



## 博錄肺癌液態檢體 DNA 檢測試劑

### IntelliPlex™ Lung Cancer Panel-cfDNA



82030-RT



For Research Use Only

僅供科研使用



操作本產品套組前請詳閱產品說明書

#### 1. 效能

本產品僅供科研使用，其檢測結果非用於疾病診斷與治療等臨床用途。本產品係利用博錄影像晶元磁片技術 (πCode™ technology) 並搭配“博錄”微量盤清洗機與“博錄”螢光分析儀進行檢測，旨在針對萃取自非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者血漿中的游離 DNA，定性檢測分別來自 KRAS, NRAS, PIK3CA, BRAF, EGFR, HER2, MEK1 與 AKT1 之目標基因上一共 74 種 DNA 基因突變。

#### 2. 簡介

根據非小細胞肺癌 (NSCLC) 的研究，已鑑定出了多種致癌基因中反覆發生的“驅動”突變，包括 AKT1, ALK, BRAF, EGFR, HER2, KRAS, MEK1, MET, NRAS, PIK3CA, RET 和 ROS1。DNA 基因突變和 RNA 基因重組皆能導致 NSCLC 腫瘤發生，而這些基因標記已作為非小細胞肺癌分子鑑定的基礎。目前針對 NSCLC 患者的治療已有可使用的抑制劑，且持續在開發新藥物。因此，能有效評估多種癌基因的突變狀態已成為癌症治療評估中的關鍵。利用博錄影像晶元磁片 (πCode Technology) 原理，博錄肺癌液態檢體 DNA 檢測試劑可偵測 74 個核苷酸突變 (表 1)。

表 1. 可檢出之基因突變位點

| 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     |
|        |         | p.E746_T751del    | c.2236_2253del18        | 12728     |

| Gene | Exon    | Amino Acid Change      | Nucleotide change         | COSMIC ID |
|------|---------|------------------------|---------------------------|-----------|
|      |         | 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. 技術原理

#### 博錄影像晶元磁片 $\pi$ Code MicroDisc

博錄影像晶元磁片( $\pi$ Code MicroDisc)係利用光罩微影建構製程，產生高達 85,000 種不同的圖像於磁片圓盤上以應用於多元檢測技術。每個影像晶元磁片各有不同圖像，對應於結合在磁片上的特定標的，各種結合不同標的物的影像晶元磁片匯集後，能夠在一次的樣本反應中同時檢測多種標的。

#### 試驗原理

- I. 自血漿檢體萃取 DNA
- II. 聚合酶鏈鎖反應同步多元擴增特定突變基因
- III. 將 PCR 擴增子產物與已鍵結特定突變探針的晶元磁片進行雜交反應
- IV. SA-PE 反應進行螢光標記
- V. 以“博錄”螢光分析儀檢測螢光訊號並進行磁片影像解碼分析

### 4. 警語與注意事項

- 僅供科研使用

- 此檢測試劑套組僅供專業的實驗室人員使用。
- 實驗室空間及設備需區分為 PCR 擴增前與 PCR 擴增後專用，且操作流程需為單向以避免汙染。
- PCR 擴增前之操作流程需於生物安全櫃內進行。
- 切勿使用過期的試劑套組或試劑。
- 反應試劑已經過適當地稀釋處理，不建議自行再進行稀釋等配製。
- 所有化學、生物原料、以及來自人類來源的原料或檢體均需被視為有潛在風險或具感染性，應依照感染性廢棄物作適當處置。
- 部分試劑中含有高度稀釋濃度的 EDTA 和/或疊氮化鈉。請遵循良好實驗室規範和通用預防措施指南，以避免任何風險。
- 依照標籤或說明書指示儲存檢測試劑套組及其內容物。
- 不得混用不同批次生產的試劑，或其他來源或其他製造商的試劑或混合使用。
- 遵循地方法規規範處理未使用的試劑、檢體和實驗操作廢棄物
- 請穿戴無粉手套操作實驗，並請勿觸碰實驗操作孔盤底部或畫記任何記號，其指紋殘留或記號將會影響訊號或影像解碼的判讀。
- 請遵守一般實驗室安全守則：
  - 請勿用口吸量
  - 請穿著手套、實驗衣及護目裝置
  - 請勿於實驗室飲食及吸菸
  - 請於操作檢體或試劑後清潔雙手
- 實驗工作區域及實驗相關耗材於使用前皆須徹底清潔，建議先使用 0.5%次氯酸鈉漂白水(家用漂白水以 1:10 稀釋)擦拭後，再以 70%酒精進行清潔。
- 任何與產品有關的嚴重事故應回報給製造商和使用者所在地區之主管當局。
- 物質安全資料表可向博錄客服人員索取或經由博錄官網下載

