

2019 年 1 月

therascreen[®] EGFR RGQ PCR Kit

手冊



版本 2



供體外診斷使用

可供與 Rotor-Gene[®] Q MDx 儀器搭配使用



874111



QIAGEN Manchester Ltd Skelton House, Lloyd Street North,
Manchester, M15 6SH, UK



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, 德國



1116287ZH-TW

目錄

適用範圍	6
摘要與說明	7
程序原理	9
提供的材料	12
試劑組內容物	12
需要但並未提供的材料	13
警告和注意事項	15
一般注意事項	15
試劑儲存與處理	17
運輸條件	17
儲存條件	17
檢體處理與儲存	18
程序	19
DNA 提取與製備	19
操作程序：樣本評估	20
操作程序：EGFR 突變檢測	31
結果判讀（自動）	43
Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package 軟體標幟	44
故障排除指南	48
品質控制	49
限制	49
效能特性	50

分析效能	50
空白極限 (LOB)、工作範圍和臨界值	50
DNA 輸入對 ΔC_T 值的影響	51
交叉反應性	51
準確度：與參考分析方法進行比較	52
檢測極限 (LOD) 值	52
干擾	54
再現性	55
臨床效能	57
臨床結果資料：GIOTRIF®	57
臨床結果資料：IRESSA®	59
參考資料	61
符號	63
附錄 A：therascreen EGFR RGQ PCR Kit 人工操作程序	64
一般資訊	64
操作程序：建立溫度曲線	64
程序（人工）	75
操作程序：樣本評估（人工）	75
操作程序：EGFR 突變檢測（人工）	75
操作程序：therascreen EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q 預備	75
結果判讀（人工）	81
軟體分析設定	81
樣本評估資料分析	82
EGFR 突變檢測資料分析	83

附錄 B：安裝 <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package 軟體	91
聯絡資訊	94
訂購資訊	95
手冊修訂歷程記錄	97

適用範圍

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 是一種體外診斷檢測工具，可檢測 EGFR 基因中的 29 種體細胞突變。它可對非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者腫瘤樣本的突變狀態進行定性評估。

評估結果可用於幫助臨床醫生識別哪些 NSCLC 患者可能會受益於 EGFR 酪胺酸激酶抑制劑治療。

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 可對從 NSCLC 患者的福馬林固定、石蠟包埋 (FFPE) 腫瘤組織中提取的 DNA 樣本進行檢測，並在 Rotor-Gene Q MDx 儀器上運轉。該產品僅可由經過培訓的人員在專業的實驗室環境中使用。

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 適用於體外診斷用途。

摘要與說明

在人類癌症中已發現存在 EGFR 致癌基因突變 (1, 2)。這些突變的存在與非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者對特定酪胺酸激酶抑制劑 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 治療的反應相關 (3–8)。在美國、歐洲或澳洲患者中，此類 EGFR 致癌基因突變在 NSCLC 患者總人群中的發生機率約為 10%，而在日本和台灣患者中，發生機率高達 30% (1, 2, 9)。

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 是一種即用型試劑組，可在 Rotor-Gene Q MDx 儀器上利用聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 檢測 29 種 EGFR 癌症相關基因突變。

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 採用 Scorpions® (10) 和 ARMS (擴增受阻突變體系) (11) 技術，可在野生型基因體 DNA 背景下檢測 EGFR 致癌基因外顯子 18、19、20 和 21 中的 29 種突變 (表 1)。以下為突變概要：

- 外顯子 19 中的 19 種缺失突變 (可檢測這 19 種缺失突變中的任何一種的存在，但無法區分它們)
- 外顯子 20 中的三種插入突變 (可檢測這三種插入突變中的任何一種的存在，但無法區分它們)
- G719X (可檢測 G719S、G719A 或 G719C 的存在，但無法區分它們)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

所採用的這些方法具有高度選擇性，並且根據存在的 DNA 總量，可在野生型基因體 DNA 背景下檢測較低比例的突變型 DNA。這些選擇性和檢測極限優於染料終止子定序等技術。

表 1：突變和 COSMIC 識別編號清單

外顯子	突變	COSMIC* ID	鹼基改變
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	缺失	12384	2237_2255>T
		12387	2239_2258>CA
		12419	2238_2252>GCA
		12422	2238_2248>GC
		13551	2235_2252>AAT
		12678	2237_2251del15
		6218	2239_2247del9
		12728	2236_2253del18
		12367	2237_2254del18
		6210	2240_2251del12
		6220	2238_2255del18
		6223	2235_2249del15
		6225	2236_2250del15
		6254	2239_2253del15
		6255	2239_2256del18
		12369	2240_2254del15
		12370	2240_2257del18
20	S768I	6241	2303G>T
	插入	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
	T790M	6240	2369C>T
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

* COSMIC：癌症體細胞突變目錄：<http://cancer.sanger.ac.uk/>。

程序原理

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 包含八種獨立的 PCR 擴增反應混合液：七種 EGFR 致癌基因外顯子 18、19、20 和 21 突變特異性反應液及一種外顯子 2 野生型對照液。該試劑組的主要組件說明如下。

ARMS

對偶基因或突變特異性擴增透過 ARMS 實現。*Taq* DNA 聚合酶 (*Taq*) 可有效區分 PCR 引物 3' 端上的匹配與錯配情況。即使在大多數序列未攜帶突變的樣本中，特定突變序列亦會選擇性擴增。當引物完全匹配時，擴增將以全效率向前推進。若 3' 鹼基錯配，則僅會發生低量的背景擴增。

Scorpions

擴增檢測使用 *Scorpions* 執行。*Scorpions* 是雙官能分子，含有與探針共價結合的 PCR 引物。探針中的螢光基團與已整合到探針中的淬滅劑相互作用，進而減弱螢光。在 PCR 過程中，當探針與擴增子相結合時，螢光基團便會與淬滅劑分離，促使發生可檢出的螢光增強。

試劑組型式

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 提供八種檢測：

- 一種對照檢測 (CTRL)
- 七種突變檢測

所有反應混合液均含標記有羧基螢光素 (FAM™) 的用於檢測標靶的試劑，以及標記有六氟螢光素 (HEX™) 的內部對照檢測劑。內部對照檢測可檢測是否存在可能導致偽陰性結果的抑制物。若存在 FAM 擴增，內部對照擴增可能在競爭中處於劣勢，內部對照的目的是為了證明如果沒有 FAM 擴增，則是真實陰性結果，而不是失敗的 PCR 反應。

檢測

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 檢測程序分為兩步。在第一步中，進行對照檢測，以評估樣本中的總可擴增 EGFR DNA。在第二步中，進行突變和對照檢測，以確定是否存在突變型 DNA。

對照檢測

使用標記有 FAM 的對照檢測評估樣本中的總可擴增 EGFR DNA。對照檢測的擴增區域為 EGFR 基因外顯子 2。我們設計了引物和 *Scorpions* 探針，以避免任何已知的 EGFR 多態性。

突變檢測

每種突變檢測均含有用 FAM 標記的 *Scorpions* 探針和 ARMS 引物，用於區分野生型 DNA 和特定突變型 DNA。

對照

注意：所有實驗檢測必須含有陽性和陰性對照。

陽性對照

每次檢測必須在試管 1-8 中裝入陽性對照。*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 含有 EGFR 陽性對照液 (Positive Control, PC)，在陽性對照反應中用作模板。將評估陽性對照結果，以確保試劑組在聲明的標準限度內進行檢測。

陰性對照

每次檢測必須在試管 9-16 中含有陰性對照（「無模板對照」：NTC）。*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 含有 NTC 用水做為無模板對照的「模板」。無模板對照用於評估運轉設定過程中任何可能的污染，並用於評估內部對照反應的效能。

內部對照反應評估

除了目標反應之外，每種反應混合液還含有一種內部對照 (internal control, IC)。失敗表示可能存在導致不準確結果的抑制物，或試管發生了操作者設定錯誤。內部對照採用非 EGFR 相關性寡核苷酸標靶序列、未標記的引物及用 HEX 標記的 *Scorpions* 引物，以便將其與對照和突變反應混合液中的用 FAM 標記的 *Scorpions* 區分開來。若存在 FAM 擴增，內部對照擴增可能在競爭中處於劣勢，因而生成的 IC C_T (HEX) 值可能在規定範圍外。對於這些樣本，FAM 結果仍然有效。

樣本評估

我們強烈建議使用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 隨附的對照反應混合液（試管 CTRL）對樣本中的總可擴增 EGFR DNA 進行評估。對照檢測的擴增區域為 EGFR 基因外顯子 2。我們建議僅使用對照檢測設立樣本，使用 EGFR 陽性對照液 (PC) 做為陽性對照，使用「模板」用水做為無模板對照。

注意：DNA 評估應當基於 PCR，並且可能與基於吸光度讀數的定量有差異。本產品提供額外的對照反應混合液（試管 CTRL），在使用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 進行分析前對樣本中的 DNA 品質和數量進行評估。

平台和軟體

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 專門設計用於與 Rotor-Gene Q MDx 儀器搭配使用。透過 *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體為不同的循環參數或「運轉」設定 Rotor-Gene Q MDx 儀器。

therascreen EGFR CE Assay Package 軟體包含兩個模板：「*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template」（用於樣本評估）和「*therascreen* EGFR CE Locked Template」（用於檢測 EGFR 突變）。這些模板包含 PCR 運轉參數並可計算結果。

可以在開放模式（即不使用 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體）下將 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 與 Rotor-Gene Q 軟體版本 2.3 配合使用。如需詳細資訊，請參閱第 64 頁上的「附錄 A：therascreen EGFR RGQ PCR Kit 人工操作程序」。

提供的材料

試劑組內容物

therascreen EGFR RGQ PCR Kit				(24)
目錄編號				874111
反應次數				24
顏色	試劑名稱	試管 ID		體積
紅色	Control Reaction Mix (對照反應混合液)	1	CTRL	2 × 600 µl
紫色	T790M Reaction Mix (T790M 反應混合液)	2	T790M	600 µl
橙色	Deletions Reaction Mix (缺失反應混合液)	3	Del	600 µl
粉紅色	L858R Reaction Mix (L858R 反應混合液)	4	L858R	600 µl
綠色	L861Q Reaction Mix (L861Q 反應混合液)	5	L861Q	600 µl
黃色	G719X Reaction Mix (G719X 反應混合液)	6	G719X	600 µl
灰色	S768I Reaction Mix (S768I 反應混合液)	7	S768I	600 µl
藍色	Insertions Reaction Mix (插入反應混合液)	8	Ins	600 µl
米色	EGFR Positive Control (EGFR 陽性對照液)	9	PC	300 µl
薄荷色	Taq DNA Polymerase (Taq DNA 聚合酶)	Taq	2 × 80 µl	2 × 80 µl
白色	Nuclease-free water for No Template Control (無模板對照用無核酸酶水)	NTC	1.9 ml	1.9 ml
白色	Nuclease-free water for Dilution (稀釋用無核酸酶水)	Dil.	1.9 ml	1.9 ml
therascreen EGFR RGQ PCR Kit 手冊				1

需要但並未提供的材料

在操作化學物質時，務必穿戴合適的實驗室工作服、拋棄式手套和護目鏡。如需瞭解更多資訊，請參閱相應的安全資料表 (safety data sheets, SDS)，其可從產品供應商處獲得。

試劑

- DNA 提取試劑盒（參閱第 19 頁上的「DNA 提取與製備」）

耗材和一般實驗室設備

- 樣本製備專用移液管*（可調式）
- PCR 預混合液製備專用移液管*（可調式）
- 模板 DNA 分注專用移液管*（可調式）
- 無 DNA 酶、RNA 酶和 DNA 的帶濾芯移液吸頭（為避免交叉污染，推薦使用帶有氣溶膠屏障的移液吸頭）
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml（連排管和蓋，0.1 ml），與 72 孔轉子搭配使用（目錄編號 981103 或 981106）
- 無 DNA 酶、RNA 酶和 DNA 的微量離心管，用於製備預混合液
- Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes（72 × 0.1 ml 試管上樣裝置），用於人工反應操作的鋁砧，帶有單通道吸管（目錄編號 9018901）
- 熱混合器*、加熱迴轉式培養箱*、加熱塊*或能夠在 90°C 下孵育的水浴箱*
- 帶轉子的桌上型離心機*，用於 2 ml 反應管
- 振盪混合器*

* 確保按照生產商的建議檢查並校準儀器和設備。

PCR 用設備

- 帶循環綠色和循環黃色螢光通道（分別用於檢測 FAM 和 HEX）的 Rotor-Gene Q MDx 儀器*†
- Rotor-Gene Q 軟體，版本 2.3
- Rotor-Gene Q *therascreen*EGFR CE Assay Package CD（Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE 檢測套件軟體光碟），版本 3.0.5（目錄編號 9023537）

注意：Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體需要 2.3 版 Rotor-Gene Q 軟體。

* 確保按照生產商的建議檢查並校準儀器和設備。

† 在某些國家或地區，如果適用，可以使用生產日期為 2011 年 5 月或以後的 Rotor-Gene Q 5plex HRM 儀器。生產日期可以從儀器背面的序號中獲知。序號的格式為「mmyyynn」，其中「mm」表示生產月份的數字，「yy」表示生產年份的最後兩位數字，「nnn」表示唯一的儀器識別碼。

警告和注意事項

供體外診斷使用

在操作化學物質時，務必穿戴合適的實驗室工作服、拋棄式手套和護目鏡。如需瞭解更多資訊，請參閱相應的安全資料表 (SDS)。這些安全資料表以簡潔方便的 PDF 格式在線上提供：www.qiagen.com/safety，對於每種 QIAGEN 試劑組和每種試劑組組分，您可以從中找到、流覽並列印 SDS。

如需瞭解 Rotor-Gene Q 儀器的安全資訊，請參閱儀器隨附的使用者手冊。

根據當地安全規定丟棄樣本和檢測廢棄物。

一般注意事項

使用者應始終注意以下事項。

- 本檢測用於 FFPE NSCLC 組織檢體。
- 儲存並將陽性材料（檢體和陽性對照液）與所有其他試劑分開，在空間分隔區域中將其加入反應混合液中。
- 要特別小心地預防合成對照材料所造成的 PCR 污染。我們建議使用單獨的專用移液管預備反應混合液並加入 DNA 模板。反應混合液的製備與分注必須在加入模板以外的一個單獨區域進行。Rotor-Gene Q 管在 PCR 運轉結束之後不得打開。這是為了防止 PCR 後產物的實驗室污染。
- 所有化學物質和生物材料都具有潛在的危險性。檢體和樣本具有潛在的感染性，必須做為生物危害材料處理。
- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 中的試劑已經進行了最佳稀釋。切勿進一步稀釋試劑，否則可能導致效能喪失。切勿使用不足 25 µl 的反應體積（反應混合液加樣本），否則會增加偽陰性風險。

- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 中提供的所有試劑僅適用於與同一 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 中提供的其他試劑搭配使用。切勿替換 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 中的試劑或 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 間的試劑，否則可能影響效能。
- 僅使用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 中提供的 *Taq* DNA 聚合酶（試管 *Taq*）。不要採用來自同一類型或任何其他類型的其他試劑組中的 *Taq* DNA 聚合酶替換，或採用來自另一家供應商的 *Taq* DNA 聚合酶替換。
- 不要使用過期或儲存不當的組分。

注意：必須注意確保正確的樣本檢測，重點是消除錯誤樣本進入、裝載錯誤和移液錯誤。

注意：試劑經確認可進行人工操作。如果使用自動化方法，可能因儀器上的「滯留體積」需要填充試劑導致反應次數減少。

試劑儲存與處理

運輸條件

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 用乾冰運輸，必須保證到達時仍為冷凍狀態。如果 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 到達時未處於冷凍狀態、在運輸過程中外包装已經打開或產品中缺少包裝說明、手冊或試劑，請聯絡 **QIAGEN** 公司技術服務部或當地經銷商（見封底或瀏覽 www.qiagen.com）。

儲存條件

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 應在收到後立即置於恆溫冰箱中以 -30 至 -15°C 的溫度避光儲存。**Scorpions**（與用螢光標記的所有分子一樣）必須避光，以避免光漂白和效能喪失。按照建議的儲存條件在原包裝中儲存時，試劑組可在標籤上註明的失效日期前保持穩定。應避免反覆凍融。我們建議凍融次數不超過八次。

試劑必須在環境溫度 (15 – 25°C) 下解凍最少 1 小時，最多 4.5 小時。一旦試劑可以使用，便可以預備 PCR 反應，且裝有預混合液和 DNA 樣本的 **Rotor-Gene Q** 管應立即裝載到 **Rotor-Gene Q MDx** 儀器上。從 PCR 預備開始到運轉開始的總時間不應超過：

- 6 小時（如果儲存在環境溫度下）
注意：此時間包括 PCR 預備時間和儲存時間。
- 18 小時（如果儲存在 2 – 8°C 的冰箱中）
注意：此時間包括 PCR 預備時間和儲存時間。

注意：為了確保最佳的活性和效能，**Scorpions**（與用螢光標記的所有分子一樣）必須避光，以避免光漂白。

注意：為了獲得 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 中試劑的最佳使用，應將樣本分批。如果單獨檢測樣本，將使用更多的試劑並將減少 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 可檢測的樣本數目。

檢體處理與儲存

注意：所有樣本必須視為潛在感染性材料。

樣本材料必須是從 FFPE 組織中提取的人類基因體 DNA。檢體必須按照標準的病理學方法進行運輸，以確保檢體的品質。

腫瘤樣本為非均質性，來自一份腫瘤樣本的資料可能與來自同一腫瘤的其他切片不一致。腫瘤樣本也可能含有非腫瘤組織。不預期非腫瘤組織的 DNA 含有 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 檢測的突變。

要製備用於 DNA 提取的組織樣本：

- 使用標準材料和方法將組織檢體固定在 10% 中性福馬林緩衝液 (neutral buffered formalin, NBF) 中，並將組織檢體嵌入石蠟中。使用切片機從石蠟塊切取 5 µm 的連續切片並將其裝載到載玻片上。
- 利用受過訓練的人員（例如病理學家）評估蘇木素及伊紅 (H&E) 染色的切片，以確認存在腫瘤。
- 染色的切片不得用於 DNA 提取。
- 在室溫 (15–25°C) 下儲存所有 FFPE 塊和載玻片。載玻片在 DNA 提取之前可在環境溫度下最多儲存 1 個月。

程序

DNA 提取與製備

已透過利用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (目錄編號 60404) 提取的 DNA，得出本試劑組的效能特性。若您所在國家可取得此試劑組，應用於進行 DNA 製備。如果使用功能相當的 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (目錄編號 56404)，則按照手冊中的說明進行 DNA 提取，並注意以下事項：

