

ICS 01.040.11

C 30

# T/GDPMAA

## 广东省精准医学应用学会团体标准

T/GDPMAA 0012—2023

### 高通量基因测序项目分类

The Classification Criteria of High Through-put Gene Sequencing Projects

(发布稿)

(本稿完成时间: 2023-6-7)

2023-7-22 发布

2023-7-22 实施

广东省精准医学应用学会 发布



广东省精准医学应用学会 (GDPMAA) 是广东省组织开展精准医学学术交流、国际交流、人才培养、出版刊物、科技创新、产学研相结合等活动的省级社会团体。制定广东省精准医学应用学会标准 (以下简称: 粤精准医标准), 满足企业需要, 推动企业标准化工作, 是广东省精准医学应用学会的工作内容之一。中国境内的团体和个人, 均可提出制、修订粤精准医标准的建议并参与有关工作。

粤精准医标准按《广东省精准医学应用学会团体标准管理办法(试行)》进行制定和管理。

粤精准医标准草案经向社会公开征求意见, 并得到参加审定会议的75%以上的专家、成员的投票赞同, 方可作为粤精准医标准予以发布。

考虑到本标准中的某些条款可能涉及专利权, 广东省精准医学应用学会不负责对其任何专利权的鉴别。

在本标准实施过程中, 如发现需要修改或补充之处, 请将意见和有关资料寄给广东省精准医学应用学会, 以便修订时参考。

---

---

该标准为广东省精准医学应用学会制定, 其版权为广东省精准医学应用学会所有。除了用于国家法律或事先得到广东省精准医学应用学会文字上的许可外, 不许以任何形式再复制该标准。

广东省精准医学应用学会地址: 广东省广州市越秀区天河路 45-21 号

邮政编码: 510075 电话: 020-87001157 传真: 020-87001157

网址: [www.gdpmaa.com](http://www.gdpmaa.com) 电子信箱: [pm@gdpmaa.com](mailto:pm@gdpmaa.com)

---

---



## 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 缩略词 .....	3
5 高通量基因测序项目的综述 .....	3
6 高通量基因测序项目分类 .....	4
6.1 核酸提取项目及其分类 .....	4
6.2 样本采集项目及其分类 .....	5
6.3 测序项目及其分类 .....	5
7 高通量基因测序检测项目的技术分类 .....	7
7.1 样本准备 .....	7
7.2 测序文库构建 .....	7
7.3 测序 .....	8
7.4 数据分析 .....	9
7.5 结果报告和咨询 .....	9
7.6 质量控制 .....	10
8 高通量基因测序在肿瘤领域的应用分类 .....	10
8.1 DNA 测序 .....	10
8.2 RNA 测序 .....	13
9 高通量基因测序在遗传领域中的应用分类 .....	13
9.1 组织 DNA 测序 .....	13
9.2 单细胞 DNA 测序 .....	15
9.3 细胞外游离 DNA 测序 .....	16
10 高通量基因测序在感染与微生物领域的应用分类 .....	17
10.1 病原宏基因组下一代测序 .....	17
10.2 病原靶向下一代测序 .....	19
11 高通量基因测序在临床其它领域的应用 .....	19
11.1 药物基因组学的临床检测 .....	19
11.2 移植配型 .....	20
11.3 白血病的诊断 .....	20
参 考 文 献 .....	21

## 前 言

本标准按GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

本标准由广东省精准医学应用学会提出并归口。

本标准起草单位：中山大学孙逸仙纪念医院、中山大学附属第一医院、中山大学附属第三医院、南方医科大学珠江医院、南方医科大学南方医院、广东省人民医院、广州医科大学附属第一医院、广州医科大学附属第二医院、暨南大学附属第一医院、广东省中医院、广东省公共卫生研究院、因美纳（中国）科学器材有限公司、北京泛生子基因科技有限公司、北京贝瑞和康生物技术有限公司、深圳华大基因股份有限公司、广州达安基因股份有限公司。

本标准主要起草人：

欧阳能太、廖健伟、杨剑锋、章钧、周宏伟、柯尊富、侯铁英、郑磊、刘世霆、黄宪章、刘艳辉、陆元志、蔡贞、林勇平、熊丽、张凤玲、赵智贤、蒋析文、陈定强、莫立乾、李淑华、段朝晖、周强、姜萍萍、钟晶、曾凡薇、栗东芳、殷晓燕、李沛志、梁蕊、罗镇明、马山、梁志坤、周建文、石永杰、何群、张婉君。

本标准是首次制订。

## 引 言

随着精准医学的发展,作为精准医学领域核心技术的高通量基因测序(又称二代测序、下一代测序、NGS)技术近些年来逐渐兴起,已越来越广泛地应用于临床实践,特别是在肿瘤个体化治疗、遗传性疾病、感染性疾病和药物基因组学等多个领域已取得了长足的进步。

高通量基因测序的平台、技术、产品,也得到了长足发展,呈纷繁复杂之势。但对于高通量测序的项目分类,目前还没有统一标准。

高通量基因测序项目分类的缺失,不利于政府监管部门对这一新技术进行的分类监管,不利于推进技术规范应用;不利对于高通量检测进行分类的成本核算,不利于定价机制的合理形成;不利于研发企业部署产品研发线路,研发新技术、新产品。

因此,为了推进、规范和促进高通量基因测序技术应用,我们亟需规范对高通量基因测序检测项目在临床应用上的分类,并明确有关类别,从而推动相关技术的价格形成机制研究,明确相关项目的定价逻辑和定价参考标准,为行业内的应用方、研发方等提供清晰的指引,助力提升医疗保障水平。

# 高通量基因测序项目分类

## 1 范围

本标准规定了高通量基因测序检测项目在临床应用中的分类原则和分类类别。

本标准适用于规范高通量基因测序检测在临床应用中的分类,指导有关高通量基因测序检测在临床应用中的研发、定价和推广。

本标准适用于临床医学领域中涉及高通量基因测序项目研发和应用的医疗卫生机构、第三方检测机构、技术研发企业等。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 29859-2013 生物信息学术语

GB/T 34798-2017 核酸数据库序列格式规范

GB/T 35890-2018 高通量测序数据序列格式规范

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

T/GDPMAA 0004-2020 基于孕妇外周血浆游离DNA高通量测序无创产前筛查胎儿基因组病技术标准

## 3 术语和定义

### 3.1

#### 高通量测序 (High-throughput sequencing)

也称为下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS),指通过大规模平行测序等技术对包括人类外显子或者全基因组序列等进行测序,同时产生数千条至数百万条测序片段,然后通过生物信息处理与标准参考基因组序列比对等,得到序列变异、融合、拷贝数变异(copy number variants, CNV) 等信息。

### 3.2

#### 全基因组测序 (Whole genome sequencing, WGS)

对人类基因组的全序列进行测序,包含基因外显子区域与非编码区域。

### 3.3

#### 外显子组测序 (Whole exome sequencing, WES)

指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。目前,全外显子测序已应用于单基因遗传病疾病、复杂罕见病、肿瘤用药指导等。

### 3.4

#### 靶向测序 (Targeted sequencing / Target region sequencing)

指针对某一类疾病(或表型)已知的致病基因及关联基因或已知的驱动基因或抑癌基因或已知的致病性病原微生物基因或耐药基因对应的序列进行高通量测序检测。靶向测序包含除全基因组测序外的其他目标区域测序。

## 3.5

**实体瘤靶向测序 (Targeted sequencing of solid tumor)****3.5.1 肿瘤大 panel 测序 (Large solid tumor gene panel)**

指实体瘤相关的驱动基因或抑癌基因, 重要信号通路基因对应的序列进行高通量测序检测, 该检测同时需要满足肿瘤突变负荷 (Tumor mutation burden, TMB) 检测要求: 检测范围包含 300 个以上基因且检测 panel 编码区域大于等于 1.0Mb。

**3.5.2 中 panel 测序 (Medium solid tumor gene panel)**

指检测范围在 100-300 个实体瘤相关的驱动基因或抑癌基因, 重要信号通路基因对应的序列进行高通量测序检测。

**3.5.3 小 panel 测序 (Small solid tumor gene panel)**

指检测范围在  $\leq 100$  个实体瘤相关的驱动基因或抑癌基因对应的序列进行高通量测序检测。

**3.5.4 肿瘤循环 DNA 测序 (Circulating tumor DNA sequencing)**

通过高通量测序技术针对血液中游离的肿瘤 DNA 片段进行测序, 获取肿瘤的相关基因组信息。ctDNA 测序技术可以应用于肿瘤的早期诊断, 肿瘤精准用药指导, 耐药机制评估以及预后评估和复发监测。

## 3.6

**无创产前筛查 (Non-invasive prenatal testing, NIPT)**

针对胎儿 21、18、13 三体综合征, 通过母血浆中胎儿游离 DNA 片段进行高通量测序检测。

## 3.7

**基因组拷贝数变异测序 (Copy number variation sequencing, CNV-Seq)**

基于高通量测序的低深度全基因组测序, 针对不同样本来源 (如羊水、绒毛、脐带血、流产组织、外周血等) 进行染色体拷贝数变异检测。

## 3.8

**胚胎植入前非整倍体检测 (Preimplantation genetic testing for aneuploidies, PGT-A)**

指在接受辅助生殖技术治疗的患者中, 对胚胎滋养层细胞进行活检获取细胞利用高通量测序技术针对胚胎细胞进行染色体非整倍体检测, 选择性植入正常胚胎, 避免因异常胚胎造成的反复种植失败、反复流产、出生缺陷等。

## 3.9

**胚胎植入前染色体结构异常检测 (Preimplantation genetic testing for structural chromosomal rearrangements, PGT-SR)**

指在接受辅助生殖技术治疗的患者中, 对胚胎滋养层细胞进行活检获取细胞利用高通量测序技术针对胚胎细胞进行染色体结构异常进行检测。针对夫妻双方之一为染色体结构异常携带者。

## 3.10

**植入前单基因遗传病检测 (Preimplantation genetic testing for monogenic disorders, PGT-M)**

指在胚胎移植前, 对胚胎滋养层细胞进行活检获取细胞, 利用高通量测序技术针对胚胎细胞进行单基因遗传疾病的基因变异进行检测, 降低单基因病出生缺陷风险。

## 3.11

**宏基因组高通量测序 (Metagenomic next-generation sequencing, mNGS)**

指通过对临床样本中微生物和宿主核酸的测序分析, 无偏倚地检测多种病原微生物。

## 3.12

**测序深度 (Sequencing depth)**

指在一次测序实验中对特定基因组区域或整个基因组的测序覆盖度。通常以 $\times$ 倍为单位来表示, 如 $100\times$ 表示该基因组区域或整个基因组的碱基被测序 100 次。

