

肿瘤突变负荷检测国家参考品

**National reference materials for tumour mutation burden
detection**

【类别】体外诊断试剂参考品

【批号】360042-201901

【性状】DNA 样本, 无色液体

【用途】本参考品为首批研制。参考品原料系以 11 对配对细胞系和 1 对非配对细胞系提取的 DNA, 用于肿瘤突变负荷检测产品的性能评价。适用于高通量测序法(注: 其他方法学产品用户需自行证明其适用性)

【组成和规格】60 支/套, 25 ng/ μ L, 15 μ L/支, 具体组成为:

序号	产品名称	检测项目	备注
1	TMB-1-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
2	TMB-1-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
3	TMB-1-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
4	TMB-1-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
5	TMB-1-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
6	TMB-2-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
7	TMB-2-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
8	TMB-2-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
9	TMB-2-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
10	TMB-2-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
11	TMB-4-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
12	TMB-4-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
13	TMB-4-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
14	TMB-4-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	



中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control

地址:北京市大兴区华佗路 31 号 电话:010 53852448 网址:www.nifdc.org.cn

国家药品标准物质使用说明书

版本号：V2.0

15	TMB-4-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
16	TMB-5-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
17	TMB-5-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
18	TMB-5-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
19	TMB-5-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
20	TMB-5-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
21	TMB-6-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
22	TMB-6-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
23	TMB-6-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
24	TMB-6-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
25	TMB-6-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
26	TMB-7-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
27	TMB-7-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
28	TMB-7-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
29	TMB-7-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
30	TMB-7-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
31	TMB-8-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
32	TMB-8-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
33	TMB-8-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
34	TMB-8-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
35	TMB-8-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
36	TMB-9-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
37	TMB-9-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
38	TMB-9-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
39	TMB-9-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
40	TMB-9-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	



中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control

地址:北京市大兴区华佗路 31 号 电话:010 53852448 网址:www.nifdc.org.cn

国家药品标准物质使用说明书

版本号：V2.0

41	TMB-11-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
42	TMB-11-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
43	TMB-11-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
44	TMB-11-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
45	TMB-11-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
46	TMB-12-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
47	TMB-12-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
48	TMB-12-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
49	TMB-12-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
50	TMB-12-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
51	TMB-13-0%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	配对样本的 control 样本
52	TMB-13-1%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
53	TMB-13-2%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
54	TMB-13-5%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
55	TMB-13-10%	肿瘤基因突变负荷 (TMB)	
56	TMB-14-0%	差异性 SNP/Indel 位点	配对样本的 control 样本
57	TMB-14-1%	差异性 SNP/Indel 位点	
58	TMB-14-2%	差异性 SNP/Indel 位点	
59	TMB-14-5%	差异性 SNP/Indel 位点	
60	TMB-14-10%	差异性 SNP/Indel 位点	

【特性量值】

突变比例 VAF>1%、VAF>3% 及 VAF>5%的突变计算的 TMB 标准值见下表:

样本名称	1%标准 TMB	3%标准 TMB	5%标准 TMB
TMB-1-0	/	/	/
TMB-1-1	15.65	0.29	0.11
TMB-1-2	20.28	2.05	1.05



中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control

地址:北京市大兴区华佗路 31 号 电话:010 53852448 网址:www.nifdc.org.cn

国家药品标准物质使用说明书

版本号：V2.0

TMB-1-5	34.85	8.12	2.27
TMB-1-10	44.52	19.91	9.03
TMB-2-0	/	/	/
TMB-2-1	17.92	0.74	0.37
TMB-2-2	24.52	1.14	0.52
TMB-2-5	21.02	4.68	1.70
TMB-2-10	25.41	11.26	5.44
TMB-4-0	/	/	/
TMB-4-1	14.64	0.24	0.06
TMB-4-2	22.24	1.09	0.30
TMB-4-5	30.22	7.06	1.87
TMB-4-10	38.74	14.91	9.29
TMB-5-0	/	/	/
TMB-5-1	19.84	0.50	0.11
TMB-5-2	19.50	0.57	0.08
TMB-5-5	18.45	2.97	1.06
TMB-5-10	23.36	6.30	4.09
TMB-6-0	/	/	/
TMB-6-1	11.05	0.12	0.00
TMB-6-2	25.28	1.99	1.20
TMB-6-5	28.88	4.21	0.82
TMB-6-10	41.03	8.42	5.48
TMB-7-0	/	/	/
TMB-7-1	15.93	0.21	0.03
TMB-7-2	21.18	0.50	0.06
TMB-7-5	18.82	1.58	0.17
TMB-7-10	18.11	2.81	1.32



