

【产品名称】

通用名称：EGFR 基因突变检测试剂盒（测序法）

【包装规格】20 人份/盒

【预期用途】

该产品用于定性检测经临床确诊为非小细胞肺癌患者石蜡包埋肺部癌组织样本中的 EGFR 基因外显子 18-21 的突变。

肺癌是我国发病率和死亡率最高的癌症，其中非小细胞肺癌（Non-Small Cell Lung Cancer，NSCLC）约占所有肺癌的 80%。EGFR 酪氨酸激酶抑制剂，能特异性地抑制具有 EGFR 基因突变的非小细胞肺癌的生长，改善预后。因此，在使用酪氨酸激酶抑制剂治疗前，《非小细胞肺癌临床实践指南》推荐进行 EGFR 的突变检测。

EGFR 基因由 28 个外显子组成。其酪氨酸激酶功能区由外显子 18-24 编码，迄今为止发现的 EGRF 基因突变主要位于外显子 18-21。本试剂盒用于检测 EGFR 基因外显子 18-21 上的突变位点（详见附表 1），检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

PCR 测序法原理是采用毛细管电泳技术取代传统的聚丙烯酰胺平板电泳，应用 ABI 公司专利的四色荧光染料标记的双脱氧核苷三磷酸（标记终止物法），因此通过单引物 PCR 测序反应，生成的 PCR 产物则是相差 1 个碱基的 3’末端为 4 种不同荧光染料的单链 DNA 混合物，使得四种荧光染料的测序 PCR 产物可在一根毛细管内电泳，从而避免了泳道间迁移率差异的影响，大大提高了测序的精确度。由于分子大小不同，在毛细管电泳中的迁移率也不同，当其通过毛细管读数窗口段时，激光检测器窗口中的电荷耦合器件（CCD）摄影机检测器就可对荧光分子逐个进行检测，激发的荧光经光栅分光，以区分代表不同碱基信息的不同颜色的荧光，并在电荷耦合器（CCD）摄影机上同步成像，分析软件可自动将不同荧光转变为 DNA 序列，从而达到 DNA 测序的目的。分析结果能以凝胶电泳图谱、荧光吸收峰图或碱基排列顺序等多种形式输出。

本试剂盒针对 EGFR 基因外显子 18-21，设计特异性引物，采用 PCR 扩增法结合测序技术，检测 EGFR 基因第 18-21 外显子的突变情况。

【主要组成成分】

组分名称		规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂	EGFR PCR 反应液（18）	740μL/管	1	引物、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	EGFR PCR 反应液（19）	740μL/管	1	引物、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	EGFR PCR 反应液（20）	740μL/管	1	引物、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	EGFR PCR 反应液（21）	740μL/管	1	引物、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	EGFR 酶系	240μL/管	1	热启动 Taq 酶
质控品	EGFR 阴性质控品	120μL/管	1	灭菌纯化水
	EGFR 野生型阳性质控品	120μL/管	1	EGFR 野生型 DNA
	EGFR 突变型阳性质控品（19）	30μL/管	1	EGFR 19 外显子 E746-A750del (2) 突变型质粒
	EGFR 突变型阳性质控品（21）	30μL/管	1	EGFR 21 外显子 L858R 突变型质粒
测序试剂	EGFR 测序引物（18）	20μL/管	1	引物
	EGFR 测序引物（19）	20μL/管	1	引物
	EGFR 测序引物（20）	20μL/管	1	引物
	EGFR 测序引物（21）	20μL/管	1	引物
	测序染料（BigDye）	160μL/管	1	脱氧核苷三磷酸、双脱氧核苷三磷酸、酶
	测序反应液（BigDye Sequencing buffer）	240μL/管	1	三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	高纯度去离子甲酰胺（Hi-Di Formamide）	800μL/管	1	甲酰胺

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

需自备的试剂：去离子水，灭菌纯化水，无水乙醇，70%乙醇， SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒（生工生物工程（上海）股份有限公司，（cat:SK8142）），125 mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA），3 mol/L 醋酸钠（pH5.2），QIAamp DNA FFPE Tissue Kit（Qiagen 公司，cat.no.60404）。

质控品说明：EGFR 阴性质控品为灭菌纯化水，EGFR 阳性质控品、EGFR 阳性野生型质控品分别通过含 EGFR 目的突变片段，EGFR 目的野生型片段的 DNA 片段制备而成，其浓度为 10ng/μL。质控品都通过灭活处理。

【储存条件及有效期】

保存于-20℃±5℃，避免反复冻融，有效期 9 个月。冻融次数应不超过 4 次；试剂开瓶次数不超过 7 次；运输采用干冰（或者冰袋）保持低温，运输时间不应超过 3 天。

