



博铼肺癌基因突变检测 cfDNA 套组 IntelliPlex™ Lung Cancer Panel-cfDNA

REF

82030

RUO

For Research Use Only

仅供科研使用



操作本产品套组前请详阅产品说明书

1. 效能

本产品仅供科研使用，其检测结果非用于疾病诊断与治疗等临床用途。本产品系利用博铼 π Code™ 磁片技术并搭配博铼晶元磁片清洗机与博铼分析仪进行检测，旨在针对提取自非小细胞肺癌(NSCLC)患者血浆中的游离DNA，定性检测分别来自 KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、HER2、MEK1 与 AKT1 之目标基因上一共 74 种 DNA 基因突变。

2. 简介

根据非小细胞肺癌(NSCLC)的研究，已鉴定出了多种致癌基因中反复发生的“驱动”突变，包括 AKT1、ALK、BRAF、EGFR、HER2、KRAS、MEK1、MET、NRAS、PIK3CA、RET 和 ROS1。DNA 基因突变和 RNA 基因重组皆能导致 NSCLC 肿瘤发生，而这些基因标记已作为非小细胞肺癌分子鉴定的基础。目前针对 NSCLC 患者的治疗已有可使用的抑制剂，且持续在开发新药物。因此，能有效评估多种癌基因的突变状态已成为癌症治疗评估中的关键。利用博铼 π Code™ 磁片技术原理，博铼肺癌基因突变检测 cfDNA 套组可侦测 74 个核苷酸突变(表 1)。

表 1. 可检出之基因突变位点

Gene	Exon	Amino Acid Change	Nucleotide change	COSMIC ID
KRAS	Exon 2	p.G12S	c.34G>A (GGT>AGT)	517
		p.G12R	c.34G>C (GGT>CGT)	518
		p.G12C	c.34G>T (GGT>TGT)	516
		p.G12D	c.35G>A (GGT>GAT)	521
		p.G12A	c.35G>C (GGT>GCT)	522
		p.G12V	c.35G>T (GGT>GTT)	520
		p.G13D	c.38G>A (GGC>GAC)	532
		p.G13C	c.37G>T (GGC>TGC)	527
	Exon 3	p.Q61H	c.183A>C (CAA>CAC)	554
		p.Q61H	c.183A>T (CAA>CAT)	555
		p.Q61L	c.182A>T (CAA>CTA)	553
		p.Q61K	c.181C>A (CAA>AAA)	549

Gene	Exon	Amino Acid Change	Nucleotide change	COSMIC ID
		p.Q61R	c.182A>G (CAA>CGA)	552
NRAS	Exon 3	p.Q61K	c.181C>A (CAA>AAA)	580
		p.Q61R	c.182A>G (CAA>CGA)	584
		p.Q61L	c.182A>T (CAA>CTA)	583
		p.Q61H	c.183A>C (CAA>CAC)	586
		p.Q61H	c.183A>T (CAA>CAT)	585
PIK3CA	Exon 9	p.E542K	c.1624G>A	760
		p.E545K	c.1633G>A	763
		p.E545Q	c.1633G>C	27133
	Exon 20	p.H1047R	c.3140A>G	775
		p.H1047L	c.3140A>T	776
BRAF	Exon 15	p.V600E1	c.1799T>A	476
EGFR	Exon 18	p.G719A	c.2156G>C	6239
		p.G719S	c.2155G>A	6252
		p.G719C	c.2155G>T	6253
	Exon 19	p.L747_T751>S	c.2240_2251del12	6210
		p.L747_E749del	c.2239_2247del9	6218
		p.E746_S752>D	c.2238_2255del18	6220
		p.E746_A750del	c.2235_2249del15	6223
		p.E746_A750del	c.2236_2250del15	6225
		p.L747_T751del	c.2239_2253del15	6254
		p.L747_T751del	c.2240_2254del15	12369
		p.L747_T751del	c.2238_2252del15	23571
		p.L747_S752del	c.2239_2256del18	6255
		p.E746_S752>A	c.2237_2254del18	12367
		p.L747_P753>S	c.2240_2257del18	12370
		p.L747_A750>P	c.2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
		p.L747_T751>P	c.2239_2251>C	12383
		p.E746_S752>V	c.2237_2255>T	12384
		p.E746_S752>I	c.2235_2255>AAT	12385
		p.E746_T751>V	c.2237_2252>T	12386
		p.L747_P753>Q	c.2239_2258>CA	12387
		p.L747_S752>Q	c.2239_2256>CAA	12403
		p.E746_T751>VA	c.2237_2253>TTGCT	12416
		p.L747_T751>Q	c.2238_2252>GCA	12419
		p.L747_A750>P	c.2238_2248>GC	12422
		p.E746_T751>A	c.2237_2251del15	12678