中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control

地址:北京市大兴区华佗路 31 号 电话:010 53852448 网址:www.nifdc.org.cn

国家药品标准物质使用说明书

版本号：V2.0

TMB-8-0	/	/	/
TMB-8-1	14.02	0.33	0.05
TMB-8-2	11.20	1.49	0.93
TMB-8-5	13.03	2.73	1.37
TMB-8-10	22.48	6.36	3.24
TMB-9-0	/	/	/
TMB-9-1	6.58	0.30	0.12
TMB-9-2	7.06	0.42	0.12
TMB-9-5	12.18	1.03	0.33
TMB-9-10	12.33	2.30	1.09
TMB-11-0	/	/	/
TMB-11-1	17.93	0.38	0.11
TMB-11-2	10.47	0.58	0.08
TMB-11-5	12.65	3.44	0.99
TMB-11-10	15.18	5.33	3.97
TMB-12-0	/	/	/
TMB-12-1	18.94	0.66	0.05
TMB-12-2	21.09	2.73	0.47
TMB-12-5	23.24	9.44	5.91
TMB-12-10	27.64	13.72	10.91
TMB-13-0	/	/	/
TMB-13-1	11.03	0.44	0.12
TMB-13-2	20.67	1.33	0.27
TMB-13-5	21.09	3.18	2.00
TMB-13-10	33.12	4.70	2.85

【使用方法和要求】



中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control

地址:北京市大兴区华佗路 31 号 电话:010 53852448 网址:www.nifdc.org.cn

- 1、按照各自包含产品肿瘤基因突变负荷方法的肿瘤基因突检测试剂盒说明书或操作规程进行。
- 2、采用本参考品进行检测, 应满足:
 - 1) 企业采用公共数据库数据建立 panel 检测和 WES 检测之间的线性回归方程, 采用的方法如下:
 - a) 下载 TCGA 的 MC3 数据 (<https://gdc.cancer.gov/about-data/publications/mc3-2017>), TCGA 24 个癌症的样本总数是 8301, QC 之后 6668, 有 3 个样本 WES TMB 为 0, 没有参与拟合, 所以最终剩余 6665 个样本, 具体样本信息请见附件 1.
 - b) 本次评估限于癌症类型表中所列的 24 种癌症
 - c) 按照 TCGA 数据通用的 QC 规则对样本和突变进行 QC, 然后从符合要求的突变中选择突变类型表中列出类型的突变, 得到突变集合 M_{raw}
 - d) 计算 TMB, 即每 Mbp CDS 上检出的突变数目。WES TMB 计算时只考虑 SNVs、InDels 和 splice 位点变异 (突变类型表中 a—f)。Panel TMB 计算方法按照各自的计算规则进行
 - e) Panel 和 WES 的一致性评估采用简单线性回归。首先, 获取 WES TMB (y) 和 panel TMB (x) 之间的线性回归曲线 $y = a + bx$ 和决定系数, 该步可由 R 函数 `lm` 实现:
 - i. `lm(y~x, data=your_data)`。
 - ii. 在选定的显著性水平 (参考品设定为 0.1) 下, 该线性回归曲线的预测区间计算可由 R 函数 `predict` 实现:
 - iii. `predict(your_linear_model, interval='predict', level=1-alpha)`。
 - iv. 若有另外的 panel TMB 数值需计算预测区间, 可同样由 R 函数 `predict` 实现:
 - v. `predict(your_linear_model, newdata=your_panel_tmb, interval='predict', level=1-alpha)`。
 - vi. 对应计算代码请见附件 2, 对应代码的说明文档请见附件 4



中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control

地址:北京市大兴区华佗路 31 号 电话:010 53852448 网址:www.nifdc.org.cn

- f) Panel 和 WES TMB 的 Pearson 相关性系数和 Spearman 相关性系数可由 python scipy.stats 的 pearsonr 和 spearmanr 计算, 对应使用方式如下所示, 对应计算代码请见附件 3, 对应代码的说明文档请见附件 4:
- pearsonr(x,y); spearman(x,y)