试剂盒生产日期及有效日期见产品包装标签。

【适用仪器】ABI Veriti DX Thermal Cycler（定性 PCR 仪）， ABI 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzer（基因分析仪）

【样本要求】

适用于本试剂盒的样本为经临床确诊为非小细胞肺癌患者的石蜡包埋肺部癌组织样本。

- 样本采集：应确定所采集样品中含有肿瘤病变细胞。石蜡包埋样品所取部分尽量在蜡块中部。
- 储存和运输：石蜡包埋组织切片样本应室温防尘保存和运送，保存期为 12 个月。

【检验方法】

1. 核酸提取（样本制备区）

建议石蜡包埋组织可使用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 试剂盒提取 DNA。使用 NanoDrop 1000 Spectrophotometer 或同类仪器对提取后的核酸进行定值。按试剂盒步骤提取的核酸 DNA，可立即加样或置于-20±5℃保存备用。

2. PCR 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出 EGFR PCR 反应液（18-21）、EGFR 酶系，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。

18 外显子测序：取 N 个（N=待测样本个数+EGFR 阴性质控品+EGFR 野生型阳性质控品） 反应管；

20 外显子测序：取 N 个（N=待测样本个数+EGFR 阴性质控品+EGFR 野生型阳性质控品） 反应管；

19 外显子测序：取 N 个（N=待测样本个数+EGFR 阴性质控品+EGFR 野生型阳性质控品+ EGFR 突变型阳性质控品（19）） 反应管；

21 外显子测序：取 N 个（N=待测样本个数+EGFR 阴性质控品+EGFR 野生型阳性质控品+ EGFR 突变型阳性质控品（21）） 反应管；

单人份 EGFR 18-21 外显子 PCR 扩增体系配制如下表：

组分	EGFR PCR 反应液（18-21）	EGFR 酶系	总体积
用量	37μL	3μL	40μL

- 按实际检测数量吸取各组份的量，充分混合，混合好后进行短时离心将管壁上的液体全部离心至管底，之后按 40μL/管分装到 PCR 管中。
3. 加样（样本制备区）
- 往上述 PCR 反应管中用带滤芯吸嘴分别加入提取后的待测样本核酸、EGFR 阴性质控品、EGFR 野生型阳性质控品、EGFR 突变型阳性质控品（19）、EGFR 突变型阳性质控品（21）各 10μL。（样本为新鲜提取的 DNA 或者旧的提取样本在冰上融化，旋涡振荡 5 秒）。盖紧管盖，8,000rpm 离心数秒后转移至扩增检测区。
4. PCR 扩增（扩增区）
- 将各反应管放入 PCR 仪，按下列条件扩增：50℃ 2 分钟，95℃ 15 分钟预变性，然后按（94℃ 30 秒→55℃ 30 秒→72℃ 45 秒）×40 个循环扩增；最后 72℃ 延伸 7 分钟。
5. 产物纯化（产物分析区）
- PCR 扩增结束以后，取 5μLPCR 产物进行 1-2%琼脂糖凝胶电泳，观察是否有目的条带扩增（18 外显子 PCR 目的条带大小为 382bp；19 外显子 PCR 目的条带大小为 297bp；20 外显子 PCR 目的条带大小为 390bp；21 外显子 PCR 目的条带大小为 304bp），如观察到明显的单一目的条带，则将上述 PCR 产物及时进行纯化，具体操作详见 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒说明书。按试剂盒步骤纯化获得的 PCR 产物进行电泳鉴定定值（PCR 产物浓度范围为 10-50ng），可立即进行测序 PCR 或置于-20±5℃保存备用（保存时间不要超过 2 天）。
6. 测序 PCR
- 纯化的PCR产物进行电泳鉴定定值，按下述表格配制测序PCR体系

试剂	用量
PCR产物	XμL（约10-50ng）
测序染料（BigDye）	2μL
测序反应液（BigDye Sequencing Buffer）	3μL
测序引物	1μL
灭菌纯化水	14-XμL
总体积	20μL