### 3.12.1 平均测序深度 (Mean depth)

指针对所检测区域测序所得的碱基总数除以该区域的长度。

### 3.12.2 有效平均测序深度

指去重后的平均测序深度。

## 3.13

### 体细胞变异 (Somatic variant)

指肿瘤细胞中发生的基因组变异，是后天发生的，而不是遗传所得。

## 3.14

### 胚系变异 (Germline variant)

指存在于生殖细胞中的基因组变异，这种变异会遗传给后代。与体细胞变异不同，胚系变异发生在胚胎发育过程中，或者在父母的生殖细胞中。

## 4 缩略词

- cfDNA——游离脱氧核糖核酸(Cell free deoxyribonucleic acid)
- ctDNA——肿瘤循环脱氧核糖核酸 (Circulating tumor deoxyribonucleic acid)
- CNV——拷贝数变异 (Copy number variation)
- cPAS——联合探针锚定聚合 (Combinatorial probe-anchor synthesis)
- CV——变异系数 (Coefficient of variation)
- MSI——微卫星不稳定性 (Micro-satellite instability)
- NGS——下一代测序 (Next generation sequencing)
- PCR——聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)
- QC——质量控制 (Quality control)
- SBS——边合成边测序 (Sequence by synthesis)
- TMB——肿瘤突变负荷 (Tumor mutation burden)
- WES——外显子组测序 (Whole exome sequencing)
- WGS——全基因组测序 (Whole genome sequencing)
- mNGS——靶向宏基因组测序 (Metagenomic next generation sequencing)
- tNGS——靶向下一代测序 (Target next generation sequencing)

## 5 高通量基因测序项目的综述

自从人类基因组计划完成，下一代基因测序 (next generation sequencing, NGS) 或二代测序、高通量基因测序为代表的新型技术不断涌现，基于基因解码的精准医学在短期内得到了蓬勃发展。NGS项目可从临床应用、技术原理及样本类型等方面进行分类 (图 1)。其中，NGS 项目的临床应用主要包括以下几方面：

(1) 肿瘤：1.目的为靶向用药的检测，项目有实体瘤的几个基因、几十个基因到几百个基因的 panel，变异类型包括单碱基变异、小插入/缺失、大片段缺失/重复、拷贝数变异等，几百个基因的大 panel 还要求能报告肿瘤突变负荷 (tumor mutation burden, TMB)，测序深度通常设置为 1000×左右。另外，在组织不可及时也可以采用外周血检测 ctDNA，需要提升测序深度至 5000×左右；2.目的为肿瘤预后与诊断的检测，这方面比较复杂，通常采用中到大的 panel；3.目的为治疗后复发监测的检测，主要是 ctDNA-MRD 检测，需要超高测序深度，如几万至十万乘。

(2) 遗传与代谢：1.儿童遗传或代谢疾病的基因诊断，主要是胚系的基因检测，目前较常用的项目有中小 panel 基因、医学全外显子组 (约 4 千多基因) 和全外显子组 (2 万多基因) 检测，测序深度通常为 100×左右；2.无创产前筛查 (noninvasive prenatal testing, NIPT)，通过母亲外周血检测胎儿染色体

体非整倍体，主要是 21-三体、18-三体 and 13-三体，是通过全基因组层面超低深度测序而计算获得；3. 产前全外显子组检测，与儿童遗传全外相同，但因胎儿表型很难提取而致解读困难，适用范围需严格控制；4. 生殖领域胚胎植入前的遗传基因筛查与诊断。

(3) 病原微生物：临床最主要的应用项目是宏基因组测序和病原微生物靶向测序，包括 DNA 和 RNA 病原微生物，可不需要培养，直接从样本中提取核酸进行测序鉴定，在临床应用具有很大的优势。但由于很多样本中含有大量的人类基因组和定植菌，在结果解读时经验很重要。

(4) 其它领域：包括药物基因组学、白血病和移植配型等领域也已开始应用 NGS 技术进行更加全面的基因谱检测以指导临床诊疗。

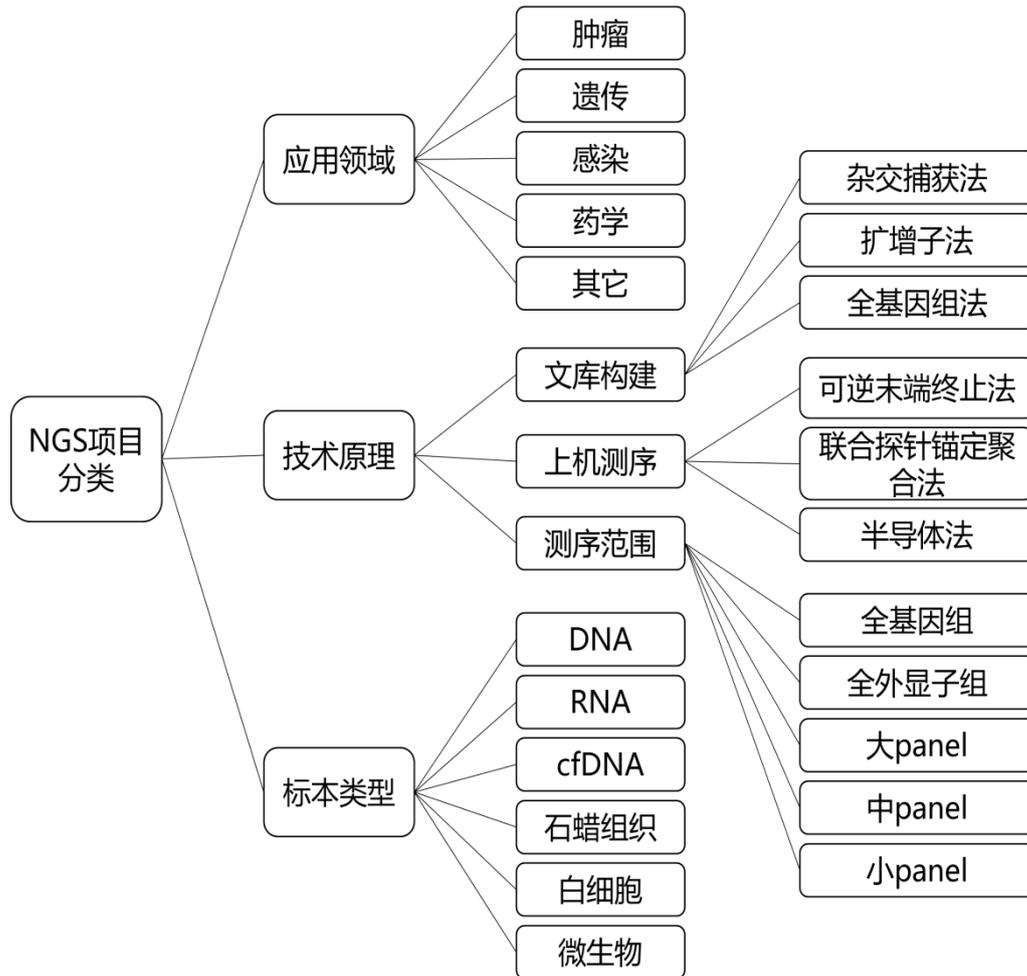


图 1 高通量基因测序项目分类原理示意图

## 6 高通量基因测序项目分类

高通量基因测序项目的各环节中，因应样本的差异、检测目标的差异，实际上在核酸提取、样本收集、生信及病理分析等步骤中存在较大差异，鉴于此，本标准将核酸提取、样本收集等环节单独作为高通量基因测序的大类项目先行划分，再对测序环节及分析环节进行项目分类归纳。

### 6.1 核酸提取项目及其分类

按照待提取核酸类型的不同，其提取工艺、技术、成本等将存在差异，建议分类如下：

表 1 核酸提取项目分类表

类型	提取工艺	备注
DNA	DNA 的提取制备	-
RNA	RNA 的提取制备	逆转录的步骤以及对 RNA 酶的预防
其它特殊类型核酸	宏基因组、表观修饰的 DNA 或 RNA、tRNA、或通过指定技术手段获得的基因组片段（如三维基因组等）	提取工艺的复杂程度须依据具体检测对象而定

对于核酸提取项目的收费标准，建议按上述项目差异进行分类区分，依据对应的核酸提取工艺的成本核算情况进行计算。

## 6.2 样本采集项目及其分类

按照待处理的样本类型，其采集工艺、技术、成本等将存在差异，建议分类如下：

表 2 样本采集项目分类表

类型	来源	采集及处理方式
胚系细胞	外周血白细胞、口腔上皮细胞等	抽血、口腔取样、毛发采集等
组织细胞	特定组织，包括正常组织和病变组织	手术、抽血等
游离核酸	外周血中的细胞外游离核酸	抽血或取腔隙体液+靶向富集
宏基因组	目标组织中的微生物菌群	-

对于样本采集项目的收费标准，建议按上述项目差异进行分类区分，依据对应的样本采集及处理工艺的成本核算情况进行计算。

## 6.3 测序项目及其分类

鉴于测序过程中，其检测范围与建库工艺相关联，其数据量、测序深度与测序通量对应的芯片规格相关联，同时其分析难度与具体分析要求相关联，因此我们建议，按测序的范围差异、数据量差异、数据分析要求差异等范畴进行分类。

对于测序环节的项目收费标准，建议按上述项目差异进行分类区分，X1/X2/Y/Z 代表不同分类要求的收费单价，依据对应的测序参数、工艺、分析需求等的成本核算情况进行计算。其中，全基因组测序范围最广，位点最多，宜按次为基准进行价格核算，靶向测序宜以位点进行价格核算；同时，根据数据量和测序深度的差异，宜按测序通量为基准进行价格核算；另外，人工数据分析方面包括质控、数据处理、病理分析等环节，宜在对应人力资源成本基础上按工时核算。项目分类结果详见以下表格。

