

• 基础研究 •

EGFR、ALK、KIT 及 KRAS 基因 Panel 体细胞突变高通量测序检测法室内质量控制的建立*

吴小延, 李丹, 杨鑫华, 刘小云, 龙亚康, 王芳, 邓玲[△]

510060 广州, 中山大学肿瘤防治中心, 华南肿瘤学国家重点实验室(吴小延、杨鑫华、刘小云、龙亚康、王芳、邓玲); 510095 广州, 广州医科大学附属肿瘤医院 核医学科(李丹)

[摘要] 目的: 利用由 295 个靶基因所组成的高通量测序 Panel, 试建立适用于包括表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)、间变淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, *ALK*)、酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor, *KIT*)及大鼠肉瘤病毒癌基因(Kirsten rat sarcoma viral oncogene, *KRAS*)体细胞突变高通量测序法日常检测的室内质量控制体系。方法: 选择 *EGFR*、*ALK*、*KIT* 和 *KRAS* 4 种基因 7 个突变类型的患者样本, 按比例稀释成 5.00%、2.50% 突变频率的样本作为外部质控品, 对其均一性、稳定性及特异性进行评价。结果: 均一性评价结果显示质控品均一性良好, 稳定性评价结果表明质控品检测结果随时间延长无明显趋势变化, 且经变异分析均显示变异系数 < 10%。结论: 临床检测突变样本型模式的阳性混合标本制备定量检测的 5.00% 和 2.50% 的两个质控品均一性、稳定性及特异性良好, 可有效用于基于探针捕获的包括 *EGFR*、*ALK*、*KIT* 及 *KRAS* 基因 Panel 体细胞突变高通量测序技术检测流程的室内质量控制, 检测结果能反映标本的真实性, 有一定的临床实用价值。

[关键词] 高通量测序技术; 室内质量控制; 质控品

[中图分类号] R730.5; R319 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2020.10.002

引文格式: Wu XY, Li D, Yang XH, et al. Establishment of internal quality control by high-throughput sequencing with the somatic mutation panel composed of *EGFR*, *ALK*, *KIT* and *KRAS* genes[J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(10): 821-829. [吴小延, 李丹, 杨鑫华, 等. *EGFR*、*ALK*、*KIT* 及 *KRAS* 基因 Panel 体细胞突变高通量测序检测法室内质量控制的建立[J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(10): 821-829.]

Establishment of Internal Quality Control by High-Throughput Sequencing with the Somatic Mutation Panel Composed of *EGFR*, *ALK*, *KIT* and *KRAS* Genes

Wu Xiaoyan, Li Dan, Yang Xinhua, Liu Xiaoyun, Long Yakang, Wang Fang, Deng Ling

Sun Yat-sen University Cancer Center, State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, Guangdong, China (Wu Xiaoyan, Yang Xinhua, Liu Xiaoyun, Long Yakang, Wang Fang, Deng Ling); Department of Nuclear Medicine, Cancer Center of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, Guangdong, China (Li Dan)

Corresponding author: Deng Ling, E-mail: dengling@sysucc.org.cn

This study was supported by grants from Department of Science and Technology of Guangdong Province (NO. 2020A1515010314, NO. 2017A030310192) and Sun Yat-sen University (NO. 17ykpy84).

[Abstract] **Objective:** To establish an internal quality control system suitable for high-throughput sequencing with a somatic mutation panel composed of 295 target genes for the daily detection of epidermal growth factor receptor (*EGFR*), anaplastic lymphoma kinase (*ALK*), Tyrosine kinase receptor (*KIT*) and Kirsten rat sarcoma viral oncogene (*KRAS*).

Methods: We selected samples of *EGFR*, *ALK*, *KIT* and *KRAS* genes in 7 mutation types, and diluted the samples with the mutation frequency of 5.00% and 2.50% as the external quality control products, and evaluated their homogeneity,

[收稿日期] 2020-05-12 **[修回日期]** 2020-06-28

[基金项目] * 广东省基础与应用基础研究基金(编号:2020A1515010314, 2017A030310192); 中山大学青年教师培育项目(编号:17ykpy84)

[通讯作者] [△] 邓玲, E-mail: dengling@sysucc.org.cn

stability and specificity. **Results:** Quality control products had good homogeneity, stability and specificity, which did not change significantly over time (coefficient of variation: <10%). **Conclusion:** Quality control products with the mutation frequency of 5.00% and 2.50% have good homogeneity, stability and specificity, which can be effectively used for the internal quality control of high-throughput sequencing technology with the somatic mutation panel composed of *EGFR*, *ALK*, *KIT* and *KRAS* genes based on probe-based capturing. The results can reflect the authenticity of the specimen and have certain practical value in clinic.