## 5. 品質控制

博錄肺癌液態檢體 DNA 檢測試劑含有一系列內部品管用晶元磁片，可監測檢體製備、PCR 擴增、SA-PE 反應程序及背景雜訊。這些品管必須符合標準，否則檢測無效。此外，整個檢測程序也透過外部品管(陽性品管及陰性品管)進行監控，以防出現偽陽性或偽陰性結果。

## 6. 試劑套組內容物

博錄肺癌液態檢體DNA檢測試劑可提供24次反應數，其試劑內容物詳列如下：

### (1) cLCP - DNA Reaction Mix

料號: 20484-R

數量及體積: 1 管, 240 µL/管

描述: 使用於聚合酶鏈鎖反應

成份: 80% 5倍擴增反應緩衝液、氯化鎂溶液、dNTPs及活化劑、10% DNA聚合酶 (微生物來源)

### (2) cLCP - DNA Primer Mix

料號: 20485-R

數量及體積: 1 管, 240 µL/管

描述: 使用於聚合酶鏈鎖反應

成份: 21% 前置引子、21% 反置引子 (生物素標記)、25% 鎖核苷酸

### (3) cLCP - DNA πCode MicroDisc

料號: 20486-R

數量及體積: 1 管, 480 µL/管

描述: 使用於捕捉PCR反應擴增子

成份: 晶元磁片、甘油及磷酸鹽緩衝液、0.1% 小牛血清白蛋白(生物性來源)、<0.1% 乙二胺四乙酸、<0.1% 疊氮化鈉

**(4) cLCP - DNA POS Control**

料號: 20487-R

數量及體積: 1 管, 120 µL/管

描述: 試劑套組陽性對照品

成份: 細胞株DNA (微生物來源)、Tris-EDTA緩衝液

**(5) NEG Control**

料號: 20549-R

數量及體積: 1 管, 120 µL/管

描述: 試劑套組陰性對照品

成份: 無核酸酶水

**(6) cLCP - DNA Hy Buffer**

料號: 20489-R

數量及體積: 1 瓶, 2.4 mL/瓶

描述: 雜交反應緩衝液

成份: 磷酸鈉鹽EDTA緩衝液

**(7) SA-PE Solution**

料號: 20302

數量及體積: 1 瓶, 7 mL/瓶

描述: 鏈霉親和素-藻紅蛋白螢光呈色劑

成份: 磷酸鹽緩衝液、0.5% 鏈霉親和素-藻紅蛋白、1% 小牛血清白蛋白(生物性來源)、<0.1% 疊氮化鈉

**7. 試驗所需材料與儀器設備(套組未提供)**

搭配 IntelliPlex 試劑必需使用之材料與儀器:

- 96 孔盤 (Plexbio; 料號: 80025 或 Greiner Bio-one; 料號: 655101)
- “博鈇”微量盤清洗機(衛部醫器製壹字第 006641 號) (PlexBio; 料號: 80033)
- “博鈇”螢光分析儀(衛部醫器製壹字第 006602 號) (PlexBio; 料號: 80000)
- U 型底槽 (PlexBio; 料號: 80023)
- V 型底槽 (PlexBio; 料號: 80024)
- DeXipher 分析軟體(RUO 版) (PlexBio; 料號: 80050)

試驗流程所需之材料:

- 採血管建議使用 Cell-Free DNA BCT®(Streck, 料號: 218961, 218962, 218992) 或 Vactainer® Venous Blood Collection Tube (BD, 料號: 367525)
- 博鈇自動化核酸萃取儀 IntelliPrep TRIO 240 (PlexBio; 料號: 80042)
- 博鈇自動化游離 DNA 萃取試劑 IntelliPrep TRIO cfDNA Extraction Kit (PlexBio; 料號: 83013)
- (選用)游離 DNA 萃取試劑套組 (建議使用 QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (50), Qiagen 料號: 55114; ConcertBio cfDNA Extraction Kit (96), ConcertBio 料號: RC1101-4, or equivalent)
- (選用) Qubit™ 螢光定量儀及其搭配定量試劑 (Invitrogen; 任何型號) 或相似品
- 乾淨的 PCR 擴增管; 建議使用 0.2ml PCR 平蓋獨立八連排 (Gunster; 料號: MB-P08A)或相似品
- 博鈇 10 倍檢測清洗緩衝液(10X Assay Wash Buffer) (PlexBio; 料號: 80220)
- 無核酸酶水; 供博鈇 10 倍檢測清洗緩衝液(PlexBio; 料號: 80220)稀釋使用
- 專用的微量吸量器\*
- 濾芯吸量管\*
- 拋棄式無粉手套

- 震盪器
- 微量離心機
- Eppendorf® PCR 保冷盒或相似品(非必要)
- 聚合酶鏈鎖反應儀(建議使用 MiniAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems™; 料號: A37834 或相似品)
- 電腦; 建議使用工業電腦 (PlexBio; 料號: 80002) 或相似品

## 8. 儲存、安定性及運送條件

### 儲存

博錄肺癌液態檢體 DNA 檢測試劑組中所有試劑組成分應儲存於 2°C -8°C。

### 安定性

請勿使用過期的博錄肺癌液態檢體 DNA 檢測試劑。所有未開封試劑組成份若遵循標籤指示適當儲存，其效期可保障至標籤所示的有效期限。

### 運送條件

博錄肺癌液態檢體 DNA 檢測試劑的運送溫度為 2 至 8°C，若收件時有破裂損壞或缺少內容物等情況，請盡速聯繫博錄客服人員(service@plexbio.com)。

## 9. 儀器與軟體

### 儀器

請遵循各儀器產品使用手冊操作流程(聚合酶鏈鎖反應儀、“博錄”微量盤清洗機及“博錄”螢光分析儀)。

### 試劑 APP 應用程式

本產品套組之檢測結果由對應之 APP 應用程式 (LCP-cfDNA\_cfrRNA)自動分析產出。此 APP 為後端資料分析軟體，作為 DeXipher 軟體(“博錄”螢光分析儀之操作軟體)之擴充功能：由 DeXipher 提供讀盤時螢光值相關的數據，經 APP 自動分析並於 DeXipher 呈現檢測結果報告。此 APP 須於首次操作試驗前完成安裝，安裝流程見下方**試劑套組 APP 安裝**，完成安裝後 APP 自動與 DeXipher 軟體聯結，無其他獨立操作介面。在進行首次分析前，務必確認試劑 APP 已安裝於 DeXipher 軟體並完成 ENC 檔案匯入。

### 試劑套組 APP 安裝

1. 於博錄官網 [www.plexbio.com](http://www.plexbio.com) 下載 LCP-cfDNA\_cfrRNA 試劑 APP 應用程式。
2. 開啟試劑套組 APP，執行安裝檔“Installer.exe”，並依循指示安裝應用程式。

**備註：**試劑套組 APP 僅需於首次操作試驗前進行安裝，若有版本更新將由客服進行通知。

### 試劑 ENC 檔案安裝

1. 於博錄官網 [www.plexbio.com](http://www.plexbio.com) 下載 LCP-cfDNA\_cfrRNA 試劑 ENC 檔案。每一批號試劑都有其對應的 ENC 檔案，若購入不同批號之試劑必須重新下載新的 ENC 檔案。請確認正確選取相對應的試劑批號(Lot no.)之 ENC 檔案。
2. 將 ENC 檔案儲存於電腦。
3. 請依循“博錄”螢光分析儀說明書操作匯入 ENC 檔案。

## 10. 檢體條件

### 檢體採集

博錄肺癌液態檢體 DNA 檢測試劑經驗證可使用血漿作為檢體。為確保整體試驗及萃取後檢體 DNA 品質，建議使用採血管 Streck Cell-Free DNA BCT®(料號: 218961, 218962, 218992) 或 BD Vactainer® Venous Blood Collection Tube(料號: 367525)。不建議使用肝素(Heparin)做為抗凝血物質，以避免影響 PCR 擴增反應的進行。