Gene	Exon	Amino Acid Change	Nucleotide change	COSMIC ID
		p.E746_T751del	c.2236_2253del18	12728
		p.E746_A750>IP	c.2235_2248>AATTC	13550
		p.E746_T751>I	c.2235_2252>AAT	13551
		p.E746_T751>IP	c.2235_2251>AATTC	13552
		p.S752_I759delSPKANKEI	c.2254_2277del24	6256
		p.S752_I759delSPKANKEI	c.2253_2276del24	13556
		p.E746_P753>VS	c.2237_2257>TCT	18427
		p.K745_E749del	c.2233_2247del15	26038
	Exon 20	p.T790M	c.2369C>T	6240
		p.C797S	c.2389T>A	6493937
		p.C797S	c.2390G>C	5945664
		p.S768I	c.2303G>T	6241
		p.V769_D770insASV	c.2307_2308ins9GCCAGCGTG	12376
		p.H773_V774insH	c.2319_2320insCAC	12377
		p.D770_N771insG	c.2310_2311insGGT	12378
		p.D770_N771insSVD	c.2311_2312ins9GCGTGGACA	13428
		p.V769_D770insASV	c.2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	13558
	Exon 21	p.L858R	c.2573T>G	6224
		p.L858R	c.2573_2574TG>GT	12429
		p.L861Q	c.2582T>A	6213
AKT1	Exon 4	p.E17K	c.49G>A	33765
MEK1	Exon 2	p.Q56P	c.167A>C	1235481
		p.K57N	c.171G>T	1235478
HER2	Exon 20	p.Ala775_Gly776insYVMA	c.2324_2325ins12	20959
		p.Ala775_Gly776insYVMA	c.2325_2326ins12	12558

3. 技术原理

博徕 πCode™ 磁片 (πCode MicroDisc)

博徕 πCode™ 磁片系利用光罩微影建构制程，产生高达 85,000 种不同的图像于环氧树脂微片上以应用于多元检测技术。每个磁片各有不同图像，对应于结合在磁片上的特定目标，各种结合不同目标物的影像磁片汇集后，能够在一次的样本反应中同时检测多种目标。

试验原理

- I. 自血浆检体提取 DNA
- II. 聚合酶链锁反应同步多元扩增特定突变基因
- III. 将 PCR 扩增子产物与已键结特定突变探针的磁片进行杂交反应
- IV. SA-PE 反应进行荧光标记
- V. 以博徕分析仪检测荧光讯号并进行磁片影像译码分析

4. 警语与注意事项

- 仅供科研使用
- 此检测试剂套组仅供专业的实验室人员使用。
- 实验室空间及设备需区分为 PCR 扩增前与 PCR 扩增后专用，且操作流程需为单向以避免污染。
- PCR 扩增前之操作流程需于生物安全柜内进行。
- 切勿使用过期的试剂套组或试剂。
- 反应试剂已经过适当地稀释处理，不建议自行再进行稀释等配制。
- 所有化学、生物原料、以及来自人类来源的原料或检体均需被视为有潜在风险或具感染性，应依照感染性废弃物作适当处置。
- 部分试剂中含有高度稀释浓度的 EDTA 和/或迭氮化钠。请遵循良好实验室规范和通用预防措施指南，以避免任何风险。
- 依照标签或说明书指示储存检测试剂套组及其内容物。
- 不得混用不同批次生产的试剂，或其他来源或其他制造商的试剂或混合使用。
- 遵循地方法规规范处理未使用的试剂、检体和实验操作废弃物
- 请穿戴无粉手套操作实验，并请勿触碰实验操作孔盘底部或画记任何记号，其指纹残留或记号将会影响讯号或影像译码的判读。
- 请遵守一般实验室安全守则：
 - 请勿用口吸量
 - 请穿着手套、实验衣及护目装置
 - 请勿于实验室饮食及吸烟
 - 请于操作检体或试剂后清洁双手
- 实验工作区域及实验相关耗材于使用前皆须彻底清洁 建议先使用 0.5%次氯酸钠漂白水(家用漂白水以 1:10 稀释)擦拭后，再以 70%酒精进行清洁。
- 任何与产品有关的严重事故应回报给制造商和使用者所在地区之主管当局。
- 物质安全数据表可向博徠客服人员索取或经由博徠官网下载

5. 质量控制

博徠肺癌基因突变检测 cfDNA 套组含有一系列内部品管用磁片，可监测检体制备、PCR 扩增、SA-PE 反应程序及背景噪声。这些品管必须符合标准，否则检测无效。此外，整个检测程序也透过外部品管(正对照品及负对照品)进行监控，以防出现伪阳性或伪阴性结果。

6. 试剂套组内容物

博徠肺癌基因突变检测cfDNA套组可提供24次反应数，其试剂内容物详列如下：

(1) cLCP - DNA Reaction Mix (cLCP – DNA反应混合液)

料号: 20484-RC

数量及体积: 1 管, 240 µL/管

描述: 使用于聚合酶链锁反应

成份: 80% 5倍扩增反应缓冲液、氯化镁溶液、dNTPs及活化剂、10% DNA聚合酶 (微生物来源)