[Key words] High-throughput sequencing technology; Indoor quality control; Quality control material

近年来,随着国家大力推进精准医疗计划,高通量测序技术在临床检测应用上取得极大的发展,其应用已扩展至肿瘤个体化治疗、遗传疾病风险预测、传染性基因及心血管疾病等其他复杂疾病的临床诊断和治疗中,检测范围涵盖各个领域^[1-8]。然而,高通量测序技术作为一种快速崛起的新技术,目前尚缺乏系统性的法规或指南来规范高通量测序技术检测项目的开展,只能参考国内外有关学会已出台的零散的相关共识与指南^[9-14]。高通量测序技术是由许多细小过程联结或嵌套组成的一个极为复杂的检测过程,由于该技术实验操作步骤较多,检测流程复杂,数据信息量大等因素,故需要进行合理的质量控制才能使检测质量达到既定要求^[15-17]。国内高通量测序技术平台多,设计 Panel 的大小及检测基因类型均有差别,因此,对高通量测序技术进行质量控制已经成为临床实验室迫切的需求和面临的巨大挑战^[10,18-19]。为了保证检测结果的准确性、稳定性和可靠性,应建立具体的规范化的检测流程与增加必要的内部质量控制方案,来及时发现及把控检测过程中存在的质量风险。因此将质控样本和临床样本同时进行检测可保证检测过程的有效性。本研究利用 Illumina NextSeq500 平台,人多基因突变检测通用试剂盒(燃石医学检验所有限公司,295 Panel),结合我们实验室的建库流程,对携带表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)、间变淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, *ALK*)、酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor, *KIT*)和大鼠内瘤病毒癌基因(kirsten rat sarcoma viral oncogene, *KRAS*)4种已知基因及7种突变类型样本,按比例混合稀释成基因突变频率均为5.00%和2.50%的两个质控品,通过对质控品特异性、均一性及稳定性的高通量检测结果差异对比分析,以期使高通量测序技术流程更稳定,结果更可靠。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集中山大学肿瘤防治中心分子诊断科标本库

经过燃石医学检验所有限公司,295 Panel 高通量检测已知 *EGFR*、*ALK*、*KIT* 和 *KRAS* 基因突变类型及野生型的福尔马林固定石蜡包埋(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)组织样本,并通过苏州吉因加生物医学工程有限公司的人1021基因突变检测试剂盒的高通量测序法校验其突变,且分别将 *EGFR*、*ALK*、*KIT* 和 *KRAS* 4种基因共7个突变位点按5.00%、2.50%的突变频率混入全阴野生型样本,作为外部质控品。

1.2 高通量测序

常规石蜡包埋组织切片,根据 HE 染色结果,富集肿瘤细胞区域(大于20%)并按试剂盒说明书进行组织 DNA 提取(FFPE DNA Kit 试剂盒, QIAGEN 公司)。利用 Illumina 公司 NextSeq500 测序仪进行测序,其检测流程及工作原理(图1)为:将基因组 DNA 经超声波打断成200 bp左右的片段;进行末端修复加碱基 A;加上接头制备成文库。将样本文库加入到测序芯片上,进行桥式 PCR 扩增,形成 DNA 簇,通过有荧光标记的脱氧核糖核苷三磷酸,进行边合成边测序。

1.3 数据分析

使用燃石医学有限公司提供的标准化自动样本管理与数据分析系统对原始数据进行过滤并进行生物信息学分析。

1.4 均一性评价

为保证质控样本的均一性,将制备好的质控品随机抽取10支进行均一性评价,用相同的仪器、试剂及同一人进行检测。

1.5 稳定性评价

1.5.1 短期稳定性实验 随机抽取在冷冻条件下(-20℃)保存的5.00%、2.50%的突变质控品,做好标记,分别放于指定温度(2℃~8℃、25℃),每种条件放置10支。从第0周开始,每周抽取2支,用高通量检测试剂盒检测,连续监测1个月。

1.5.2 长期稳定性实验 随机抽取置于-20℃冷冻保存的5.00%、2.50%的突变质控品2支,用高通量检测试剂盒检测,每月分别检测1次,连续检测

12 个月。

1.5.3 测序深度评价 将稀释好的 5.00%、2.50% 阳性质控品分别降采样到 3 000 ×、2 000 ×、900 ×、700 ×、500 ×、400 ×、350 ×、200 ×，每个深度分别取 3 次，然后利用 Illumina 公司 NextSeq500 测序仪进行检测，以观察测序深度与灵敏度的关系，进一步验证质控品的稳定性。

1.5.4 Levey-Jennings 质控图评价 连续选择 20

次日常检测的 5.00%、2.50% 质控品突变结果，根据各突变点的平均突变频率值，经计算可得到其均值(\bar{x})、标准差(s)和变异系数(coefficient of variation, CV)，进一步计算出 $\bar{x} - 2s$ 、 $\bar{x} + 2s$ 、 $\bar{x} - 3s$ 、 $\bar{x} + 3s$ 的数值，以 $\bar{x} \pm 3s$ 为失控值，以 $\bar{x} \pm 2s$ 为警告值，绘制出 Levey-Jennings 质控图，对结果进行质控分析。