表 3 高通量基因测序项目分类表

项目名称	应用领域	具体项目	按测序范围差异 (建库工艺差异)	按数据量/测序深度差异 (通量差异)	按数据分析要求差异 (含质控、序列数据处理、样本病理评估)
全基因组低数据量二代测序	染色体非整倍体、拷贝数变异筛查、拷贝数变异检测、病原微生物宏基因检测, 进行病原微生物鉴定	NIPT、PGT-A、NIPT plus、CNV-Seq、病原微生物宏基因组检测	全基因组测序 (按 X1/次收费)	(按 Y/G 数据量收费)	数据分析 (按 Z/小时收费)
全基因组高数据量二代测序	遗传性疾病全基因组检测、病变组织全基因组检测	诊疗明确相关特定基因、特定位点分析、罕见变异、复杂变异、染色体结构变异、突变谱等分析	全基因组测序 (按 X1/次收费)		
靶向小 panel 低数据量二代测序	目标组织的特异性基因检测, 须包含相关专业的临床生信分析	用药检测、单基因/多基因遗传位点检测、基因包检测、PGT-SR、PGT-M	靶向测序小 panel (<100 基因, 按 X2/位点收费)		
靶向小 panel 高数据量二代测序	细胞外游离 DNA 的临床诊疗相关基因检测, 须包含相关专业的临床生信分析	用药检测 (微创、无创取样)	靶向测序小 panel (<100 基因, 按 X2/位点收费)		
靶向中 panel 低数据量二代测序	目标组织的特异性基因检测, 须包含相关专业的临床生信分析	遗传病、肿瘤病理诊断	靶向测序中 panel(100-300 基因, 按 X2/位点收费)		
靶向中 panel 高数据量二代测序	目标组织的特异性基因检测, 须包含相关专业的临床生信分析	肿瘤病理诊断	靶向测序中 panel(100-300 基因, 按 X2/位点收费)		
靶向大 panel 高数据量二代测序	目标组织 (一般是肿瘤相关组织) 的特异性基因检测 (含 TMB), 须包含相关专业的临床生信分析	肿瘤病理诊断、外显子组测序	靶向测序大 panel (>300 基因 WES 等, 按 X2/位点收费)		

## 7 高通量基因测序检测项目的技术分类

高通量测序实验过程主要包括样本准备、测序文库构建、上机测序和数据分析四个步骤。针对需要解决的临床问题和测序目的，在送检样本类型、样本处理、文库构建方式、测序平台选择和参数要求、以及数据分析等步骤均有不同的需求。

### 7.1 样本准备

本部分实验的目的是从各种类型的送检样本中提取高质量和足够量的核酸以确保后续测序步骤的有效进行。

#### 7.1.1 样本类型

NGS 的临床应用领域广泛，根据需解决的临床问题，可测定各种类型样本，包括固定/新鲜组织、血液、尿液等各种体液、肺泡灌洗液、分泌物、脱落细胞等。

#### 7.1.2 样本预处理

根据具体的测序目的，有些类型的样本有特殊的采样或送检要求，或在进行核酸提取步骤前需经过适当的预处理步骤。如在进行肿瘤游离 DNA 高通量测序时，由于血浆中 ctDNA 含量极低，为减少有核血细胞分解释放细胞基因组 DNA 带来的干扰，建议使用专用的血浆游离 DNA 样本采集管；进行肿瘤组织高通量测序时，在处理样本前应先进行 HE 染色评估肿瘤细胞的含量，确保其中肿瘤细胞比例  $\geq 20\%$ ；如为石蜡组织切片，还需进行彻底脱蜡后再进行常规提取；在进行 mNGS 病原体高通量测序，对于胸腹水、引流液、或新鲜组织等高人源样本还应考虑去宿主以提高某些微生物检测的灵敏度；对于细胞壁较厚的病原体如分枝杆菌或真菌，需要用特殊的破壁方法。

#### 7.1.3 核酸提取

核酸提取方式主要分为溶液型抽提、柱式抽提和磁珠纯化法三类，实验室应充分评估各提取方式或试剂的性能，根据不同样本类型和测序目的选择不同的方式或试剂进行提取。例如，DNA 和 RNA 在理化性质上存在差异，通常采用不同的试剂盒分别提取 DNA 或 RNA；对于样本质量差，存在降解的样本（如 FFPE 样本）还需要选用商业试剂盒进行修复。

#### 7.1.4 核酸质量评估

提取后应对核酸质量进行验证，验证指标至少包括核酸完整性和得率。

## 7.2 测序文库构建

文库构建是将待测 DNA 分子连上特定的检测接头序列的过程，测序引物、分子标签及扩增引物等序列均以接头序列的形式固定在待测分子的 5'和 3'两端，制备好的高通量测序文库包括连有相应接头的一系列 DNA 片段。选择合适的文库构建方法可以避免上机样本出现较大偏倚，从而尽可能地减少测序误差。以 DNA 建库为例，建库流程一般包括核酸片段化、接头连接、分选纯化、文库扩增等环节。根据不同的测序目的，建库方式又可分为随机测序建库和目标区域测序建库。建库方式选择主要依据临床预期用途，具体见后续应用分类章节。

### 7.2.1 核酸片段化

核酸提取后需要对核酸进行片段化，以满足不同建库方式及不同测序策略需求。常用的片段化方法主要有机械打断法（超声打断、雾化等）和酶切法。

### 7.2.2 全基因组测序文库构建

全基因组测序（Whole Genome Sequencing, WGS）是指对生物体整个基因组序列进行测序，可

获得完整的基因组信息。全基因组测序采用随机建库策略，根据文库制备过程中是否需要进行 PCR 扩增富集，可分为含有 PCR 扩增和 PCR-free 两种文库制备方案。

应用场景：全基因组测序结果包含完整的基因信息，在鉴定单核苷酸变异、拷贝数变异、插入/缺失等变异类型具有优势。

### 7.2.3 目标区域测序文库构建

目标区域测序 (Target Region Sequencing, TRS) 是通过探针杂交捕获法或多重 PCR 方法将目标区域 DNA 富集后进行高通量测序的方法。该方法能够获得目标区域的遗传信息，可提高基因组中特定区域的检测效率，显著降低检测成本。

#### 7.2.3.1 探针杂交捕获

在全基因组文库基础上，基于碱基互补配对原理，设计合成核酸探针，对目标区域进行杂交富集后进行测序。根据目标区域的大小范围分为全外显子测序文库、几十到上千个基因外显子区域测序文库、突变热点区域测序文库。

应用场景：适合目标区域范围较大的测序策略，如：外显子组测序，大 panel 检测等。

#### 7.2.3.2 扩增子建库

设计多重 PCR 引物进行扩增富集目标区域并进行测序的技术。通常适用于检测几十到几千个位点，或几十 kb 以下的区域，成本较低。

应用场景：适合目标区域范围较小的测序策略，如 BRCA1/2 基因检测，几十个基因的突变热点检测等。

### 7.2.4 RNA 测序文库构建

相较于 DNA 文库构建，RNA 提取完成后首先需要通过随机引物和逆转录酶作用下逆转录成 cDNA，再进行下一步的文库构建。RNA 文库构建根据检测范围也分为转录组测序文库和目标区域测序文库。

### 7.2.5 文库质量评估

在高通量测序过程中，文库质量直接影响测序数据的准确性和完整性。完成文库构建后应对构建的文库进行质量评估。主要的文库质控指标为文库片段大小和文库浓度评估，除此之外，还应包括文库转化率、文库复杂度、均一性、准确性等。

## 7.3 测序

### 7.3.1 测序方法

目前主流的高通量测序技术包括可逆末端终止子测序技术、联合探针锚定聚合测序技术，以及离子半导体法测序技术。测序方法的选择主要取决于需解决的临床问题，结合测序通量、测序准确性、测度读长、测序周期、测序成本等综合考虑。

### 7.3.2 测序数据质量评价指标

测序数据的质量会影响下游数据分析，由于目前的高通量测序技术均有一定的错误率，因此在进行分析前需要对测序数据进行质量评价，并进行适当地过滤和筛选以提高数据质量。

**7.3.2.1 碱基质量值：**是衡量测序质量的重要指标，用于评估下机序列数的准确度，常以 Q20 和 Q30 表示。

**7.3.2.2 序列碱基分布和 GC 含量：**序列 GC 含量可以协助判断测序过程是否存在明显的序列偏向性。人类基因组 GC 含量为 40% 左右，如果测序原始数据 GC 含量出现较大偏离提示基因组中某些特定区域反复测序的几率高于平均水平，提示测序文库污染，或其他偏倚的存在。

**7.3.2.3 序列重复水平：**正常文库内序列的多样性水平很高，大多数的序列应该只出现一次。如果多次重复出现，提示存在一定程度的富集偏倚或测序文库污染。

## 7.4 数据分析

生物信息分析是对测序得到的原始序列进行数据分析和处理并得到分析结果的过程，对于 NGS 检测结果的准确性有决定性意义。目前尚没有标准化的生物信息学分析流程，实验室需根据预期检测目的，选择适合的软件、算法和生物数据库，根据检测方法特点及预期用途设立必要的质量控制标准，建立本实验室生物信息学分析流程，并进行性能验证。每个步骤都必须仔细评估数据处理的准确性和完整性，确保达到预期性能。

### 7.4.1 数据分析流程

一般包括原始测序数据预处理和质量控制、序列比对及变异识别、变异注释或物种鉴定、结果判定及报告几个关键步骤。

#### 7.4.1.1 原始测序数据质量评估和数据预处理

高通量测序产生的图像信息一般由相应测序平台提供的软件转化为原始序列数据，原始数据需要进行质量评估（主要指标参见 7.3.2），并进行标签识别、接头及低质量序列过滤、去除冗余重复序列等预处理。

#### 7.4.1.2 序列比对及变异识别

序列比对指通过生物信息学分析软件将测得序列与参考基因组进行比对，得到每一条序列在参考基因组上的位置信息，并完成排序。在去除重复序列（多重扩增子测序数据除外），进行必要的质控评估（如比对率、平均测序深度与测序深度均一性）后，可通过生物信息学分析对 SNV、Indel 等变异进行识别。实验室应有必要的数据质控并根据实验室建立的标准进行数据过滤，以减少假阳性和假阴性结果。变异识别的灵敏度取决于测序数据和参考数据的质量及所采用的算法。

#### 7.4.1.3 变异注释

比对分析后识别的变异数据需通过各种变异信息数据库对检出变异从不同层面进行注释，完成后继续分析和解读，通过注释信息获得变异位点的临床意义，锁定可能的致病变异来指导临床诊断和治疗。变异注释信息包括变异类型、变异位点与疾病关联注释、变异危害性预测等。注释信息应该按照标准命名法对检出变异进行统一命名注释列出，对变异的分类和注释也应遵循相关专业的指南或行业标准。