(2) cLCP - DNA Primer Mix (cLCP – DNA引物混合液)

料号: 20485-RC

数量及体积: 1 管, 240 µL/管

描述: 使用于聚合酶链锁反应

成份: 21% 前置引子、21% 反置引子 (生物素标记)、25% 锁核苷酸

(3) cLCP - DNA π Code MicroDisc (cLCP – DNA 环氧树脂微片)

料号: 20486-RC

数量及体积: 1 管, 480 μ L/管

描述: 使用于捕捉PCR反应扩增子

成份: 环氧树脂微片、甘油及磷酸盐缓冲液、0.1% 小牛血清白蛋白(生物性来源)、<0.1% 乙二胺四乙酸、<0.1% 迭氮化钠

(4) cLCP - DNA POS Control (cLCP - DNA正对照品)

料号: 20487-RC

数量及体积: 1 管, 120 μ L/管

描述: 试剂套组阳性对照品

成份: 细胞株DNA(微生物来源)、Tris-EDTA缓冲液

(5) NEG Control (负对照品)

料号: 20549-RC

数量及体积: 1 管, 120 μ L/管

描述: 试剂套组阴性对照品

成份: 无核酸酶水

(6) cLCP - DNA Hy Buffer (cLCP – DNA杂交缓冲液)

料号: 20489-RC

数量及体积: 1 瓶, 2.4 mL/瓶

描述: 杂交反应缓冲液

成份: 磷酸钠盐EDTA缓冲液

(7) SA-PE Solution (链霉亲和素-藻红蛋白)

料号: 20302-RC

数量及体积: 1 瓶, 7 mL/瓶

描述: 链霉亲和素-藻红蛋白荧光呈色剂

成份: 磷酸盐缓冲液、0.5% 链霉亲和素-藻红蛋白、1% 小牛血清白蛋白(生物性来源)、<0.1% 迭氮化钠

7. 试验所需材料与仪器设备(套组未提供)

搭配 IntelliPlex 试剂必需使用之材料与仪器:

- 96 孔盘 (Plexbio; 料号: 80025 或 Greiner Bio-one; 料号: 655101)
- 博徠晶元磁片清洗机 (PlexBio; 料号: 80033)
- 博徠分析仪 (PlexBio; 料号: 80000)
- U 型底槽 (PlexBio; 料号: 80023)
- V 型底槽 (PlexBio; 料号: 80024)
- DeXipher 分析软件(RUO 版) (PlexBio; 料号: 80050)
- 博徠 10 倍分析清洗缓冲液(10X Assay Wash Buffer) (PlexBio; 料号: 80220)
- 无核酸酶水; 供博徠 10 倍分析清洗缓冲液(PlexBio; 料号: 80220)稀释使用

试验流程所需之材料:

- 采血管建议使用 Cell-Free DNA BCT®(Streck, 料号: 218961, 218962, 218992) 或 Vactainer® Venous Blood Collection Tube (BD, 料号: 367525)
- 游离 DNA 提取试剂套组 (建议使用 QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (50), Qiagen 料号: 55114; ConcertBio cfDNA Extraction Kit (96), ConcertBio 料号: RC1101-4, or equivalent)
- Qubit™ 荧光定量仪及其搭配定量试剂 (Invitrogen; 任何型号) 或相似品
- 干净的 PCR 扩增管; 建议使用 0.2ml PCR 平盖独立八连排 (Gunster; 料号: MB-P08A)或相似品

- 专用的微量吸量器*
- 滤芯吸量管*
- 抛弃式无粉手套
- 震荡器
- 微量离心机
- Eppendorf® PCR 保冷盒或相似品(非必要)
- 聚合酶链锁反应仪(建议使用 MiniAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems™; 料号: A37834 或相似品)
- 计算机; 建议使用工业计算机 (PlexBio; 料号: 80002) 或相似品

8. 储存、安定性及运送条件

储存

博铼肺癌基因突变检测 cfDNA 套组中所有试剂组成分应储存于 2°C -8°C。

安定性

请勿使用过期的博铼肺癌基因突变检测 cfDNA 套组。所有未开封试剂组成份若遵循标签指示适当储存,其效期可保障至标签所示的有效期限。

运送条件

博铼肺癌基因突变检测 cfDNA 套组的运送温度为 2 至 8°C,若收件时有破裂损坏或缺少内容物等情况,请尽速联系博铼客服人员(service@plexbio.com)。

9. 仪器与软件

仪器

请遵循各仪器产品使用手册操作流程(聚合酶链锁反应仪、博铼晶元磁片清洗机及博铼分析仪)。

试剂 APP 应用程序

本产品套组之检测结果由对应之 APP 应用程序 (LCP-cfDNA_cfrRNA)自动分析产出。此 APP 为后端数据分析软件,作为 DeXipher 软件(博铼分析仪之操作软件)之扩充功能:由 DeXipher 提供读盘时荧光值相关的数据,经 APP 自动分析并于 DeXipher 呈现检测结果报告。此 APP 须于首次操作试验前完成安装,安装流程见下方**试剂套组 APP 安装**,完成安装后 APP 自动与 DeXipher 软件联结,无其他独立操作接口。在进行首次分析前,务必确认试剂 APP 已安装于 DeXipher 软件并完成 ENC 档案汇入。

