 探针的捕获特异性 (捕获效率) 不低于 45%；

d) 有效平均覆盖深度应达到性能确认时建立的标准。宜满足：

1) 检测肿瘤 (癌) 组织样本的有效平均覆盖深度不宜低于 150X；

2) 检测配对样本 (正常组织或外周血) 的有效平均覆盖深度不宜低于 100X。

注：有效平均覆盖深度 (effective average depth of coverage)，指高通量基因测序结果中，去除重复序列后基因组上待测目标区域中所有位点的平均覆盖深度。“高通量基因测序结果”的定义见GB/T 35537—2017，3.1.1。“平均覆盖深度”的定义见GB/T 30989—2014，3.32。

10.2.3 阴性质控品

阴性质控品检测结果应为阴性。

宜使用已通过其他方法 (如SNP-array或WGS) 检测，确定不会为阳性的阴性标准品或临床样本。除HRD总分值较低、确保为阴性外，LOH、TAI、LST三个相关指标单独的分值宜都在较低的分数区间。

10.2.4 阳性质控品

阳性质控品检测结果应为阳性。

宜使用已通过其他方法 (如SNP-array或WGS) 检测，确定为阳性的标准品或临床样本。除HRD总分值较高、确保为阳性外，LOH、TAI、LST三个相关指标单独的分值宜都在较高的分数区间。

10.2.5 待测样本

满足数据质控要求，分析LOH、TAI及LST分值，根据结果综合计算输出HRD分值。

10.3 结果描述及判定

10.3.1 通则

根据设定的阳性判断值 (cutoff value) 进行检测项目的结果判定。若检测项目的阳性判断值未经过临床药效学层面验证，则判定结果仅体现为检测项目技术层面分析性能本身的结果，仅能代表技术层面的HRD阴阳性划分；检测结果临床上以LDT的形式参考使用，不代表具有临床上伴随诊断层面与药效关联性的推荐意义。技术层面确定的阳性判断值宜进一步完成临床药效学层面验证，在具体癌种及具体药物中针对性开展，得到最终可用于临床药效结果预测的阳性判断值。

10.3.2 阴性判定

对于通过质控的待测样本，若分析得到的HRD分值 $<$ cutoff value，则判定为检测结果阴性。

10.3.3 阳性判定

对于通过质控的待测样本，若分析得到的HRD分值 \geq cutoff value，则判定为检测结果阳性。

11 检测方法的局限性

11.1 肿瘤样本降解严重或交联严重，用于建库的 DNA 有效片段较少时，最终有效平均覆盖深度未达到质控要求，可能导致 HRD 检测失败。

11.2 肿瘤样本中肿瘤细胞含量未达质控要求，无足够的杂合性位点可用于分析时，可能导致 HRD 检测失败。

11.3 在使用配对样本进行“双样本”检测时，应使用自身对照进行 HRD 检测；若使用单肿瘤组织样本进行“单样本”检测，应在检测项目分析性能研究中评估参考集的饱和度和性染色体对于检测的影响。

11.4 LOH、TAI 和 LST 的计算结果与 HRD 检测试剂和使用的生信分析流程相关，三指标定义相同的情况下，不同检测项目的分析结果亦可能产生一定的差异。目前 LOH、TAI、LST 的长度阈值，在专家共识中已有推荐，但实际可能受具体检测项目 HRD 捕获区域的影响，因此检测项目应进行方法学性能确认。

11.5 不同癌种、药物和检测项目均可能引起 HRD 分值的阳性判断值的差异。具体检测项目的阳性判断值应首先在技术层面分析性能确认时建立，若未经药效学层面验证，检测结果临床上以 LDT 的形式参考使用。宜通过具体癌种和药物的药效学研究进行阳性判断值的验证。

参 考 文 献

- [1] GB/T 18457—2015 制造医疗器械用不锈钢针管
- [2] GB/T 27025—2019 检测和校准实验室能力的通用要求
- [3] GB/T 35537—2017 高通量基因测序结果评价要求
- [4] GB/T 38576—2020 人类血液样本采集与处理
- [5] YY/T 0980.1—2016 一次性使用活组织检查针第1部分：通用要求
- [6] SZDB/Z 91—2014 人类样本库建设与管理规范
- [7] SZDB/Z 186—2016 用于高通量测序研究的人类血液样本采集、处理、运输和储存规范
- [8] 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
- [9] T/SZGIA 2—2018 人类全基因组遗传变异解读的高通量测序数据规范
- [10] T/SZGIA 3—2018 植入前胚胎遗传学高通量测序检测技术规范
- [11] CLSI MM17-ED2:2018 Validation and Verification of Multiplex Nucleic Acid Assays, 2nd Edition
- [12] 上皮性卵巢癌PARP抑制剂相关生物标志物检测的中国专家共识（2020版）
- [13] 同源重组修复缺陷临床检测与应用专家共识（2021版）
- [14] 体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则-参考值(参考区间)，2019，附件10
- [15] 临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识（2017版）
- [16] 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）
- [17] 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南（试行）（2015版）
- [18] 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）
- [19] 徐超，刘容枝. 体外诊断试剂阳性判断值或参考区间研究解析[J]. 中国医疗器械杂志. 2021, 45(3):330-334.
- [20] 季加孚等. 肿瘤组织标本库常用实验技术手册. 科学出版社
- [21] R. E. Miller, A. Leary, C. L. Scott, et al. ESMO recommendations on predictive biomarker testing for homologous recombination deficiency and PARP inhibitor benefit in ovarian cancer[J]. Annals of Oncology, 2020, 31(12):1606-1622.
- [22] Watkins JA, Irshad S, Grigoriadis A, et al. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers[J]. Breast Cancer Res. 2014, 16:211.
- [23] Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). 2013, 4:271-273.
- [24] Caitlin A. Nichols, William J. Gibson, Meredith S. Brown, et al. Loss of heterozygosity of essential genes represents a widespread class of potential cancer vulnerabilities[J]. Nature Communications. 2020, 11:2517.
- [25] Popova, T., E. Manie, G. Rieunier, et al. Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation[J]. Cancer Res. 2012, 72(21):5454-62.
- [26] REGULATION (EU) 2017/746 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU
- [27] Abkevich, V., K. M. Timms, B. T. Hennessy, et al. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer[J]. Br. J. Cancer. 2012, 107(10):1776-82.

[28]Birkbak, N. J., Z. C. Wang, J. Y. Kim, et al. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents[J]. *Cancer Discov.* 2012, 2(4):366 - 75.

[29]Timms KM, Abkevich V, Hughes E, et al. Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes[J]. *Breast Cancer Res.* 2014, 16(6):475.

[30]SUMMARY OF SAFETY AND EFFECTIVENESS DATA (SSED): Myriad myChoice® CDx. Premarket Approval Application (PMA) Number: P190014. Date of FDA Notice of Approval: October 23, 2019. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf19/P190014B.pdf

[31]Michael Lo, Zhenman Fang, Jie Wang, et al. Algorithm-Hardware Co-design for BQSR Acceleration in Genome Analysis ToolKit[J]. *IEEE Computer Society.* 2020, 157-166.

[32]Leandro de Araújo Lima, Kai Wang. PennCNV in whole-genome sequencing data[J]. *BMC Bioinformatics.* 2017, 18:383.