- 切勿使用 QIAGEN 脫蠟溶液。僅使用 *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* (QIAamp DNA FFPE Tissue 試劑組手冊) 中所述的二甲苯/乙醇脫蠟方法。
- 確保使用分子生物學級乙醇*執行所有必需的步驟。
- 對於每個樣本，使用新的解剖刀將整個組織區域從兩個切片刮到帶標籤的微量離心管中。
- 蛋白酶 K 消化 (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* [QIAamp DNA FFPE Tissue 試劑組手冊] 中的步驟 11) 必須在 $56^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 下執行 1 小時 ± 5 分鐘。
- 蛋白酶 K 消化 (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* [QIAamp DNA FFPE Tissue 試劑組手冊] 中的步驟 12) 必須在 $90^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 下執行 1 小時 ± 5 分鐘。
- 切勿使用 *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* (QIAamp DNA FFPE Tissue 試劑組手冊) 中所述的 RNA 酶步驟。
- 樣本必須用 120 μl 來自 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 的洗脫緩衝液 (ATE) 進行洗脫 (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* [QIAamp DNA FFPE Tissue 試劑組手冊] 中的步驟 20)。
- 基因體 DNA 在提取後可於 $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ 下儲存 1 週，或者在使用前可於 -30 至 -15°C 下最多儲存 8 週。

注意： *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 中的所有檢測均可生成短 PCR 產物。然而，*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 對嚴重片斷化的 DNA 不起作用。

* 不要使用含有甲醇或甲基乙基酮等其他物質的變性乙醇。

操作程序：樣本評估

對於自動樣本評估，本操作程序用於透過 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體的「*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template」評估樣本中的總可擴增 DNA。

注意：對於人工 DNA 樣本評估，請參閱第 64 頁上的「附錄 A：therascreen EGFR RGQ PCR Kit 人工操作程序」。

開始前要點

- 在開始程序前，請閱讀第 15 頁上的「一般注意事項」。
- 在開始操作程序前，花時間熟悉 Rotor-Gene Q MDx 儀器。請參閱儀器的使用者手冊。
- 不要振盪 *Taq* 或含有 *Taq* 的任何混合液，否則可使酶失去活性。
- 透過將移液吸頭放置在液面正下方移取 *Taq*，以避免吸頭被過量酶包覆。
- 可用的對照反應混合液最多可評估 24 份樣本。

開始前需完成的事項

- 在首次使用 Rotor-Gene Q MDx 儀器前，請確保 *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體已安裝妥當（參閱第 91 頁上的「附錄 B：安裝 *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體」）。
- 在每次使用前，所有試劑必須在室溫 (15–25°C) 下完全解凍，時間最少為 1 小時，最多為 4.5 小時，透過顛倒 10 次進行混合，並進行短暫離心以收集試管底部的成分。
- 透過顛倒 10 次混合所有樣本，並進行短暫離心以收集試管底部的成分。
- 在每次使用前，確保 *Taq* 處於室溫 (15–25°C)。短暫離心試管以收集試管底部的酶。

程序

1. 在環境溫度 (15–25°C) 下解凍對照反應混合液 (CTRL)、無模板對照 (NTC) 用無核酸酶水和 EGFR 陽性對照液 (PC)，時間最少為 1 小時，最多為 4.5 小時。
- 開始運轉前的試劑解凍時間、PCR 預備時間和儲存時間如表 2 所示。

表 2。解凍時間、PCR 預備時間和儲存溫度

最小解凍時間	最大解凍時間	PCR 預備完成後的儲存溫度	最大 PCR 預備和儲存時間
1 h	4.5 h	環境溫度 (15–25°C)	6 h
1 h	4.5 h	2–8°C	18 h

- 注意：**PCR 預備在環境溫度 (15–25°C) 下進行。術語「儲存」是指完成 PCR 預備與在 Rotor-Gene Q MDx 儀器上開始運轉 PCR 之間的時間。
- 注意：**將 *Taq* 恢復到環境溫度 (15–25°C)，所用時間與其他試劑相同（參閱第 17 頁上的「試劑儲存與處理」）。短暫離心試管以收集試管底部的酶。
2. 當試劑解凍後，透過顛倒每個試管 10 次來混合試劑，以避免鹽局部集中，然後短暫離心試管，以收集試管底部的成分。
3. 按照表 3 中的體積，製備 DNA 樣本的足量對照預混合液（對照反應混合液 [CTRL] 加 *Taq*）、一份 EGFR 陽性對照反應液和一份無模板對照反應液。包括用於一份額外樣本的試劑，以允許 PCR 預備時有充分的過剩。
- 預混合液中包含除樣本外的 PCR 所需的所有組分。

表 3。對照檢測預混合液的製備

組分	體積
對照反應混合液 (CTRL)	19.5 µl × (n + 1)*
Taq DNA 聚合酶 (Taq)	0.5 µl × (n + 1)
總體積	20 µl/反應

* n = 反應次數（樣本加對照液）。製備足夠用於一份額外樣本 (n + 1) 的預混合液，以允許 PCR 預備時有充分的過剩。值 n 不得超過 26（24 份樣本，加 2 份對照液）。

注意：製備預混合液時，首先將所需體積的對照反應混合液添加到相關試管中，最後添加 Taq。

4. 用移液管輕輕地來回吹打 10 次以充分混合預混合液。根據表 4 中的佈局將適當數量的連排管放置在上樣裝置中。立即將 20 µl 預混合液添加到每個 PCR 連排管中。

將蓋子留在塑膠容器中，直到需要時才取下。對於 DNA 樣本評估，將對照檢測預混合液添加到一個陽性對照試管、一個無模板對照試管和每個樣本的一個試管中。

表 4。上樣裝置中的 DNA 樣本評估檢測佈局。數字表示上樣裝置中的位置，並指示最終轉子位置。

檢測	位置								
對照	1[PC]	9	17	25	–	–	–	–	–
對照	2[NTC]	10	18	26	–	–	–	–	–
對照	3	11	19	–	–	–	–	–	–
對照	4	12	20	–	–	–	–	–	–
對照	5	13	21	–	–	–	–	–	–
對照	6	14	22	–	–	–	–	–	–
對照	7	15	23	–	–	–	–	–	–
對照	8	16	24	–	–	–	–	–	–

5. 立即將 5 µl NTC 用水添加到位置 2 的試管中並加蓋。
6. 將 5 µl 的各樣本添加到樣本試管（試管位置 3–26）中並加蓋。

7. 將 5 μ l EGFR 陽性對照液添加到位置 1 的試管中並加蓋。

注意避免裝載或移液錯誤，以確保將 NTC 用水、樣本和陽性對照液正確添加到適當的試管中。標記試管的蓋子以顯示將試管裝載到 Rotor-Gene Q MDx 儀器中的方向。

8. 當所有 PCR 試管加蓋後，對樣本試管的填充液位進行目測檢查，以確保樣本已加入所有試管中。

9. 顛倒所有 PCR 試管四次，以混合樣本和反應混合液。

10. 根據表 4 中的佈局將 PCR 連排管放置在 72 孔轉子的適當位置中。

如果轉子未滿，用加蓋的空試管填充轉子上的所有空位置。

11. 立即將 72 孔轉子放置到 Rotor-Gene Q MDx 儀器中。確保密封圈（Rotor-Gene Q MDx 儀器的配件）放置在轉子頂部，以便在運轉期間固定試管。

注意：如果採用人工樣本評估，請參閱第 64 頁上的「附錄 A：therascreen EGFR RGQ PCR Kit 人工操作程序」。

12. 按兩下連接到 Rotor-Gene Q MDx 儀器的電腦桌面上的「therascreen EGFR CE Control Run Locked Template」(therascreen EGFR CE 對照運轉鎖定模板) 圖示以啟動 Rotor-Gene Q 軟體 (圖 1)。



圖 1。用於對照運轉的 EGFR CE 鎖定模板圖示 (樣本評估)。

13. 「Setup」（預備）標籤將按預設開啟（圖 2）。確保密封圈連接正確，然後選擇「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊。關閉 Rotor-Gene Q MDx 儀器蓋。

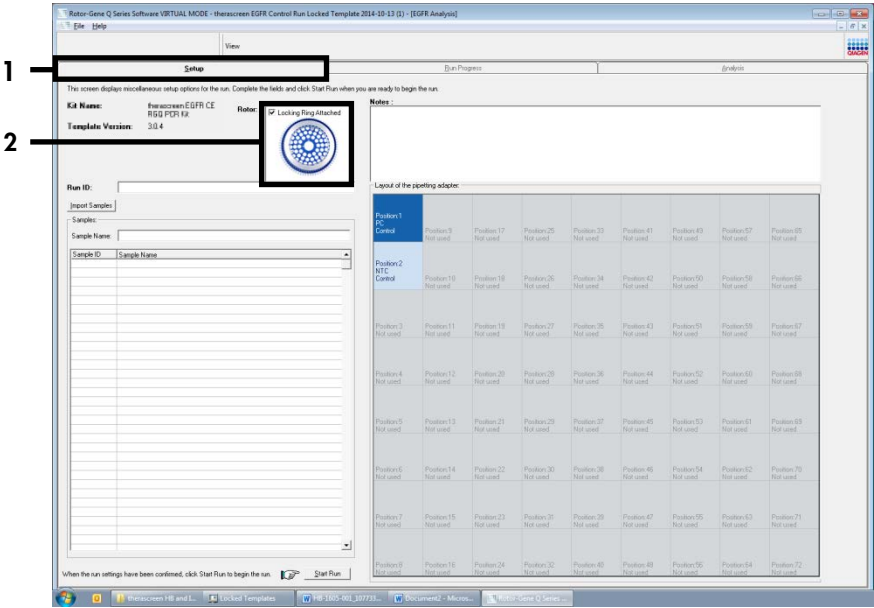


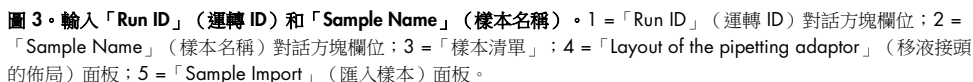
圖 2。「Setup」（預備）標籤 (1) 和「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊 (2)。

14. 根據當地的命名慣例在「Run ID」（運轉 ID）對話方塊欄位中輸入運轉 ID。根據當地的命名慣例在「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位中輸入樣本名稱，然後按 Return 鍵。

這樣可將樣本名稱新增到下面的樣本清單中，並為樣本指定「樣本 ID」（1、2、3 等）。此外，右側的「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板將更新，以納入樣本名稱（圖 3）。

注意：或者，可以使用「Import Samples」（匯入樣本）功能匯入以 *.smp（Rotor-Gene Q 樣本檔案）或 *.csv（逗點分隔值檔案）格式儲存的樣本名稱。樣本名稱將使用此方法自動填入。

注意：超過八個字元的樣本名稱可能無法完全顯示在「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板中。



注意：要編輯樣本名稱，按一下樣本清單中的「樣本名稱」，所選樣本將顯示在上面的「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位中。根據當地的命名慣例編輯樣本名稱，然後按 **Return** 鍵更新名稱。

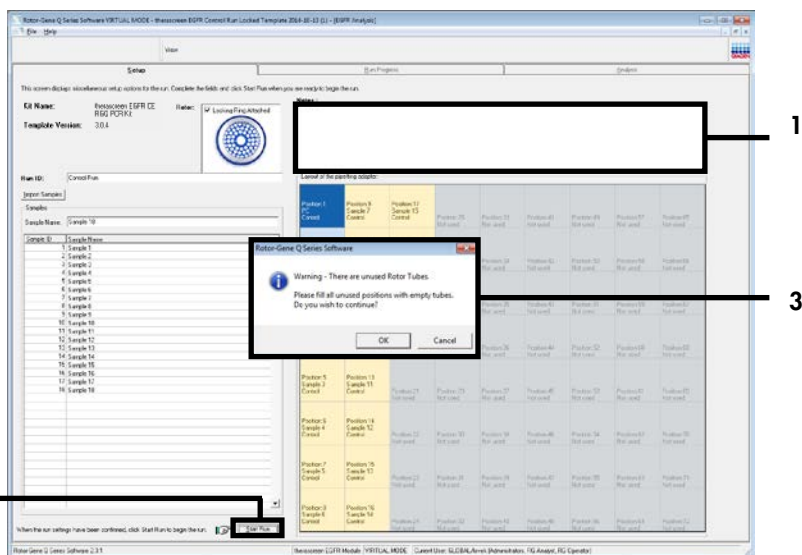


圖 5。「Notes」（附註）對話方塊欄位 (1)、「Start Run」（開始運轉）按鈕 (2) 和未使用的轉子位置「警告」(3)。

17. 「Save As」（另存新檔）視窗將開啟。選擇適當的檔案名稱，並將 PCR 運轉另存為 *.rex 運轉檔案到所選位置。按一下「Save」（儲存）（圖 6）。

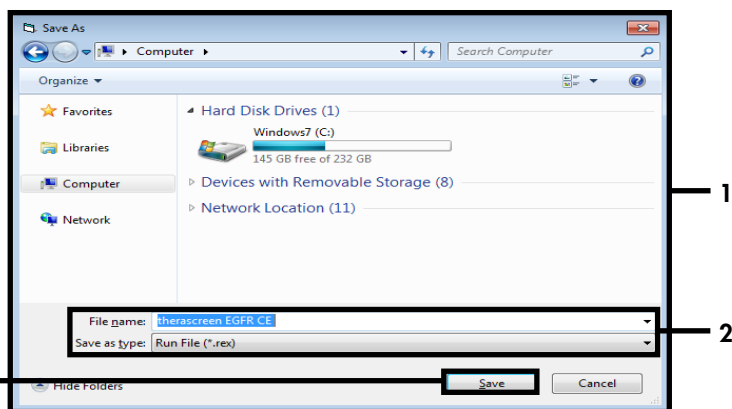


圖 6。「Save As」（另存新檔）視窗 (1) • 2 = 「File Name」（檔案名稱）和「Save as type」（檔案類型）欄位；

3 = 「Save」（儲存）。

18. PCR 運轉將開始。

注意：當運轉開始時，將開啟「Run Progress」（運轉進度）標籤，以顯示溫度追蹤和剩餘運轉時間（圖 7）。

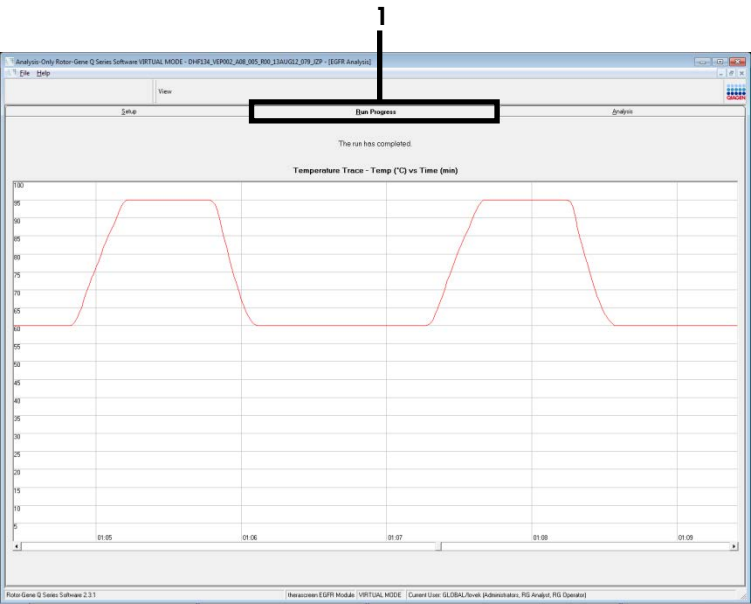


圖 7。「Run Progress」（運轉進度）標籤 (1)。

19. 運轉完成後，將開啟「Analysis」（分析）標籤。

注意：如果「Analysis」（分析）標籤無法開啟，按一下「Analysis」（分析）標籤（圖 8）。

注意：計算方法的說明提供於第 43 頁上的「結果判讀（自動）」部分。

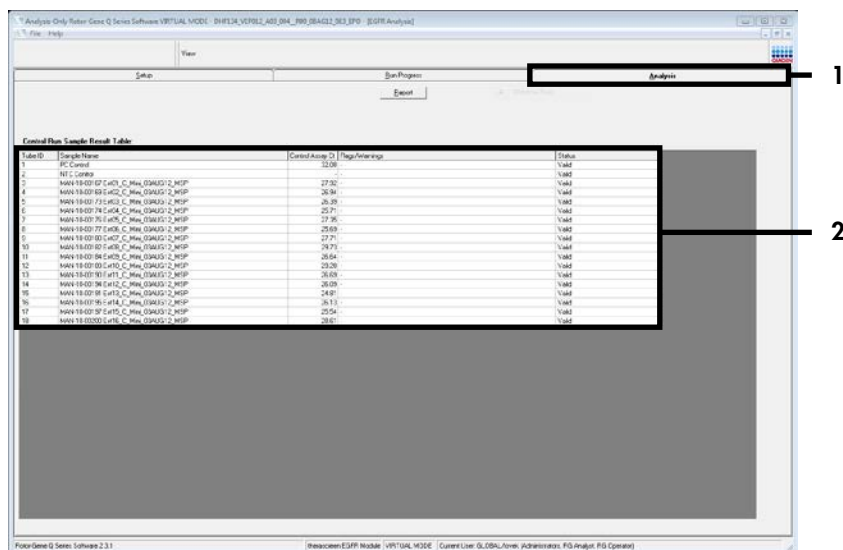


圖 8。「Analysis」（分析）標籤 (1) 和結果報告 (2 = 樣本 QC 結果表)。

20. 對照結果在「樣本 QC 結果表」中報告如下 (圖 8)。

運轉對照 (試管位置 1 和 2 分別為陽性對照和無模板對照)。如果結果在可接受範圍內，則均顯示為「Valid」（有效）。否則顯示「Invalid」（無效）結果。

樣本對照反應 $C_T > 31.10$ ；顯示為「Invalid」（無效）。DNA 數量不足以進行突變分析。重新檢測樣本。如果 DNA 數量仍然不足，則提取更多的腫瘤組織（如果可用）。

樣本對照反應 $C_T < 23.70$ ；顯示為「Invalid」（無效）。DNA 濃度過高而無法進行突變分析。使用稀釋用無核酸酶水 (Dil.) 進行稀釋並重新檢測。稀釋至 C_T 為 23.70–31.10。1:1 稀釋可使 C_T 值增加約 1.0。

樣本對照反應 C_T 為 23.70–31.10 ($23.70 \leq$ 對照 $C_T \leq 31.10$)；顯示為「Valid」（有效）。DNA 濃度適合進行突變分析。

注意：如果需要重新提取或稀釋，則重複對照反應以確認 DNA 濃度適合使用。

21. 按一下「Report」（報告）以生成報告檔案。「Report Browser」（報告瀏覽器）視窗將開啟。在「Templates」（模版）下選擇「EGFR CE Analysis Report」（EGFR CE 分析報告），然後按一下「Show」（顯示）（圖 9）。