试剂套组 APP 安装

1. 于博铼官网 www.plexbio.com 下载 LCP-cfDNA_cfrRNA 试剂 APP 应用程序。
2. 开启试剂套组 APP,执行安装档“Installer.exe”,并依循指示安装应用程序。

备注: 试剂套组 APP 仅需于首次操作试验前进行安装,若有版本更新将由客服进行通知。

试剂 ENC 档案安装

1. 于博铼官网 www.plexbio.com 下载 LCP-cfDNA_cfrRNA 试剂 ENC 档案。每一批号试剂都有其对应的 ENC 档案,若购入不同批号之试剂须重新下载新的 ENC 档案。请确认正确选取相对应的试剂批号(Lot no.)之 ENC 档案。
2. 将 ENC 档案储存于计算机。
3. 请依循博铼分析仪说明书操作汇入 ENC 档案。

10. 检体条件

检体采集

博徕肺癌基因突变检测 cfDNA 套组经验证可使用血浆作为检体。为确保整体试验及提取后检体 DNA 质量，建议使用采血管 Streck Cell-Free DNA BCT®(料号: 218961, 218962, 218992) 或 BD Vactainer® Venous Blood Collection Tube(料号: 367525)。不建议使用肝素(Heparin)做为抗凝血物质，以避免影响 PCR 扩增反应的进行。

检体运送与保存

血液检体可置于采血管 Streck Cell-Free DNA BCT®内以室温条件下运送，并且可于室温环境下保存 2 天。

血液检体可置于采血管 BD Vacutainer® Venous Blood Collection Tubes 内以室温条件下运送，或以 4°C 冷藏并于 1 小时内完成提取。

检体提取前处理

自全血(8-9 mL)分离血浆：

将采血管(Streck Cell-Free DNA BCT® 或 BD Vacutainer® Venous Blood Collection Tubes)内之检体，于室温下以转速 1,6000 x g 离心 10 分钟。

将血浆分层(~4 mL)移至离心管(试剂组未提供)中，并以孔径 0.8 µm 的针筒过滤器(试剂组未提供)过滤至另一离心管。完成过滤的血浆可于-80°C 下冷冻保存 6 个月。血浆检体需以干冰冷冻保存运送，寄送到达后应立即置于-80°C 冷冻保存。

提取后 DNA 检体储存

提取后的 DNA 检体若立即使用可储存于-15 至-25°C (≤24 小时) 若要长期储存(>24 小时)请置放于 -80°C 环境中。提取后的 DNA 请避免重复的冷冻/解冻循环。

11. 操作前注意事项

1. 请确认已完成安装试剂 APP 和 ENC 档案于 DeXipher 软件。
2. 检体建议使用 QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit 进行游离 DNA 的提取，请依循提取试剂的指示进行核酸提取流程，并确保有足够 20µL 且提取后游离 DNA 浓度 $\geq 0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 以进行后续检测分析。有关提取操作的详细讯息，请参阅其使用操作手册。

12. 试验流程

警告：操作前请详阅说明书并遵循每一个操作步骤。

12.1 DNA 提取、定量及 PCR 置备

1. 仔细依照 QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit 的操作流程进行游离 DNA 的手动提取，并依指示适当保存提取后的样本。
2. 遵循 Qubit 荧光定量仪及其搭配之试剂(或相似品)之操作步骤进行提取后 DNA 浓度测量，建议提取后游离 DNA 浓度 $\geq 0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。为确保试验顺利执行，每个检体及正对照品/负对照品不需经过样本稀释，各取用 20 µL 的样本以进行 PCR 扩增反应的制备。
3. 将每个检体 DNA 使用前震荡混匀，快速离心后置于冰上备用。
4. 遵循下表配置 PCR 反应液操作，并特别注意避免检体 DNA 操作时交叉污染

PCR 反应液制备

cLCP - DNA反应混合液	10 µL
cLCP - DNA引物混合液	10 µL
检体DNA/正对照品/负对照品	20 µL
总计	40 µL

备注:

- PCR 反应液制备时, 若反应数较多, 则依比例计算所需反应数的总体积, 再分别加入 PCR 反应管, 最后分别加入提取后检体 DNA 或正(负)对照品。建议配制高于所需的总反应体积备用。
- 每一次试验都需包含正对照品与负对照品。

12.2 多元聚合酶链锁反应扩增

1. 将制备好的 PCR 反应管置入聚合酶链锁反应仪, 并设定扩增条件如下:

PCR 扩增反应条件*

Temp. (°C)	Time	Cycles
95	5 min	-
95	20 sec	9
70	20 sec	
60~52*	20 sec	
60	25 sec	
95	20 sec	29
70	20 sec	
55	20 sec	
60	25 sec	
4	Hold	-