- 灭菌纯化水用量视PCR产物加入体积而定，总体积应为20 μL。
- 将各反应管放入定性PCR仪，按下列条件扩增：96℃ 1分钟→（96℃ 10秒→ 50℃ 5秒→60℃ 4分钟）× 25个循环→4℃保温。
7. 测序产物纯化（产物分析区）
- 7.1 取测序PCR反应结束后的PCR反应管，各PCR反应管加入2μL 125 mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）和2μL 3 mol/L醋酸钠（pH5.2）到管底。
- 7.2 再加入50μL 无水乙醇，盖紧管盖，短时振荡后，室温避光放置15分钟。
- 7.3 4℃下12,000rpm离心30分钟，立即小心去上清（若不能立即操作，请在操作前重新离心3分钟）。
- 7.4 每管加入150μL 预冷70%乙醇，4℃下12,000rpm离心10分钟，立即小心去上清（尽量将管底的70%乙醇吸干净，若不能立即操作，请在操作前重新离心3分钟），此步骤可重复操作一次。
- 7.5 室温避光放置15-30分钟（观察管底液体，使70%乙醇挥发干净），此步骤产物可密封避光置于-20±5℃保存5天。
- 7.6 加入10μL 高纯度去离子甲酰胺（Hi-Di Formamide），短时振荡溶解DNA，进行短时离心将管壁上的液体全部离心至管底。
- 7.7 溶解后的样品在定性PCR仪上 95℃变性5分钟，迅速置冰中冷却4分钟后，准备上样电泳。
- 7.8 96孔反应板纯化方法请参照BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit用户手册。

8. 基因分析仪测序
- 8.1 加样：变性后的测序产物加入与基因分析仪配套的 96 孔板，盖好，按加样顺序编辑样品列表。根据测序仪型号 ASSY 选用具有 IVD 标志的 Seq std BDT V3.1 ASSYXL POP7 或 Seq std BDT V3.1 ASSY POP7 进行测序。
- 8.2 使用 ABI 基因分析仪时，应用 ABI 公司 Data Collection 与 Sequencing Analysis 软件进行数据收集和分析。Data Collection 与 Sequencing Analysis 分析软件的进一步信息请参阅 Data Collection 与 Analysis Software 用户手册。测序结果自动保存在预设位置，反应结束后打开测序结果进行分析，得到.ab1、.phd.1 格式的文件。

9. 结果分析
- 9.1 运行 SeqScanner 程序，分析导入测序结果。
- 9.2 （1）EGFR 外显子 18：按 Find 快捷键，找到序列“CAAAGTGCTG”。
- （2）EGFR 外显子 19：按 Find 快捷键，找到序列“TATCAA”。
- （3）EGFR 外显子 20：按 Find 快捷键，找到序列Ⓚ“GTGATGGCCA”；找到序列Ⓚ“CTCATCA”。
- （4）EGFR 外显子 21：按 Find 快捷键，找到序列“GATTTTGGGC”。

如果不能找到此序列，可能样本序列个别碱基发生突变情况，应校正后重新查找。

- 9.3 突变分析
- （1）EGFR 外显子 18：从找到的序列往后的第 1-3 个碱基，野生型为 GGC；否则为 EGFR 外显子 18 突变，详细如下表。
- （2）EGFR 外显子 19：从找到的序列往后的第 1-12 个碱基，野生型为 GGAATTAAGAGA；否则为 EGFR 外显子 19 突变，详细如下表。
- （3）EGFR 外显子 20：从找到的序列 往后的第 1-21 个碱基，野生型为 GCGTGGACAACCCCCACGTGT；从找到的序列 往后的第 1 个碱基，野生型为 C；否则为 EGFR 外显子 20 突变，详细如下表。
- （4）EGFR 外显子 21：从找到的序列往后的第 1 个碱基和第 10 个碱基，野生型为 T；否则为 EGFR 外显子 21 突变，详细如下表。

外显子	Cosmic ID	突变名称	碱基变化	查找序列	查找序列往后的碱基序列
18	6252	G719S	2155G>A	CAAAGTGCTG	AGC
	6253	G719C	2155G>T		TGC
	6239	G719A	2156G>C		GCC
19	6223	E746_A750del(1)	2235_2249 del 15	TATCAA	AACATCTC
	13551	E746_T751>I	2235_2252 >AAT(complex)		AATATCTC
	6225	E746_A750del(2)	2236_2250 del 15		GACATCTC
	12728	E746_T751del	2236_2253 del 18		GTCTCCGA
	12384	E746_S752>V	2237_2250 >T(complex)		GGTACATC
	12678	E746_T751>A	2237_2251 del 15		GGCATCTC
	12367	E746_S752>A	2237_2254 del 18		GGCTCCGA
	12422	L747_A750>P	2238_2248 >GC(complex)		GGAGCCAACAT
	12419	L747_T751>Q	2238_2252 >GCA(complex)		GGAGCAATCTC
	6220	E746_S752>D	2238_2255 del 18		GGATCCGAAAG
	6218	L747_E749del	2239_2247 del 9		GGAAGCAACAT
	12382	L747_A750>P	2239_2248 TTAAGAGAAG>C(complex)		GGAACCAACAT
	12383	L747_T751>P	2239_2251>C(complex)		GGAACCATCTC
	6254	L747_T751del	2239_2253 del 15		GGAATCTCCGA
	6255	L747_S752del	2239_2256 del 18		GGAACCGAAAG
	12387	L747_P753>Q	2239_2258 >CA(complex)		GGAACAGAAAG
	6210	L747_T751>S	2240_2251 del 12		GGAATCATCTC
	12369	L747_T751del	2240_2254 del 15		GGAATCTCCGA
	12370	L747_P753>S	2240_2257 del 18		GGAATCGAAAG
20	6241	S768I	2303 G>T	GTGATGGCCA	T
	12376	V769_D770insASV	2307_2308 ins (GCCAGCGTG)		GCGTGGCCAGCGTGGAC