## 檢體運送與保存

血液檢體可置於採血管 Streck Cell-Free DNA BCT®內以室溫條件下運送，並且可於室溫環境下保存 2 天。

血液檢體可置於採血管 BD Vacutainer® Venous Blood Collection Tubes 內以室溫條件下運送，或以 4°C 冷藏並於 1 小時內完成萃取。

## 檢體萃取前處理

自全血(8-9 mL)分離血漿：

將採血管(Streck Cell-Free DNA BCT® 或 BD Vacutainer® Venous Blood Collection Tubes)內之檢體，於室溫下以轉速 1,6000 x g 離心 10 分鐘。

將血漿分層(~4 mL)移至離心管(試劑組未提供)中，並以孔徑 0.8 µm 的針筒過濾器(試劑組未提供)過濾至另一離心管。完成過濾的血漿可於-80°C 下冷凍保存 6 個月。血漿檢體需以乾冰冷凍保存運送，寄送到達後應立即置於-80°C 冷凍保存。

## 萃取後 DNA 檢體儲存

萃取後的 DNA 檢體若立即使用可儲存於-15 至-25°C (≤24 小時)，若要長期儲存(>24 小時)請置放於 -80°C 環境中。萃取後的 DNA 請避免重複的冷凍/解凍循環。

## 11. 操作前注意事項

檢體建議使用博錄自動化核酸萃取儀或手動以 QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit 進行游離 DNA 的萃取，請依循儀器或萃取試劑的指示進行核酸提取流程，有關萃取操作的詳細訊息，請參閱其使用操作手冊。

### • 若使用博錄自動化核酸萃取儀 (IntelliPrep TRIO 240)進行萃取：

請遵循第 12.1a 節所述之步驟在博錄自動化核酸萃取儀上自動進行提取、定量和 PCR 預設的操作。在博錄自動化核酸萃取儀純化處理所需的樣品量為 4000 µL，並最後於 100 µL 提取緩衝液中進行洗脫。請注意，提取的 DNA 濃度應在 0.5~1 ng/µL 之間，以確保最佳的檢測性能。

### • 若手動以 QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit 進行萃取：

請依照第 12.1b 節的步驟進行手動 DNA 核酸提取，定量和 PCR 製備，並確保有足夠 20µL 且濃度≥ 0.5 ng/µL 的萃取 DNA 進行後續檢測分析。

## 12. 試驗流程

**警告：**操作前請詳閱說明書並遵循每一個操作步驟。

### 12.1a (自動) 在博錄自動化核酸萃取儀進行DNA 萃取、定量及PCR置備

1. 仔細遵循博錄自動化核酸萃取儀及所搭配的博錄自動化游離 DNA 萃取試劑所指示的操作步驟進行游離 DNA 萃取、定量及 PCR 製備。
2. 當所有自動化程序完成後，取出 PCR 製備盤並接續第 12.2 節進行操作，並將博錄自動化核酸萃取儀上含有核酸提取液的提取管(Elution Tube)進行適當的保存。

### 12.1b (手動) DNA 萃取、定量及 PCR 置備

1. 仔細依照 QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit 的操作流程進行游離 DNA 的手動萃取，並依指示適當保存萃取後的樣本。
2. 遵循 Qubit 螢光定量儀及其搭配之試劑(或相似品)之操作步驟進行萃取後 DNA 濃度測量。
3. 為確保試驗順利執行，建議萃取後有足夠 20µL 且 DNA 濃度≥ 0.5 ng/µL。每個檢體及陽性、陰性對照品各需使用 20 µL 的 DNA 樣本進行 PCR 擴增反應的製備。
4. 將每個檢體 DNA 使用前震盪混勻，快速離心後置於冰上備用。

## 5. 遵循下表配置 PCR 反應液操作，並特別注意避免檢體 DNA 操作時交叉汙染

**PCR 反應液製備**

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| cLCP-DNA Reaction Mix | 10 µL |
| cLCP-DNA Primer Mix   | 10 µL |
| 檢體DNA/陽性對照品/陰性對照品     | 20 µL |
| 總計                    | 40 µL |