***备注:**

- 设定升温速率(Ramp rate): 3°C/sec (ABI MiniAmp™; 料号: A37834)。
- 60~52 温度设定表示每经过一个扩增循环降温一度, 直到温度达 52 °C。

12.3 DNA 杂交及 SA-PE 荧光标记反应

1. 将 10 倍分析清洗缓冲液(10X Assay Wash Buffer)倒入博铼晶元磁片清洗机(IntelliPlex 1000 πCode Processor)提供的分析清洗缓冲液瓶, 并加入 900 毫升的无核酸酶水以稀释至 1 倍分析清洗缓冲液(1X Assay Wash Buffer)备用。

备注: 配制完成的 1 倍分析清洗缓冲液(1X Assay Wash Buffer)最多可存放一周。请注意, 分析清洗缓冲液是否足够反应操作, 使用者可依需求另行添购博铼 10 倍分析清洗缓冲液(料号: 80220)。

博铼晶元磁片清洗机(IntelliPlex 1000 πCode Processor)分析清洗缓冲液耗损体积:

程序	分析清洗缓冲液耗损体积(mL)
初始化检查	50
DNA & RNA 程序 (1 排, 8 个反应为上限)	150
DNA & RNA 程序 (3 排, 24 个反应为上限)	220

2. 加入 20 μL cLCP - DNA πCode MicroDisc 至 96 孔盘: 将 cLCP - DNA πCode MicroDisc (cLCP - DNA 环氧树脂微片)震荡 10 秒混匀后, 快速取出 20 μL 直接加入 96 孔盘反应微孔(well), 以微量吸量管作来回抽吸。(每加 4 个微孔后, 须将其重新震荡混匀, 确保磁片的均匀分布)。
- 备注:** 每管扩增后产物(含样本、正对照品/负对照品) 都需各别的反应微孔, 且应依第 1 排 A1, B1...至 H1, 再至第 2 排 A2, B2...至 H2 的顺序方向使用 96 孔盘。
3. 每个反应微孔加入 100 μL cLCP-DNA Hy Buffer (cLCP - DNA 杂交缓冲液)。
4. 快速离心 PCR 扩增子产物。
5. 将 PCR 扩增后产物放入聚合酶链锁反应仪进行变性解螺旋, 设定程序为 95°C; 7 分钟, 变性后的 PCR 扩增产物, 请快速离心后立即置于冰上 (4°C; 例如使用 Eppendorf® PCR 保冷盒或相似品), 使用前先离心并于一个小时内使用完毕。

备注：于聚合酶链锁反应仪取出变性后 PCR 扩增产物时，请注意上盖高温避免烫伤。

- 每个反应微孔加入 20 μL 变性后 PCR 扩增子产物。
- 以微量吸量管吸取足够的 **SA-PE Solution** (链霉亲和素-藻红蛋白)到 SA-PE 溶液槽(V 型底槽)中，请注意 V 型底槽的基本耗损量为 500 μL ，当反应排数达 6 排以上，基本耗损量则应调整至 800 μL 。操作一排的 **SA-PE Solution** 基本使用体积为 900 μL 。

使用体积计算范例：

假设反应排数共 3 排，所需要的 SA-PE 溶液体积至少为 **400 μL X 3 排 + 500 μL = 1.7mL**
为确保分注管能够吸取足够体积进行分注，建议吸取多于计算体积的反应液至 V 型底槽中。

备注：SA-PE Solution (链霉亲和素-藻红蛋白)添加量对照如下表。

反应排数	SA-PE Solution (链霉亲和素-藻红蛋白)体积(μL)
1	900
2	1300
3	1700
4	2100
5	2500
6	2900
7	3600
8	4000
9	4400
10	4800
11	5200
12	5600

- SA-PE Solution (链霉亲和素-藻红蛋白)需要避光。
 - 切勿重复使用残留于 V 型底槽的 SA-PE Solution 及使用过的 V 型底槽。
- 杂交与清洗程序：此反应使用博隼晶元磁片清洗机当中**分子测定**窗口中的 **DNA & RNA 程序**。请参阅博隼晶元磁片清洗机之使用说明书执行内建试剂反应程序 (首页/ 分子检测/ 选择反应排数/ DNA&RNA/ 确认用户接口显示的反应条件正确/ 开始执行)，反应执行完毕后，微孔盘即可进行译码分析。

备注：

- 博隼晶元磁片清洗机必需定期进行保养维护。
- 切勿于仪器操作中开启仪器前门。
- 本试剂可分次于 4 个样本以运行 6 次含正(负)对照品之检测，至多进行 24 个样本测试。