注意：要以網頁封存格式將報告儲存到其他位置，按一下每個報告左上角的「Save As」（另存新檔）。

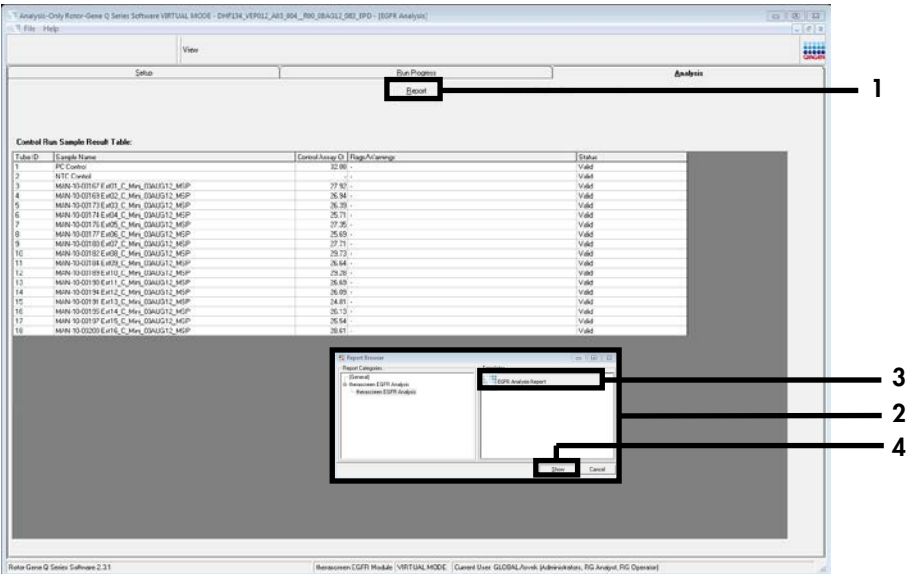


圖 9。選擇「EGFR CE Analysis Report」（EGFR CE 分析報告）。1 = 「Report」（報告），2 = 「Report Browser」（報告瀏覽器）視窗，3 = 「EGFR Analysis Report」（EGFR 分析報告）選項，4 = 「Show」（顯示）。

操作程序：EGFR 突變檢測

本操作程序用於 EGFR 突變檢測。樣本經過 DNA 樣本評估後，可採用自動化軟體透過 EGFR 突變檢測進行檢測。

注意：對於人工突變評估，請參閱第 64 頁上的「附錄 A：therascreen EGFR RGQ PCR Kit 人工操作程序」。

開始前要點

- 在開始程序前，請閱讀第 15 頁上的「一般注意事項」。
- 在開始操作程序前，花時間熟悉 Rotor-Gene Q MDx 儀器。請參閱儀器的使用者手冊。
- 樣本經過 DNA 樣本評估後，可採用 EGFR 突變檢測進行檢測。
- 為了有效利用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit，樣本必須七個分為一批。批量較小表示 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 可檢測的樣本較少。
- 樣本必須使用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 中提供的所有反應混合液進行檢測。
- 切勿振盪 *Taq* 或含有 *Taq* 的任何混合液，否則可使酶失去活性。
- 透過小心地將移液吸頭放置在液面正下方移取 *Taq*，以避免吸頭被過量酶包覆。

開始前需完成的事項

- 在首次使用 Rotor-Gene Q MDx 儀器前，請確保 *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體已安裝妥當（參閱第 91 頁上的「附錄 B：安裝 *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體」）。
- 在每次使用前，所有試劑必須在環境溫度 (15–25°C) 下完全解凍，時間最少為 1 小時，最多為 4.5 小時，透過顛倒 10 次進行混合，並進行短暫離心以收集試管底部的成分。
- 透過顛倒 10 次混合所有樣本，並進行短暫離心以收集試管底部的成分。
- 在每次使用前，確保 *Taq* 處於環境溫度 (15–25°C) 下。短暫離心試管以收集試管底部的酶。

程序

1. 在環境溫度 (15–25°C) 下解凍所有反應混合液試管、NTC 用水和 EGFR 陽性對照液，時間最少為 1 小時，最多為 4.5 小時。

開始運轉前的試劑解凍時間、PCR 預備時間和儲存時間如表 5 所示。

表 5。解凍時間、PCR 預備時間和儲存溫度

最小解凍時間	最大解凍時間	PCR 預備完成後的儲存溫度	最大 PCR 預備和儲存時間
1 h	4.5 h	環境溫度 (15–25°C)	6 h
1 h	4.5 h	2-8°C	18 h

注意：PCR 預備在環境溫度 (15–25°C) 下進行。術語「儲存」是指完成 PCR 預備與在 Rotor-Gene Q MDx 儀器上開始運轉 PCR 之間的時間。

注意：將 *Taq*（試管 *Taq*）恢復到環境溫度 (15–25°C)，所用時間與其他試劑相同（參閱第 17 頁上的「試劑儲存與處理」）。短暫離心試管以收集試管底部的酶。

2. 當試劑解凍後，透過顛倒每個試管 10 次來混合試劑，以避免鹽局部集中，然後短暫離心試管，以收集試管底部的成分。
3. 按照表 6 中的體積，製備 DNA 樣本的足量檢測預混合液（檢測反應混合液加 *Taq*）、一份 EGFR 陽性對照液和一份無模板對照反應液。包括用於一份額外樣本的試劑，以允許 PCR 預備時有充分的過剩。

預混合液中包含除樣本外的 PCR 所需的所有組分。

表 6。檢測預混合液的製備

檢測	反應混合液試管	反應混合液體積	Taq DNA 聚合酶 體積 (試管 Taq)
對照	CTRL	19.5 µl × (n+1)*	0.5 µl × (n+1)*
T790M	T790M	19.5 µl × (n+1)	0.5 µl × (n+1)
缺失	Del	19.5 µl × (n+1)	0.5 µl × (n+1)
L858R	L85R	19.5 µl × (n+1)	0.5 µl × (n+1)
L861Q	L861Q	19.5 µl × (n+1)	0.5 µl × (n+1)
G719X	G719X	19.5 µl × (n+1)	0.5 µl × (n+1)
S768I	S768I	19.5 µl × (n+1)	0.5 µl × (n+1)
插入	Ins	19.5 µl × (n+1)	0.5 µl × (n+1)

* n = 反應次數 (樣本加對照液)。製備足夠用於一份額外樣本 (n + 1) 的預混合液，以允許 PCR 預備時有充分的過剩。值 n 不得超過七 (加對照液)，因為七是可以適合運轉的最大樣本數。

4. 用移液管輕輕地來回吹打 10 次以充分混合檢測預混合液。根據表 7 中的佈局將適當數量的連排管放置在上樣裝置中。立即將 20 µl 適當的檢測預混合液添加到每個 PCR 連排管中。
- 將蓋子留在塑膠容器中，直到需要時才取下。

表 7。上樣裝置中的對照和突變檢測佈局。數字表示上樣裝置中的位置，並指示最終轉子位置。

檢測	位置								
	對照		樣本編號						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
對照	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
缺失	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
插入	8	16	24	32	40	48	56	64	72

5. 立即將 5 μ l NTC 用水添加到位置 9–16 的試管中並加蓋。
6. 將 5 μ l 的各樣本添加到樣本試管（試管位置 17–24、25–32、33–40、41–48、49–56、57–64 和 65–72）中並加蓋。
7. 將 5 μ l EGFR 陽性對照液添加到位置 1–8 的試管中並加蓋。

注意避免裝載或移液錯誤，以確保將 NTC 用水、樣本和 EGFR 陽性對照液正確添加到適當的試管中。

每個試管應含有 25 μ l 的總反應液（20 μ l 步驟 3 中製備的檢測預混合液（表 6）加 5 μ l NTC/樣本/PC）。數字表示上樣裝置中的位置，並指示最終轉子位置。

標記試管的蓋子以顯示將試管裝載到 Rotor-Gene Q MDx 儀器中的方向。

8. 當所有 PCR 試管加蓋後，對樣本試管的填充液位進行目測檢查，以確保樣本已加入所有試管中。
9. 顛倒所有 PCR 試管四次，以混合樣本和反應混合液。
10. 根據表 7 中的佈局將 PCR 連排管放置在 72 孔轉子的適當位置中。

每次 PCR 運轉最多可以包含七個樣本。如果轉子未滿，用加蓋的空試管填充轉子上的所有空位置。

11. 立即將 72 孔轉子放置到 Rotor-Gene Q MDx 儀器中。確保密封圈（Rotor-Gene Q MDx 儀器的配件）放置在轉子頂部，以便在運轉期間固定試管。

注意：如果採用人工 EGFR 突變檢測，請參閱第 64 頁上的「附錄 A：therascreen EGFR RGQ PCR Kit 人工操作程序」。

12. 按兩下連接到 Rotor-Gene Q MDx 儀器的膝上型電腦桌面上的「therascreen EGFR CE Locked Template」（therascreen EGFR CE 鎖定模板）圖示以啟動 Rotor-Gene Q 軟體（圖 10）。



圖 10。EGFR CE 鎖定模板圖示（EGFR 突變檢測）。

13. 「Setup」（預備）標籤將按預設開啟（圖 11）。確保密封圈連接正確，然後選擇「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊。關閉 Rotor-Gene Q MDx 儀器蓋。

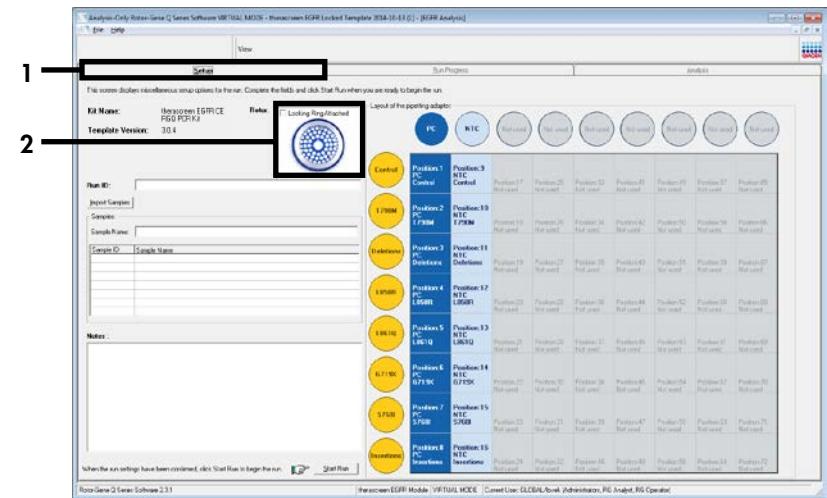


圖 11。「Setup」（預備）標籤 (1) 和「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊 (2)。

14. 根據當地的命名慣例在「Run ID」（運轉 ID）對話方塊欄位中輸入運轉 ID。根據當地的命名慣例在「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位中輸入樣本名稱，然後按 Return 鍵。

這樣可將樣本名稱新增到下面的樣本清單中，並為樣本指定「樣本 ID」（1、2、3 等）。此外，右側的「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板將更新，以納入樣本名稱（圖 12）。

注意：或者，可以使用「Import Samples」（匯入樣本）按鈕匯入以 *.smp（Rotor-Gene Q 樣本檔案）或 *.csv（逗點分隔值檔案）格式儲存的樣本名稱。樣本名稱將使用此方法自動填入。

注意：在「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板中，檢查新增的樣本名稱是否以顏色變化反白顯示，以及樣本名稱是否在樣本位置（圖 12）。

注意：最多可以新增七個樣本。樣本 ID（位於樣本圓圈中）將自動指定，範圍從 1 到 7。

注意：超過八個字元的樣本名稱可能無法完全顯示在「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板中。

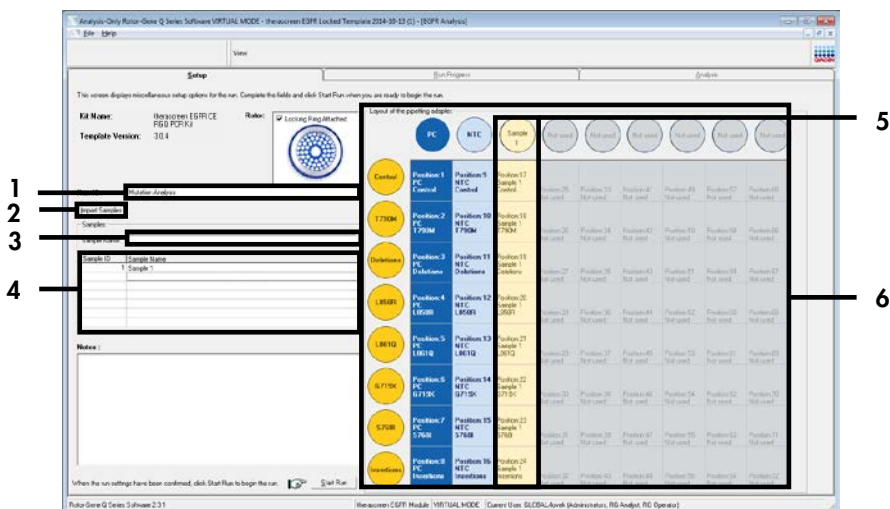


圖 12 • 輸入「Run ID」（運轉 ID）和「Sample Name」（樣本名稱）。1 = 「Run ID」（運轉 ID）對話方塊欄位；2 = 「Sample Import」（匯入樣本）按鈕；3 = 「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位；4 = 「樣本清單」；5 = 「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板；6 = 反白顯示的樣本圓圈及下面的 8 檢測欄。

15. 重複步驟 14 以輸入所有其他樣本的名稱（圖 13）。

注意：要編輯樣本名稱，按一下樣本清單中的「樣本名稱」，所選樣本將顯示在上面的「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位中。根據當地的命名慣例編輯樣本名稱，然後按 Return 鍵更新名稱。

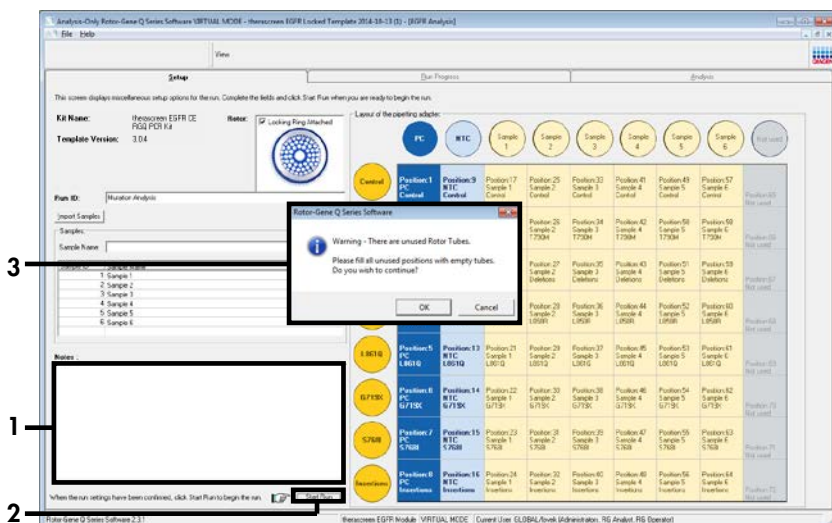


圖 14。「Notes」(附註)對話方塊欄位 (1)、「Start Run」(開始運轉) 按鈕 (2) 和未使用的轉子位置「警告」(3)。

17. 「Save As」(另存新檔) 視窗將開啟。選擇適當的檔案名稱，並將 PCR 運轉另存為 *.rex 運轉檔案到所選位置。按一下「Save」(儲存) (圖 15)。

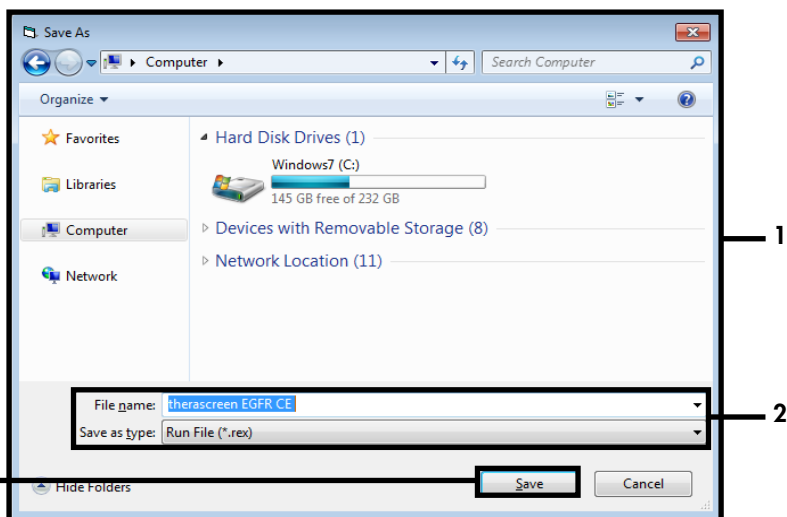


圖 15。「Save As」(另存新檔)視窗 (1) • 2 = 「File Name」(檔案名稱)和「Save as type」(檔案類型)欄位；
3 = 「Save」(儲存)。