**備註：**

- PCR 反應液製備時，若反應數較多，則依比例計算所需反應數的總體積，再分別加入 PCR 反應管，最後分別加入萃取後檢體 DNA 或陽(陰)性對照品。建議配製高於所需的總反應體積備用。
- 每一次試驗都需包含陽性對照品與陰性對照品。

**12.2 多元聚合酶鏈鎖反應擴增**

## 1. 將製備好的 PCR 反應盤(管)置入聚合酶鏈鎖反應儀，並設定擴增條件如下：

**PCR 擴增反應條件\***

| 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   | -      |

**\*備註：**

- 設定升溫速率(Ramp rate): 3°C/sec (ABI MiniAmp™; 料號: A37834)。
- 60~52溫度設定表示每經過一個擴增循環降溫一度，直到溫度達 52 °C。

**12.3 DNA 雜交及 SA-PE 螢光標記反應**

## 1. 將 10 倍檢測清洗緩衝液(10X Assay Wash Buffer)倒入“博錄”微量盤清洗機(IntelliPlex 1000 πCode Processor)提供的檢測清洗緩衝液瓶，並加入 900 毫升的無核酸酶水以稀釋至 1 倍檢測清洗緩衝液(1X Assay Wash Buffer)備用。

**備註：**配製完成的 1 倍檢測清洗緩衝液(1X Assay Wash Buffer)最多可存放一周。請注意，檢測清洗緩衝液是否足夠反應操作，使用者可依需求另行添購博錄 10 倍檢測清洗緩衝液(料號: 80220)。

“博錄”微量盤清洗機(IntelliPlex 1000 πCode Processor)檢測清洗緩衝液耗損體積：

| 程序                               | 檢測清洗緩衝液耗損體積(mL) |
|----------------------------------|-----------------|
| 初始化檢查                            | 50              |
| DNA & RNA 程序<br>(1 排, 8 個反應為上限)  | 150             |
| DNA & RNA 程序<br>(3 排, 24 個反應為上限) | 220             |

2. 加入 20 µL 晶元磁片(πCode)至 96 孔盤：將 cLCP - DNA 晶元磁片震盪 10 秒混勻後，快速取出 20 µL 晶元磁片直接加入 96 孔盤反應微孔(well)，以微量吸量管作來回抽吸。(每加 4 個微孔後，須將晶元磁片重新震盪混勻，確保磁片的均勻分布)。

**備註：**每管擴增後產物(含樣本、陽性/陰性品管) 都需各別的反應微孔，且應依第 1 排 A1, B1...至 H1，再至第 2 排 A2, B2...至 H2 的順序方向使用 96 孔盤。

3. 每個反應微孔加入 100  $\mu$ L cLCP-DNA 雜交緩衝液(cLCP-DNA Hy Buffer)。
4. 快速離心 PCR 擴增子產物。
5. 將 PCR 擴增後產物放入聚合酶鍊鎖反應儀進行變性解螺旋，設定程式為 95°C; 7 分鐘，變性後的 PCR 擴增產物，請快速離心後立即置於冰上 (4°C；例如使用 Eppendorf® PCR 保冷盒或相似品)，使用前先離心並於一個小時內使用完畢。

**備註：**於聚合酶鍊鎖反應儀取出變性後 PCR 擴增產物時，請注意上蓋高溫避免燙傷。

6. 每個反應微孔加入 20  $\mu$ L 變性後 PCR 擴增子產物。
7. 以微量吸量管吸取足夠的 SA-PE 溶液到 SA-PE 溶液槽(V 型底槽)中，請注意 V 型底槽的基本耗損量為 500 $\mu$ L，當反應排數達 6 排以上，基本耗損量則應調整至 800 $\mu$ L。操作一排的 SA-PE 溶液基本使用體積為 900 $\mu$ L。

#### **使用體積計算範例：**

假設反應排數共 3 排，所需要的 SA-PE 溶液體積至少為 **400  $\mu$ L X 3 排 + 500  $\mu$ L = 1.7mL**  
為確保分注管能夠吸取足夠體積進行分注，建議吸取多於計算體積的反應液至 V 型底槽中。

