

受理号：CSZ1700127

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人类 10 基因突变联合检测试剂盒
(可逆末端终止测序法)

产品管理类别：三类 6840

申请人名称：厦门艾德生物医药科技股份有限公司

国家食品药品监督管理总局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息	3
一、 申请人名称	3
二、 申请人住所	3
三、 生产地址	3
产品审评摘要	4
一、 产品概述	4
二、 临床前研究摘要	7
三、 临床评价摘要	15
四、 收益-风险评估	24
综合评价意见	28

基本信息

一、申请人名称

厦门艾德生物医药科技股份有限公司

二、申请人住所

厦门市海沧区鼎山路 39 号

三、生产地址

厦门市海沧区鼎山路 39 号

产品审评摘要

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

表 1 试剂盒主要组成成分

编号	试剂盒组成	数量
1	LC-末端修复缓冲液	105 μL ×1 管
2	LC-末端修复酶	45 μL ×1 管
3	LC-连接缓冲液	450 μL ×1 管
4	LC-连接增强子	15 μL ×1 管
5	LC-接头	28 μL ×1 管
6	LC-扩增反应缓冲液①	750 μL ×1 管
7	LC-D5 引物*	6 μL ×8 管
8	LC-D7 引物*	4 μL ×12 管
9	LC-封闭剂	70 μL ×1 管
10	LC-捕获探针	50 μL ×1 管
11	LC-杂交缓冲液	100 μL ×1 管
12	LC-磁珠洗涤缓冲液	500 μL ×1 管
13	5×洗涤缓冲液①	880 μL ×1 管
14	5×洗涤缓冲液②	660 μL ×1 管
15	5×洗涤缓冲液③	440 μL ×1 管
16	5×洗涤缓冲液④	440 μL ×1 管
17	LC-扩增反应缓冲液②	290 μL ×1 管
18	LC-聚合酶	15 μL ×1 管
19	LC-阳性对照品 (突变类型为 EGFR-T790M、EGFR-L858R、KRAS-G12V 及 GOPC(E8)-ROS1(E35))	100 μL ×1 管
20	LC-阴性对照品 (试剂盒检测范围内基因变异阴性)	100 μL ×1 管

试剂盒具体组成成分、配套试剂及软件见说明书。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）、结直肠癌（CRC）患者经中性福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）的组织样本中EGFR/ALK/ROS1/RET/KRAS/NRAS/PIK3CA/BRAF/HER2/MET基因变异。其中，针对NSCLC，EGFR基因中：19号外显子缺失（19del）、L858R点突变用于吉非替尼片的伴随诊断检测，T790M点突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测；ALK基因重排（融合）和ROS1基因重排（融合）用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测；针对CRC，KRAS基因野生型用于西妥昔单抗注射液的伴随诊断检测；如表2所示。

表2 伴随诊断用途的基因变异类型及相应的靶向药物

药物	基因及变异类型	癌种
吉非替尼片	EGFR: 19del、L858R	非小细胞肺癌
甲磺酸奥希替尼片	EGFR: T790M	
克唑替尼胶囊	ALK 重排（融合）	
	ROS1 重排（融合）	
西妥昔单抗注射液	KRAS 野生型	结直肠癌

表3中为本试剂盒可以检出，但未经伴随诊断验证的基因变异类型。

表3 未经伴随诊断用途验证的基因变异类型

基因名称	变异类型	癌种
EGFR	G719A、G719S、G719C、S768I、D770_N771insG、L861Q	非小细胞肺癌
RET	KIF5B exon 15; RET exon 12	
HER2	A775_G776insYVMA	
MET	Intron14 c.3082+1G>T	
KRAS	G12D、G12A、G12V、G12S、G12C、Q61H	

BRAF	V600E	非小细胞肺癌 结直肠癌
NRAS	G12D、Q61R、Q61K	
PIK3CA	H1047R	

其检测结果仅供临床参考，不应作为患者个体化治疗的唯一依据。临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

（三）产品包装规格

24测试/盒

（四）产品检验原理

本试剂盒通过构建样本DNA测序文库，并使用特异探针对文库进行目标区域捕获富集，捕获后的文库通过高通量测序，可实现多个基因多个突变的一次性检测。

首先，以FFPE样本提取的DNA为材料，进行DNA片段化处理，并使用磁珠对DNA进行片段选择，然后对所得片段进行末端修复和加A处理，使用DNA连接酶将接头连接到DNA模板的两端，再使用带有标签序列（Index）的引物和聚合酶进行PCR扩增得到扩增文库；扩增文库与带有生物素标记的寡核苷酸探针进行液相杂交，并用链霉素包被的磁珠对与探针结合的文库进行捕获富集，最后经过PCR扩增得到捕获文库。捕获文库采用基因测序仪（型号：NextSeq CN500，杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司生产，注册证号：国械注准20153400460）进行高