12.4 影像译码与荧光侦测

- 依照博隼分析仪使用说明书进行影像与荧光信息读取。

备注：

- 博隼分析仪需每个月以校正盘定期进行校正。
 - 请确认已完成安装试剂 APP 和 ENC 档案于 DeXipher 软件。
- 开启 DeXipher 软件执行 Qualitative Assay 检测。
 - 在 DeXipher 软件接口选择待分析的反应微孔，并输入每一微孔的检体信息。
 - 输入欲储存的试验名称("Assay Name")并将反应完成的 96 孔盘如屏幕所示的摆盘方向置入博隼分析仪中进行影像译码与荧光侦测。
 - 检测数据结果将透过 ENC 档案进行分析并产出检测报告。

备注:

- 若同时检测超过 24 个检体，需使用多个同批号的试剂盒进行测试。

13. 结果判读

DeXipher 软件所生成的报告包含对照组与样品的检测结果，外部控制(正对照品及负对照品)的结果必须为“通过”(Pass)，否则失败(Failed)的正对照品及负对照品结果将使整个检测获判无效，而不产生测试样品的结果判读。

若正对照品及负对照品的结果为“通过”，则各测试样品的结果将会列于摘要，并详列于各别分页报告。针对每个测试样品的内部控制(参考基因品管及内部品管、讯号监测品管、磁片数目品管和背景值品管)亦必须全数“通过”，否则该样品的检测结果仍会被判定为无效，且不会显示其检测结果。内部品管与背景值品管失败并不会造成检测结果获判无效，内部品管失败的阳性样品仍会被视为该检测结果有效。目标基因突变的检测结果将会显示于报告中。

表 2. 结果判读对照表

分析结果	报告说明	判读
侦测到突变	参照表 1	检测出目标突变
未侦测到突变	无	未检测出任何突变
结果未显示	因外部品管失败或至少其一内部品管失败导致该试验获判 无效	请参照排解疑难章节的说明及指示

备注:

- 所有测试及验证皆由专用试剂 APP 应用程序搭配博铄晶元磁片清洗机与博铄分析仪进行。
- 「侦测到突变基因」表示至少一个突变位点之信号值高于其相对应的 cutoff 值。

14. 非临床效能评估**空白值侦测极限 (LoB)**

空白值侦测极限 (LoB) 是由不同操作者以不同批次试剂及非指定仪器，针对 405 个血浆检体进行各 1~2 重复测试所得到的结果。检体来源为非肺癌患者之正常人血浆。各突变位点于 LoB 测试所检测到的背景荧光最大值与三个标准偏差值则视为博铄肺癌基因突变检测 cfDNA 套组中各突变点的临界值(cutoff value)。惟“未侦测到基因突变(None)”的结果会被记录至空白值侦测极限的数据当中。

侦测极限 (LoD)

博铄肺癌基因突变检测 cfDNA 套组各 DNA 突变位点之检体(混合质体来源)，混合野生型人类基因组片段并序列稀释(突变稀释浓度范围 0.10 - 5%)。各检体浓度于每批试剂套组分 3 天进行共 21 次重复测试。在 PriProbit 分析下预测到各突变位点 $\geq 95\%$ 阳性命中率最低浓度结果显示于表 3。DNA 侦测极限范围为 0.10 ~2.32%。

表 3. 侦测极限 (LoD)

Gene	Amino Acid Change	Nucleotide Change	LoD (% Mutation)
KRAS	p.G12S	c.34G>A (GGT>AGT)	0.10%
	p.G12R	c.34G>C (GGT>CGT)	0.59%
	p.G12C	c.34G>T (GGT>TGT)	0.28%
	p.G12D	c.35G>A (GGT>GAT)	0.59%
	p.G12A	c.35G>C (GGT>GCT)	0.24%
	p.G12V	c.35G>T (GGT>GTT)	0.24%

	p.G13D	c.38G>A (GGC>GAC)	0.10%
	p.G13C	c.37G>T (GGC>TGC)	0.76%
	p.Q61H	c.183A>C (CAA>CAC)	0.24%
	p.Q61H	c.183A>T (CAA>CAT)	1.49%
	p.Q61L	c.182A>T (CAA>CTA)	1.35%
	p.Q61K	c.181C>A (CAA>AAA)	0.63%
	p.Q61R	c.182A>G (CAA>CGA)	2.32%
NRAS	p.Q61K	c.181C>A (CAA>AAA)	0.29%
	p.Q61R	c.182A>G (CAA>CGA)	0.60%
	p.Q61L	c.182A>T (CAA>CTA)	0.50%
	p.Q61H	c.183A>C (CAA>CAC)	0.57%
	p.Q61H	c.183A>T (CAA>CAT)	1.65%
PIK3CA	p.E542K	c.1624G>A	0.62%
	p.E545K	c.1633G>A	0.73%
	p.E545Q	c.1633G>C	0.23%
	p.H1047R	c.3140A>G	0.47%
	p.H1047L	c.3140A>T	0.25%
BRAF	p.V600E1	c.1799T>A	0.10%
EGFR	p.G719A	c.2156G>C	0.12%
	p.G719S	c.2155G>A	0.24%
	p.G719C	c.2155G>T	0.25%
	p.L747_T751>S	c.2240_2251del12	0.11%
	p.L747_E749del	c.2239_2247del9	0.43%
	p.E746_S752>D	c.2238_2255del18	0.62%
	p.E746_A750del	c.2235_2249del15	0.42%
	p.E746_A750del	c.2236_2250del15	0.64%
	p.L747_T751del	c.2239_2253del15	1.73%
	p.L747_T751del	c.2240_2254del15	1.73%
	p.L747_T751del	c.2238_2252del15	1.73%
	p.L747_S752del	c.2239_2256del18	0.32%
	p.E746_S752>A	c.2237_2254del18	0.61%
	p.L747_P753>S	c.2240_2257del18	0.33%
	p.L747_A750>P	c.2239_2248TTAAGAGAAG>C	0.24%
	p.L747_T751>P	c.2239_2251>C	0.33%
	p.E746_S752>V	c.2237_2255>T	0.25%
	p.E746_S752>I	c.2235_2255>AAT	0.25%
	p.E746_T751>V	c.2237_2252>T	0.56%
	p.L747_P753>Q	c.2239_2258>CA	0.36%
	p.L747_S752>Q	c.2239_2256>CAA	0.12%