	12378	D770_N771insG	2310_2311 ins GGT		GCGTGGACGGTAAC
	12377	H773_V774insH	2319_2320 ins CAC		GCGTGGACAACCCCACCACG
	6240	T790M	2369 C>T		T
	6224	L858R	2573 T>G		G
21	6213	L861Q	2582 T>A	GATTTTGGGC	TGGCCAAACA

9.4 若测序峰图不能满足分析要求，应重新测序。

10. 质控标准

- 10.1 EGFR 阴性质控品：检测结果，无 EGFR 目的片段，为 EGFR 阴性。
- 10.2 EGFR 野生型阳性质控品：检测结果为 EGFR 野生型
- 10.3 EGFR 突变型阳性质控品（19）：检测结果为 EGFR 19 号外显子 E746_A750de1(2) 突变型。
- 10.4 EGFR 突变型阳性质控品（21）：检测结果为 EGFR 21 号外显子 L858R 突变型。

在以上各项同时满足的条件下，本次检测实验有效，否则全部实验应重新进行。

【阳性判断值】

通过临床试验验证，本试剂盒的判定标准为：当测序 raw data 信号<100rfu，视该信号值为背景信号；当 raw data 信号值≥100rfu 时，直接作为碱基判定依据。

【检验结果的解释】

- 1. 结果判定：采用 SeqScanner 软件进行分析，若与 EGFR 野生型序列匹配，则判定为 EGFR 野生型。其他则为突变型。对于 EGFR 19 外显子和 EGFR 20 外显子插入突变的测序结果，其野生型和突变型的测序峰值会混在一起，造成从突变位置开始，测序峰会混乱。判断时去除野生型的测序峰，根据剩下的测序峰判断其突变类型。若因测序峰混乱导致不能判断其突变类型，则相应记录为 EGFR 19 外显子突变或 EGFR20 外显子插入突变。
- 2. 检测结果阴性只能说明样本含有的 EGFR 基因浓度低于本试剂盒的检测下限或者 EGFR 突变基因在该样本中占的比例低于 20%，测序无法检出。
- 3. 测序结果为包含目的位点的 4 段 DNA 序列，该序列内的其他突变点也可以同时检出。

【检验方法的局限性】

- 1. 浓度低于 2ng/μL 或突变率低于 20%的样本不适合用本试剂盒。
- 2. 本试剂盒可以检测 EGFR 的 18-21 外显子的基因突变，对其他区段的突变无法检测。
- 3. 保存年限过久的石蜡组织样本可能提取不出合格的 DNA。

【产品性能指标】

- 1. 测定范围：本试剂盒的检测范围为 2ng/μL~100ng/μL。
- 2. 最低检出量：本试剂盒最低检出量为样本总核酸浓度为 10ng/μL 时可检出 20%突变率。
- 3. 本试剂盒不受内源性干扰物质（胆红素、甘油三酯、血红蛋白和白蛋白）和外源性干扰物质（二甲苯、无水乙醇、吉非替尼、厄洛替尼）的影响。
- 4. 精密度：检测浓度为含有 20%突变的 10ng/μL 的 EGFR 阳性样本，检测结果均为 EGFR 阳性，批内和批间重复性好，符合率为 100%。
- 5. 交叉反应：与其它人基因组序列（含 BRAF 基因、PIK3CA 基因、C-KIT 基因片段的质粒）进行交叉实验，检测结果表明并无交叉反应。
- 6. 临床检测结果表明，本试剂盒的灵敏度（阳性符合率）为 97.60%，特异性为（阴性符合率）100%，总符合率为 98.77%。