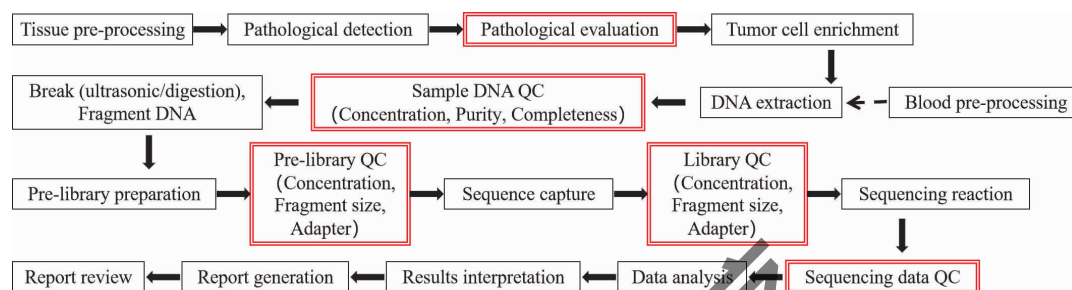


图 1 基于捕获高通量测序技术检测流程

Figure 1. Process of Capture-Based Next-Generation Sequencing

Sections indicated by bold red boxes are internal quality control chains added in the process.

QC: Quality control.

1.6 特异性实验

采用人多基因突变检测通用试剂盒(燃石医学检验有限公司, 295 Panel)分别对 5.00%、2.50% 的突变质控品进行检测,检测中使用相同的剂量,仪器消耗品及同一位操作人员。对比结果。

1.7 统计学分析

用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,均一性、稳定性评价均采用 CV 进行分析。CV = 标准差(s)/平均值(\bar{x}),根据计算 CV 进行评估,CV 越小,稳定性越高。本文以 CV < 10% 做为均一性、稳定性良好的标准^[20]。

2 结果

2.1 人 1 021 基因突变检测结果

本研究对选取已知 *EGFR*、*ALK*、*KIT* 和 *KRAS* 4 种基因突变类型的 FFPE 肿瘤样本的人 1 021 基因突变检测试剂盒检测情况分析结果显示,选取的样本均携带基因突变,共有 7 种突变类型(包括小片段缺失、插入、点突变和融合),说明选取的临床样本含有目的片段,将临床样本测序后证明符合预期实验结果。具体结果见图 2、表 1。

2.2 质控品 5.00%、2.50% 的高通量检测结果

通过对质控品 5.00% 的高通量测序结果分析

显示,共检出 5 种基因突变类型(因 5.00% 突变频率高,稀释量超出总积量,故只选取了 5 个突变类型的样本),突变频率在 3.70% ~ 5.60% (表 2)。通过对质控品 2.50% 的高通量测序结果分析显示,共检出 7 种基因突变类型,突变频率在 1.90% ~ 3.10% (表 2)。

2.3 均一性实验

对随机抽取的 10 个 5.00%、2.50% 质控品进行室内质控品日内重复性测定,突变率差异在正常变化范围内,5.00% 质控品和 2.50% 质控品 CV 均 < 10%,从图 3、4 所示数据可以看出符合质控品的日内重复性要求,证明重复性良好结果。

2.4 稳定性实验

质控品在不同温度下的短期稳定性验证,分别在第 0、1、2、3、4 周取同样的检测量 200 ng 进行检测,评价结果见图 5;质控品在 -20℃ 长期稳定性验证,分别在第 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 月取同样的检测量 200 ng 进行检测,评价结果见图 6。5.00%、2.50% 突变率质控品在不同温度下检测结果无明显变化,且经变异分析均显示 CV < 10%,表明质控品随保存时间延长不存在趋势变化。因此,质控品 5.00% 和质控品 2.50% 在 4℃ 和 25℃ 条件下短期保存 1 个月是稳定的,在 -20℃ 长期保存 12

个月也是稳定的。将 5.00%、2.50% 阳性质控品分别进行 3 000 ×、2 000 ×、900 ×、700 ×、500 ×、400 ×、350 × 及 200 × 不同深度的高通量测序,每个深度分别取 3 次,结果显示 500 × 以上,质控品的突变率不会随着测序深度出现明显的变异,均能测出低突变标本,说明质控品稳定性较好(图 7、8)。根据连续

20 次日常质控品检测结果绘制的 Levey-Jennings 质控图显示,5.00%、2.50% 质控品分别计算出均值(\bar{x})为 5.11% 和 2.68%,标准差(s)为 0.13% 和 0.10%,CV 为 2.61% 和 3.99%,可根据其质控趋势判断质控品比较稳定(图 9、10)。