18.PCR 運轉將開始。

注意：當運轉開始時，將開啟「Run Progress」(運轉進度)標籤，以顯示溫度追蹤和剩餘運轉時間(圖 16)。

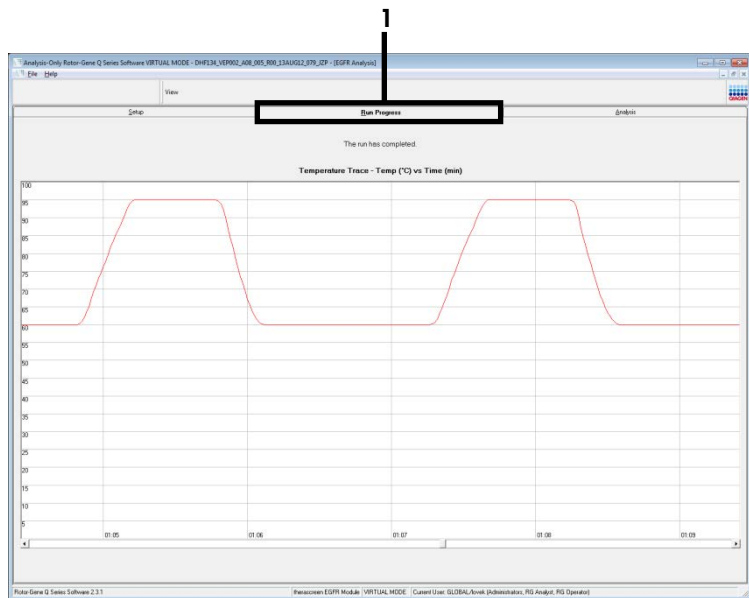


圖 16。「Run Progress」(運轉進度)標籤。

19.運轉完成後，將開啟「Analysis」(分析)標籤。

注意：如果「Analysis」(分析)標籤無法開啟，按一下「Analysis」(分析)標籤(圖 17)。

注意：計算方法的說明提供於第 43 頁上的「結果判讀(自動)」部分。

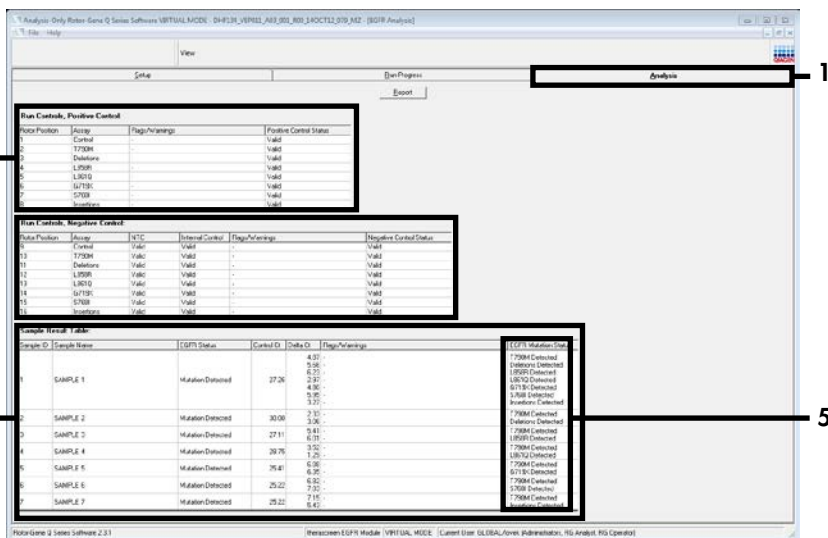


圖 17。「Analysis」（分析）標籤 (1) 和結果報告。2 = 「Run Controls, Positive Control」（運轉對照，陽性對照），3 = 「Run Controls, Negative Control」（運轉對照，陰性對照）面板；4 = 「Sample Result Table」（樣本結果表）；5 = 「Mutation Status」（突變狀態）面板。

20. 檢測結果報告如下（圖 18）。

Run Controls, Positive Control（運轉對照，陽性對照）面板：如果結果在可接受範圍內，則「Positive Control Status」（陽性對照狀態）將顯示「Valid」（有效），否則將顯示「Invalid」（無效）結果。

Run Controls, Negative Control（運轉對照，陰性對照）面板：如果「NTC」（無模板對照）和「Internal Control」（內部對照）結果均在可接受範圍內，則「Negative Control Status」（陰性對照狀態）將顯示「Valid」（有效），否則將顯示「Invalid」（無效）結果。

Sample Result Table（樣本結果表）面板：在「EGFR Mutation Status」（EGFR 突變狀態）欄下報告突變陽性樣本的具體突變。

21.按一下「Report」（報告）以生成報告檔案。「Report Browser」（報告瀏覽器）視窗將開啟。在「Templates」（模版）下選擇「EGFR CE Analysis Report」（EGFR CE 分析報告），然後按一下「Show」（顯示）（圖 18）。

注意：要以網頁封存格式將報告儲存到其他位置，按一下每個報告左上角的「Save As」（另存新檔）。

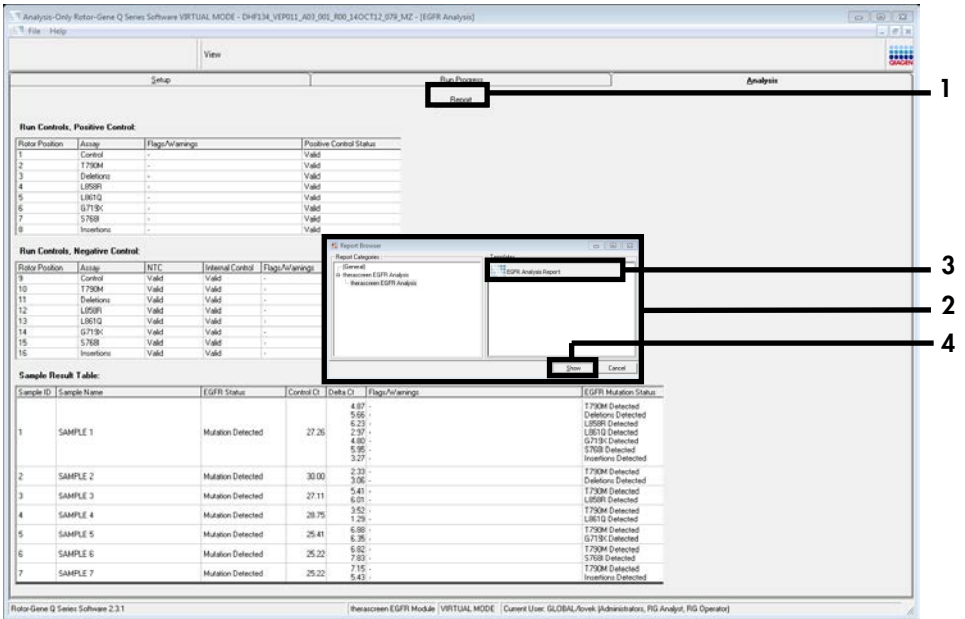


圖 18。選擇「EGFR CE Analysis Report」（EGFR CE 分析報告）。1 = 「Report」（報告），2 = 「Report Browser」（報告瀏覽器）面板，3 = 「EGFR Analysis Report」（EGFR 分析報告），4 = 「Show」（顯示）。

結果判讀（自動）

當運轉完成後，*therascreen* EGFR Assay Package 軟體將自動執行分析和突變識別。以下資訊說明了 *therascreen* EGFR Assay Package 軟體如何進行分析和突變識別。

注意：對於人工結果分析，請參閱第 81 頁上的「結果判讀（人工）」。

將特定反應的螢光超過閾值的 PCR 循環定義為 C_T 值。 C_T 值表示特定輸入 DNA 的數量。低 C_T 值表示較高的輸入 DNA 濃度，高 C_T 值表示較低的輸入 DNA 濃度。具有 C_T 值的反應被歸類為陽性擴增。

Rotor-Gene Q 軟體在任何兩個記錄值之間插入螢光信號。 C_T 值因此可以是 0 到 40 範圍內的任何實數（不限於整數）。對於 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit，綠色 (FAM) 通道和黃色 (HEX) 通道的閾值分別設定為 0.075 和 0.02 相對螢光單位。這些值在 *therascreen* EGFR Assay Package 軟體中自動設定。評估運轉對照（PC、NTC 以及 IC），以確保滿足可接受的 C_T 值，且反應正確地進行。

使用以下方程式計算每個突變檢測的樣本 ΔC_T 值：

$$\Delta C_T = [\text{突變檢測 } C_T \text{ 值}] - [\text{對照檢測 } C_T \text{ 值}]$$

如果樣本的 ΔC_T 小於或等於該檢測的臨界 ΔC_T 值，則該樣本被歸類為突變陽性。如果大於該臨界值，則該樣本含有的突變百分比低於 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 所能檢測到的突變百分比（超出檢測極限）或者該樣本為突變陰性，將被報告為「未檢測到突變」。

突變反應中沒有擴增將被評為「未檢測到突變」。根據背景擴增計算的 ΔC_T 值預計將大於臨界 ΔC_T 值，樣本將被歸類為「未檢測到突變」。

檢測結果將顯示為「檢測到突變」、「未檢測到突變」、「無效」或「運轉對照失敗」（如果運轉對照不成功）。對於突變陽性樣本，將報告特異性突變。一個腫瘤可以含有多個突變。在這種情況下，將報告多個突變。

Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 軟體標幟

表 8（下一頁）列出了 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 軟體可能生成的標幟及其含義，以及要採取的措施。

標幟名稱的建構方式可提供關於受影響試劑組組分、受影響樣本或對照以及故障模式的資訊。

例如：

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = 陽性對照 (PC) 對照檢測 (CTRL_ASSAY) 已失敗 (FAIL)
- NTC_INT_CTRL_FAIL = 無模板對照 (NTC) 內部對照 (INT_CTRL) 已失敗 (FAIL)
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = 樣本 (SAMPLE) 對照檢測 (CTRL) 具有高濃度 (HIGH_CONC)。

表 8。標幟、含義及要採取的措施

標幟	含意	措施
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR 運轉無效 — 對照反應中的陽性對照的 FAM C _T 超出範圍。	重複整個 PCR 運轉。
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PCR 運轉無效 — 一個或多個突變對照反應的 FAM C _T 超出範圍。	重複整個 PCR 運轉。
PC_CTRL_INVALID_DATA	PCR 運轉無效 — 陽性對照（對照反應混合液）中的螢光資料無法判讀。	重複整個 PCR 運轉。
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR 運轉無效 — 陽性對照（突變反應混合液）中的螢光資料無法判讀。	重複整個 PCR 運轉。
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR 運轉無效 — 陰性對照的內部對照高於範圍。	重複整個 PCR 運轉。
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR 運轉無效 — 陰性對照的內部對照低於範圍。	重複整個 PCR 運轉。
NTC_INVALID_CT	PCR 運轉無效 — 陰性對照的 FAM 無效（小於極限）。	重複整個 PCR 運轉。
NTC_INVALID_DATA	PCR 運轉無效 — 陰性對照中的螢光資料無法判讀。	重複整個 PCR 運轉。
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	樣本無效 — 樣本對照中的螢光資料無法判讀。	預備新的 PCR 運轉以重複檢測相關樣本。
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	樣本無效 — 樣本對照中的 FAM C _T 過低。	稀釋樣本以增加 C _T 值。此稀釋應當根據以下假設進行計算：用試劑組中提供的水 1:1 稀釋將使 C _T 增加 1.0；樣本稀釋後，預備新的突變評估運轉以重複檢測樣本。或者，如果樣本已經在 DNA 樣本評估運轉後稀釋，則直接用稀釋的樣本進行 EGFR 突變檢測。
SAMPLE_CTRL_FAIL	樣本無效 — 樣本對照反應中的 FAM C _T 過高。	預備新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時樣本無效，並且如果 DNA 的數量仍然不足，則額外提取兩個 FFPE 組織切片（如果可獲得）。預備新的 PCR 運轉以檢測上述提取物。如果樣本無效，則對第二個提取物重複 PCR 運轉。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，不應進行進一步的檢測。

標幟	含意	措施
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	內部對照 (HEX) CT 過高 (或無 C _T)，FAM 通道突變陰性。	<p>對於生成 SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 標幟且在臨床相關突變反應混合液中檢測到 (或未檢測到) 突變的樣本 – 報告結果，不需要進一步檢測。</p> <p>根據以下假設 (即 1:1 稀釋將使對照反應的 C_T 增加 1.0) 用試劑組中提供的水稀釋樣本，確保最終體積 > 40 µl (例如 40 µl DNA 和來自標有 DIL 的試管的 40 µl 水)。</p> <p>預備新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從兩個額外 FFPE 切片中提取樣本。預備新的 PCR 運轉以檢測上述提取物。</p> <p>如果第二個提取物無效，則如上所述進行稀釋。</p> <p>如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，不應進行進一步的檢測。</p>
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	突變試管無效 — 樣本 (內部對照) C _T HEX 過低	<p>對於生成 SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 標幟且在臨床相關突變反應混合液中檢測到 (或未檢測到) 突變的樣本 – 報告結果，不需要進一步檢測。</p> <p>預備新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則額外提取兩個 FFPE 組織切片 (如果可獲得)。預備新的 PCR 運轉以檢測上述提取物。如果無效，則對第二個提取物重複 PCR 運轉。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，不應進行進一步的檢測。</p>
SAMPLE_INVALID_DATA	突變試管無效 — 內部對照中的螢光資料無法判讀。	<p>對於生成 SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 標幟且在臨床相關突變反應混合液中檢測到 (或未檢測到) 突變的樣本 – 報告結果，不需要進一步檢測。</p> <p>預備新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則額外提取兩個 FFPE 組織切片 (如果可獲得)。預備新的 PCR 運轉以檢測上述提取物。如果無效，則對第二個提取物重複 PCR 運轉。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，不應進行進一步的檢測。</p>

標幟	含意	措施
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	樣本的一個或多個突變為陽性；同時相同樣本的一個或多個突變無效。	<p>對於生成 SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 標幟且在臨床相關突變反應混合液中檢測到（或未檢測到）突變的樣本 - 報告結果，不需要進一步檢測。</p> <p>對於生成 SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 標幟且在臨床相關突變反應混合液中獲得「無效」結果的樣本，按照特定無效標幟措施用所有反應混合液重新檢測樣本。</p> <p>如果受影響的樣本生成 SAMPLE_INT_CTRL_FAIL 標幟及另一種標幟，則必須接續 SAMPLE_INT_CTRL_FAIL 標幟中樣本的稀釋措施。預備新的 PCR 運轉並重新檢測樣本。</p> <p>對於在重複 PCR 運轉時生成 SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 標幟且在臨床相關突變反應混合液中獲得「無效」結果的樣本，從兩個額外 FFPE 切片中提取樣本。用所有反應混合液預備新的 PCR 運轉以檢測上述提取物。</p> <p>如果此樣本對臨床相關突變反應混合液再次產生無效結果，則按照特定無效標幟措施用所有反應混合液重複檢測樣本。如果受影響的樣本生成 SAMPLE_INT_CTRL_FAIL 及另一種標幟，則必須接續 SAMPLE_INT_CTRL_FAIL 標幟中樣本的稀釋措施。預備新的 PCR 運轉並重新檢測此樣本。</p> <p>如果在此次重複檢測時觀察到 SAMPLE_POS_AND_INVALID 標幟，則樣本具有不確定的突變狀態。</p>

故障排除指南

本故障排除指南對解決發生的任何問題都可能有用。如需瞭解更多資訊，請參閱我們技術支援中心的常見問題頁面：www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx。如果您對本手冊中的資訊和操作程序，或對樣本和檢測技術有任何問題，QIAGEN 技術服務部的科學家將樂意為您解答（欲獲得聯絡資訊，請參見封底或瀏覽 www.qiagen.com）。

意見和建議

NTC 樣本在綠色 FAM 通道中顯示陽性結果

- | | |
|--------------|--|
| PCR 準備期間發生污染 | 使用新的試劑對複製品重複 PCR。
如果可能，在加入待檢測樣本後直接蓋上 PCR 管。
定期確保工作區和儀器無污染。 |
|--------------|--|

EGFR 陽性對照無信號

- | | |
|--|--|
| a) 選擇用於 PCR 資料分析的螢光通道不符合操作程序 | 對於資料分析，選擇循環綠色螢光通道進行 EGFR PCR 分析，選擇循環黃色螢光通道進行內部對照 PCR 分析。 |
| b) Rotor-Gene Q MDx 儀器溫度曲線的程式設計錯誤 | 將溫度曲線與操作程序進行比較。如果不正確，則重複運轉。 |
| c) PCR 設定錯誤 | 透過移液方案檢查您的工作步驟，如有必要，重複 PCR。 |
| d) 單個或多個試劑組組分的儲存條件與「試劑儲存與處理」（第 17 頁）部分的說明不一致 | 檢查試劑的儲存條件和有效期限（見試劑組標籤），如有必要，使用新的試劑組。 |
| e) <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit 已過期 | 檢查試劑的儲存條件和有效期限（見試劑組標籤），如有必要，使用新的試劑組。 |

品質控制

依照 QIAGEN 的 ISO 認證品質管制系統，每批 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 已針對預定品質標準進行了檢測，以確保產品品質一致。

限制

產品的檢測結果必須結合所有相關的臨床和實驗室檢查結果進行判讀，不能單獨用於診斷。

本產品只能由在體外診斷程式和 Rotor-Gene Q MDx 儀器方面經過專業指導和訓練的人員使用。

本產品僅用於 Rotor-Gene Q MDx 即時定量 PCR 系統。

嚴格遵守 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Handbook (*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 手冊) 才能得到最佳結果。除本手冊中描述的情況以外，不建議對試劑進行稀釋，否則會導致效能受損。

重要的是，在使用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 進行樣本分析前應對樣本中的 DNA 數量和品質進行評估。我們提供了額外的對照反應混合液以確定檢測的 C_T 值是否可接受。不得使用吸光度讀數，因為它們與斷裂 DNA 樣本的 C_T 值不相關。

應注意試劑組上和所有組分標籤上的有效期限和儲存條件。不要使用過期或儲存不當的組分。

效能特性

分析效能

採用從 NSCLC 患者和 FFPE 人細胞株 (FFPE 細胞株) 收集的 FFPE 組織檢體進行研究，進而確定 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 的特定效能特性。使用肺癌細胞株 (A549) 得到 FFPE 細胞株，以產生具有所需特異性 EGFR 突變的細胞株。當組織檢體或細胞株不可用時，使用質體 DNA。

空白極限 (LOB)、工作範圍和臨界值

一項遵循 NCCLS EP17-A (2004) (12) 指引的研究對總共 417 個 FFPE 樣本進了檢測，以確定每種突變檢測的 LOB 和臨界值。此外還確定了工作範圍。臨界值已確立，如表 9 所示。

表 9。每種突變檢測的已確立臨界值

檢測	臨界值 (ΔCT)
T790M	≤ 7.40
缺失	≤ 8.00
L858R	≤ 8.90
L861Q	≤ 8.90
G719X	≤ 8.90
S768I	≤ 8.90
插入	≤ 8.00

對照反應 C_T 範圍確定為 23.70–31.10 C_T。

檢測臨界值和工作範圍經過標準品和更多 FFPE 樣本的驗證。在驗證期間，用高輸入基因體 DNA 和高輸入突變 DNA 評估每個檢測，進而評估臨界值在野生型 DNA 背景下區分正確突變的能力（參閱第 51 頁上的「交叉反應性」）。同時評估了輸入 DNA 對突變識別的影響（參閱第 51 頁上的「DNA 輸入對 ΔC_T 值的影響」）。

為了評估 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 在缺少模板時的效能，並為了確保空白樣本或具有野生型 DNA 的樣本不產生可能指示低濃度突變的分析信號，將對沒有模板和 NSCLC EGFR 野生型 DNA 的樣本進行評估。結果表明 NTC 樣本和 FFPE 野生型樣本沒有陽性突變識別。

DNA 輸入對 ΔC_T 值的影響

DNA 輸入濃度定義為樣本中的可擴增 EGFR DNA 總量，其透過來自對照反應的 C_T 值確定。為了證明 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 效能在整個對照反應 C_T 範圍 (23.70–31.10) 內的一致性，所有七個 EGFR 突變檢測均針對一個 6 點、1:3 稀釋系列（從 FFPE 細胞株提取的 DNA）進行了檢測。對於每個突變，稀釋液 1 的目標 C_T 大約為 24.70。最終稀釋液的 C_T 大約為 32–33，超出了對照反應 C_T 範圍。總體而言，在不同總 DNA 輸入濃度測得的 ΔC_T 值在 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 的整個工作範圍內一致。