【注意事项】

- 1. 本试剂盒仅用于体外检测。
- 2. 实验前请仔细阅读本说明书。
- 3. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样品应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，操作中使用的试管、吸头丢弃前需经灭菌处理。标本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 4. 试剂盒中组分需在有效期内使用，不使用本试剂盒提供的组分进行实验将可能导致错误结果。
- 5. 试剂盒阴性质控品和阳性质控品虽经验证病毒已灭活，但没有任何一种已知的测试方法可以完全确保人源性物质不含有传染性物质。所有人源性物质都可能具有潜在的传染性，操作时应视为传染性物质进行处理。
- 6. 实验人员必须进行专业培训。PCR 实验应分别在样品制备区，试剂准备区，扩增区和产物分析区进行，各区应相对分隔。人和实验用物品应从试剂准备区、样品制备区、扩增区到产物分析区单向流动，PCR 试剂盒不可存放于产物分析区。
- 7. 标本处理区应安装负压超净工作台。实验过程中必须穿工作服，各实验区工作服应分开。实验过程应带一次性手套，使用自卸管移液器。
- 8. 所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。
- 9. 对每次实验应进行质量控制。
- 10. 本实验测序仪工作环境实验室温度可维持在 15~30℃，无温度波动；湿度可维持在 20~80%，无凝露。
- 11. 标本制备区所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；实验完毕应用 10%次氯酸或 70%酒精或紫外线灯处理工作台和移液器。
- 12. 测序反应要求使用密封性能良好的的反应管，否则会影响测序效果，反应后体积小于 8μl 应放弃测序。推荐使用 Axygen 0.2ml 反应管。
- 13. 配制测序体系过程应在冰上进行，测序试剂应预先分装，避免反复冻融。
- 14. 测序操作应交予受专业测序培训的人员操作。若测序峰图不能满足分析要求，应重新测序。

【参考文献】

- 1.Yi-Long Wu et al, Epidermal growth factor receptor mutations and their correlation with gef itinib therapy in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis based on updated individual patient data from six medical centers in mainland China. J Thorac Oncol. 2007; 2: 430-439.
- 2.Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med 2009,361:947-957.
- 3.Inoue A, Kobayashi K, Usui K, et al. First-line gefitinib for patients with advanced non-small cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy[J]. J Clin Oncol 2009,27:1394-1400.
- 4.Kobayashi SI,Canepa HM,Bailey A S,et al.Compound EGFR mutations and response to EGFR tyrosine kinase inhibitors[J],J Thorac Oncol,2013,8(1):45-51.
- 5.ZhangY L,Sun Y H,et al.Sequential treatment of tyrosine kinase inhibitors and chemotherapy for EGFR-mutated non-small cell lung cancer:a meta-analyisi of Phase III trials[J].Onco Targets and Therapy,2013,6:1771-1777.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司
住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号
联系方式：
传真：020-32068820 电话：400 000 0340 020-32290789
邮政编码：510665 网址：http://www.daangene.com
售后服务单位名称：广州达安基因股份有限公司
生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。
生产许可证编号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号

【说明书核准日期及修改日期

附表 1:

外显子	Cosmic ID	突变类型	碱基变化
18	6252	G719S	2155G>A
	6253	G719C	2155G>T
	6239	G719A	2156G>C
19	6223	E746_A750del (1)	2235_2249 del 15
	13551	E746_T751>I	2235_2252 >AAT(complex)
	6225	E746_A750del (2)	2236_2250 del 15
	12728	E746_T751del	2236_2253 del 18
	12384	E746_S752>V	2237_2250 >T(complex)
	12678	E746_T751>A	2237_2251 del 15
	12367	E746_S752>A	2237_2254 del 18
	12422	L747_A750>P	2238_2248 >GC(complex)
	12419	L747_T751>Q	2238_2252 >GCA(complex)
	6220	E746_S752>D	2238_2255 del 18
	6218	L747_E749del	2239_2247 del 9
	12382	L747_A750>P	2239_2248 TTAAGAGAAG>C(complex)
	12383	L747_T751>P	2239_2251>C(complex)
	6254	L747_T751del	2239_2253 del 15
	6255	L747_S752del	2239_2256 del 18
	12387	L747_P753>Q	2239_2258 >CA(complex)
	6210	L747_T751>S	2240_2251 del 12
	12369	L747_T751del	2240_2254 del 15
	12370	L747_P753>S	2240_2257 del 18
20	6241	S768I	2303 G>T
	12376	V769_D770insASV	2307_2308 ins (GCCAGCGTG)
	12378	D770_N771insG	2310_2311 ins GGT
	12377	H773_V774insH	2319_2320 ins CAC
	6240	T790M	2369 C>T
21	6224	L858R	2573 T>G
	6213	L861Q	2582 T>A