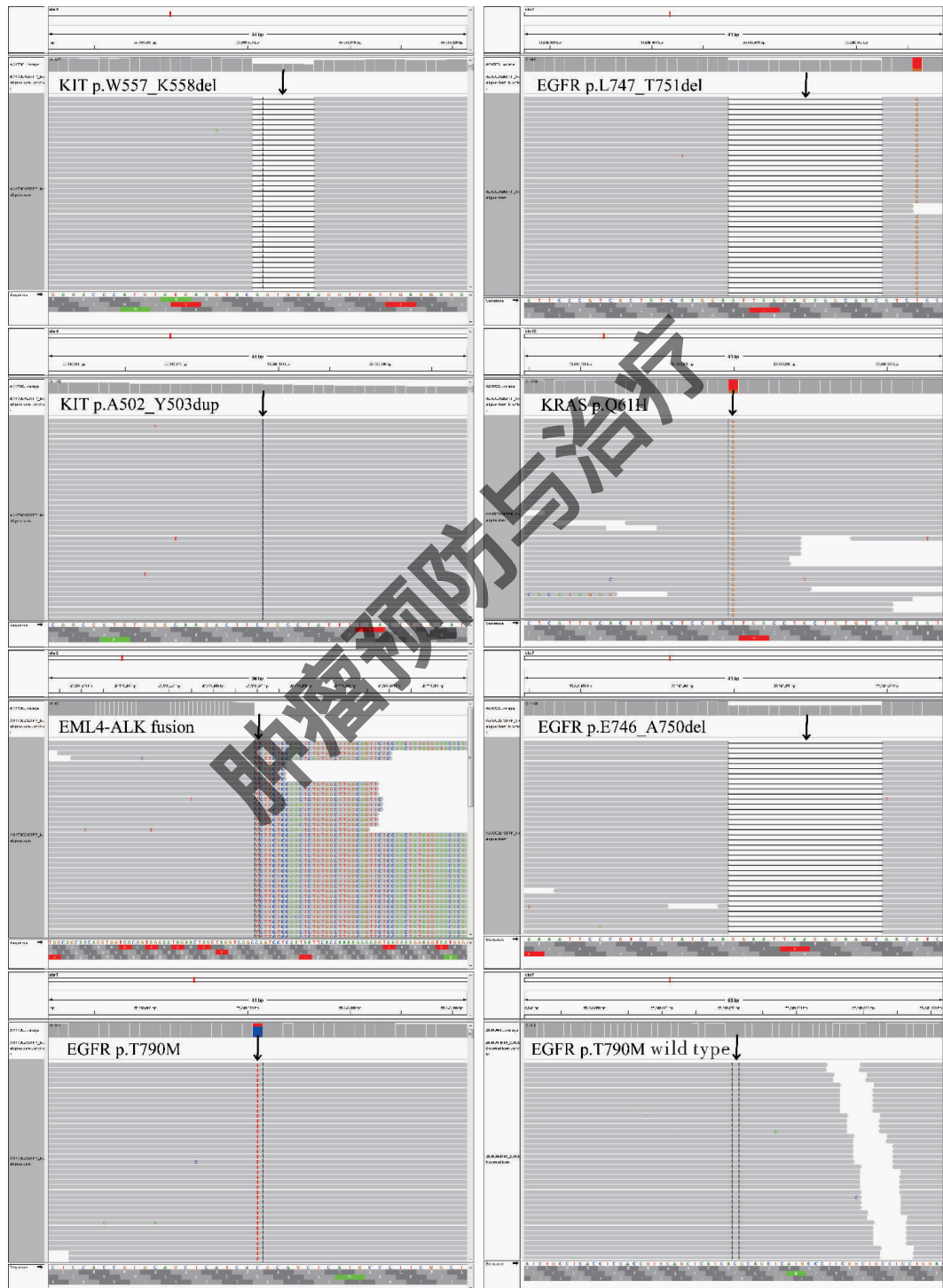


图 2 突变型标本和野生型标本的高通量测序结果

Figure 2. High-Throughput Sequencing Data of Mutant and Wide-Type Samples

The results did not vary as sites, genes and sequences differed. EGFR T790M was set as an example in this article.

表 1 高通量测序检测阳性标本结果

Table 1. Mutant Specimens in High-Throughput Sequencing

No.	Detection site	Result	Mutation frequency(%)
1	<i>KIT</i>	p. W557_K558del	34.90
2	<i>EGFR</i>	p. L747_T751del	18.80
3	<i>KIT</i>	p. A502_Y503dup	24.80
4	<i>KRAS</i>	p. Q61H	22.40
5	<i>ALK</i>	<i>EML4-ALK</i>	49.30
6	<i>EGFR</i>	p. E746_A750del	29.60
7	<i>EGFR</i>	p. T790M	25.50
8	<i>EGFR/ALK/KIT/KRAS</i>	Wild type	0.00

Other three genotypes which are not listed in samples 1 – 7 are wild type. For example, the *KIT* genotype of sample 1 was mutant, and other genotypes (*EGFR/ALK/KRAS*) were wild types; all types in sample 8 were wild type.

表 2 质控品 5.00%、2.50% 高通量测序结果

Table 2. High-Throughput Sequencing Results of Quality Control Products with Mutation Frequency of 5.00% and 2.50%

Variable	Actual mutation frequency(%)						
	<i>KRAS</i> Q61H	<i>EGFR</i> T790M	<i>KIT</i> A502_Y503dup	<i>KIT</i> W557_K558del	<i>EGFR</i> E746_A750del	<i>EGFR</i> L747_T751del	<i>ALK EML4-ALK</i>
2.50%	2.2	2.6	2.3	3.1	2.5	2.8	1.9
5.00%	-	4.7	5.6	4.6	5.5	-	3.7