表 1 癌症类型

BLCA	ESCA	LIHC	READ
BRCA	GBM	LUAD	SKCM
CESC	HNSC	LUSC	STAD
CHOL	KIRC	MESO	UCEC
COAD	KIRP	OV	UCS
DLBC	LGG	PAAD	UVM

表 2 TCGA 数据通用的 QC 规则

样本	MSAF $\geq 10\%$ Artifact 比例 $< 50\%$
突变	Non-artifacts DP ≥ 25 AD ≥ 3 AF $\geq 5\%$

表 3 突变类型

- a. Missense_Mutation
- b. In_Frame_Del
- c. In_Frame_Ins
- d. Frame_Shift_Del
- e. Frame_Shift_Ins
- f. Splice_Site



中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control

地址:北京市大兴区华佗路 31 号 电话:010 53852448 网址:www.nifdc.org.cn

- g. Nonsense_Mutation
- h. Nonstop_Mutation
- i. Translation_Start_Site
- j. Silent

表 4 TMB 计算规则示例

方法	突变集合	纳入 TMB 计算的突变类型	备注
参考品 WES	M_{wes}	a—f	
示例	M_{GP} 、 M_{HR}	a—j	需另行去除驱动突变
Panel 示例	M_{GP} 、 M_{HR}	a—i	
示例	M_{GP} 、 M_{HR}	a—j	需另行去除驱动突变
示例	M_{GP} 、 M_{HR}	a—j	需另行去除驱动突变

得出 panel 检测与公共数据库 WES 检测的线性回归方程并计算样本的标准 TMB 的指标值 (适配 WES 的), 按照 Panel 自身参数估计的该数值的 90CI (90% 置信区间)。

2) 检测参考品盘, 得出除 14 号样本外的其他用于检测 TMB 的参考品 (control 样本除外) 的 TMB 值, 将按照 panel 规则计算的 TMB 值带入 panel 检测与公共数据库 WES 检测的线性回归方程, 并计算样本的标准 TMB 和该值的 90% 置信区间。

3) 根据 panel 计算 TMB 的规则中纳入计算的突变比例, 将计算得到的 TMB 值与参考品相应突变比例的标准 TMB 值进行比较, 要求标准 TMB 值在计算样本的标准 TMB 值 90% 置信区间的比例不少于 90%。

4) 根据已有的两种细胞系有差异的高置信 SNP/Indel 位点标准集, 根据 panel 检测的 bed 文件, 采用 panel 检测的 VCF 与标准集进行比对, 突变位点检测准确性要求 TMB-14-2%、TMB-14-5%、TMB-14-10% 的突变检测准确性应分别不低于 40%、60%、80%。



中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control

地址: 北京市大兴区华佗路 31 号 电话: 010 53852448 网址: www.nifdc.org.cn

注 1：所使用参考基因组版本为 hs37d5；

注 2：VCF 版本为 V4.2，主要包含 CHROM（染色体位置），POS（突变起始位置），ID（变异位点在数据库中的 ID），REF（参考碱基），ALT（突变碱基），QUAL（变异位点的质量），FILTER（过滤信息），INFO（额外信息）。

【包装】 1.5mL 螺口冻存管

【贮藏】 DNA 样本置于-70℃以下保存

【注意事项】

- 1.本品应在-70℃及以下保存和运输，避免 3 次以上反复冻溶；
- 2.使用时应待参考品完全融化，并混合均匀后方可加样；
- 3.本参考品含有人源样本，具有潜在生物危害，请勿随意处置。
- 4.PCR 操作按照分区进行，使用带滤芯的枪头吸取，防止污染。

【有效期】国家药品标准物质不设具体有效期，按照规定条件保存的标准物质，在中国食品药品检定研究院发布停用通知前有效。

【技术咨询电话】 010-67095283

声 明：

- 1.请按本品说明书规定使用，若作他用，用户须自行证明适用性；
- 2.因用户使用或储存不当所引起的损害或投诉，用户自行承担相关责任；
- 3.用户收到本品后应立即核对品种、数量、包装等，若出现质量、数量等不符，相关赔偿只限于标准物质本身，不涉及其他任何损失。

*注：

协作单位：

北京吉因加医学检验实验室有限公司

杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司

南京世和基因生物技术有限公司

深圳华大智造科技有限公司



中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control

地址:北京市大兴区华佗路 31 号 电话:010 53852448 网址:www.nifdc.org.cn