交叉反應性

在高 DNA 輸入時檢測野生型 EGFR DNA 以評估非特异性擴增。結果證明最低 ΔC_T 值超過確定的臨界值，表明沒有非特异性擴增。

針對所有反應混合液在高 DNA 輸入時檢測 FFPE 細胞株，以評估潛在的交叉反應性。結果表明沒有因突變型反應之間的交叉反應性造成的影響。對於所有非匹配的反應混合液和 DNA 樣本，最小 ΔC_T 值均高於各自的檢測臨界值。

準確度：與參考分析方法進行比較

一項研究證實了 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 相對於雙向 Sanger 定序的突變檢測一致性。該研究檢測了 360 個 FFPE 樣本。

對 Sanger 和 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 結果均為有效的樣本進行分析，以評估陽性一致性百分比 (Positive Percent Agreement, PPA)、陰性一致性百分比 (Negative Percent Agreement, NPA) 和總體一致性百分比 (Overall Percent Agreement, OPA)。這些百分比以及相應的雙側 95% 信賴區間 (confidence intervals, CI) 總結於表 10。

表 10。一致性分析

測量	一致性百分比 (N)	95% CI
陽性一致性百分比	99.4% (157/158)	96.5%–100.0%
陰性一致性百分比	86.6% (175/202)	81.2%–91.0%
總體一致性百分比	92.2% (332/360)	89.0%–94.8%

對於 28 個不一致的總體一致性百分比結果：

- 1 (3.6%) 個樣本被 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 檢測為野生型結果（即未檢測到突變），但被 Sanger 定序檢測為突變結果。
- 27 (96.4%) 個樣本被 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 檢測為突變結果，但被 Sanger 定序檢測為野生型結果。

檢測極限 (LOD) 值

執行了一項研究以確定 29 種 EGFR 突變的 LOD。LOD 定義為野生型 DNA 背景下突變型 DNA 的最低量，其中突變型樣本將在 95% 的檢測結果中提供突變陽性結果 (C₉₅)。

為了確定每種突變的 LOD，在低和高輸入 DNA 濃度下製備具有不同突變百分比的樣本，並用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 進行檢測（表 11）。透過邏輯迴歸計算每種檢測的 LOD。為了驗證 LOD，對確定 LOD 下的突變樣本進行檢測，並驗證陽性檢測率。

表 11。使用低和高 DNA 輸入 FFPE 臨床檢體、FFPE 細胞株或質體確定的 LOD

外顯子	突變	COSMIC* ID	鹼基改變	LOD (% 突變型)	
				低	高
18	G719A	6239	2156G>C	7.41 [†]	1.57 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5.08 [†]	7.75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10.30 [‡]	— [¶]
19	缺失	12384	2237_2255>T	1.58 [§]	0.49 [§]
		12387	2239_2258>CA	4.91 [†]	1.48 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16.87 [†]	12.47 [†]
		12422	2238_2248>GC	3.24 [†]	1.65 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4.24 [†]	1.41 [†]
		12678	2237_2251del15	0.55 [§]	0.24 [§]
		6218	2239_2247del9	8.47 [†]	— [¶]
		12728	2236_2253del18	2.43 [†]	— [¶]
		12367	2237_2254del18	2.72 [†]	— [¶]
		6210	2240_2251del12	4.09 [†]	— [¶]
		6220	2238_2255del18	2.70 [†]	0.82 [†]
		6223	2235_2249del15	6.40 [†]	1.63 [†]
		6225	2236_2250del15	2.80 [†]	1.42 [†]
		6254	2239_2253del15	0.86 [§]	0.47 [§]
		6255	2239_2256del18	0.14 [§]	0.05 [§]
		12369	2240_2254del15	4.94 [§]	1.56 [§]
		12370	2240_2257del18	8.10 [§]	2.08 [§]
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0.25 [§]	0.10 [§]
		12383	2239_2251>C	4.58 [§]	1.74 [§]

外顯子	突變	COSMIC* ID	鹼基改變	LOD (% 突變型)	
				低	高
20	S768I	6241	2303G>T	7.66 [†]	2.18 [†]
	插入	12376	2307_2308insGCCAGCGTG	11.61 [†]	— [‡]
		12378	2310_2311insGGT	4.91 [†]	1.31 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2.40 [†]	0.65 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9.72 [†]	5.09 [†]
21	L858R	6224	2573T>G	5.94 [†]	1.13 [†]
	L861Q	6213	2582T>A	2.22 [†]	0.66 [†]

* COSMIC：癌症體細胞突變目錄：<http://cancer.sanger.ac.uk/>。

[†] LOD 值使用細胞株確定

[‡] LOD 值使用質體確定

[§] LOD 值使用臨床樣本確定

[¶] 未評估

干擾

壞死組織的影響

對於 EGFR 突變型和野生型檢體，壞死組織含量不超過 50% 的 NSCLC FFPE 臨床檢體不會干擾 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 的識別結果。

外源性物質

在突變型和野生型樣本中以 10 倍濃度對 DNA 提取過程中存在的潛在干擾物質進行了檢測：石蠟、二甲苯、乙醇和蛋白酶 K。結果表明這些物質不會干擾 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 的識別結果。

再現性

批次間再現性

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 檢測系統採用兩種獨立的試劑組：用於分離 DNA 的 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 或 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit，和用於擴增 DNA 及檢測 EGFR 突變狀態的 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit。使用三個批次的 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 和三個批次的 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 證明了批次間再現性和互換性。EGFR 突變檢測的跨批次正確識別的總體百分比為 97.8% (317/324)，而野生型樣本為 100% (379/379)。

檢體處理

使用取自三個 FFPE 檢體塊（具體為外顯子 19 缺失突變 [2235–2249 del15]、外顯子 21 L858R 突變和一個野生型）的切片檢查了 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 的再現性。對於每個檢體，在三個中心執行兩次提取，並且在六天時間內於三個非連續天進行檢測，每個檢體總共 18 個資料點。在每個中心，兩名操作人員使用一批 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit（每個中心一批，總共三批）和同批 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 試劑（所有中心）執行檢測。所有突變型和野生型檢體結果均有效，並產生預期的識別結果（正確識別 = 100%，每個檢體 18/18），支持 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 在 DNA 分離預分析步驟中的再現性和重複性。-

精密度和再現性

透過檢測從 NSCLC FFPE 臨床檢體或 FFPE 細胞株提取的 DNA，涵蓋 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 中的所有七種突變檢測，評估過 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 的精密度和再現性。NSCLC 野生型 FFPE 臨床檢體也納入研究中（表 12）。

實施基質研究設計以評估檢測再現性，方法是在三個實驗室（中心）檢測樣本，使用三批 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit（三個中心均使用三批），每個中心使用兩名操作人員，每個中心兩台儀器，每個樣本（以接近 LOD 的濃度製備）重複檢測兩次，總共 16 天。在每個中心於非連續天評估每個突變的再現性。正確識別的比例顯示在表 12（下一頁）中。

表 12。檢測再現性 – 所檢測 EGFR 突變的正確識別比例

外顯子	突變	COSMIC* ID	識別		% 正確 下單側 95% CI
			正確/總量	% 正確	
18	G719A	6239	77/78	98.72	94.06
19	缺失	12384	92/92	100	96.80
		12387	95/95	100	96.90
		12419	83/83	100	96.46
		12422	94/94	100	96.86
		13551	95/95	100	96.90
		6220	96/96	100	96.93
		6223	95/95	100	96.90
		6225	91/95	95.79	90.62
		6254	92/92	100	96.80
		6255	94/96	97.92	93.59
		12369	95/95	100	96.90
		12370	62/63	98.41	92.69
		12382	92/95	96.84	92.04
		12383	93/93	100	96.83
20	S768I	6241	82/82	100	96.41
	插入	12376	92/92	100	96.80
		12378	93/93	100	96.83
		12377	94/94	100	96.86
	T790M	6240	92/92	100	96.80
21	L858R	6224	83/84	98.81	94.48
	L861Q	6213	84/84	100	96.50
野生型	—	—	77/78	98.72	94.06

* COSMIC：癌症體細胞突變目錄：<http://cancer.sanger.ac.uk/>。

使用變異數分量分析來估計運轉內、運轉間、日間、批次間和中心間變異性的標準差和 95% 信賴區間。在所有變異數分量中，所檢測的所有 EGFR 突變的總變異係數 (coefficient of variation, CV) 為 $\leq 14.11\%$ 。在所有突變型檢測組成員中，批次間、日間和運轉間的百分比 CV 為 $\leq 8.33\%$ 。運轉內變異性（重複性/精密度）的百分比 CV 範圍為 5.99% 至 13.49%。

臨床效能

臨床結果資料：GIOTRIF®

LUX-Lung 3 臨床試驗是一項國際、多中心、開放標記、隨機分配、第 3 期試驗，旨在比較 afatinib 與化療用於一線治療攜帶 EGFR 活性突變的 IIIB 或 IV 期肺腺癌患者的效果 (ClinicalTrials.gov 編號 NCT00949650)。透過使用臨床試驗測定 (Clinical Trial Assay, CTA) 檢測患者的 EGFR 突變狀態來確定患者是否有資格參與試驗。使用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 對組織檢體進行回溯性檢測。進行銜接性試驗以評估 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 與 CTA 之間的一致性。

根據 CTA 檢測結果，345 名患者被納入隨機分配集 (afatinib：230 名患者；化療：115 名患者)。主要療效結果是由獨立審查委員會 (independent review committee, IRC) 評估的無惡化存活期 (progression-free survival, PFS)。在 345 名隨機分配患者中，使用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 對來自 264 名患者 (afatinib：178 名患者；化療：86 名患者) 的腫瘤樣本進行回溯性檢測。在總體 CTA+ 人群和 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ 人群中，與隨機分配到化療組的患者相比，隨機分配到 afatinib 組的患者的 PFS (由 IRC 確定) 經證實存在具統計學意義的改善。總體療效結果總結於表 13 和圖 19

表 13。LUX-Lung 3 臨床試驗人群中使用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 檢測的患者的臨床益處

參數	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+/ CTA+ 人群 n = 264		CTA+ 人群，n = 345	
	化療 n = 86	Afatinib n = 178	化療 n = 115	Afatinib n = 230
無惡化存活期 (PFS)				
死亡或惡化人數，N (%)	53 (61.6%)	120 (67.4%)	69 (60.0%)	152 (66.1%)
中位 PFS (月)	6.9	11.2	6.9	11.1
中位 PFS 95% CI	5.3，8.2	9.7，13.7	5.4，8.2	9.6，13.6
危險比	0.49		0.58	
危險比 95% CI	0.35，0.69		0.43，0.78	
P 值（分層對數秩檢定）*	<0.0001		<0.001	

* 按 EGFR 突變狀態和種族分層。

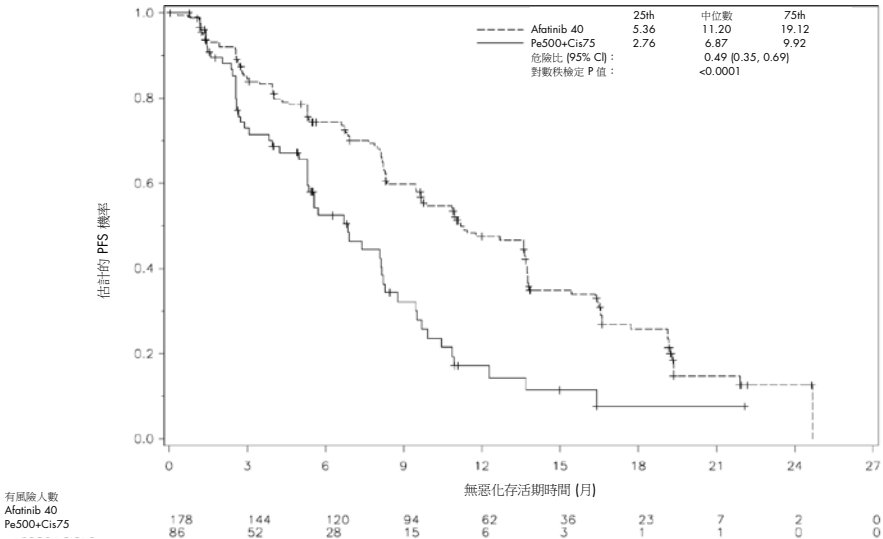


圖 19。按治療組繪出的無惡化存活期（PFS，由獨立審查委員會確定）的 Kaplan-Meier 曲線（*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+ /CTA+ 人群）。

對 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ 子集 (n = 264) 的分析顯示，與使用化療的患者相比，使用 *afatinib* 的患者的 PFS 時間（中位 PFS 分別為 6.9 和 11.2 個月）顯著增加，並且不太可能發生疾病惡化或死亡事件 (HR = 0.49, 95 % CI [0.35; 0.69], p < 0.0001)。在用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 檢測的患者子集中觀察到的臨床益處與在全研究人群 (n = 345) 中觀察到情況的相當。

臨床結果資料：IRESSA®

IRESSA Follow-up Measure (IFUM) 試驗是一項第 4 期、開放標記、單組試驗 (NCT01203917)，旨在確定一線 *gefitinib* 在 IIIA/B/IV 期 EGFR 突變陽性局部晚期或轉移性 NSCLC 高加索人患者中的療效與安全性/耐受性。IFUM 試驗設計用於按 RECIST 標準評估前瞻性選擇的 EGFR 突變型 NSCLC 高加索人患者中的客觀反應率。

符合資格的患者需要在 EGFR 外顯子 19 中存在缺失、具有 L858R、L861Q 或 G719X 置換突變並且在腫瘤樣本中不存在 T790M 或 S768I 突變或者外顯子 20 插入（由臨床試驗測定 [CTA] 前瞻性確定）。使用伴隨診斷 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 對來自經篩選參與 IFUM 臨床試驗的患者的檢體進行回溯性檢測。進行銜接性試驗以評估 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 與用於選擇 IFUM 臨床試驗患者的 CTA 之間的一致性。對於檢測 EGFR 外顯子 19 缺失和 L858R 突變，兩種檢測之間的總體一致性為 98.2% (n = 700/713; 95% CI: 96.9%, 99.0%)，且 PPA 為 88.2% (n = 90/102; 95%CI: 80.4%, 93.8%)，NPA 為 99.8% (n = 610/611; 95% CI: 99.1%, 100.0%)。

獲得了 859 名篩選患者的 CTA 檢測結果，其中 106 名患者符合 *gefitinib* 治療資格。在 859 個具有 CTA 結果的樣本中，有 765 個樣本可用於由 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 進行回溯性檢測，包括 87 個被 CTA 和 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 均檢測為 EGFR 突變陽性的樣本。

主要療效結果是由盲性獨立中央審查 (Blinded Independent Central Review, BICR) 和研究者評估的客觀反應率 (objective response rate, ORR)。在用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 檢測的患者子集中觀察到的臨床益處與在全研究人群中觀察到情況的相當。

總體療效結果總結於表 14。

表 14。IFUM 臨床試驗人群中使用 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 檢測的患者的臨床益處

參數	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+ 人群，n = 87	CTA+ 人群， n = 106
由 BICR 評估的客觀反應率 (ORR)		
反應數 (N)	42	53
ORR，% (95% CI)	48.3 (38.1–58.6)	50.0 (40.6–59.4)
中位反應持續時間 (月)	6.9 (5.6–11.4)	6.0 (5.6–11.1)
由研究者評估的客觀反應率 (ORR)		
反應數 (N)	62	74
ORR，% (95% CI)	71.3 (61.0–79.7)	69.8 (60.5–77.7)
中位反應持續時間 (月)	8.3 (7.2–11.3)	8.3 (7.6–11.3)

BICR：盲性獨立中央審查；CI：信賴區間；CTA：臨床試驗測定。

注意：Kit + 是外顯子 19 缺失/L8585R/L861Q/G719X 為陽性的結果。

由於 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 並非用於選擇 IFUM 臨床試驗的患者，因此進行另外的療效分析以考慮因被 CTA 檢測為陰性但被 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 檢測為陽性（即 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA–）而未納入試驗的患者，以及參與試驗但沒有來自 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 的有效複檢結果（即 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 未知/CTA+）的患者。所有假設分析的結果與主要療效分析的結果大體相似。















參考資料

1. Pao, W. and Miller, V.A.(2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions.J. Clin.Oncol.**23**, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A.(2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer.Cancer Res.**65**, 7525.
3. Inoue, A., et al.(2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations.J. Clin.Oncol.**24**, 3340.
4. Asahina, H., et al.(2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations.42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006.J. Clin.Oncol.**24** (18S) (Suppl), Abstr 13014.
5. Paz-Ares, L. et al.A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR).42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006.J. Clin.Oncol.**24** (18S) (Suppl), Abstr 7020.
6. Kobayashi, K., et al.(2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations.44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago 31 May 3 June 2008.J. Clin.Oncol.**26** (15S) (Suppl), Abstr 8070.
7. Sequist, L.V., et al.(2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations.J. Clin.Oncol.**15**, 2442.
8. Porta, R. et al.(2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p).J. Clin.Oncol.**26** (May 20 suppl), abstr 8038.