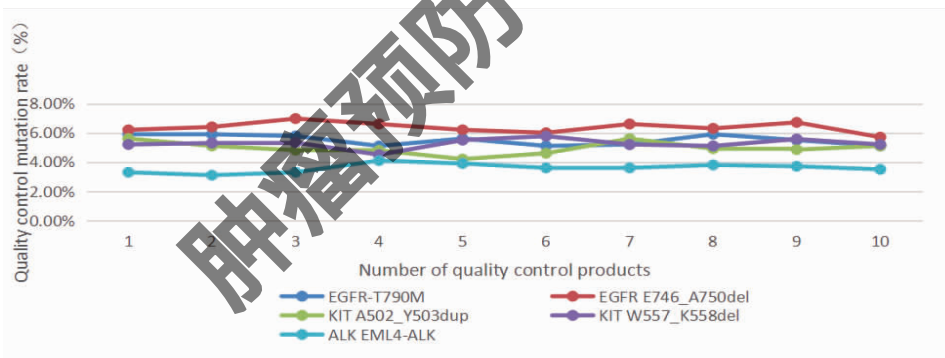


图 3 5.00% 质控品的室内质控日内重复性分析 (N=10)

Figure 3. Day-to-Day Repeatability Analysis of Quality Control Products with Mutation Frequency of 5.00% (N=10)

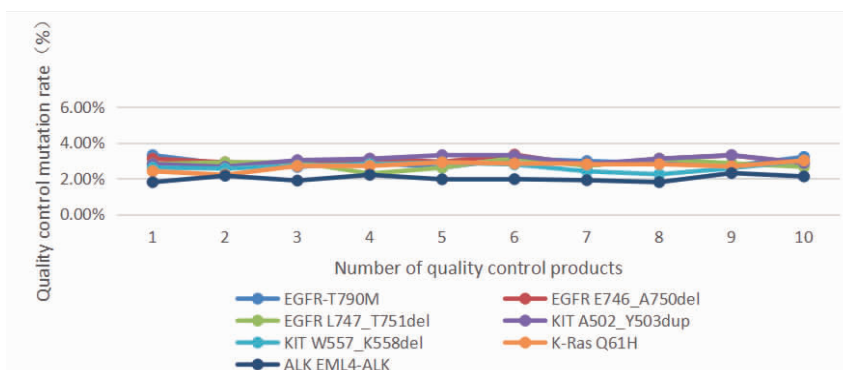


图 4 2.50% 质控品的室内质控日内重复性分析 (N=10)

Figure 4. Day-to-Day Repeatability Analysis of Quality Control Products with Mutation Frequency of 2.50% (N=10)

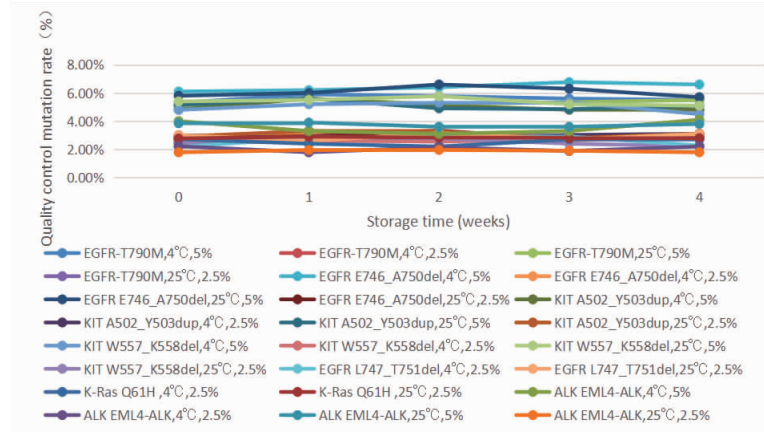


图 5 5.00%、2.50%质控品不同温度下短期稳定性结果

Figure 5. Short-Term Stability of Quality Control Products (Mutation Frequency: 5% and 2.5%) at Different Temperatures

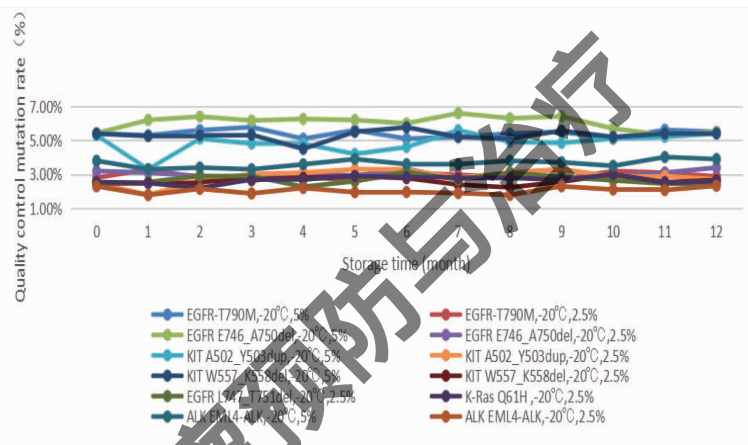


图 6 5.00%、2.50%质控品 -20°C 长期稳定性结果

Figure 6. Long-Term Stability of Quality Control Products (Mutation Frequency: 5% and 2.5%) at -20°C