	p.E746_T751>VA	c.2237_2253>TTGCT	0.59%
	p.L747_T751>Q	c.2238_2252>GCA	0.33%
	p.L747_A750>P	c.2238_2248>GC	0.50%
	p.E746_T751>A	c.2237_2251del15	0.50%
	p.E746_T751del	c.2236_2253del18	0.32%
	p.E746_A750>IP	c.2235_2248>AATTC	0.24%
	p.E746_T751>I	c.2235_2252>AAT	0.69%
	p.E746_T751>IP	c.2235_2251>AATTC	0.25%
	p.S752_I759delSPKANKEI	c.2254_2277del24	1.19%
	p.S752_I759delSPKANKEI	c.2253_2276del24	1.19%
	p.E746_P753>VS	c.2237_2257>TCT	0.25%
	p.K745_E749del	c.2233_2247del15	0.52%
	p.T790M	c.2369C>T	1.00%
	p.C797S	c.2389T>A	1.45%
	p.C797S	c.2390G>C	1.29%
	p.S768I	c.2303G>T	0.49%
	p.V769_D770insASV	c.2307_2308ins9GCCAGCGTG	1.11%
	p.H773_V774insH	c.2319_2320insCAC	0.39%
	p.D770_N771insG	c.2310_2311insGGT	0.74%
	p.D770_N771insSVD	2311_2312ins9GCGTGGACA	1.11%
	p.V769_D770insASV	2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	1.11%
	p.L858R	c.2573T>G	0.48%
	p.L858R	c.2573_2574TG>GT	0.23%
	p.L861Q	c.2582T>A	0.24%
AKT1	p.E17K	c.49G>A	0.29%
MEK1	p.Q56P	c.167A>C	0.58%
	p.K57N	c.171G>T	0.23%
HER2	p.Ala775_Gly776insYVMA	c.2324_2325ins12	0.30%
	p.Ala775_Gly776insYVMA	c.2325_2326ins12	0.30%

15. 疑难解答

下述疑难排除表列出了检测过程中可能出现的问题与解决方式：

状况	可能原因	解决方式
无法辨识检测项目 (No Valid Assay Assigned)	1. 未放置 96 孔盘 2. 96 孔盘放置方向错误 3. 未安装 APP 应用程序 4. 未汇入 ENC 档案 5. 混用不同批号试剂套组	1. 确认放入 96 孔盘并重新读取 2. 确认放入 96 孔盘方向正确并重新读取 3. 确认正确安装 APP 应用程序并重新读取 4. 确认正确汇入 ENC 档案并重新读取 5. 多个样品同次检测请使用同批号试剂