**備註：**SA-PE 溶液添加量對照如下表。

| 反應排數 | SA-PE 溶液體積( $\mu$ L) |
|------|----------------------|
| 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 溶液需要避光
  - 切勿重複使用殘留於 V 型底槽的 SA-PE 溶液及使用過的 V 型底槽。
8. 雜交與清洗程序：此反應使用“博鈺”微量盤清洗機當中分子測定視窗中的 **DNA & RNA 程序**。請參閱“博鈺”微量盤清洗機之使用說明書執行內建試劑反應程序 (首頁/ 分子檢測/ 選擇反應排數/ DNA&RNA/ 確認使用者介面顯示的反應條件正確/ 開始執行)，反應執行完畢後，微孔盤即可進行解碼分析。

#### **備註：**

- “博鈺”微量盤清洗機必需定期進行保養維護。
- 切勿於儀器操作中開啟儀器前門。
- 本試劑可分次用於 4 個樣本以運行 6 次含陽性及陰性品管之檢測，至多進行 24 個樣本測試。

## **12.4 影像解碼與螢光偵測**

1. 依照“博鈺”螢光分析儀使用說明書進行影像與螢光資訊讀取。

#### **備註：**

- “博鈺”螢光分析儀需每個月以校正盤定期進行校正。
- 請確認已完成安裝試劑 APP 和 ENC 檔案於 DeXipher 軟體。

- 開啟 DeXipher 軟體執行 Qualitative Assay 檢測。
- 在 DeXipher 軟體介面選擇待分析的反應微孔，並輸入每一微孔的檢體資訊。
- 輸入欲儲存的試驗名稱("Assay Name")並將反應完成的 96 孔盤如螢幕所示的擺盤方向置入"博銖"螢光分析儀中進行影像解碼與螢光偵測。
- 檢測數據結果將透過 ENC 檔案進行分析並產出檢測報告。

**備註:**

- 若同時檢測超過 24 個檢體，需使用多個同批號的試劑盒進行測試。

**13. 結果判讀**

DeXipher 軟體所生成的報告包含對照組與樣品的檢測結果，外部控制(陽性和陰性對照品)的結果必須為"通過"(Pass)，否則失敗(Failed)的陽性或陰性對照品結果將使整個檢測獲判無效，而不產生測試樣品的結果判讀。

若陽性和陰性對照品的結果為"通過"，則各測試樣品的結果將會列於摘要，並詳列於各別分頁報告。針對每個測試樣品的內部控制(參考基因品管及內部品管、訊號監測品管、晶元磁片數目品管和背景值品管)亦必須全數"通過"，否則該樣品的檢測結果仍會被判定為無效，且不會顯示其檢測結果。內部品管與背景值品管失敗並不會造成檢測結果獲判無效，內部品管失敗的陽性樣品仍會被視為該檢則結果有效。目標基因突變的檢測結果將會顯示於報告中。

**表 2. 結果判讀對照表**

| 分析結果   | 報告說明                        | 判讀              |
|--------|-----------------------------|-----------------|
| 偵測到突變  | 參照表 1                       | 檢測出目標突變         |
| 未偵測到突變 | 無                           | 未檢測出任何突變        |
| 結果未顯示  | 因外部品管失敗或至少其一內部品管失敗導致該試驗獲判無效 | 請參照排解疑難章節的說明及指示 |

**備註:**

- 所有測試及驗證皆由專用試劑 APP 應用程式搭配"博銖"微量盤清洗機與"博銖"螢光分析儀進行。
- 「偵測到突變基因」表示至少一個突變位點之信號值高於其相對應的 cutoff 值。

**14. 非臨床效能評估****空白值偵測極限 (LoB)**

空白值偵測極限 (LoB) 是在 3 天試驗測試中，分別由兩位操作者使用兩批試劑、兩套儀器針對 120 個血漿檢體進行各 2 重複測試所得到的結果。檢體來源為非肺癌患者之血漿。各突變位點於 LoB 測試所檢測到的背景螢光最大值與三個標準差值則視為博銖肺癌檢測試劑中各突變點的臨界值(cutoff value)。惟"未偵測到基因突變(None)"的結果會被記錄至空白值偵測極限的數據當中。