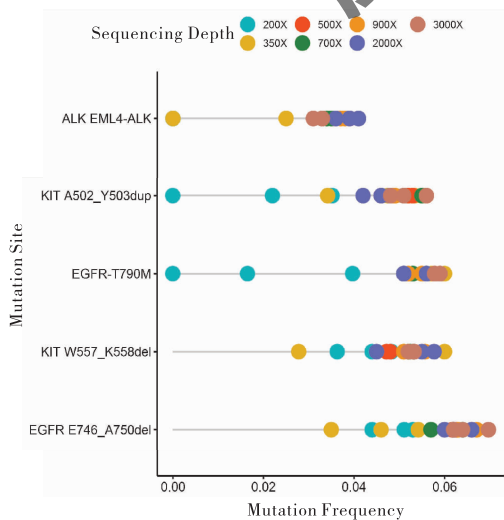


图 7 5.00%质控品不同测序深度与灵敏度的关系

Figure 7. Relationship between Different Sequencing Depths and Sensitivity of Quality Control Products with Mutation Frequency of 5.00%

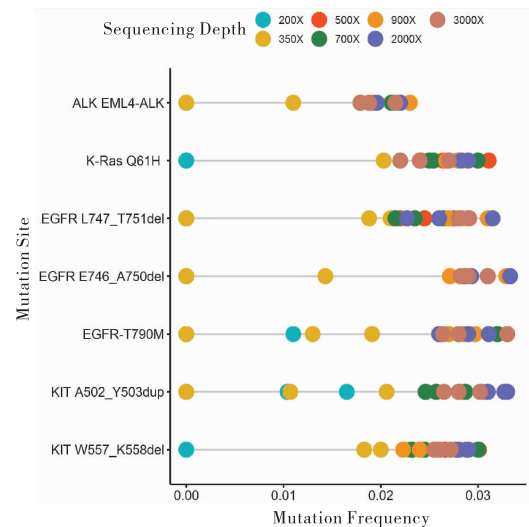


图 8 2.50%质控品不同测序深度与灵敏度的关系

Figure 8. Relationship between Different Sequencing Depths and Sensitivity of Quality Control Products with Mutation Frequency of 2.50%

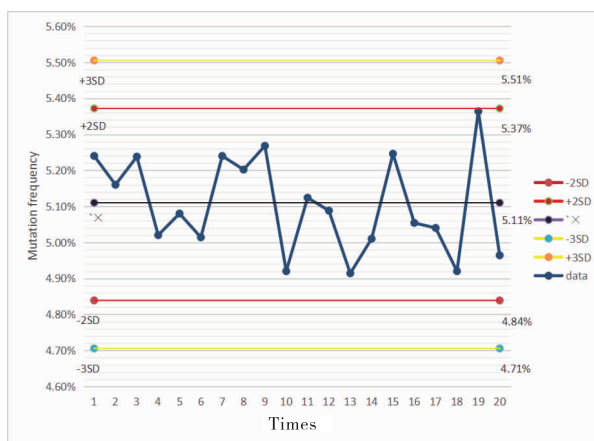


图 9 5.00% 质控品 Levey-Jennings 质控图
Figure 9. Levey-Jennings Quality Control Chart (Mutation Frequency: 5.00%)

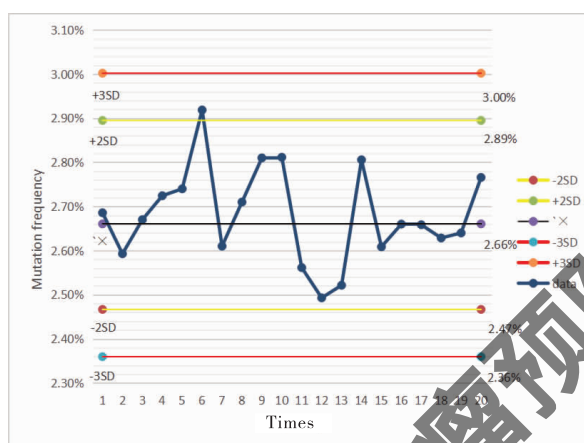


图 10 2.50% 质控品 Levey-Jennings 质控图
Figure 10. Levey-Jennings Quality Control Chart (Mutation Frequency: 2.50%)

2.5 特异性试验

同时采用人多基因突变检测通用试剂盒(燃石医学检验有限公司, 295 Panel) 分别对 5.00%、2.50% 的突变质控品进行检测, 只有 7 个突变位点, 并无其他交叉阳性, 特异性符合要求。

3 讨论

目前我国和世界上各实验室所使用的高通量检测均为实验室自建试验。这意味着高通量检测在临床应用中具有非常大的灵活性, 也意味着高通量检测临床应用具有较大的风险性, 这给高通量检测实验室的管理、人员培训和质量控制等(包括检测实验和生物学信息分析)带来巨大的压力^[21-23]。二代测序检测项目与传统检测项目相比具有质控点多、自配试剂多、指南标准少及检验过程的性能验证和