-
9. Jaene, P.A. and Johnson, B.E.(2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors.Clin.Cancer Res.**12**, 4416s.
 10. Whitcombe, D. et al.(1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence.Nature Biotech.**17**, 804.
 11. Thelwell, N. et al.(2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection.Nucleic Acids Res.**28**, 3752.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004).Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline, 1st ed. CLSI Document EP-17A.Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

符號

包裝和標籤上可能出現以下符號：

符號	符號定義
	含有足夠進行 <N> 次反應的試劑
	使用期限
	體外診斷醫療器材
	目錄號碼
	批號
	材料編號
	避免光照
	全球交易品項識別代碼
	授權代表
	R 表示使用說明（手冊）修訂，n 表示修訂編號
	溫度限制
	製造商
	參閱使用說明
	警示

附錄 A：therascreen EGFR RGQ PCR Kit 人工操作程序

本部分包含在開放模式（即不使用 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體）下將 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 與 Rotor-Gene Q 軟體版本 2.3 配合使用的說明。

一般資訊

- 有關所需材料的清單，請參閱第13頁的「需要但並未提供的材料」。
- 有關樣本製備和樣本佈局的完整說明，請參閱第 20 頁的「操作程序：樣本評估」和第 31頁的「操作程序：EGFR 突變檢測」。
- 在開始每次運轉前，請確保循環參數是正確的。

操作程序：建立溫度曲線

在開始前，為 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 分析建立溫度曲線。DNA 樣本評估和 EGFR 突變檢測的循環參數相同。

程序

循環參數匯總在表 15 中。

表 15。溫度曲線

循環	溫度	時間	資料獲取
1	95°C	15 分鐘	無
40	95°C	30 秒	無
	60°C	60 秒	綠色和黃色

1. 在連接至 Rotor-Gene Q MDx 儀器的電腦之桌面上的 Rotor-Gene Q 系列軟體 2.3 圖示上按兩下。

2. 要建立新模板，選擇「Empty Run」（空運轉），然後按一下「New」（新增）以輸入「New Run Wizard」（新運轉精靈）。
3. 選擇「72-well rotor」（72孔轉子）做為轉子類型。確認密封圈已連接，然後選擇「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊。按一下「Next」（下一步）（圖 20）。

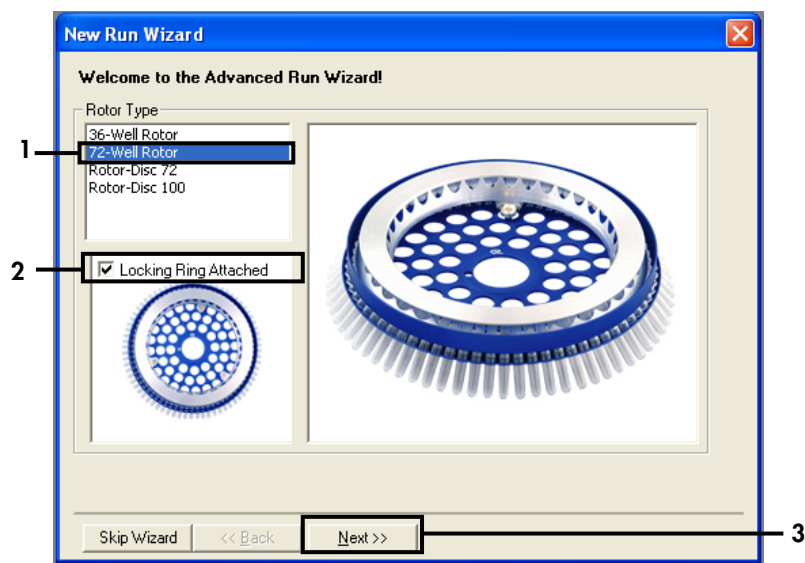


圖 20。「New Run Wizard」（新運轉精靈）對話方塊。1 = 「Rotor type」（轉子類型）；2 = 「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊；3 = 「Next」（下一步）。

4. 輸入操作者的姓名。新增任何註釋並在反應體積處輸入 25。確保「Sample Layout」（樣本佈局）為「1, 2, 3...」。按一下「Next」（下一步）（圖 21）。

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator :

Notes :

Reaction Volume (µL):

Sample Layout :

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

圖 21 • 輸入操作者的姓名和反應體積。 1 = 「Operator」（操作者）對話方塊欄位和「Notes」（註釋）對話方塊欄位；2 = 「Reaction Volume」（反應體積）欄位和「Sample Layout」（樣本佈局）欄位；3 = 「Next」（下一步）。

5. 按一下「New Run Wizard」（新運轉精靈）對話方塊（圖 22）中的「Edit Profile」（編輯曲線），並根據以下步驟選擇運轉參數。

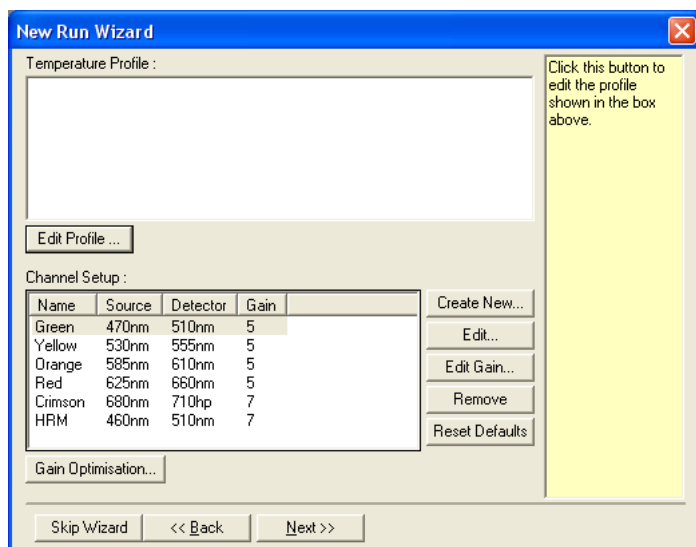


圖 22。「New Run Wizard」(新運轉精靈) 中的「Edit Profile」(編輯曲線)。

6. 按一下「Insert after」(之後插入) 並選擇「New Hold at Temperature」(新保持保溫) (圖 23)。

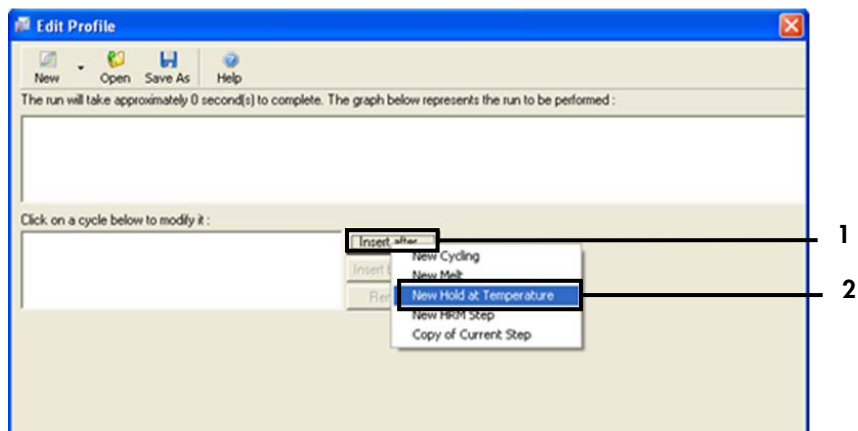


圖 23。插入初始孵育步驟。1 = 「Insert after」(之後插入)；2 = 「New Hold at Temperature」(新保持保溫)。

- 將「Hold Temperature」（保持保溫）變更為 95°C，並將「Hold Time」（保持時間）變更為「15 mins 0 secs」（15 分鐘 0 秒）。按一下「Insert after」（之後插入），然後選擇「New Cycling」（新循環）（圖 24）。

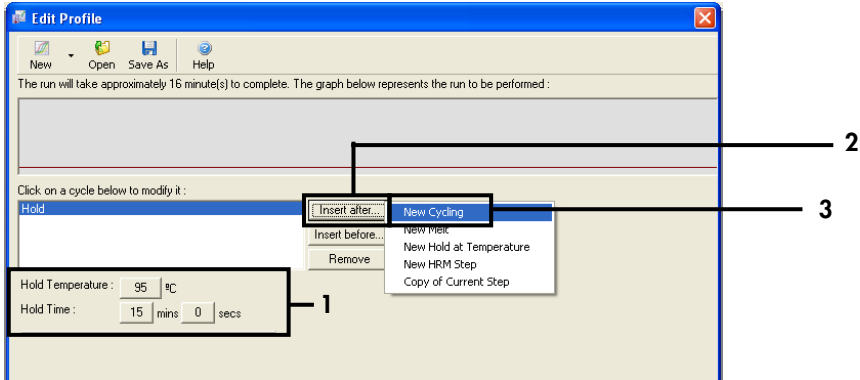


圖 24 • 95°C 初始孵育步驟。1 = 「Hold Temperature and Hold Time」（保持保溫和保持時間）；2 = 「Insert after」（之後插入）；3 = 「New Cycling」（新循環）。

- 將循環重複數改為 40。選擇第一步並設定為「95°C for 30 secs」（95°C 保持 30 秒）（圖 25）。

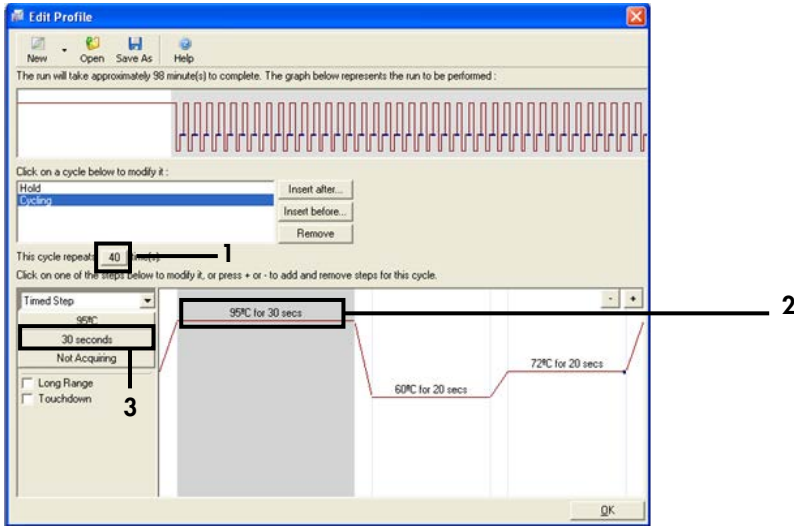


圖 25 • 95°C 循環步驟。1 = 「循環重複數」方塊；2 = 第一步：溫度設定；3 = 第一步：時間設定。

9. 選擇第二步並設定為「60°C for 60 secs」（60°C 保持 60 秒）。本步過程中透過選擇「Not Acquiring」（不獲取）啟用資料獲取（圖 26）。

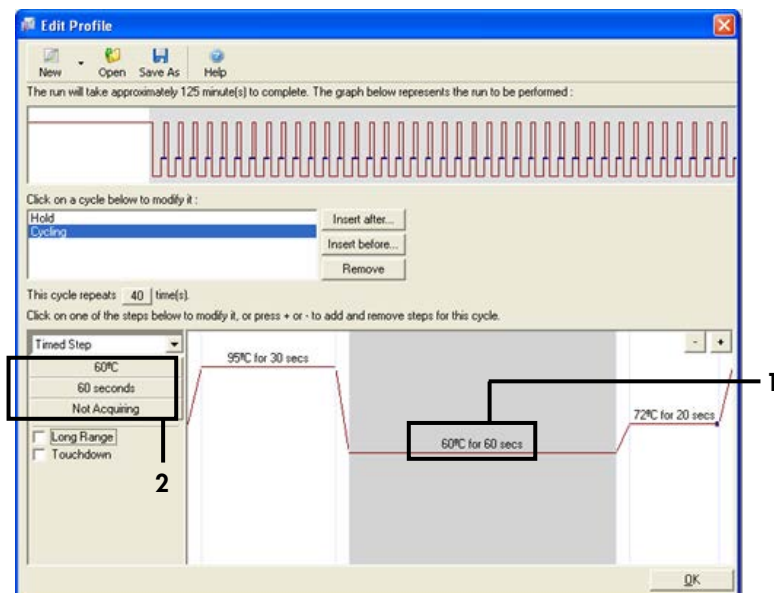


圖 26 • 60°C 循環步驟。1 = 第二步：溫度和時間設定；2 = 「Not Acquiring」（不獲取）按鈕。

10. 透過選擇「>」從「Available Channels」（可用通道）清單中轉移 Green（綠色）和 Yellow（黃色）通道以將其設定為採集通道。按一下「OK」（確定）（圖 27）。

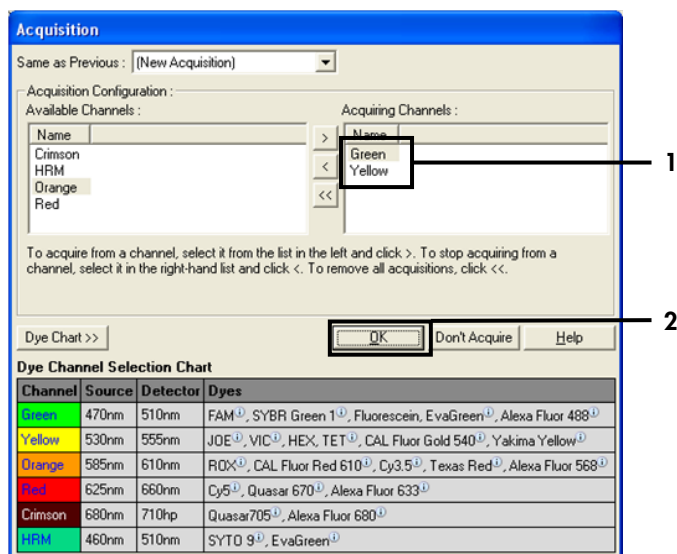


圖 27。在 60°C 循環步驟採集。1 = 所選的通道；2 = 「OK」（確定）。

11. 選擇第三步，按一下「-」按鈕即可刪除該步驟。按一下「OK」（確定）（圖 28）。

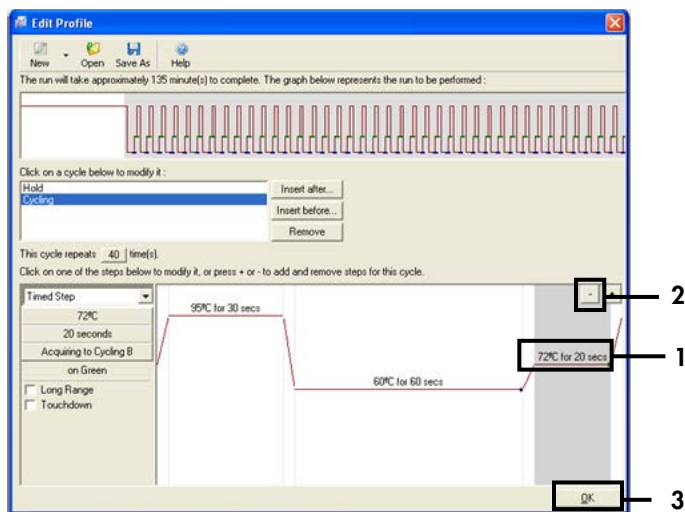


圖 28。取消延伸步驟。1 = 第三步；2 = 刪除；3 = 「OK」（確定）。

12. 在下一個對話方塊中，按一下「Gain Optimisation」（增益最佳化）（圖 29）。

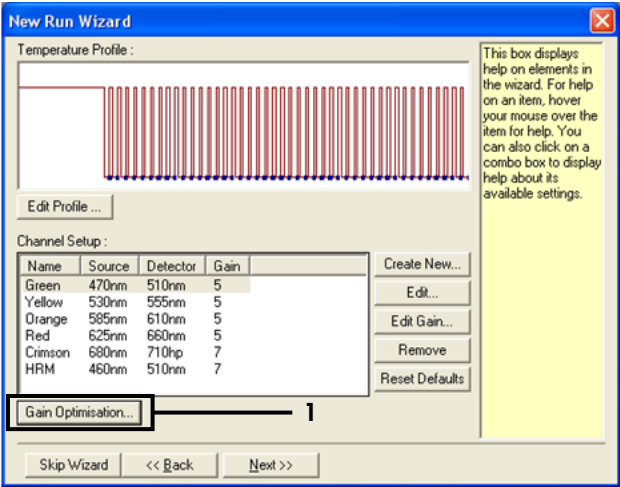


圖 29。增益最佳化 (1)。

13. 按一下「Optimise Acquiring」（最佳化採集）。隨即顯示每個通道的通道設定。透過按一下兩個通道的「OK」（確定）接受這些預設值（圖 30）。

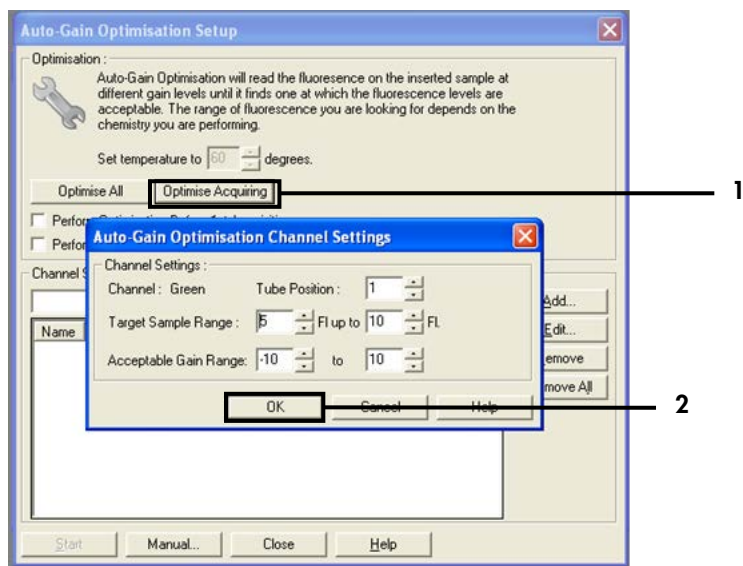


圖 30 • 綠色通道的自動增益最佳化。1 = 「Optimise Acquiring」（最佳化採集）；2 = 「OK」（確定）。

14. 勾選「Perform Optimisation before 1st Acquisition」（在第 1 次採集前執行最佳化）方塊，然後按一下「Close」（關閉）按鈕返回至精靈（圖 31）。

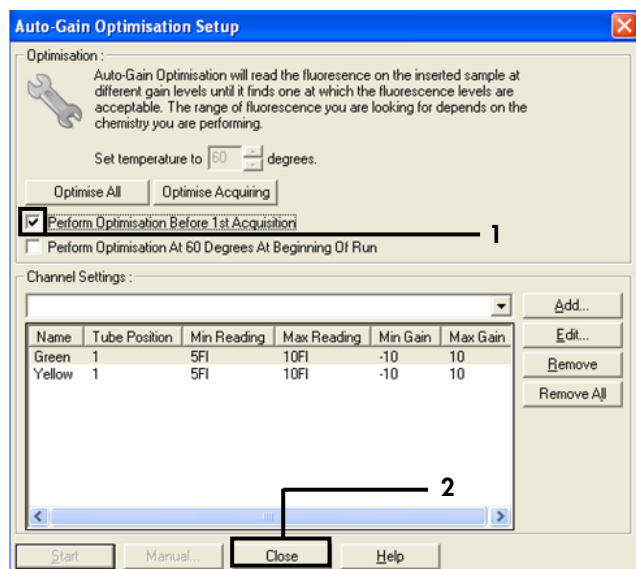


圖 31 • 選擇綠色和黃色通道。 1 = 「Perform Optimisation before 1st Acquisition」（在第 1 次採集前執行最佳化）核取方塊；2 = 「Close」（關閉）。

15. 按一下「Next」（下一步）（圖 32），透過選擇「Save Template」（儲存模板）將 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 模板（*.ret 檔案）儲存在適當的位置。