### 7.4.2 硬件及软件配置

#### 7.4.2.1 硬件需求

高通量测序检测产生数据规模庞大，信息分析计算高度复杂，实验室需配备高性能处理速度的计算机服务器确保完成批量样本的并行分析，并且需要根据实验室样本规模、数据存储要求、存储时间等保留有足够空间储存患者信息和序列数据。

#### 7.4.2.2 软件需求

生物信息分析各个流程均有多种算法，需要多种软件，目前尚无标准化的统一生物信息学分析流程。实验室需根据需求选择不同的开源软件、商业付费软件、自建软件等或构成软件组合用于各步骤分析。

#### 7.4.2.3 数据库

高通量测序的生物信息学分析的各个分析环节均需要借助相应的生物信息学数据库和分析工具。实验室需使用标准化数据对使用数据库的精确性和准确性进行评估，并持续跟踪数据库的更新，确保数据的准确性和可重复性。除利用公共数据库和商业数据库，实验室还有必要根据检测需求建立实验室内部数据库，如肿瘤体细胞变异检测数据库、宏基因组测序实验室的背景数据库、病原体解读数据库等。

#### 7.4.3 人员要求

生物信息学分析团队成员需具备生物信息学专业背景知识，熟悉各种数据分析软件的使用方法及功能，还应同时具有医学、分子生物学、临床实验室基本知识，并且视不同临床应用场景，包括具有遗传学、肿瘤学、临床微生物学或药理学相关专业背景知识团队成员。生物信息学分析团队应接受持续培训，能够及时更新知识，熟悉相关领域最新进展。

## 7.5 结果报告和咨询

高通量测序结果报告和解释也是保证检测质量的重要环节。报告中除应具备一般实验室报告的要素，还应包括特定信息，包括检测方法、关键质控信息、测序结果的报告和解释、进一步检测建议等。

实验室应根据各项专业指南的变异分级标准建立变异类型报告的标准和原则，报告中变异位点需符

合国际参考命名委员会制定标准，对检出变异根据临床意义进行分类描述，如引用参考文献进行结果解释，需要在报告单中注明参考文献来源。报告签发需要检测人、审核人、结果解读人员共同签字。必要时，针对遗传性肿瘤、肿瘤个体化用药、遗传变异等还需提供报告咨询服务和进一步检测的建议。

## 7.6 质量控制

高通量测序实验步骤繁多，流程复杂，影响因素多，实验过程处理不当极容易导致检测结果异常。为了确保整个实验工作流程的分析准确性，实验室应建立全面的质量控制体系。

### 7.6.1 全流程质量控制

对于不同临床应用目的和不同类型样本，测序平台和生物信息分析流程的检测能力存在差异。在应用到临床检测之前，必须首先完成从样本前处理到生物信息学分析整个检测系统全流程分析性能确认，至少应包括检测准确度、精密度、分析特异性、及临床性能确认等。临床性能确认通过患者人群研究得到，应包括临床敏感性，特异性，阳性预测值与阴性预测值。

### 7.6.2 室内质控

#### 7.6.2.1 NGS 质量控制要点

高通量测序实验全流程包括实验标本的预处理、核酸提取及其片段化、建库、扩增、靶序列富集、混样、测序前准备及测序，测序后的数据分析、对比、注释和结果报告等生物信息学分析流程。实验室应针对测序检测全流程的各个步骤建立质量控制指标及参数，其中关键质控点为：核酸样本的质量评估；文库构建的质量控制；测序数据的质量评价。实验室应建立检测全流程各步骤的质量控制指标及参数，测序流程各环节质量控制：见 7.1.4；7.2.5；7.3.2。

#### 7.6.2.2 室内质量控制

高通量测序日常检测中应设置弱阳性、阴性和无模板对照等质控品，与临床样本同批进行检测，以监测检测质量及当批临床样本检测的有效性。理想的弱阳性质控品应接近检测下限，实验室可根据检测项目和检测平台制定相应的可接受的质控标准，这是对实验室测定的即时性评价，在室内质量控制与改进中不可或缺。一旦出现失控，应分析失控原因，并采取相应的纠正和预防措施。

#### 7.6.2.3 室间质量评价

开展高通量测序的实验室应定期参加室间质量评价（EQA）或能力验证（PT），也可以采取实验室间比对以检测和评估检测结果的准确性和可比性，并保存室间质量评价或实验室室间比对记录，对不合格的结果应进行原因分析，并采取质量改进措施。

## 8 高通量基因测序在肿瘤领域的应用分类

### 8.1 DNA 测序

#### 8.1.1 正常细胞 DNA 测序

遗传性肿瘤检测针对的是个体体细胞中与肿瘤遗传性基因相关的胚系变异，这些发生致病性变异的基因可在家系中世代遗传，多数遗传性肿瘤为常染色体显性遗传。肿瘤遗传易感基因的测序是针对胚系细胞核DNA的测序。目前多种高发性的遗传性肿瘤已经有了比较明确的致病原因，比如与肠癌相关的遗传性疾病主要有Lynch综合征、家族性腺瘤性息肉病和黑斑息肉病（P-J综合征）；BRCA1/2基因致病性变异，使女性发生乳腺癌风险提高5倍，发生卵巢癌险提高10-30倍。但比较明确的肿瘤遗传易感基因数量有限，临床应用上主要为小panel靶向测序，可快速检测目前已知与遗传性肿瘤相关的基因变异情况，评估肿瘤遗传风险并指导家系管理和临床干预方案的制定。

1. 胚系基因杂交捕获 panel 测序
- 2) 项目名称：遗传性某癌种 X 基因胚系检测（X 为基因数量）；
- 3) 核酸类型：DNA；

- 4) 样本类型: 外周血、唾液、口腔拭纸等;
- 5) 测序项目分类: 小 panel 低数据量二代测序;
- 6) 基本技术要求:
  - A. 检测范围和局限性: 检测突变类型包括点突变、片段插入或缺失、基因拷贝数变异、结构变异等。检测项目所覆盖的基因和突变形式根据 panel 需求而定, 应明确检测范围内可检测的区域及 panel 的临床用途, 说明检测局限性等;
  - B. 测序深度: 使用不同的测序平台、不同的文库构建方法, 对测序深度也有不同的要求。推荐平均测序深度  $\geq 100\times$ ;
- 7) 临床应用说明: 适用于针对特定目标基因变异、插入/缺失、拷贝数变异或基因重排的检测。

## 2. 胚系基因多重扩增 panel 测序

- 1) 项目名称: 遗传性某癌种 X 胚系基因检测 (X 为基因数量);
- 2) 核酸类型: DNA;
- 3) 样本类型: 外周血、唾液、口腔拭纸等;
- 4) 测序项目分类: 小 panel 低数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求:
  - A. 检测范围和局限性: 检测突变类型包括点突变、片段插入或缺失、结构变异等。检测项目所覆盖的基因和突变形式根据 panel 需求而定, 应明确检测范围内可检测的区域及 panel 临床用途, 说明检测局限性等;
  - B. 测序深度: 使用不同的测序平台、不同的文库构建方法, 对测序深度也有不同的要求。推荐平均测序深度  $\geq 100\times$ ;
- 6) 临床应用说明: 适用于针对特定目标的基因变异、插入/缺失或基因重排的检测。

## 8.1.2 肿瘤组织 DNA 测序

### 8.1.2.1 组织 DNA 全基因组测序

肿瘤全基因组测序为组织DNA随机测序, 目前临床应用较少, 本章节不作讨论。

### 8.1.2.2 组织 DNA 杂交捕获测序

#### 1. 肿瘤外显子组测序

目前临床应用较少, 本章节不作讨论。

#### 2. 杂交捕获大panel测序

- 1) 项目名称: 实体瘤X基因检测 (X为基因数量);
- 2) 样本类型: 新鲜的手术组织、穿刺组织、组织包埋石蜡块或石蜡切片等;
- 3) 核酸类型: DNA;
- 4) 测序项目分类: 大panel高数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求:
  - A. 检测范围: 检测项目所覆盖的基因和突变形式根据 panel 需求而定, 应明确检测范围内可检测的区域及 panel 临床用途, 说明检测局限性等; 检测突变类型包括点突变、片段插入或缺失、基因重排、基因拷贝数变异等, 还应覆盖肿瘤突变负荷 (TMB)、微卫星不稳定性 (MSI) 等基因组 biomarker。TMB 检测准确性与 panel size 相关, 要求检测 panel 编码区域大于等于 1.0Mb;
  - B. 样本要求及测序深度: 选取肿瘤组织样本进行高通量检测时, 需先评估其肿瘤细胞含量, 推荐组织样本中肿瘤细胞含量应达到 20%以上。使用不同的测序平台、选用不同的文库构建方法, 对测序深度也有不同的要求, 中国肿瘤驱动基因分析联盟(CAGC)专家共识建议, 对肿瘤细胞核 DNA 标本的高通量有效平均测序深度应达到  $500\times$ 以上;
- 6) 临床应用说明: 肿瘤大 panel 除囊括目前国内外获批的具有明确诊断、治疗价值的基因变异和正在开展临床试验的药物相关靶点基因外, 还提供肿瘤信号通路相关基因和 DNA 错配修复相关基因的变异信息, 以及与免疫治疗疗效预测相关的 TMB、MSI 等评估。

#### 3. 杂交捕获中小panel测序

- 1) 项目名称: 某癌种X基因检测 (X为基因数量) (可写出具体基因), 命名举例: 人 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因检测 (也可命名肺癌4基因检测);
- 2) 样本类型: 新鲜的手术组织、穿刺组织、组织包埋石蜡块或石蜡切片等;
- 3) 测序项目分类: 小panel低数据量二代测序;
- 4) 核酸类型: DNA;

- 5) 基本技术要求:
  - A. 检测范围及局限性: 根据需求而定, 应明确检测范围内可检测区域及不覆盖区域。根据设计目的分析点突变、CNV、结构变异等, 无法完成设计目标以外的检测;
  - B. 样本要求及测序深度: 选取肿瘤组织样本进行高通量检测时, 需先评估其肿瘤细胞含量, 推荐组织样本中肿瘤细胞含量应达到20%以上。使用不同的测序平台、选用不同的文库构建方法, 对测序深度也有不同的要求, CAGC专家共识建议, 对肿瘤细胞核DNA标本的高通量有效平均测序深度应达到500×以上。
- 6) 临床应用说明: 适用于针对特定设计目标的基因变异、缺失、重复或基因重排检测。具体实验方案、分析方式、检测范围等需根据设计方案确定;