确认还不完备^[24-25]等特点。因此, 高通量实验室室内质量控制(internal quality control, IQC) 是保证实验结果准确的重要环节, 已成为各级实验室日常工作中一项不可或缺的内容。本研究严格按照高通量测序技术的质量控制要求及方法, 并且自制外部质控品进行 IQC, 以保证检测结果的准确性与稳定性。分析前对样本的运输和保存进行质量控制, 分析中需要病理医师对可评估的样本进一步明确病理诊断, 并评价标本有无出血、坏死和不利于核酸检测的前处理(例如含盐酸脱钙液处理), 病变细胞(如肿瘤细胞)的总量和比例, 避免假阴性; 组织标本中肿瘤细胞含量建议达到 20% 以上, 低于此标准可富集后检测^[26-29]; 再如, 在进入高通量检测流程环节, 核酸质量是高通量检测成功的关键因素^[30], 在制备文库前应采用多种方法对核酸质量进行评估, 包括纯度、浓度和完整性分析^[31-33]; 在文库制备过程中, 需要对文库的浓度、片段大小等进行质量分析, 每个检测项目应设定其文库质量的要求, 明确接受或拒绝的标准; 分析后需要对下机数据进行初步质量控制, 看数据质量是否满足生信分析需求等等。

IQC 是保证检测质量的关键环节, 主要监测其重复性, 是质量改进不可缺少的措施。在进行高通量测序日常室内质控时, 可采用质控品作为内源性或平行对照。本研究利用已知 *EGFR*、*KIT*、*ALK* 和 *KRAS* 突变结果的临床样本, 将不同突变频率的样本按比例混合稀释成 *EGFR*、*ALK*、*KIT* 和 *KRAS* 四种基因突变频率均为 5.00% 和 2.50% 的两个外部质控品, 经高通量检测技术平台检测, 验证其均一性、短期稳定性及长期稳定性, 变异分析均显示 $CV < 10\%$, 说明该质控品及检测平台能够保证检测结果的准确性和稳定性。测序深度是指每个测序区域被测到的目的基因短序列数, 是高通量测序中重要的技术参数。本研究中做了测序深度与灵敏度的关系的探索, 结果表明该分析系统当测序数据达到 $500 \times$ 以上时, 对低频突变位点的阳性样本检出率达到 100%, 对解决肿瘤异质性问题的检测非常重要, 说明质控品具有良好的稳定性, 不会随着测序深度的变化而出现明显的变化。Levey-Jennings 质控图是能够直观地显示外部对照的动态变化, 监视其变化幅度是否在允许的范围之内, 从而指示检验稳定性的线图^[34]。本研究连续选取了 20 次日常检测工作的质控品结果, 并选择 Levey-Jennings 质控图进行室内质控, 当突变频率值在 $\bar{X} \pm 2s$ 范围时, 说明结果稳定性良好, 而超出表示系统处于告警状态, 当值超

出 $\bar{X} \pm 3s$ 范围时,系统处于失控状态。本实验结果显示 2.5% 突变质控品第 6 次实验数据超出 $\bar{X} \pm 2s$ 范围但低于 $\bar{X} \pm 3s$ 范围,说明可能是系统误差或随机误差造成的。质控图的使用具有较高的检出分析误差能力,同时具有较低的假失控概率。

基因组 DNA 能够涵盖包括野生型、纯合突变型和杂合突变型在内的所有突变类型。因此本研究利用日常检验阳性及阴性样本自制质控品,将检测样本作为质控品可以模拟基因组复杂性,与检测标本具有相同性质,既符合临床检测的需要又节省了成本,同时该质控物稳定性和特异性较强。此核酸质控品从日常检测的样本中获取,一般选择核酸溶液超过 100 μL 且浓度高于 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的样本核酸,根据 200 ng 的投入量需求,每次实验仅需要 1 ~ 2 μL 质控核酸,此质控品可以保证一个实验室 6 个月以上的 IQC 需要。本实验选择的自制质控品从来源上难以大量获得,且未经过严格的标准物筛选检测,但样本混合后检测的实际突变频率与预期突变频率基本一致,但是也有个别差异稍大,原因可能有如下几点:样本间的差异性、探针捕获效率的不同、在稀释混合样本中带来的误差等,这些都可能导致后面检测结果突变频率的偏差。虽然质粒没有来源限制,且突变频率比较容易控制,但是质粒不能检测核酸提取过程,不能全面地监控试剂盒的检测能力。