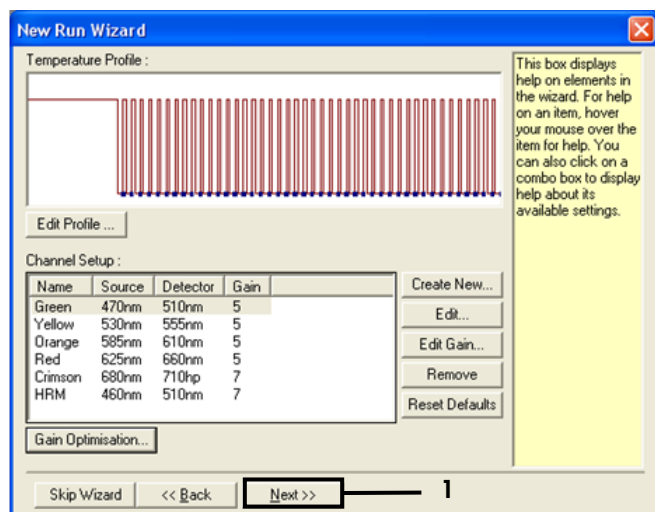


圖 32 • 「Next」（下一步）(1)。

程序（人工）

操作程序：樣本評估（人工）

本操作程序用於評估樣本中的全部可擴增 DNA，應在 EGFR 突變分析之前執行。

- 根據第 20 頁上「操作程序：樣本評估」部分一直到第 11 步的說明製備樣本。
- 根據第 75 頁上「操作程序：therascreen EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q 預備」部分的說明在 Rotor-Gene Q MDx 儀器上預備 PCR 運轉。
- 在運轉完成之後，根據第 82 頁上「樣本評估資料分析」部分的說明分析資料。

操作程序：EGFR 突變檢測（人工）

- 通過樣本評估的樣本可用於檢測 EGFR 突變。
- 根據第 31 頁上「操作程序：EGFR 突變偵測」部分一直到第 11 步的說明製備樣本。
- 根據第 75 頁上「操作程序：therascreen EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q 預備」部分的說明在 Rotor-Gene Q MDx 儀器上預備 PCR 運轉。
- 在運轉完成之後，根據第 83 頁上「EGFR 突變檢測資料分析」部分的說明分析資料。

操作程序：therascreen EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q 預備

程序

1. 開啟 Rotor-Gene Q 系列軟體版本 2.3 並開啟相應的 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 溫度曲線（*.ret 檔案）。

有關建立溫度曲線和選擇運轉參數的說明，請參閱第 64 頁的「操作程序：建立溫度曲線」。

2. 確保已選擇正確的轉子，並選擇相應的方塊確認密封圈已連接。按一下「Next」（下一步）（圖 33）。

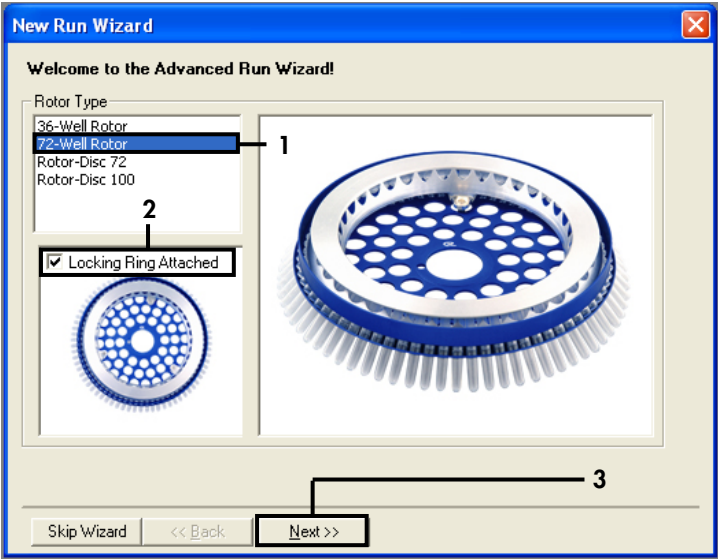


圖 33。「New Run Wizard」（新運轉精靈）對話方塊和歡迎螢幕。1 = 「Rotor type」（轉子類型）；2 = 「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊；3 = 「Next」（下一步）。

3. 輸入操作者的姓名。新增任何註釋，確保反應體積已設定為 25 並且「Sample Layout」（樣本佈局）為「1, 2, 3...」。按一下「Next」（下一步）（圖 34）。

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator : — 1

Notes : — 2

Reaction Volume (µL): — 3

Sample Layout : — 4

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings. — 5

Skip Wizard << Back Next >>

圖 34 • 「New Run Wizard」(新運轉精靈) 選項螢幕。 1 = 「Operator」(操作者)；2 = 「Notes」(註釋) 欄位；3 = 「Reaction Volume」(反應體積)；4 = 「Sample Layout」(樣本佈局) 欄位；5 = 「Next」(下一步)。

4. 下一個視窗允許編輯溫度曲線。(無需進行編輯，因為溫度曲線已根據第 64 頁上「操作程序：建立溫度曲線」中的說明建立。) 按一下「Next」(下一步) (圖 35)。

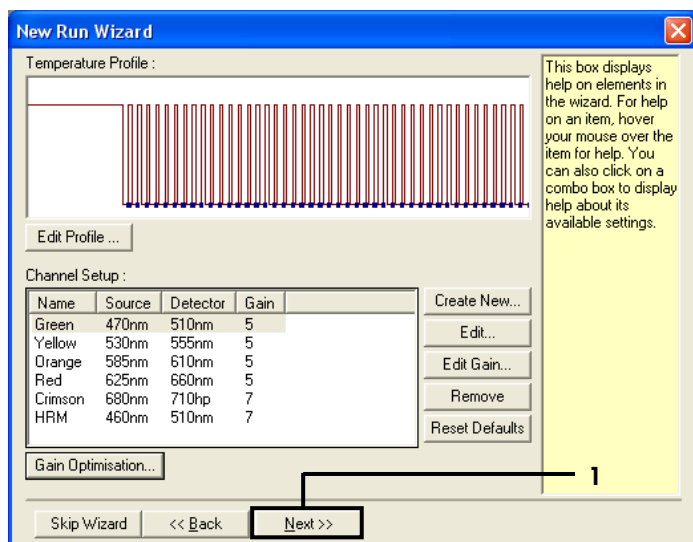


圖 35。「New Run Wizard」(新運轉精靈)對話方塊和溫度編輯螢幕 (1 = 「Next」(下一步))。

5. 檢查概要，然後按一下「Start Run」(開始運轉)以儲存運轉檔案並開始運轉 (圖 36)。

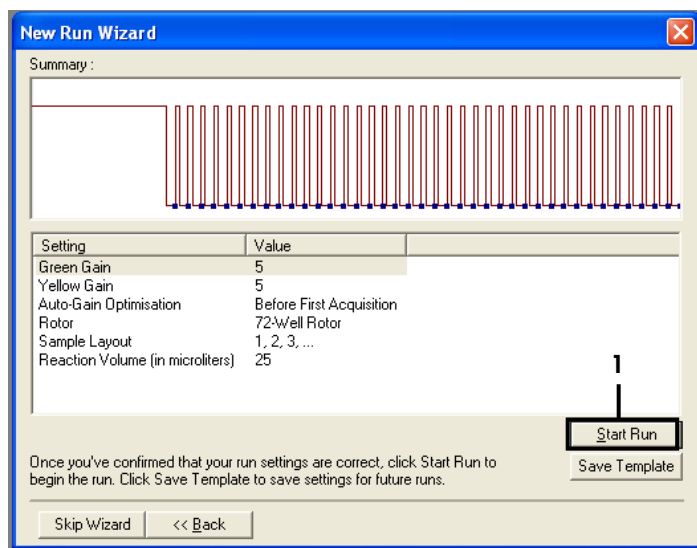


圖 36。「New Run Wizard」(新運轉精靈)對話方塊和概要螢幕 (1 = 「Start Run」(開始運轉))。

6. 在運轉開始後，新的視窗開啟。您可以現在輸入樣本名稱，或者按一下「Finish」（完成）並在運轉期間透過選擇「Sample」（樣本）進行輸入，或者在運轉完成之後輸入。
7. 按一下「Finish and Lock Samples」（完成並鎖定樣本）將阻止您編輯樣本名稱。在輸入樣本名稱時，使用者應特別小心以確保正確的樣本檢測和分析。
注意：當命名樣本時，「Name」（名稱）欄中空試管的欄位應留空。
8. 在運轉完成之後，根據第 82 頁的「樣本評估資料分析」部分或者第 83 頁的「EGFR 突變檢測資料分析」部分（視情況而定）分析資料。
9. 如果需要定量報告，在 Rotor-Gene Q 運轉檔案中按一下工具列上的「Reports」（報告）。
10. 在報告瀏覽器中，按一下「Report Categories」（報告類別）下的「Cycling A Green (Page 1)」(循環 A 綠色 [第 1 頁])（圖 37）。

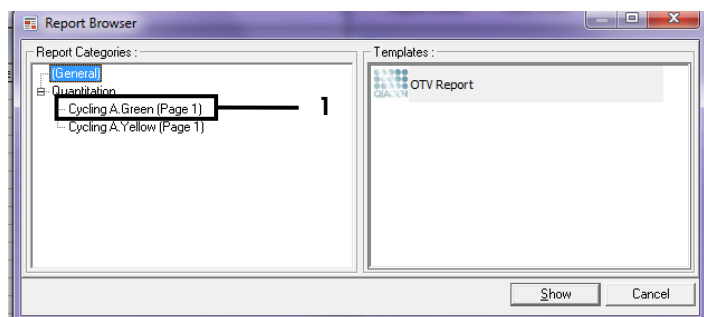


圖 37。報告瀏覽器（1 = 「Cycling A Green (Page 1)」(循環 A 綠色 [第 1 頁])）。

11. 選擇「Templates」（模板）下的「Quantitation (Full Report)」(定量[完整報告])（圖 38）。

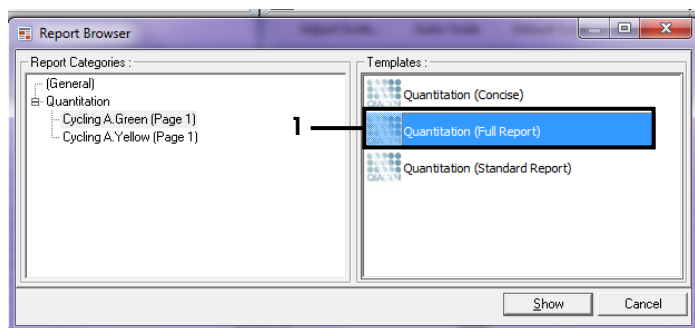


圖 38 • 定量報告（完整報告）(1)。

12. 按一下「Show」（顯示）以生成報告。
13. 按一下「Save As」（另存新檔）以儲存電子版。
14. 針對「Cycling A Yellow (Page 1）」（循環 A 黃色[第 1 頁]）重複這些步驟。

結果判讀（人工）

在 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 運轉（DNA 樣本評估或 EGFR 突變分析）完成後，根據以下程序分析資料：

- 軟體分析設定
- DNA 樣本評估分析（人工）
注意：有關試管佈局，請參閱第 22 頁的「表 4」
- EGFR 突變檢測分析（人工）
注意：有關試管佈局，請參閱第 33 頁的「表 7」

軟體分析設定

1. 使用 Rotor-Gene Q 系列軟體版本 2.3 開啟相應的運轉檔案 (*.rex)。
2. 如果在執行運轉之前樣本尚未命名，按一下「Edit Samples」（編輯樣本）。
3. 在「Name」（名稱）欄中插入樣本名稱。
注意：將任何空試管的名稱留空。
4. 按一下「Analysis」（分析）。在分析頁面，按一下「Cycling A Yellow」（循環 A 黃色）以查看黃色 (HEX) 通道。
5. 按一下「Named On」（已命名）。
注意：這可以確保空試管不會包含在分析中。
6. 選擇「Dynamic tube」（動態試管）。
7. 選擇「Slope correct」（斜率正確）。
8. 選擇「Linear scale」（線性標度）。
9. 選擇「Take Off Adj」（分支 Adj），在頂部方塊中輸入值 15.01（「如果在循環前計算了 TOP 值」），在底部方塊中輸入值 20.01（「然後使用以下循環和 TOP」）。
10. 將閾值設定為 0.02 並檢查黃色 (HEX) 通道 C_T 值。

11. 在分析頁面，按一下「Cycling A Green」（循環 A 綠色）以查看綠色 (FAM) 通道。
12. 選擇「Named On」（已命名）。
13. 選擇「Dynamic tube」（動態試管）。
14. 選擇「Slope correct」（斜率正確）。
15. 選擇「Linear scale」（線性標度）。
16. 選擇「Take Off Adj」（分支 Adj），在頂部方塊中輸入值 15.01（「如果在循環前計算了 TOP 值」），在底部方塊中輸入值 20.01（「然後使用以下循環和 TOP」）。
17. 將閾值設定為 0.075 並檢查綠色 (FAM) 通道 C_T 值。

樣本評估資料分析

在 DNA 樣本評估運轉完成之後，請參閱第 81 頁的「軟體分析設定」並按如下操作分析資料。（有關試管佈局，請參閱第 22 頁的「表 4」。）

運轉對照分析

陰性對照

為確保模板未受到污染，綠色 (FAM) 通道上 NTC 不得產生低於 40 的 C_T 值。

為確保運轉設定正確，黃色 (HEX) 通道上 NTC 顯示的擴增次數必須在 29.85–35.84 範圍內。可接受的值應在這些值範圍內並包含這些值。

陽性對照

綠色 (FAM) 通道上 EGFR PC 顯示的 C_T 值必須在 28.13–34.59 範圍內。此範圍之外的值表明檢測設定出現問題，因此運轉失敗。

注意：如果陰性或陽性對照失敗，則不得使用樣本資料。

樣本分析

如果 DNA 樣本評估運轉對照有效，則分析可以繼續。綠色 (FAM) 通道上樣本對照 C_T 值必須位於 23.70 至 31.10 範圍內。如果樣本 C_T 值位於此範圍之外，則參考以下提供的指南。

- 樣本對照檢測 $C_T < 23.70$

對照 $C_T < 23.70$ 的樣本（高 DNA 濃度）將超出突變檢測的負荷，必須進行稀釋。為在低濃度檢測每個突變，濃度過高的樣本應經過稀釋以落在 23.70 至 31.10 的 C_T 值範圍內。稀釋樣本 DNA 可增加 C_T 值（按 1:1 稀釋可將 C_T 值增加大約 1.0）。使用套組提供的水（稀釋用水 [Dil.]）稀釋樣本。

- 樣本對照檢測 $C_T > 31.10$

如果綠色 (FAM) 通道上對照 $C_T > 31.10$ ，建議重新提取樣本。起始 DNA 模板不足將導致無法以檢測規定的臨界值檢測出所有 EGFR 突變。

EGFR 突變檢測資料分析

樣本必須透過 DNA 樣本評估之後才能用於檢測 EGFR 突變（請參閱第 82 頁的「樣本評估資料分析」）。

在 EGFR 突變檢測運轉完成之後，請參閱第 81 頁的「軟體分析設定」並按如下操作分析資料。（有關試管佈局，請參閱第 33 頁的「表 7」。）

運轉對照分析

請參閱圖 39 中的運轉對照分析工作流程圖。

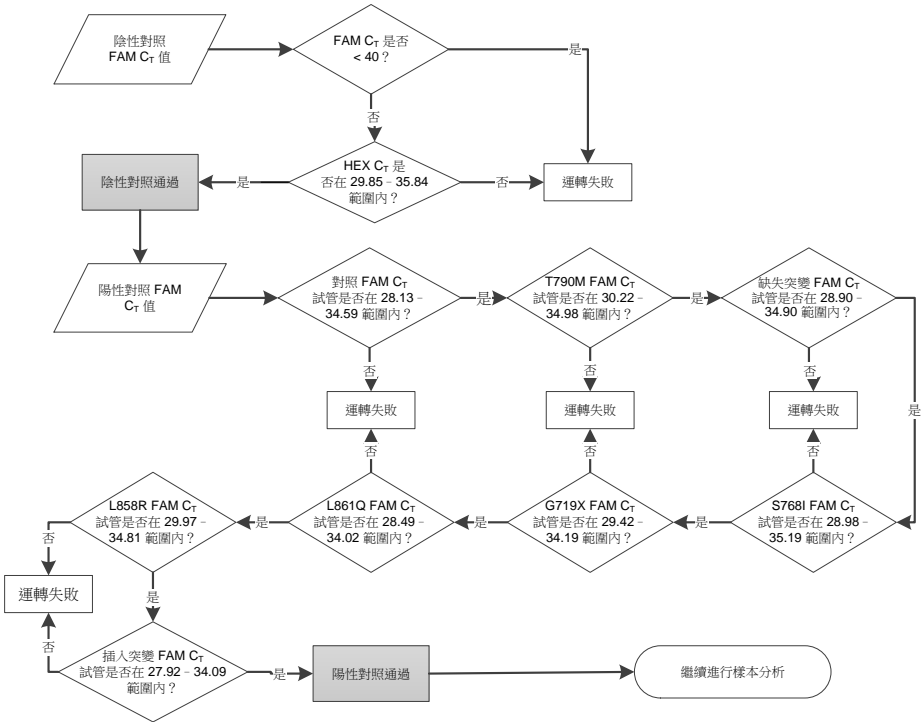


圖 39 • EGFR 突變檢測的運轉對照分析工作流程圖。

陰性對照

為確保模板未受到污染，綠色 (FAM) 通道上每個 EGFR 突變檢測的 NTC 不得產生低於 40 的 C_T 值。

為確保運轉設定正確，黃色 (HEX) 通道上 NTC 顯示的擴增次數必須在 29.85–35.84 範圍內。可接受的值應在這些值範圍內並包含這些值。

陽性對照

對於每個 EGFR 突變檢測，綠色 (FAM) 通道上 EGFR PC 顯示的 C_T 值必須在 表 16 所示的範圍內。此範圍之外的值表明檢測設定出現問題，因此運轉失敗。

注意：如果陰性或陽性運轉對照失敗，則不得使用樣本資料。

表 16。陽性反應對照可接受的 C_T 範圍（EGFR 突變檢測分析）

反應混合液	樣本	通道	C _T 範圍
對照	PC	綠色	28.13–34.59
T790M	PC	綠色	30.22–34.98
缺失	PC	綠色	28.90–34.90
L858R	PC	綠色	29.97–34.81
L861Q	PC	綠色	28.49–34.02
G719X	PC	綠色	29.42–34.19
S768I	PC	綠色	28.98–35.19
插入	PC	綠色	27.92–34.09

樣本分析 – 樣本對照綠色 (FAM) 通道 C_T 值

如果 EGFR 突變檢測運轉的陽性和陰性對照有效，則樣本的 EGFR 突變檢測可繼續。

綠色 (FAM) 通道中樣本的對照 C_T 值必須位於 23.70–31.10 範圍內。（有關試管佈局，請參閱第 324 頁的表 7。）

如果樣本對照 C_T 值位於此範圍之外，則參考以下提供的指南。

- 樣本對照檢測 $C_T < 23.70$

對照 $C_T < 23.70$ 的樣本（高 DNA 濃度）將超出突變檢測的負荷，必須進行稀釋。為在低濃度檢測每個突變，濃度過高的樣本應經過稀釋以落在 23.70 至 31.10 的 C_T 值範圍內。稀釋樣本 DNA 可增加 C_T 值（按 1:1 稀釋可將 C_T 值增加大約 1.0）。使用套組提供的水（稀釋用水 [Dil.]）稀釋樣本。

