

肿瘤突变负荷检测国家参考品

National reference materials for tumour mutation
burden (TMB) 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】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)	



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

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)	
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)	



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

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)	
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 $MSAF \geq 1\%$ 、 $MSAF \geq 2\%$ 、 $MSAF \geq 3\%$ 、 $MSAF \geq 4\%$ 及 $MSAF \geq 5\%$ 的突变计算的 TMB 标准值见下表:



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

样本名称	1% 标准 TMB	2%标准 TMB	3%标准 TMB	4%标准 TMB	5%标准 TMB
TMB-1-0	/	/	/	/	/
TMB-1-1	1.91	0.14	0.05	0.03	0.03
TMB-1-2	8.98	1.65	0.35	0.11	0.03
TMB-1-5	22.05	14.64	6.80	3.14	1.05
TMB-1-10	23.68	23.14	19.98	13.55	8.29
TMB-2-0	/	/	/	/	/
TMB-2-1	1.14	0.14	0.06	0.03	0.03
TMB-2-2	4.30	1.26	0.23	0.09	0.06
TMB-2-5	12.64	7.50	3.88	2.21	1.27
TMB-2-10	17.53	14.42	11.03	7.52	5.02
TMB-4-0	/	/	/	/	/
TMB-4-1	2.03	0.14	0.11	0.09	0.09
TMB-4-2	7.52	2.18	0.38	0.18	0.09
TMB-4-5	15.06	10.83	6.41	3.39	1.62
TMB-4-10	18.02	16.86	13.27	11.17	8.23
TMB-5-0	/	/	/	/	/
TMB-5-1	1.58	0.67	0.58	0.39	0.35
TMB-5-2	3.79	1.36	0.45	0.32	0.30
TMB-5-5	6.42	5.59	2.97	1.50	1.09
TMB-5-10	6.71	6.24	6.09	5.80	4.50
TMB-6-0	/	/	/	/	/
TMB-6-1	1.48	0.23	0.08	0.03	0.03



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

TMB-6-2	3.79	0.98	0.20	0.12	0.06
TMB-6-5	5.71	3.52	2.30	1.02	0.44
TMB-6-10	7.26	6.86	5.64	3.82	3.15
TMB-7-0	/	/	/	/	/
TMB-7-1	0.39	0.06	0.03	0.03	0.03
TMB-7-2	1.64	0.35	0.09	0.05	0.05
TMB-7-5	3.12	1.68	0.85	0.30	0.14
TMB-7-10	3.50	3.02	2.24	1.39	1.06
TMB-8-0	/	/	/	/	/
TMB-8-1	0.47	0.05	0.05	0.05	0.05
TMB-8-2	2.03	0.47	0.26	0.23	0.20
TMB-8-5	3.58	2.59	0.94	0.50	0.29
TMB-8-10	4.21	3.77	3.58	2.73	1.62
TMB-9-0	/	/	/	/	/
TMB-9-1	0.76	0.14	0.09	0.09	0.09
TMB-9-2	0.95	0.26	0.12	0.08	0.06
TMB-9-5	3.42	1.30	0.61	0.36	0.24
TMB-9-10	3.77	3.02	1.68	1.11	0.76
TMB-11-0	/	/	/	/	/
TMB-11-1	1.33	0.39	0.23	0.21	0.20
TMB-11-2	3.70	1.41	0.44	0.18	0.12
TMB-11-5	5.65	4.67	3.68	1.79	0.89
TMB-11-10	5.41	5.06	4.76	4.12	3.89
TMB-12-0	/	/	/	/	/
TMB-12-1	1.77	0.32	0.14	0.24	0.21
TMB-12-2	5.09	2.21	0.68	0.17	0.06
TMB-12-5	8.55	6.53	4.20	2.50	1.23



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

TMB-12-10	10.27	8.38	7.38	6.08	4.62
TMB-13-0	/	/	/	/	/
TMB-13-1	0.80	0.23	0.18	0.09	0.09
TMB-13-2	1.59	0.67	0.33	0.20	0.14
TMB-13-5	3.08	1.89	0.98	0.59	0.44
TMB-13-10	4.67	3.30	2.77	2.09	1.61

【使用方法和要求】

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变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>)。

■ 选择下表癌症类型：

Study Abbreviation	Study Name
BLCA	膀胱尿路上皮癌
BRCA	乳腺浸润癌
CESC	宫颈鳞状细胞癌和宫颈内膜腺癌
CHOL	胆管癌
COAD	结肠腺癌
DLBC	淋巴样肿瘤弥漫性大 B 细胞淋巴



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：01053852448 网址：www.nifdc.org.cn