综上,本实验室自制质控品达到了本研究所建立的高通量测序技术检测流程及内部质控标准体系的全部参考数值,突变频率在 2.50% ~ 5.00% 也能被稳定检测出,未出现假阴性,说明质控品的建立可以使检测结果可靠、准确度高,显示该标准体系的参数具有广泛的参考意义,对测序结果正确性、稳定性起到举足轻重的作用,也为同行或即将开展该门技术的相关医技和科研人员提供参考或借鉴意义,同时促进高通量测序技术更好地进入临床应用和科研工作中,以助精准医疗一臂之力。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Sequeiros J, Paneque M, Guimarães B, *et al.* The wide variation of definitions of genetic testing in international recommendations, guidelines and reports[J]. *J Community Genet*, 2012, 3(2): 113-124.
- [2] Kiezun A, Garimella K, Do R, *et al.* Exome sequencing and the genetic basis of complex traits[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(6): 623-630.
- [3] Quinn AM, Hickson N, Adaway M, *et al.* Diagnostic mutation profiling and validation of non-small-cell lung cancer small biopsy samples using a high throughput platform[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(5): 784-792.
- [4] Tan A Y, Michael A, Liu G, *et al.* Molecular diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease using next-generation sequencing[J]. *J Mol Diagn*, 2014, 16(2): 216-228.
- [5] Alkorta-Aranburu G, Sukhanova M, Carmody D, *et al.* Improved molecular diagnosis of patients with neonatal diabetes using a combined next-generation sequencing and MS-MLPA approach[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2016, 29(5): 523-531.
- [6] Poninska JK, Bilinska ZT, Franaszczyk M, *et al.* Next-generation sequencing for diagnosis of thoracic aortic aneurysms and dissections: diagnostic yield, novel mutations and genotype phenotype correlations[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 115.
- [7] 周莹, 许冰莹. 二代测序技术在临床医学上的相关应用[J]. *昆明医科大学学报*, 2016, 37(3): 137-139.
- [8] 曹轲, 陈正庭, 常莉, 等. cfDNA 在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(9): 849-857.
- [9] Matthijs G, Souche E, Alders M, *et al.* Guidelines for diagnostic next-generation sequencing[J]. *Eur J Hum Genet*, 2016, 24(1): 2-5.
- [10] Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, *et al.* ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing[J]. *Genet Med*, 2013, 15(9): 733-747.
- [11] Dienstmann R, Dong F, Borger D, *et al.* Standardized decision support in next generation sequencing reports of somatic cancer variants[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(5): 859-873.
- [12] Li MM, Datto M, Duncavage EJ, *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]. *J Mol Diagn*, 2017, 19(1): 4-23.
- [13] 中华人民共和国卫生部. 肿瘤个体化治疗检测技术指南(试行)[S]. 2015-7-31.
- [14] 《临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识》编写组. 临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识[J]. *中华病理学杂志*, 2017, 46(3): 145-148.
- [15] 张势华, 林世平, 张智勇. 医院检验科 ISO 15189 规范管理制度

- 度范本[M].北京:中国计量出版社,2008.
- [16] Hutchins RJ,Phan KL,Saboor A, *et al.* Practical guidance to implementing quality management systems in public health laboratories performing next-generation sequencing: Personnel, equipment, and process management (phase 1)[J]. *J Clin Microbiol*, 2019,57(8): e00261-19.
- [17] 马晓露,李士军. 浅谈 ISO15189 质量管理体系规范下的医院检验科人员的教育和管理[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(5):146-147.
- [18] 邵向阳,徐伟文. 下一代测序(NGS)技术的发展及在肿瘤研究的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(5):289-296.
- [19] 段建春. 二代测序技术在肺癌精准治疗时代的应用与思考[J]. *中华医学杂志*, 2018,98(19):1528-1530.
- [20] 裴兵. 人乳头瘤病毒(6/11,16/18)核酸实时荧光 PCR 检测室内质控品研制及应用[J]. *现代检验医学杂志*, 2012, 27(5):154-157.
- [21] 喻东,郭瀛军. 高通量测序临床应用中数据质量控制和分析若干问题的探讨[J]. *检验医学*, 2017, 32(4):255-261.
- [22] Gargis AS,Kalman L, Berry MW, *et al.* Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(11):1033-1036.
- [23] Aziz N, Zhao Q, Bry L, *et al.* College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2015, 139(4):481-493.
- [24] 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, (2):2057-2065.
- [25] 肖林林,胡婷婷,魏取好,等. 二代测序临床应用的质量控制[J]. *临床检验杂志*, 2019, (10):745-748.
- [26] Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, *et al.* Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(11):1023-1031.
- [27] Hume S, Nelson TN, Speevak M, *et al.* CCMG practice guideline: Laboratory guidelines for next-generation sequencing [J]. *J Med Genet*, 2019, 56(12):792-800.
- [28] Liu D,Zhou HW,Shi DW, *et al.* Quality control of next-generation sequencing-based in vitro diagnostic test for onco-relevant mutations using multiplex reference materials in plasma [J]. *J Cancer*, 2018,9(9):1680-1688.
- [29] Zhang C, Wang YJ, Hu X, *et al.* An improved NGS library construction approach using DNA isolated from human cancer formalin-fixed paraffin-embedded samples [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2019, 302(6):941-946.
- [30] 杨军,张标,马恒辉,等. FFPE 组织提取 DNA 样本质量评价的多中心调研[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(6):691-695.
- [31] Michele S, Marisa G, Vincenzo C, *et al.* DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(6):e62692.
- [32] Bonin S, Hlubek F, Benhattar J, *et al.* Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues [J]. *Virchows Arch*, 2010, 457(3):309-317.
- [33] Bielawski K, Zaczek A, Lisowska U, *et al.* The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis [J]. *Int J Mol Med*, 2001, 8(5):573-578.
- [34] 钟焱,周钢. EGFR19 基因体细胞突变焦磷酸测序法室内质量控制的建立[J]. *临床检验杂志*, 2016, 34(3):222-224.