状况	可能原因	解决方式
正(负)对照品品管失败 (Assay Control(s) Failed)	1. 未添加正对照品/负对照品 2. DNase 污染 3. 试验失败 4. 检测出现交叉污染 5. 正(负)对照品检测孔设置错误	1. 确认依步骤添加正(负)对照品。 2. 确保于不含 DNase 环境正确依循检测操作流程。 3. 确保正确依循所有检测操作流程。 4. 清洁所有仪器设备及空间,并区分为 PCR 扩增前与 PCR 扩增后专用,单向操作流程以避免污染。 5. 正确选取正(负)对照品检测孔并重新读取。
磁片数目失败 (πCode MicroDiscs Count Fail)	DeXipher 软件无法侦测足量磁片进行分析 1. 微孔内磁片未均匀散布 2. 未添加足够磁片于微孔中 3. 分析清洗缓冲液产生微生物污染 4. 仪器设备异常	1. 重新震散孔盘并重新读取 2. 磁片添加前,确保磁片均匀震散并适量取出。 3. 杂交反应时请使用新鲜配制的分析清洗缓冲液及无核酸酶水以降低磁片流失率。 4. 请通知博徠客服人员
SA-PE 监测品管失败 (SA-PE Monitor Control Fail)	SA-PE 溶液效能以 SA-PE 监测品管进行评估 1. 未添加或未使用足量的 SA-PE 溶液 2. SA-PE 溶液失效 3. 博徠晶元磁片清洗机反应排数设定错误	1. 确保正确遵循所有检测程序,计算足够的 SA-PE 溶液体积于溶液槽内。 2. 确保 SA-PE 溶液正确避光储存,请勿使用过期的 SA-PE 溶液。 3. 重新检测并正确选取反应排数。
背景值品管失败 (Blank Control Fail)	背景值品管是不应产生讯号的内部品管 1. 博徠晶元磁片清洗机反应程序设定错误 2. SA-PE 溶液残留于微孔中 3. 博徠分析仪未定期校正 4. 孔盘底部标注记号	1. 确认试剂反应程序设置正确 2. 请准备足量且新鲜配制的清洗液及无核酸酶水进行清洗反应程序 3. 每个月定期校正博徠分析仪 4. 请勿在孔盘底部作任何标记
内部品管失败 (Internal Control Fail)	内部品管用于监控所有操作流程,有效试验必须通过内部品管检测 1. 检体提取失败或 PCR 干扰物残留导致 PCR 抑制反应 2. PCR 操作流程未正确执行 3. DNase 污染 4. 杂交反应失败	1. 正确操作检体提取纯化步骤,确保温度与离心操作条件正确,并避免乙醇残留。 2. 确保正确遵循 PCR 操作流程,并正确储存试剂。请勿使用过期试剂或混用不同批号试剂。 3. 确保于不含 DNase 环境正确依循检测操作流程。 4. 确保正确遵循所有检测程序,且扩增后产物在变性后随即操作下一步骤。
参考基因品管失败 (Reference Gene Control Fail)	参考基因品管用于监控测试检体之质量,有效试验必须通过参考基因品管检测 1. 未添加检测样品或未使用人类来源之 DNA 检体 2. 检体检测总量不足或检体质量不佳 3. 检体提取失败或 PCR 干扰物残留导致 PCR 抑制反应 4. PCR 操作流程未正确执行	1. 确认添加检测样品,并重新操作,若使用人工改造之 DNA 检体将导致无效试验结果。 2. 定量检体浓度并确认检体质量,重新测试后若仍为无效试验,请确认检体采集方式合乎标准。若必须请重新采集检体再进行测试。 3. 正确操作检体提取纯化步骤,确保温度与离心操作条件正确,并避免乙醇残留。 4. 确保正确遵循 PCR 操作流程,并正确储存试剂。请勿使用过期试剂或混用不同批号试剂。

16. 符号

符号	定义	符号	定义
	仅供科研使用		销售料号
	批号		详阅使用说明书
	制造厂		保存期限
	温度限制		制造日期
	内含足够 <n> 次反应试剂		

17. 参考文献

1. <https://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/>
2. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. (2004) EGFR receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. Proc Natl Acad Sci USA. 101(36):13306-11
3. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Co`te JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res. 66(8):3992-5
4. <http://www.uniprot.org/uniprot/P01116>
5. Baynes RD, Gansert J. (2009) KRAS mutational status as a predictor of epidermal growth factor receptor inhibitor efficacy in colorectal cancer. Am J Ther. 16(6):554-61
6. Sakuma, M. (2000) PriProbit, ver. 1.63. Available from James E. Throne USDA-ARS GMPRC, Manhattan, KS (<http://bru.usgmrl.ksu.edu/throne/>)
7. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. (2009) Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. Pathol Res Pract. 2009; 205:858–862.
8. Food and Drug Administration. Class labeling changes to anti-EGFR monoclonal antibodies, cetuximab (Erbix) and panitumumab (Vectibix): KRAS mutations. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucml172905.htm>.
9. Loupakakis F, Ruzzo A, Cremolini C, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. Br J Cancer 2009 Aug 18;101(4):715-21.
10. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptortargeted therapy in metastatic colorectal cancer. J Natl Cancer Inst 2009 Oct 7;101(19):1308-24.

商标、版权和知识产权

本产品以及相关仪器所使用的技术，其相关知识产权为博铄生技股份有限公司所有，包括一个或多个美国专利：(US10302640B2, US10859910B2, EP3307867A1, US10894975B2, US10436778B2, US10436776B2, US9063044B2, US10019815B2)或者美国及其它国家/地区的一个或多个其它专利或待批专利申请。除了购买产品的特定使用权，博铄生技股份有限公司并未授予任何其他许可证或权利。有关产品的更多信息，请联系博铄生技股份有限公司。

 PlexBio™, IntelliPlex™, πCode™, πCode™, DeXipher™, DigiPlex™, 是博铄生技股份有限公司的商标或注册商标。所有其他商标仅用于识别目的，并可能是其各自所有者的商标或注册商标。

©2021 版权所有，博铄生技股份有限公司保留所有权利。