### 8.1.2.3 组织 DNA 多重扩增测序

#### 1. 多重扩增大panel测序

多重扩增子建库在肿瘤大panel应用较少, 本章节不作讨论。

#### 2. 多重扩增中小panel测序

- 1) 常用名称: 某癌种 X 基因检测 (X 为基因数量);
- 2) 样本类型: 新鲜的手术组织、穿刺组织、组织包埋石蜡块或石蜡切片;
- 3) 核酸类型: DNA;
- 4) 测序项目分类: 小 panel 低数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求:
  - A. 检测范围和局限性: 检测项目所覆盖的基因的特定突变类型, 应明确检测范围内可检测的区域及 panel 临床用途, 说明项目局限性等;
  - B. 测序深度: 选取肿瘤组织样本进行高通量检测时, 需先评估其肿瘤细胞含量, 推荐组织样本中肿瘤细胞含量应达到 20%以上。使用不同的测序平台、选用不同的文库构建方法, 对测序深度也有不同的要求, 《基于下一代测序技术的 BRCA 基因检测流程中国专家共识》中推荐, 基于扩增子建库方法对肿瘤 BRCA 基因 NGS 检测的平均测序深度应达到 1000×以上;
- 6) 临床应用说明: 适用于针对特定目标基因变异、插入/缺失或基因重排的检测。具体实验方案、分析方式、检测范围等需根据特定的临床用途确定。

### 8.1.3 体液游离 DNA 测序

#### 8.1.3.1 游离 DNA 随机测序

目前临床应用较少, 本章节不作讨论。

#### 8.1.3.2 游离 DNA 片段杂交捕获测序

##### 1. 杂交捕获大 panel 测序

- 1) 常用名称: 泛癌种 X 基因 ctDNA 检测 (X 为基因数量);
- 2) 样本类型: 血液、尿液、脑脊液、胸腔积液等;
- 3) 核酸类型: cfDNA 或 ctDNA;
- 4) 测序项目分类: 大 panel 高数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求:
  - A. 检测范围和局限性: 检测项目所覆盖的基因和突变形式根据 panel 需求而定, 应明确检测范围内可检测的区域及 panel 临床用途, 说明项目局限性等;
  - B. 测序深度: 使用不同的测序平台、选用不同的文库构建方法, 对测序深度也有不同的要求, CAGC 建议 cfDNA 有效测序深度 $\geq 1000\times$ , 目标区域覆盖度 $\geq 80\%$ ;
- 6) 临床应用说明: 适用于用药指导、预后分析、耐药机制评估等, 具体实验方案、分析方式、检测范围等需根据特定的临床用途确定。

##### 2. 杂交捕获中小 panel 测序

- 1) 常用名称: 某癌种 X 基因 ctDNA 检测 (X 为基因数量);
- 2) 样本类型: 同上;
- 3) 核酸类型: 同上;
- 4) 测序项目分类: 中小 panel 高数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求: 同上;

- 6) 临床应用说明：同上。

## 8.2 RNA 测序

### 8.2.1 实体肿瘤细胞 RNA 测序

#### 1. 转录组测序

目前临床应用较少，本章节不作讨论。

#### 2. 指定区域测序

- 1) 常用名称：某某融合基因测序，命名举例：某肿瘤融合基因检测；ALK/ROS1基因检测；
- 2) 样本类型：新鲜的手术组织、穿刺组织、组织包埋石蜡块或石蜡切片等；
- 3) 核酸类型：RNA；
- 4) 测序项目分类：中小 panel 高数据量二代测序；
- 5) 测序方式：根据需求设计并定向获取少量特定cDNA片段后行NGS测序；
- 6) 基本技术要求：检测范围及局限性：检测panel一般包含几个或几十基因，基于RNA水平检测多种基因融合变异，包括已知和未知变异类型，实际panel应明确检测范围内可检测区域及不覆盖区域，根据设计目的分析区域内特定变异等，无法完成目标变异以外的检测；RNA比较容易降解，对样本和实验技术要求较高；
- 7) 临床应用说明：适用于针对特定设计目标的基因融合检测。具体实验方案、分析方式、检测范围等需根据设计方案确，适用于临床诊断和靶向治疗。

## 9 高通量基因测序在遗传领域中的应用分类

鉴于RNA测序在目前临床遗传领域应用较少，本章节中仅讨论DNA测序。

### 9.1 组织 DNA 测序

#### 9.1.1 组织 DNA 随机测序

##### 1. 组织DNA随机测序 (<1×) -基因组拷贝数变异测序

- 1) 常用名称：基因组拷贝数变异测序 (Copy Number Variation Sequencing)，简称：CNV-Seq
- 2) 样本类型：血液、肌肉、骨骼、羊水等各类含完整DNA的组织细胞；
- 3) 核酸类型：DNA；
- 4) 测序项目分类：全基因组低数据量二代测序；
- 5) 基本技术要求：以全基因组为检测范围，测序深度、有效数据量、覆盖度、测序质量等相关质控数据能够达到产品说明书标称的检测需求；供应商需提供相应分析软件，并给出常见CNV异常的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值等参考指标；
  - A. 检测范围：一般用于23对染色体的非整倍体、500kb以上的拷贝数变异以及30%以上的染色体非整倍体嵌合的检测；
  - B. 检测局限性：
    - ① 无法检测基因组整体拷贝数变化，如三倍体和多倍体、单亲二体等，对重复区域的CNV亦无法准确检测；
    - ② 无法检测染色体结构异常，如相互易位、倒位等；也无法区分游离型三体 (例如47,XX,+21) 和易位型三体 (例如46,XX,der(14; 21))；
    - ③ 无法准确鉴定嵌合体比例。相同片段缺失、重复嵌合时，无法准确判断异常比例。如47,XXX与45,X两种细胞嵌合时，若比例为各占50%，则CNV-seq检测结果准确；
    - ④ 由于覆盖度不均匀等原因，检测结果存在假阳性或假阴性的可能性，需验证；
- 6) 临床应用说明：
  - A. 适用于产前诊断、流产物查因、儿童发育迟缓/智力低下 (DD/ID)、自闭症 (ASD)、多发畸形 (MCA) 等疑似存在染色体拷贝数变异情况的明确诊断；

- B. 产前诊断、流产物查因等存在混合样本风险的检测时，需使用短串联重复序列(short tandem repeat, STR)分型等技术确认样本来源和单一性之后，再进行CNV检测；
- C. 受基因组结构的影响，CNV Seq技术对于CNV的检测无法精确到具体的长度范围，故不能以片段长度确定能否检测。对于基因组结构合适的区域，适当深度的CNV seq技术也能检测到500kb以下乃至100kb的CNV，但无法简单评价可靠性，且多数临床意义不明确，故不作要求；
- D. 检测过程由实验室技术人员完成，人员和时间需求根据设备、试剂需求而定。分析过程由技术人员和临床医师共同完成，推荐按照国际、国内指南或团标等相应分析流程进行。阳性结果分析时需充分查阅相关文献及数据库资料并汇总，每组分析人员（初级技师+中级技师+中级临床医师）分析阳性病例的数量建议不多于8个/天；检测报告中签名人员至少应包含实验人员、审核人员及临床分析人员。建议由临床参与分析的医务人员提供咨询。

## 2. 组织DNA随机测序 (> 40×) -全基因组测序

- 1) 常用名称：全基因组测序 (Whole Genome Sequencing)；简称：WGS；
- 2) 样本类型：血液、肌肉、骨骼、羊水等各类含完整DNA的组织细胞；
- 3) 核酸类型：DNA；
- 4) 测序项目分类：全基因组高数据量二代测序；
- 5) 基本技术要求：以全基因组为测序范围，平均深度 $\geq 40\times$ ；有效数据量、覆盖度、测序质量等相关质控数据能够达到产品说明书标称的检测需求；
  - A. 检测范围：外显子及内含子区变异（包括点突变、50bp以内插入/缺失），线粒体基因变异（包括点突变、20bp以内插入/缺失），染色体数目异常及断点位于非重复区的特定位置的缺失/重复变异，及部分大片段的缺失/重复变异；
  - B. 检测局限性：
    - ① 无法准确检测涉及高度重复或同源的基因组区域，如染色体着丝粒区、异染色质区、端粒亚端粒区、同源基因区域等；
    - ② 高GC区域因覆盖度较低，容易造成结果不准确；由于覆盖度不均匀等原因，检测结果存在假阳性或假阴性的可能性，仅能作为筛查用途，结果需一代测序等合适方案验证；
    - ③ 线粒体检测时无法避免基因组同源区测序结果的干扰、亦无法明确线粒体的异质性现象；故仅能作为筛查用途，结果需验证，必要时需采用定量检测方法确认；
    - ④ 无法检测罗氏易位、环状染色体等重复序列连接的结构变异；
- 6) 临床应用说明：
  - A. 测序深度低于外显子组测序 (WES)，适用于CMA、WES或基因包检测不足以满足检测需求，且又怀疑患者全部或部分症状由遗传变异所引起，如怀疑基因变异位于内含子深处等。不适用于怀疑存在基因印迹疾病、目标疾病致病基因存在高度同源区域等情况。因测序深度较低，阳性结果需要进一步验证。CNV分析时，如恰好测通了CNV的断点位置，则相对可靠；其他CNV则需要通过区间reads数计数分析来计算，与基因组拷贝数变异测序的原理一致，适用于大片段CNV的分析，小片段CNV检测可靠性尚缺乏全面样本验证，且因测序分布不均匀、无法准确界定能否准确检测的分界片段大小。
  - B. 检测过程由实验室技术人员完成，人员和时间需求根据设备、试剂需求而定。分析过程由技术人员和临床医师共同完成，推荐按照指南、标准等分析流程进行。建议按家系的方式进行检测，不建议患者的单独分析。阳性病例家系分析需充分查阅资料并汇总分析，每组分析人员（初级技师+中级技师+中级临床医师）每天分析建议不超过1个家系；检测报告中签名人员至少应包含实验人员、审核人员、及临床分析人员。建议由临床参与分析的医务人员提供咨询。