- 樣本對照檢測 $C_T > 31.10$

如果綠色 (FAM) 通道上對照 $C_T > 31.10$ ，建議重新提取樣本。起始 DNA 模板不足將導致無法以檢測規定的臨界值檢測出所有 EGFR 突變。

請參閱圖 40 中的 EGFR 突變檢測樣本分析工作流程圖。

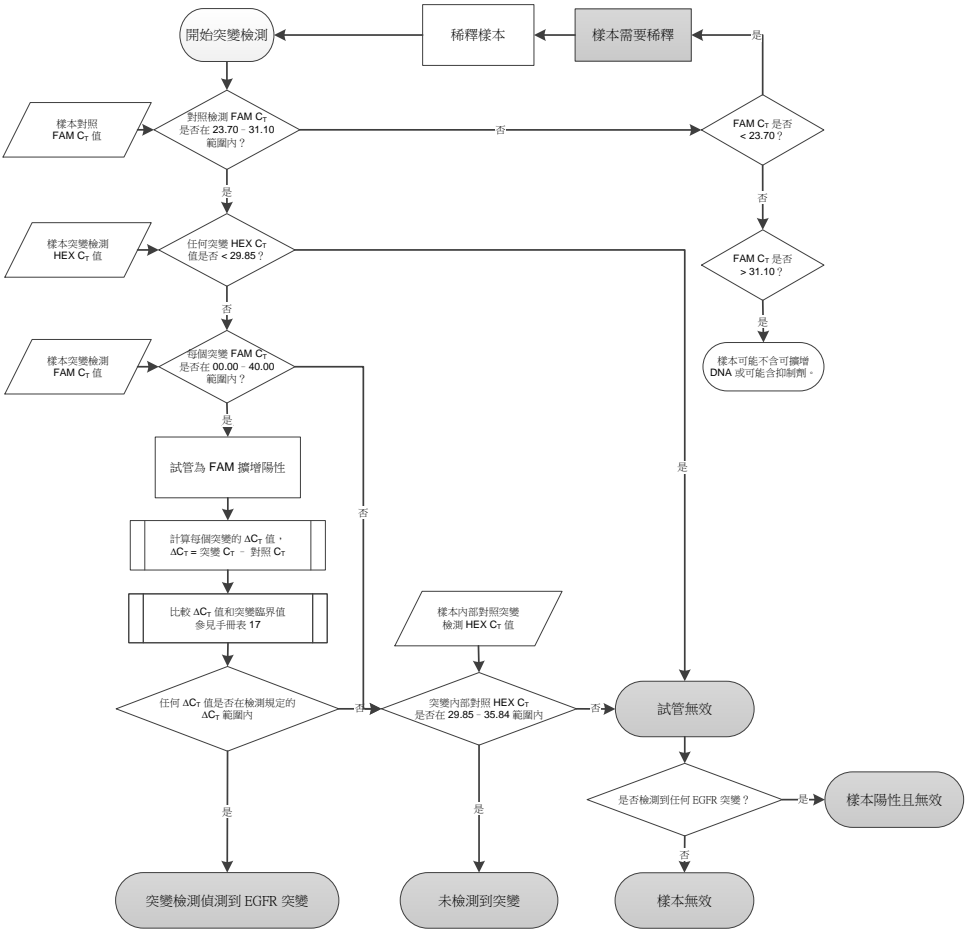


圖 40。EGFR 突變檢測的樣本分析工作流程圖。

樣本分析 – 樣本內部對照黃色 (HEX) 通道 C_T 值

請參閱圖 40 中的 EGFR 突變檢測樣本分析工作流程圖。

必須對每份樣本的所有試管進行分析。檢查黃色 (HEX) 通道上內部對照的每個試管產生的 HEX 信號是否位於 29.85–35.84 範圍內。有三種可能的結果。

- 如果內部對照 C_T 低於任何突變檢測的規定範圍 (< 29.85)，則黃色 (HEX) 通道擴增的結果無效。該試管的黃色 (HEX) 通道擴增無效。
- 如果內部對照 C_T 位於規定的範圍 (29.85–35.84) 內，則黃色 (HEX) 通道擴增的結果為陽性
該試管的黃色 (HEX) 通道擴增有效。
- 如果內部對照 C_T 高於規定的範圍 (> 35.84)，則黃色 (HEX) 通道擴增的結果為陰性。

如果綠色 (FAM) 通道有擴增並且該反應的 ΔC_T 小於或等於該試管的檢測臨界值，則黃色 (HEX) 通道擴增有效。如果試管的綠色 (FAM) 通道中沒有擴增或者 ΔC_T 值高於檢測臨界值，則黃色 (HEX) 通道擴增無效。

黃色 (HEX) 通道中的內部對照擴增可能由於 PCR 抑制而失敗。稀釋樣本可降低抑制劑的影響。需要注意的是，此操作同時也稀釋了樣本中的目標 DNA。使用套組提供的水（稀釋用水 [Dil.]）稀釋樣本。

樣本分析 – 樣本突變檢測綠色 (FAM) 通道 C_T 值

應對照 表 17 中列出的值核對所有七份 EGFR 突變反應混合液的綠色 (FAM) 通道值。可接受的值應在顯示的值範圍內並包括這些顯示的值。（有關試管佈局，請參閱第 33 頁的「表 7」。）

表 17。綠色 (FAM) 通道中樣本 EGFR 突變反應的可接受值 (EGFR 突變檢測分析)

檢測	C _T 範圍	臨界值 (ΔC _T)
T790M	0.00–40.00	≤ 7.40
缺失	0.00–40.00	≤ 8.00
L858R	0.00–40.00	≤ 8.90
L861Q	0.00–40.00	≤ 8.90
G719X	0.00–40.00	≤ 8.90
S768I	0.00–40.00	≤ 8.90
插入	0.00–40.00	≤ 8.00

- 如果樣本的綠色 (FAM) 通道 C_T 位於規定的範圍內，則該樣本為 FAM 擴增陽性。
- 如果樣本的綠色 (FAM) 通道 C_T 高於規定的範圍，或者沒有擴增，則該樣本為 FAM 擴增陰性。

對於 FAM 擴增陽性的每個 EGFR 突變檢測試管，按以下所示計算 ΔC_T 值，確保突變和對照 C_T 值來自同一樣本。（有關試管佈局，請參閱第 33 頁的「表 7」。）

$$\Delta C_T = [\text{突變檢測 } C_T \text{ 值}] - [\text{對照檢測 } C_T \text{ 值}]$$

對於所述的分析，比較樣本的 ΔC_T 值與臨界值（表 17）。確保檢測應用了正確的臨界值。

臨界值是指高於該值時分析的陽性信號可能是由於野生型 DNA 上 ARMS 引物的背景信號所致。如果在某個檢測中樣本的 ΔC_T 值高於臨界值，則該樣本歸類為陰性或超出了用於該檢測的試劑盒的檢測極限。

每份樣本的每次突變反應的狀態可能為以下之一：

- 檢測到突變
- 未檢測到突變
- 無效

檢測到突變

綠色 (FAM) 通道擴增為陽性且 ΔC_T 值處於或低於臨界值。如果一份樣本檢測到多個突變，則均可進行報告。

未檢測到突變

綠色 (FAM) 通道擴增為陽性且 ΔC_T 值高於臨界值。

綠色 (FAM) 通道擴增陰性且黃色 (HEX) 通道擴增（內部對照）陽性。

無效

黃色 (HEX) 通道擴增（內部對照）無效。

綠色 (FAM) 通道擴增陰性且黃色 (HEX) 通道擴增（內部對照）陰性。

注意：對於一份樣本，一個試管可能為黃色 (HEX) 通道擴增陰性，另一個試管可能為綠色 (FAM) 通道擴增陽性。在這種情況下，第二個試管的結果可被視為「檢測到突變」，但是所鑒定的特定突變可能並非該樣本的唯一可能的突變。

附錄 B：安裝 *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 用於與 Rotor-Gene Q MDx 儀器和 72 孔轉子搭配使用。*therascreen* EGFR CE Assay Package (*therascreen* EGFR CE 檢測套件軟體) 單獨以光碟 (目錄編號 9023537) 提供。此檢測套件軟體包括「*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template」(*therascreen* EGFR CE 對照運轉鎖定模板) 和「*therascreen* EGFR CE Locked Template」(*therascreen* EGFR CE 鎖定模板)。

注意：*therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體只能與 Rotor Gene Q 軟體版本 2.3 一同使用。確保安裝了正確版本的 Rotor Gene Q 軟體之後再安裝 *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體。如果您的 Rotor-Gene Q MDx 儀器在交付時安裝的是較早版本的軟體，在 Rotor-Gene Q MDx 產品頁面上「Product Resources」(產品資源) 部分的「Operating Software」(作業軟體) 下面下載 Rotor-Gene Q 軟體版本 2.3 進行升級，參閱 www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources。

程序

1. 訂購 *therascreen* EGFR CE Assay Package CD (*therascreen* EGFR CE 檢測套件軟體光碟，目錄編號 9023537)。
2. 將光碟插入已連接至 Rotor-Gene Q MDx 儀器的電腦之光碟機。
3. 如果光碟自動載入，按兩下「*therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.5.exe*」檔案開始安裝。
或者，在已連接的電腦上使用檔案瀏覽器找到此可執行檔並啟動。
4. *therascreen* EGFR CE Assay Package 軟體安裝精靈打開。按一下「Next」(下一步) 繼續 (圖 41)。

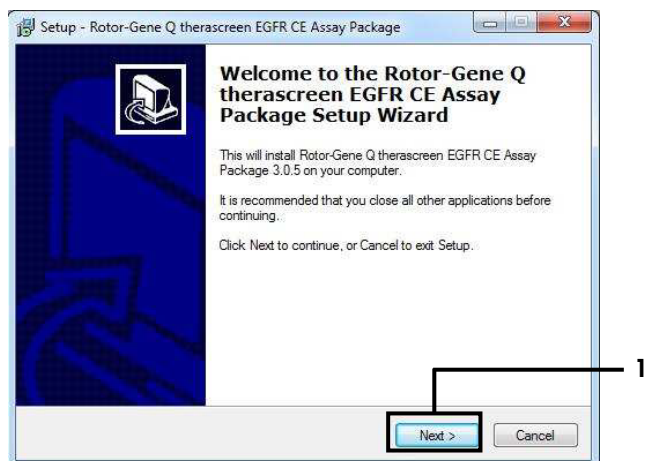


圖 41。「Setup Wizard」（安裝精靈）對話方塊（1 = 「Next」（下一步））。

5. 閱讀對話方塊中的授權協議，透過勾選陳述「I accept the agreement」（我接受協議）接受協議。按「Next」（下一步）繼續（圖 42）。

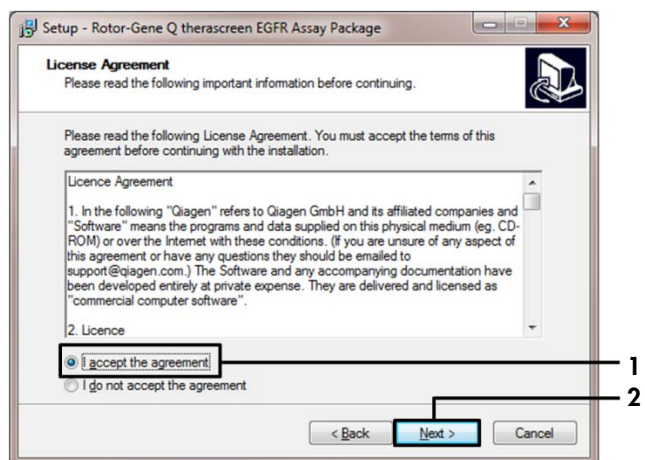


圖 42。「License Agreement」（授權協議）對話方塊。1 = 「I accept the agreement」（我接受協議）；2 = 「Next」（下一步）。

6. 安裝將自動啟動。當安裝完成時，最後的「安裝精靈」對話方塊開啟。按一下「Finish」（完成）退出（圖 43）。

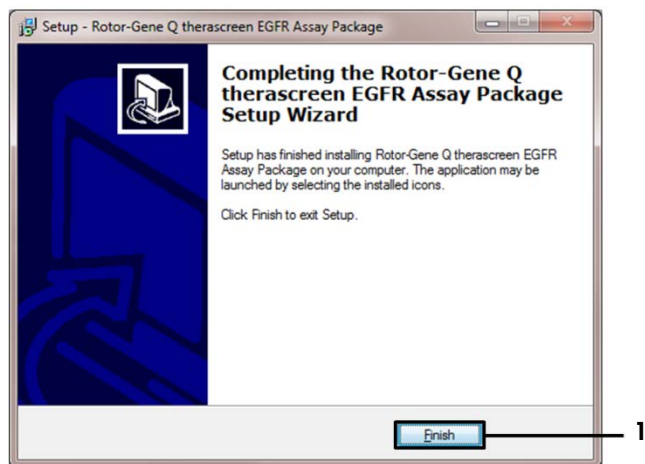


圖 43。完成安裝精靈（1 = 「Finish」（完成））。

7. 重啟電腦。

「*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template」（*therascreen* EGFR CE 對照運轉鎖定模板）和「*therascreen* EGFR CE Locked Template」（*therascreen* EGFR CE 鎖定模板）的捷徑將自動生成並顯示在桌面上（圖 44）。

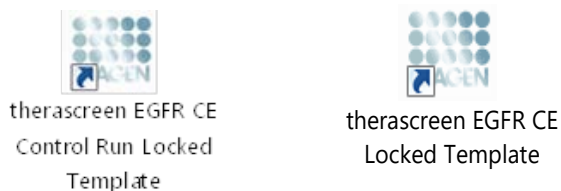


圖 44。EGFR CE Control Run Locked Template（EGFR CE 對照運轉鎖定模板）和 EGFR CE Locked Template（EGFR CE 鎖定模板）圖示。

聯絡資訊

有關技術協助和更多資訊，請瀏覽我們的技術支援中心（www.qiagen.com/Support）、撥打 00800-22-44-6000 或者聯絡 QIAGEN 技術服務部門或當地的經銷商（參閱封底或瀏覽 www.qiagen.com）。

訂購資訊

產品	目錄	目錄編號
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	24 次反應：對照檢測、7 次突變檢測、陽性對照、 <i>Taq</i> DNA 聚合酶、NTC 用水和樣本稀釋用水	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package CD	與 <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit 和 QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 儀器搭配使用的軟體操作程序套裝	9023537
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 次 DNA 製備：QIAamp MinElute® 管柱、蛋白酶 K、緩衝液和收集管 (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 次反應：50 QIAamp MinElute 管柱、蛋白酶 K、緩衝液和收集管 (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx 和配件		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	即時定量 PCR 系統和高解析度融化分析儀，帶有 5 個通道（綠色、黃色、橙色、紅色和深紅色）加 HRM 通道、膝上型電腦、軟體、配件，為期 1 年的零件維修保固以及人工、安裝和培訓	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	即時定量 PCR 系統和高解析度融化分析儀，帶有 5 個通道（綠色、黃色、橙色、紅色和深紅色）加 HRM 通道、膝上型電腦、軟體、配件：包含為期 1 年的零件維修保固，不包括人工、安裝和培訓	9002032
Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes	帶有 72 × 0.1 ml 試管的鋁砧，使用單通道吸量管進行人工反應設定	9018901

產品	目錄	目錄編號
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 個 4 連排管，以及用於 1000 次反應的蓋	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 × 250 個 4 連排管，以及用於 10,000 次反應的蓋	981106

欲瞭解最新的許可資訊和產品特定的免責聲明，請參閱各 QIAGEN 試劑組手冊或使用者手冊。QIAGEN 試劑組手冊和使用者手冊可從 www.qiagen.com 上下載，或者從 QIAGEN 公司技術服務或您當地經銷商處取得。

手冊修訂歷程記錄

文件	變更	日期
HB-1909-002	更新「效能特性」中的 LOD 數值（表 11）。	2015 年 6 月
HB-1909-003	更新分析軟體標幟（表 8）。 更新分析重現性資料（表 12）。 在「效能特性」中新增 IRESSA 的臨床結果資料。	2016 年 8 月
HB-1909-004	更改預備儲存時間以釐清「儲存條件」和表 2 及表 5 中的解凍時間和總時間。 更新圖 40。EGFR 突變檢測的樣本分析工作流程圖。 新增 QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit（目錄編號 60404）的訂購資訊	2018 年 3 月
HB-1909-005	新增授權代表（前面封面）。 更新的「符號」部分。	2019 年 1 月

商標：QIAGEN®、Sample to Insight®、QIAamp®、MinElute®、Rotor-Gene®、Scorpions®、*therascreen*® (QIAGEN 集團)；FAM™、HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.)；GIOTRIF® (Boehringer Ingelheim)、IRESSA® (AstraZeneca 集團)

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 是 CE 認證的診斷試劑組，符合歐洲體外診斷指令 98/79/EC。並非在所有國家或地區均有售。

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 的有限授權合約

使用本產品表示產品的購買者或使用者同意以下條款：

1. 本產品僅可根據產品提供的操作程序和本手冊，與檢驗組中包含的組分搭配使用。不得將本檢驗組隨附的組分與任何未包含在本檢驗組中的組分搭配或整合使用，QIAGEN 未在其智慧財產權下授予任何此等許可，除非在本產品提供的操作程序、本手冊或 www.qiagen.com 上提供的其他操作程序中另有說明。這些其他操作程序有些是由 QIAGEN 使用者為其他使用者提供的。這些操作程序未經 QIAGEN 全面測試或最佳化。QIAGEN 既不擔保也不保證這些操作程序不會侵犯第三方的權利。
2. 除了特別聲明的許可外，QIAGEN 不保證本檢驗組和/或其使用不會侵犯第三方的權利。
3. 本檢驗組及其組分僅供一次使用，不得重複使用、翻新或再銷售。
4. 除了特別聲明的許可外，QIAGEN 明確否認全部明示或暗示的任何其他許可。
5. 本檢驗組的購買者和使用者同意不會採取或允許他人採取可導致或促成以上所禁止行為的任何措施。QIAGEN 可在任何法院申請強制執行此有限許可協定的禁止事項，並應取得在強制執行此有限許可協定，或本試劑組和/或其組分相關的任何智慧財產權的任何行動過程中，所產生的所有調查和訴訟費用，包括律師費。

有關最新的許可條款，請瀏覽 www.qiagen.com。

HB-1909-005 01-2019 © 2019 QIAGEN，保留所有權利。

提示

訂購：www.qiagen.com/shop | 技術支援：support.qiagen.com | 網站：www.qiagen.com