**偵測極限 (LoD)**

博銖肺癌液態檢體 DNA 檢測試劑各 DNA 突變位點之檢體(混合質體來源)，混合野生型人類基因組片段並序列稀釋(突變稀釋濃度範圍 0.10 - 5%)。各檢體濃度於每批試劑套組分 3 天進行共 21 次重複測試。在 PriProbit 分析下預測到各突變位點≥95%陽性命中率最低濃度結果顯示於表 3。DNA 偵測極限範圍為 0.10 ~2.32%。

**表 3. 偵測極限 (LoD)**

| Gene | Amino Acid Change | Nucleotide Change | LoD (% Mutation) |
|------|-------------------|-------------------|------------------|
| KRAS | p.G12S            | c.34G>A (GGT>AGT) | 0.10%            |

| Gene   | Amino Acid Change | Nucleotide Change  | LoD (% Mutation) |
|--------|-------------------|--------------------|------------------|
|        | 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%            |

| Gene | Amino Acid Change      | Nucleotide Change        | LoD (% Mutation) |
|------|------------------------|--------------------------|------------------|
|      | 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_2312ins9GCGTGGA     | 1.11%            |
|      | p.V769_D770insASV      | 2309_2310AC>CCAGCGTGAT   | 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. 疑難排解

下述疑難排除表列出了檢測過程中可能出現的問題與解決方式：

| 狀況                                              | 可能原因                                                                                                                                          | 解決方式                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 無法辨識檢測項目<br>(No Valid Assay Assigned)           | 1. 未放置 96 孔盤<br>2. 96 孔盤放置方向錯誤<br>3. 未安裝 APP 應用程式<br>4. 未匯入 ENC 檔案<br>5. 混用不同批號試劑套組                                                           | 1. 確認放入 96 孔盤並重新讀取<br>2. 確認放入 96 孔盤方向正確並重新讀取<br>3. 確認正確安裝 APP 應用程式並重新讀取<br>4. 確認正確匯入 ENC 檔案並重新讀取<br>5. 多個樣品同次檢測請使用同批號試劑                                                                                |
| 陽性品管或陰性品管失敗<br>(Assay Control(s) Failed)        | 1. 未添加陽性/陰性品管或陽性/內部品管未正確回溶<br>2. DNase 汙染<br>3. 試驗失敗<br>4. 檢測出現交叉污染<br>5. 陽性/陰性品管檢測孔設置錯誤                                                      | 1. 確認陽性品管正確回溶，並不重覆冷凍解凍使用。確認依步驟添加陽性/陰性品管。<br>2. 確保於不含 DNase 環境正確依循檢測操作流程。<br>3. 確保正確依循所有檢測操作流程。<br>4. 清潔所有儀器設備及空間，並區分為 PCR 擴增前與 PCR 擴增後專用，單向操作流程以避免汙染。<br>5. 正確選取陽性/陰性品管檢測孔並重新讀取。                       |
| 晶元磁片數目失敗<br>( $\pi$ Code MicroDiscs Count Fail) | DeXipher 軟體無法偵測足量晶元磁片進行分析<br>1. 微孔內晶元磁片未均勻散佈<br>2. 未添加足夠晶元磁片於微孔中<br>3. 檢測清洗緩衝液產生微生物汙染<br>4. 儀器設備異常                                            | 1. 重新震散孔盤並重新讀取<br>2. 晶元磁片添加前，確保晶元磁片均勻震散並適量取出。<br>3. 雜交反應時請使用新鮮配製的檢測清洗緩衝液及無核酸酶水以降低晶元磁片流失率。<br>4. 請通知博錄客服人員                                                                                              |
| SA-PE 監測品管失敗<br>(SA-PE Monitor Control Fail)    | SA-PE 溶液效能以 SA-PE 監測品管進行評估<br>1. 未添加或未使用足量的 SA-PE 溶液<br>2. SA-PE 溶液失效<br>3. “博錄”微量盤清洗機反應排數設定錯誤                                                | 1. 確保正確遵循所有檢測程序，計算足夠的 SA-PE 溶液體積於溶液槽內。<br>2. 確保 SA-PE 溶液正確避光儲存，請勿使用過期的 SA-PE 溶液。<br>3. 重新檢測並正確選取反應排數。                                                                                                  |
| 背景值品管失敗<br>(Blank Control Fail)                 | 背景值品管是不應產生訊號的內部品管<br>1. “博錄”微量盤清洗機反應程序設定錯誤<br>2. SA-PE 溶液殘留於微孔中<br>3. “博錄”螢光分析儀未定期校正<br>4. 孔盤底部標註記號                                           | 1. 確認試劑反應程序設置正確<br>2. 請準備足量且新鮮配製的清洗液及無核酸酶水進行清洗反應程序<br>3. 每個月定期校正“博錄”螢光分析儀<br>4. 請勿在孔盤底部作任何標記                                                                                                           |
| 內部品管失敗<br>(Internal Control Fail)               | 內部品管用於監控所有操作流程，有效試驗必須通過內部品管檢測<br>1. 檢體萃取失敗或 PCR 干擾物殘留導致 PCR 抑制反應<br>2. PCR 操作流程未正確執行<br>3. DNase 汙染<br>4. 雜交反應失敗                              | 1. 正確操作檢體萃取純化步驟，確保溫度與離心操作條件正確，並避免乙醇殘留。<br>2. 確保正確遵循 PCR 操作流程，並正確儲存試劑。請勿使用過期試劑或混用不同批號試劑。<br>3. 確保於不含 DNase 環境正確依循檢測操作流程。<br>4. 確保正確遵循所有檢測程序，且擴增後產物在變性後隨即操作下一步驟。                                         |
| 參考基因品管失敗<br>(Reference Gene Control Fail)       | 參考基因品管用於監控測試檢體之品質，有效試驗必須通過參考基因品管檢測<br>1. 未添加檢測樣品或未使用人類來源之 DNA 檢體<br>2. 檢體檢測總量不足或檢體品質不佳<br>3. 檢體萃取失敗或 PCR 干擾物殘留導致 PCR 抑制反應<br>4. PCR 操作流程未正確執行 | 1. 確認添加檢測樣品，並重新操作，若使用人工改造之 DNA 檢體將導致無效試驗結果。<br>2. 定量檢體濃度並確認檢體品質，重新測試後若仍為無效試驗，請確認檢體採集方式合乎標準。若必須請重新採集檢體再進行測試。<br>3. 正確操作檢體萃取純化步驟，確保溫度與離心操作條件正確，並避免乙醇殘留。<br>4. 確保正確遵循 PCR 操作流程，並正確儲存試劑。請勿使用過期試劑或混用不同批號試劑。 |