### 9.1.2 组织 DNA 指定区域测序

#### 1. 组织DNA指定区域测序-全外显子组测序

- 1) 常用名称：全外显子组测序；简称：WES
- 2) 样本类型：血液、肌肉、骨骼、羊水等各类含完整DNA的组织细胞；
- 3) 核酸类型：DNA；
- 4) 测序项目分类：靶向大 panel 高数据量二代测序；
- 5) 基本技术要求：

- A. 全外显子组测序:
- ① 测序范围: 人类全部外显子组编码区 (>20000个基因)
  - ② 测序深度: 有效平均测序深度 $\geq 100\times$ ;  $20\times$ 覆盖度 $\geq 95\%$ ;
  - ③ 测序数据量: 有效数据量 $\geq 10\text{G}$ ;
- B. 临床全外显子组测序 (Clinical Whole Exome Sequencing) :
- ① 测序范围: 来自于DECIPHER、HGMD、OMIM、ClinVar、HGNC、ICCG或相关数据库收录的与特定临床表型相关的基因, 一般在4000个基因以上;
  - ② 测序深度: 有效平均测序深度 $\geq 100\times$ ,  $20\times$ 覆盖度 $\geq 95\%$ ;
  - ③ 测序数据量: 平均有效数据量通常 $\geq 2\text{Gb}$ ;
  - ④ 测序质量:  $Q20\geq 90\%$ 、 $Q30\geq 85\%$ ; 基因组比对率 $> 99\%$ ;
- C. 检测范围: ClinGen等数据库确认的疾病相关基因的外显子区 (不包括启动子区等非编码区) 及外显子相邻20bp的内含子区中的点突变、小的缺失插入突变 (20bp以内) ;
- D. 检测局限性:
- ① CNV检测可靠性欠佳, 结果需验证, 且不能检测基因组结构变异 (例如易位、倒位等) ;
  - ② 由于覆盖度不均匀等原因, 检测结果存在假阳性或假阴性的可能性, 需验证;
  - ③ 嵌合体 (体细胞变异)、深度内含子变异、动态突变、基因甲基化变异、重复序列区域等无法检测;
  - ④ 不能进行线粒体基因变异检测;
- 6) 临床应用说明:
- A. 适用于产前诊断、流产物查因、儿童发育迟缓/智力低下 (DD/ID)、自闭症 (ASD)、多发畸形 (MCA)、成人疾病等疑似存在基因变异情况的明确诊断;
  - B. 全外显子组测序 (>20000基因) 相比医学外显子组测序 (>4000基因) 能够提供更多的其他基因的外显子区域的变异信息, 并且在未来重分析和科研层面均有价值。对于临床诊断较为明确的先天遗传性疾病, 可选择特定设计的医学外显子组或临床外显子组测序方案; 对于临床诊断尚不清楚且又高度怀疑是遗传性疾病的, 推荐全外显子组测序;
  - C. 检测过程由实验室技术人员完成, 人员和时间需求根据设备、试剂需求而定。分析过程由技术人员和临床医师共同完成, 推荐按照ACMG或相应分析流程进行。建议按家系的方式进行检测, 如仅为患者单独检测, 推荐添加亲代行相应位点验证。阳性病例分析需充分查阅资料, 每组分析人员 (初级技师+中级技师+中级临床医师) 每天分析建议不超过2-3个家系; 检测报告中签名人员至少应包含实验人员、审核人员、及临床分析人员。建议由临床参与分析的医务人员提供咨询。

## 2. 组织DNA指定区域测序- 某某基因包测序

- 1) 常用名称: 某某基因测序, XX panel Seq; 命名举例: 遗传性耳聋基因检测-4基因; 地中海贫血基因包检测-3基因;
- 2) 样本类型: 各类组织来源的DNA;
- 3) 核酸类型: DNA;
- 4) 测序项目分类: 靶向小 panel 低数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求: 根据需求而定, 应明确检测范围内可检测区域及不覆盖区域。检测范围及局限性: 根据设计目的分析点突变、CNV、结构变异、或重复区域内特定变异等, 无法完成设计目标以外的检测;
- 6) 临床应用说明: 适用于针对特定设计目标的基因变异、缺失、重复或检测。具体实验方案、分析方式、检测范围等需根据设计方案确定。

## 9.2 单细胞 DNA 测序

单细胞提取DNA并进行NGS测序是一类较新的第三代试管婴儿诊疗技术, 包括植入前胚胎非整倍体检测 (PGT-A), 胚胎植入前单基因遗传病检测 (PGT-M), 胚胎植入前染色体结构异常检测 (PGT-SR)。相关技术的临床应用时间相对较短、范围较窄, 临床有效性、方案的可靠性等还需进一步明确, 以下项目分类仅作为技术参考。

### 9.2.1 单细胞 DNA 随机测序

#### 1. 单细胞DNA随机测序 (> 0.7M) -胚胎植入前非整倍体检测

- 1) 常用名称: 胚胎植入前非整倍体检测 (Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies) ; 简称: PGT-A;
- 2) 样本类型: 胚胎细胞, 囊胚外滋养层细胞;
- 3) 核酸类型: DNA;
- 4) 测序项目分类: 全基因组低数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求: 全基因组低深度测序;
  - A. 测序覆盖率: PGT-A-4M 不低于4%, PGT-A-1M 不低于10%;
  - B. 测序数据量: PGT-A-4M 不低于0.7M reads, PGT-A-1M 不低于10M reads;
  - C. CNV检测: PGT-A-4M 为4Mb以上的缺失和重复, PGT-A-1M 不低于为1Mb以上的缺失和重复。
  - D. 检测局限性: 本方法不能检测基因组高度重复区域 (如: 近端粒、近着丝粒和13、14、15、21、22染色体短臂) 的异常和XY高度同源区域异常; 不能检测染色体平衡易位、罗氏易位、倒位、环状染色体; 不能检测单倍体、多倍体、单亲二倍体。对于嵌合体检测, chr19可用于30Mb以上且大于50%的嵌合检测; 其他染色体则为20Mb以上且大于30%的嵌合;
- 6) 临床应用说明: 可用于胚胎植入前非整倍体检测, 实际有效性存在争议。

## 2. 单细胞DNA随机测序 (1M) -胚胎植入前染色体结构异常检测

- 1) 常用名称: 胚胎植入前染色体结构异常检测 (Preimplantation Genetic Testing for Structural chromosomal Rearrangements) ; 简称: PGT-SR;
- 2) 样本类型: 外周血样本、胚胎细胞, 囊胚外滋养层细胞;
- 3) 核酸类型: DNA;
- 4) 测序项目分类: 靶向小 panel 高数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求:
  - A. 测序范围: 目标区域捕获测序, 染色体组内发生相互易位/罗氏易位/倒位断点附近区域; 测序覆盖率: 30%左右; 测序数据量: 下机数据量不低于100万reads; 核酸提取: DNA至少100ng, 体积不超过35  $\mu$ l;
  - B. 检测范围: 染色体组内发生的各种表面平衡重排染色体 (ABCR) 追踪的分子标记;
  - C. 检测局限性: 由于端粒和着丝粒都由高度重复DNA序列组成, 并且都与多种蛋白质相结合形成复杂的结构, 尤其着丝粒, 可为上百万碱基对的高重复序列, 测序可能存在较大困难, 会有无法检出可能性;
- 6) 临床应用说明: 适用于因一方或双方为染色体结构异常 (平衡易位、罗氏易位、倒位等), 欲行植入前胚胎产前诊断的患者。

### 9.2.2 单细胞 DNA 指定区域测序

例: 单细胞DNA指定区域测序 (500 $\times$ ) -胚胎植入前单基因遗传病检测

- 1) 常见名称: 胚胎植入前单基因遗传病检测 (Preimplantation Genetic Testing for Monogenic disorders) ; 简称: PGT-M
- 2) 样本类型: 胚胎细胞, 囊胚外滋养层细胞;
- 3) 核酸类型: DNA;
- 4) 测序项目分类: 靶向小 panel 高数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求:
  - A. 测序范围: 目标致病基因上下游2M内; 测序深度: 平均500 $\times$ ; 测序数据量: 下机数据量不低于30万reads; 测序质量: 20 $\times$ 覆盖度 > 80%、30 $\times$ 以上深度的覆盖度 > 50%;
  - B. 检测范围: 家系已知单基因病致病变异;
  - C. 检测局限性: 仅能针对明确致病变异进行检测和分析, 其他基因变异无法检测; 因胚胎基因组存在一定概率的重组现象, 有可能导致单体型无法判断或判断错误;
- 6) 临床应用说明: 适用于基因变异为明确致病或致病基因连锁标记明确的家庭生育正常后代, 疾病通常为严重的致死、致残、致畸、致愚的遗传性疾病, 且遗传机制明确。

### 9.3 细胞外游离 DNA 测序

例: 游离DNA随机测序-非侵入性产前筛查/扩展型非侵入性产前筛查

- 1) 规范名称: 孕妇外周血胎儿游离DNA产前检测/筛查 (Non-invasive prenatal testing, NIPT) ; 简称: NIPT;

- 2) 样本类型: 孕妇外周血或孕妇外周血血浆
- 3) 核酸类型: 游离DNA;
- 4) 测序项目分类: 全基因组低数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求:
  - A. 应包括所有数据质量参考标准, 如原始数据量、有效数据量、样本有效序列中鸟嘌呤 (Guanine, G) 和胞嘧啶 (Cytosine, C) 碱基对所占的比率 (GC 含量, GC content)、拆分率、比对率、重复率、胎儿浓度、碱基质量值 (Q score) 等指标。考虑到降低数据量可能导致假阴性和假阳性发生, 单个样本原始数据量和单个样本有效数据量不得低于试剂盒说明书的要求;  
检测范围: 胎儿常见染色体非整倍体异常 (T21,T18,T13) ;
  - B. 检测局限性: 本检测不能排除以下情况所致的智力障碍、畸形等疾患: 胎儿患21号、18号、13号染色体部分单体、部分三体、部分四体型综合征; 胎儿患嵌合型染色体疾病; 染色体异倍体 (含单倍体、三倍体、四倍体等); 染色体平衡易位、倒位、环状、微缺失、微重复综合征; 单亲二体 (UPD) ; 单基因病、线粒体病、多基因病; 感染、药物、辐射等环境诱因导致的出生缺陷。
- 6) 临床应用说明: 适用于孕妇外周血样本中胎儿的T21、T18、T13三种染色体非整倍体的检测; 无法检测平衡性基因组结构异常, CNV检测可靠性不明确。无法检测染色体异倍体 (含单倍体、三倍体、四倍体等)、单亲二体 (UPD)、单基因或多基因病等。(NIPT Plus) 项目规范建议参考广东省精准医学应用学会团体标准T/GDPMAA 0004-2020《基于孕妇外周血浆游离DNA高通量测序无创产前筛查胎儿基因组病技术标准》。