	瘤
ESCA	食管癌
GBM	多形胶质母细胞瘤
HNSC	头颈部鳞状细胞癌
KIRC	肾透明细胞癌
KIRP	肾脏肾乳头状细胞癌
LGG	脑低级脑胶质瘤
LIHC	肝细胞肝癌
LUAD	肺腺癌
LUSC	肺鳞状细胞癌
MESO	间皮间皮瘤
OV	卵巢卵巢浆液性囊腺癌
PAAD	胰腺腺癌
READ	直肠腺癌
SKCM	皮肤皮肤黑色素瘤
STAD	胃腺癌
UCEC	子宫体子宫内膜癌
UCS	子宫癌肉瘤
UVM	葡萄膜黑色素瘤

- 去除带有以下标记的样本：“native_wga_mix (Whole Genome Amplification was used early on in TCGA to mitigate low input DNA quantity for exome sequencing. Unfortunately, it led to deletion artifacts, which caused it to be discontinued in favor of using Native DNA)”、“wga (Whole Genome Amplification was used early on in TCGA to mitigate low input DNA quantity for exome sequencing. Unfortunately, it led to deletion artifacts, which caused it to be discontinued in favor of using Native DNA)”、“nonpreferredpair (flags



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

certain pairs as non-preferred, eg a pair with a normal tissue (NT) sample when a pair with a normal blood (NB) sample also exists)”, “gapfiller (One or more of the tumor/normal BAMs used for variant calling was a 'gap-filler' sequencing, meaning that it was an addition to existing sequencing efforts, done to 'fill in the gaps')”, 上述标签释义详见

<https://www.synapse.org/#!/Synapse:syn7214402/wiki/406007>; 去除 MSAF<10%的样本。

- 去除带有以下标记的变异：“StrandBias (G>T artifacts have biased support on the positive genomic strand compared to C>A mutations on the negative genomic strand.)”、“common_in_exac (common germline/artifact in ExAC v0.3 with allele count >=50, unless it's a known hotspot per Chang et al., Nature Biotechnology 34, 155-163 (2016))”、“oxog(variant was a likely oxo-G artifact based on oxoQ)”, 上述标签释义详见 <https://www.synapse.org/#!/Synapse:syn7214402/wiki/406007>; 若某样本中半数或以上的变异均带有上述标记, 则去除该样本。



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

- b) 按照确定的 TCGA 数的 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 Mraw
- MC3 总样本数 10,295, QC 后剩余 6,704, 具体样本信息请见附件 1。
 - 保留以下类型的变异: Frame_Shift_Del、Frame_Shift_Ins、In_Frame_Del、In_Frame_Ins、Missense_Mutation、Nonsense_Mutation、Nonstop_Mutation、Silent、Translation_Start_Site。
 - 保留符合以下全部条件的变异: $t_depth \geq 25$ 、 $t_alt_count \geq 3$ 、 $t_alt_count/t_depth \geq 0.05$ 、 $ExAC_AF < 0.01$ 或 $ExAC_AF == NULL$ 、 $ExAC_AF_EAS < 0.01$ 或 $ExAC_AF_EAS == NULL$ 。
 - 从上述过滤后的中分别选择位于 IDT 全外以及各家 Panel 编码区内的突变 (芯片区间两翼延伸各 50 bp)
- c) 计算 TMB, 即每 Mbp CDS 上检出的突变数目。保留以下类型变异: Frame_Shift_Del、Frame_Shift_Ins、In_Frame_Del、In_Frame_Ins、Missense_Mutation、Nonsense_Mutation、Nonstop_Mutation、Splice_Site、Translation_Start_Site, 计算各样本变异数目并转换为 “mut/Mb”。Panel TMB 计算方



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

法按照各自的计算规则进行

- d) 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, 该步由 R 函数

`lm`(<http://www.endmemo.com/program/R/lm.php>) 实现:

- ◆ `lm(y~x, data=your_data)`。
- ◆ 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:
- ◆ `predict(your_linear_model, interval='predict', level=1-alpha)`。
- ◆ 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:
- ◆ `predict(your_linear_model, newdata=your_panel_tmb, interval='predict', level=1-alpha)`。
- ◆ 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

- e) 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



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

- 代码的说明文档请见附件 4: pearsonr(x,y); spearman(x,y)
- f) 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%、80%、90%。
- 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),



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

INFO (额外信息)。

MSAF: max somatic allele frequency, VAF: variation allele frequency。

【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

*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

上海源奇生物医药科技有限公司



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn

深圳裕策生物科技有限公司

菁良基因科技(深圳)有限公司

声 明:

1. 本参考品为首批研制。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。



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:01053852448 网址:www.nifdc.org.cn