## 16. 符號

| 符號                                                                                | 定義             | 符號                                                                                | 定義      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|
|  | 僅供科研使用         |  | 銷售料號    |
|  | 批號             |  | 詳閱使用說明書 |
|  | 製造廠            |  | 保存期限    |
|  | 溫度限制           |  | 注意      |
|  | 內含足夠 <n> 次反應試劑 |  | 製造日期    |

## 17. 參考文獻

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. Lie`vre 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. Loupakis 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.

**商標、版權和知識產權**

本產品以及相關儀器所使用的技術，其相關知識產權為博銖生技股份有限公司所有，包括但不限於一個或多個，美國與其它國家/地區之專利(US10302640B2, US10859910B2, EP3307867A1, US10436778B2, US10436776B2, US10019815B2, US9063044B2, US10894975B2)及申請中專利。除了購買產品的特定使用權，博銖生技股份有限公司並未授予任何其它許可證或權利。有關產品更多信息，請聯繫博銖生技股份有限公司。

 PlexBio®, PlexBio®, IntelliPlex®, IntelliPrep™, πCode®, πCodo™, DeXipher™, DigiPlex® 是博銖生技股份有限公司的使用商標或註冊商標，所有其它品牌及產品名稱則為其各自所有者之商標。

©2023 版權所有，博銖生技股份有限公司保留所有權利。

**醫療器材商名稱：**博銖生技股份有限公司

**醫療器材商地址：**臺北市內湖區陽光街 351 號 5 樓之 1、6 樓之 1、6 樓之 2、7 樓之 5

**醫療器材製造廠名稱：**博銖生技股份有限公司

**醫療器材製造廠地址：**臺北市內湖區陽光街 351 號 6 樓之 1、之 2

**規格：**82030-RT