## 10 高通量基因测序在感染与微生物领域的应用分类

### 10.1 病原宏基因组下一代测序

- 1) 常用名称: 病原宏基因组下一代测序; 简称: mNGS;
- 2) 样本类型: 脑脊液、肺泡灌洗液、血液、痰液、组织、咽拭子、脓液、引流液、胸水、腹水、尿液、关节液、房水、分泌物等样本。因粪便样本中病原微生物载量过高, 骨骼样本中病原微生物载量过低, 常规流程不纳入这两种样本类型;
- 3) 核酸类型: DNA 和 RNA;
- 4) 测序项目分类: 全基因组低数据量二代测序;
- 5) 基本技术要求:
  - A. 流程选择:
    - ① 目标病原为细菌、真菌、寄生虫和DNA病毒等遗传物质为DNA的微生物, 采用DNA检测流程;
    - ② 目标病原为RNA病毒时, 采用RNA检测流程;
    - ③ 目标病原为全部微生物时, 采用DNA+RNA检测流程;
  - B. 标本采集: mNGS检测标本采集需进行严格的无菌操作。
    - ① 优先采集感染部位的体液或组织等病灶部位样本, 建议抗生素使用前或患者病症明显时采集样本;
    - ② 不明原因发热, 或无明显病灶部位患者, 可建议采集送检血液样本;
  - C. 核酸提取与文库构建: 需建立核酸提取及文库构建的质控体系。
    - ① 病原体损失的问题: mNGS 方法学优势在于全面覆盖不同类型的病原体, 因此在需要提取过程中, 病原体损失的问题, 尤其是对于低载量的病原体;
    - ② 气溶胶污染问题: 不管是采用磁珠法或柱提法, 操作阶段选择手工或自动化过程中, 均需要严格考虑气溶胶污染问题, 比如自动化磁棒法提取, 可能容易导致气溶胶污染问题;
    - ③ 文库构建问题: 临床样本中病原含量低, mNGS 方法学构建是核酸小片段文库, 机械打断或转座酶等方法过程, 需要考虑样本利用率的问题;
    - ④ 同一批次多样本混合测序时, 建议采用双标签 (barcode) 标记, 降低因 index hopping (标签跳跃) 等导致同批次样本间的交叉污染问题;
  - D. 测序策略: 需要建立人源核酸干扰排除、宏基因高通量测序和生物信息分析流程。

① 测序平台选择: a. 二代测序兼具通量高与准确性高的优势, 但读长较短、不能实现边测序边分析; b. 三代测序的代表技术为纳米孔测序, 具有长读长、实时测序及设备便携的优点, 但因通量及测序准确性的问题需要样本中病原核酸较高时才能有效检出病原体;

② 一方面, 因mNGS检测结果基于特异性序列数判定为基础, 读长越长, 成为特异性序列的可靠性越高; 另一方面, 测序读长越长, 测序时间也越长(建议检测周期在24小时内), 因此测序策略选择中需兼顾可靠性与时效性, 建议测序读长 $\geq 50\text{bp}$ 或 $75\text{bp}$ ;

③ 碱基测序的准确性是mNGS结果可靠性的基础, 建议 $Q30 \geq 85\%$ ;

E. 数据库: 需建立保证种类的全面性、注释的准确性与序列的完整性的病原数据库。

① mNGS 测序数据包含了宿主人微生物(病原体、健康人体正常菌群或环境及试剂中引入的试剂工程菌等)的数据, 数据库应同时考虑人基因组数据库与微生物数据库;

② NCBI RefSeq、IMG、RVBD 等数据库包含了人类(GRCh37 与 GRCh38 版本)及微生物基因组信息, 但准确性参差不齐, 需要专业生信人员进行严格筛选及过滤, 确保获得临床应用级别的准确数据库;

③ 因单一基因组无法包含物种的所有基因组信息, 从宿主人的角度考虑, 人序列的残留会对部分微生物(尤其是真菌、病毒及寄生虫等)的鉴定造成一定的干扰, 从微生物的角度, 基于单一基因组可能存在漏检情况, 纳入所有株系基因组将增加运算时间与资源, 因此建议构建人类及微生物的泛基因组数据库, 兼具全面性与时效性;

④ 数据库区分问题: 考虑微生物或其核酸片段存在于人体、环境及试剂中, 建议构建环境、试剂及人体微生物背景数据库。

F. 数据生信分析:

① 过滤低质量测序序列: 接头污染(比例不超过1%), 短序列片段(比如有效序列长度需 $\geq 50\text{bp}$ )、数据的有效比对率 $>70\%$ 等;

② 可采用 BWA(BWA; <http://bio-bwa.sourceforge.net/>)或 Bowtie 等工具进行低质量序列及宿主序列过滤等;

③ 不同的病原微生物分析软件, 差异在于算法和数据库类型不同, 常用的是有 Kraken2、Minimap2 等, 结合测序数据来源于二代或三代测序平台, 选择不同的方法。此外, 目前开源的宏基因组物种注释软件不同算法存在不同程度的问题, 需要不断持续优秀, 如果检测团队自行建立, 需要匹配相对较强的生信团队。

G. 结果判读:

① mNGS 检测结果涉及湿实验与干实验, 多步骤流程复杂, 此外不同病原体其理化性质不同且致病能力不同, 单一的特异性序列数无法作为 mNGS 结果判读的可靠阳性判断阈值, 建议将样本类型、核酸质控、文库质控、测序数据质控、人源序列数、微生物生物总序列数、覆盖度、特异性序列数等参数, 采用深度学习、随机森林等机器学习算法纳入病原体可靠性判读评估;

② 因不同患者免疫力不同, 基础性疾病不同, 且病原体致病能力不同, mNGS 检测结果建议联合患者临床表征及传统病原学检测方法进行综合性判断。

H. 人源细胞处理技术:

① 全细胞(Whole cell)检测技术

需要采用“差异裂解”为代表的去宿主核酸技术, 降低人源宿主核酸占比, 适用于细菌与真菌感染为主, 或病原体载量较高所有样本类型, 在血液及脑脊液等病原体载量较低的样本检测上往往性能不足; 可显著提升细胞壁较厚的细菌与真菌的序列数, 有利于提升细菌、真菌等细胞壁较厚的病原体的检出性能, 但容易造成丢失寄生虫、病毒、支原体/衣原体, 及部分细胞壁较薄微生物, 及所有细胞游离核酸;

② 细胞游离(cell free)检测技术

适用于所有样本类型, 尤其是脑脊液及血液样本等优势更显著, 可全面覆盖细菌、真菌、病毒和寄生虫的多类型病原体, 但细胞游离核酸往往载量较低, 需提升核酸的提取技术和效能;

I. 检测局限性:

① 无法检测没有核酸基因组的朊病毒;

② 无法检测耐药基因点突变类型, 如结核耐药突变位点;

③ 因病原微生物与耐药基因并非一一对应关系, 及基因型与表型可能不一致的影响因素, 结果仅作为提示作用, 需验证;

④ 受病原体载量过低、测序的随机性与覆盖度不均匀等原因, 检测结果存在假阴性的可能性。

- 6) 临床应用说明: mNGS 更常用于无预设病原体的感染场景, 尤其是多种重症、疑难感染病例的病原体检测。可在以下临床场景使用:
- 适用于重症肺炎、脑炎/脑膜炎、血流感染、脓毒症/脓毒性休克、局灶脓肿、复杂性腹腔感染、骨髓炎、脓毒性关节炎、坏死性筋膜炎、骨与关节感染等疑似单一或混合感染细菌、真菌、寄生虫或病毒的病重及病危患者的病原学诊断;
  - 适用于不明原因发热查因患者的病原学诊断;
  - 适用于移植、免疫缺陷或免疫功能低下疑似单一或混合感染细菌、真菌、寄生虫或 DNA 病毒患者的病原学诊断;
  - 适用于疑似细菌、真菌、寄生虫、及病毒导致的新发、罕见或疑难感染性疾病患者的病原学诊断;
  - 适用于慢性感染且需要明确病原学证据的患者;
  - 适用于疫情预警、防控和溯源分析。

## 10.2 病原靶向下一代测序

- 常用名称: 病原靶向下一代测序; 简称: tNGS
- 样本类型: 与 mNGS 相同;
- 核酸类型: 与 mNGS 相同;
- 测序项目分类: 小 panel 低数据量二代测序;
- 基本技术要求: 与 mNGS 类似, 但为特定微生物检测;
- 临床应用说明: tNGS 更常用于初步诊断病原体范围的感染场景, 尤其是基于特定感染症候群的病原体检测。其临床使用场景与 mNGS 场景相同。

## 11 高通量基因测序在临床其它领域的应用

### 11.1 药物基因组学的临床检测

药物基因组学的临床检测过程一般包括核酸提取和靶标检测两个阶段。目前临床上使用较多的是采用核酸提取仪自动完成样本核酸提取。目前用于靶标检测的方法包括PCR-Sanger测序法、高通量测序法、实时荧光定量PCR法、PCR-基因芯片法、PCR-电泳分析法、PCR-高分辨率溶解曲线法、PCR-核酸质谱法等。但本标准仅涉及药物基因组中高通量基因测序的分类规范。同时, 在目前药物基因组学的高通量基因测序中, 核酸类型基本都是DNA, 因此本章节暂不对药物基因组学的RNA测序单独作说明。

例: 组织DNA指定区域测序-某某基因包测序

- 常用名称: 某某药物基因测序, XX 药物基因 panel Seq; 建议命名举例: 心血管药物基因检测-X 基因 X 药物; 降脂药物基因检测-X 基因 X 药物;
- 样本类型: 外周血、干血斑、口腔拭子或其他组织;
- 核酸类型: DNA;
- 测序项目分类: 小 panel 低数据量二代测序;
- 基本技术要求:
  - 检测范围及局限性: 无法完成设计目标以外的检测。送检样本如存在检测范围外的变异(如片段的缺失、重复等), 可能影响检测结果的准确性或导致结果解读的错误, 也可能导致检测失败。且随着药物基因组学的研究进展, 权威指南及数据库可能会出现更新, 并导致解读结果随之调整。鉴于当前检测技术的局限性及基因多态性对药物作用影响的研究进展, 即使在履行了工作职责和操作规程的前提下, 仍有可能出现假阳性或假阴性检测结果或与临床用药不一致的情况;
  - 数据生信分析: 对检测范围内的基因进行比对分析, 得出检测结果; 同时建议检测结果与 Sanger 测序结果进行对比, 应具备足够的灵敏度、特异性和总符合率。数据库: 应具备基因型——药物疗效的相关数据库, 并应依据有关药物基因组学的研究进展、权威指南等进行一定周期的更新;
  - 结果判读: 药物基因组学的测序结果, 需具备相关资质的药师进行专业解读, 针对所检测的突变信息来给出用药选择方案或者剂量调整方案;

- 6) 临床应用说明：适用于针对特定设计目标的基因变异、缺失、重复或检测。具体实验方案、分析方式、检测范围等需根据设计方案确定。实际临床用药也受到其它因素的影响，检测结果仅供临床参考。

## 11.2 移植配型

### HLA 分型下一代测序技术

- 1) 常用名称：HLA 分型下一代测序技术（Next generation sequencing technology for HLA typing）；简称：HLA-NGS；
- 2) 样本类型：外周血，骨髓血，毛囊，指甲，口腔拭子，羊水，细胞培养液等；
- 3) 核酸类型：DNA；
- 4) 测序项目分类：小 panel 低数据量二代测序；
- 5) 基本技术要求：
  - A. 核酸提取：DNA 至少 20ng/ $\mu$ l，体积不低过 30 $\mu$ l；测序范围：目标 HLA 基因，测序准确度 > 95%，有效数据百分率 > 75%，下机数据量不低于 10 万 reads；
  - B. 检测范围：HLA-Class I&HLA-Class II：A、B、C、E、F、G、DRB1、DRB3/4/5、DQB1、DQA1、DPB1、DPA1 共计 14 个位点；
  - C. 检测局限性：需要专业 HLA 软件分型分析；需要区分的碱基距离不宜太远，当发生杂合位置距离较远且需要报新基因时，不能确定变异在哪条 DNA 链上；适用于大量样本上机，对样本量有要求；报告周期也是限制 NGS 检测的重要原因，不适用于当天出结果。
- 6) 临床应用说明：适用于移植配型患者及潜在供体。

## 11.3 白血病的诊断

### 1. 白血病 DNA 靶向测序

- 1) 常用名称：白血病 X 基因 DNA 检测（X 为基因数量）；
- 2) 样本类型：骨髓、外周血、口腔拭子（阴性对照）等；
- 3) 核酸类型：DNA；
- 4) 测序项目分类：大/中/小 panel 高数据量二代测序；
- 5) 基本技术要求：
  - A. 检测范围：捕获基因的全部外显子区域及部分内含子区域；
  - B. 检测突变类型：点突变、片段插入或缺失、基因融合、基因拷贝数变异、结构变异等；
  - C. 检测局限性：内含子序列较长，探针难以全面覆盖，特别是高 GC 区域，且成本较高；特定内含子低质量测序和复杂重排形式，导致捕获效率差，需搭载 RNA 检测试剂盒；
- 6) 临床应用：白血病分子分型、鉴别诊断、靶向治疗及预后评估。

### 2. 白血病 RNA 靶向测序

- 1) 常用名称：白血病 X 基因 RNA 检测（X 为基因数量）；
- 2) 样本类型：骨髓、外周血等；
- 3) 核酸类型：RNA；
- 4) 测序项目分类：大/中/小 panel 高数据量二代测序；
- 5) 基本技术要求：
  - A. 检测范围：血液淋巴系统肿瘤鉴别诊断和预后及治疗相关融合基因及其常见伴侣基因；
  - B. 检测突变类型：基因融合；
  - C. 检测局限性：只限于检测重排变异类型，相较于传统的全转录组测序，基因覆盖少。
- 6) 临床应用：白血病分子分型、鉴别诊断、靶向治疗及预后评估。

## 参 考 文 献

- [1] GB/T 40974-2021 核酸样本质量评价方法. 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会.2021.11.26
- [2] 北京市临床检验中心, 北京医学会检验医学分会, 首都医科大学临床检验诊断学系, 北京市医学检验质量控制和改进中心. 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) [J]. 中华医学杂志, 2019,99(43):3393-3397. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.43.008
- [3] 北京市临床检验中心, 北京医学会检验医学分会, 首都医科大学临床检验诊断学系, 北京市医学检验质量控制和改进中心. 高通量测序技术临床规范化应用北京专家共识 (第一版遗传病部分) [J]. 中华医学杂志,2020,100(9):660-668. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.09.004
- [4] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(2): 107-120. DOI: 10.3760/cma. j. cn114452-20201026-00794
- [5] 中华医学会检验医学分会. 高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(12): 1181-1195. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200903-00704.
- [6] Charles Y. Chiu and Steven A. Miller.Clinical metagenomics. Nat Rev Genet.2019; 20(6): 341 – 355.
- [7] 黎籽秀, 刘博, 徐凌丽, 杨琳, 王慧君, 周文浩. 高通量测序数据分析和临床诊断流程的解读[J]. 中国循证儿科杂志, 2015, 10(1):19-24. DOI:10.3969/j.issn.1673-6501.2015.01.003
- [8] 李金明. 高通量测序技术[M]. 科学出版社, 2018.12
- [9] Hereditary Cancer Syndromes and Risk Assessment:ACOG COMMITTEE OPINION , Number 793 [J].Obstet Gynecol, 2019, 134(6):e143-e149.
- [10] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会.中国临床肿瘤学会 (CSCO) 结直肠癌诊疗指南 2020 版 [M]. 北京.人民卫生出版社, 2020: 1-115.
- [11] 王玉东、王颖梅等. 遗传性妇科肿瘤高风险人群管理专家共识(2020)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, v.36(09):38-47.
- [12] 中国临床肿瘤学会肿瘤标志物专家委员会, 中国肿瘤驱动基因分析联盟. 二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(26):9.
- [13] Campesato LF, Barroso-Sousa R, Jimenez L, et al. Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice[J]. Onco-target, 2015, 6(33):34221-34227.
- [14] 全基因组测序在遗传病检测中的临床应用专家共识[J].中华儿科杂志,2019,57(6):419-423.
- [15] 北京市临床检验中心, 北京医学会检验医学分会, 首都医科大学临床检验诊断学系,等. 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)[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(43):3393-3397.
- [16] Kandamurugu Manickam et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: an evidencebased clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics, Genetics in Medicine volume 23, pages2029 – 2037 (2021))
- [17] Monaghan, K.G., Leach, N.T., Pekarek, D.et al. The use of fetal exome sequencing in prenatal diagnosis: a points to consider document of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med22675 – 680 (2020.)
- [18] Manickam K, McClain MR, et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: an evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). ACMG Board of Directors. Manickam K, et al. Genet Med. 2021 Nov;23(11):2029-2037. doi: 10.1038/s41436-021-01242-6

- [19] RefSeq – NCBI Reference Sequence Database. NCBI website. [ncbi.nlm.nih.gov/refseq](http://ncbi.nlm.nih.gov/refseq). Accessed April 19, 2021.
- [20] CCDS – Consensus CDS (CCDS) Database. NCBI website. [ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi](http://ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi). Accessed April 19, 2021.
- [21] American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). NCBI website. [ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg](http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg). Accessed April 19, 2021.
- [22] Catalog of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). COSMIC website. [cancer.sanger.ac.uk/cosmic/download](http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/download). Accessed April 19, 2021.
- [23] Cancer Gene Census. COSMIC website. [cancer.sanger.ac.uk/census](http://cancer.sanger.ac.uk/census). Accessed April 19, 2021.
- [24] ClinVar Database. NCBI website. [ncbi.nlm.nih.gov/clinvar](http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar). Accessed April 19, 2021.
- [25] 中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组, 中国医师协会医学遗传医师分会遗传病产前诊断专业委员会, 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组. 低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(4):4.
- [26] 孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查实验室技术专家共识, 国家卫生健康委临床检验中心 产前筛查与诊断专家委员会. 中华检验医学杂志 2019 年 5 月第 42 卷第 5 期 Chin J Lab Med, May 2019, Vol. 42, No. 5.
- [27] Schlager R, CY Chiu, Miller S, et al. Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection[J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2017: arpa.2016-0539-RA.
- [28] Chiu C Y, Miller S A. Clinical metagenomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2019.
- [29] Gu W, Deng X, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. Nature Medicine.2021.
- [30] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(11):681-689.
- [31] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(2):14.
- [32] Charalampous T, Kay G L, Richardson H, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(7):1.
- [33] Yang Y, Walls S D, Gross S M, et al. Targeted Sequencing of Respiratory Viruses in Clinical Specimens for Pathogen Identification and Genome-Wide Analysis[J]. Nature Public Health Emergency Collection, 1838.
- [34] Allicock O M, Guo A C , Uhlemann A C, et al. BacCapSeq: a Platform for Diagnosis and Characterization of Bacterial Infections[J]. mBio, 2018, 9(5).
- [35] 王辰等. 精准医学: 药物治疗纲要. 人民卫生出版社, 2021.
- [36] 国家卫生健康委个体化医学检测技术专家委员会. 个体化医学检测指南.2016.
- [37] Tafazoli A, Guchelaar H, Miltyk W, Kretowski AJ, Swen JJ. Applying Next-Generation Sequencing Platforms for Pharmacogenomic Testing in Clinical Practice. Front Pharmacol 2021, 12.
- [38] Russell LE, Zhou Y, Almousa AA, Sodhi JK, Nwabufo CK, Lauschke VM. Pharmacogenomics in the era of next generation sequencing – from byte to bedside. Drug Metab Rev 2021, 53(2): 253-278.
- [39] Schwarz UI, Gulilat M, Kim RB. The Role of Next-Generation Sequencing in Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. Csh Perspect Med 2019, 9(2): a33027.
- [40] Ji Y, Si Y, Mcmillin GA, Lyon E. Clinical pharmacogenomics testing in the era of next generation sequencing: challenges and opportunities for precision medicine. Expert Rev Mol Diagn 2018, 18(5): 411-421.