通量测序。对于测序数据，采用生物信息学软件判读10种基因中是否存在来自肿瘤的变异。

二、临床前研究摘要

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

该试剂盒主要原材料包括：捕获探针、末端修复酶、连接酶、DNA聚合酶、对照品等，这些原材料均为外购方式获得，捕获探针为申请人自行设计后由专业的合成公司合成。申请人选择有资质的供应商提供的原料，通过功能性试验，筛选出最佳原材料和供应商。制定了各主要原材料质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和质控品设置情况

企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品和重复性(精密度)参考品。其中：

阳性参考品共18份，包括该产品可检出的所有突变或融合类型，均为DNA样本。其中8份来自临床样本，5份来自混合的细胞系参考品（由自行购买的不同突变或融合类型的15个细胞系参考品混合而成），5份来自混合人工合成DNA的人类细胞系参考品（一共含18个不同突变或融合类型）。所有参考品均用

Sanger测序法和数字PCR方法验证。

阴性参考品共8份，包括1份大肠杆菌样本，7份试剂检测范围内基因变异阴性的临床样本。所有样本均用Sanger测序法和数字PCR方法验证为相关突变阴性。

检测限参考品共10份，包括该产品可检出的所有突变或融合类型。其中5份由混合阳性细胞系和试剂检测范围内基因变异阴性的细胞系DNA稀释获得，5份由人工合成DNA和试剂检测范围内基因变异阴性的细胞系样本DNA稀释获得。10份检测限参考品稀释后的突变类型和重排（融合）类型变异比例为1%。

重复性参考品总共15份，包括该产品可检出的所有突变或融合类型。其中7份由混合阳性细胞系和试剂检测范围内基因变异阴性的细胞系DNA稀释获得，7份由人工合成DNA和试剂检测范围内基因变异阴性的细胞系样本DNA稀释获得，1份为试剂检测范围内基因变异阴性的细胞系样本DNA。12份弱阳性参考品突变比例为1~5%，2份强阳性参考品突变比例为15%，另采用试剂检测范围内基因变异阴性的细胞系制成1份阴性参考品。

该产品的对照品来源于细胞系样本的DNA，其中阳性对照品包含EGFR/KRAS基因突变阳性和ROS1基因融合，阴性对照品为试剂检测范围内10种基因变异阴性，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳生产工艺。

申请人通过使用初步确定的配方进行反应体系配制，对反应体系中的样本核酸提取试剂、末端修复试剂用量、连接试剂用量、接头用量、LC-D7/D5引物用量、杂交文库混合数量、杂交捕获文库用量、封闭剂用量、捕获探针用量、杂交液用量、磁珠用量、杂交时间、扩增反应条件等进行筛选和优化，通过功能性试验，最终确定了最佳的反应体系。

(三) 分析性能评估

分析性能评估内容包括阴/阳性参考品符合率、最低检出限、分析特异性和干扰物质、重复性、肿瘤组织样本要求研究、核酸提取纯化配套试剂组合性能研究等。

在阴/阳性参考品符合率试验中，申请人采用18份阳性参考品和8份阴性参考品对3批成品试剂盒（P215071301Z、P215071501Z、P215071701Z）进行了检测验证，检测结果均为预期的突变型，说明阳性参考品符合率和阴性参考品符合率均为100%。同时选取21个阳性临床样本在3批成品试剂盒（06018010501Z、06018032901Z、06018052101Z）上分别进行检测，结果均能正确检出。

在最低检出限试验中，申请人采用10份检测限参考品对3批成品试剂盒（P215071301Z、P215071501Z、P215071701Z）进行了检测验证，结果均能正确检出。同时选取4份经过数字PCR定量的阳性临床样本（EGFR/ALK/HER2基因变异阳性，含有点突变、插入缺失突变和基因重排），用基因变异阴性的临床样本配制8级突变频率梯度共32个样本，每个样本分别在3种建库起始量（10 ng、30 ng和50 ng）下进行了6次重复检测，确定了样本的检测限为可检测30ng DNA中频率低至1%的突变（含有点突变、插入缺失突变和基因重排）。

取15份经过数字PCR定量的阳性临床样本（EGFR/ALK/ROS1/HER2/RET/KRAS/NRAS/PIK3CA/BRAF基因变异阳性，含有点突变、插入缺失突变和基因重排），用试剂检测范围内基因变异阴性的临床样本配制成1%变异频率，在30ng建库起始量下，用3批成品试剂盒（06018010501Z、06018032901Z、06018052101Z）对各样本进行了20次重复检测验证，最终确定该产品不低于95%检出率时，可检测30ng DNA中频率低至1%的突变（含有点突变、插入缺失突变和基因重排）。

在分析特异性试验中，申请人采用试剂盒检测范围内的基因变异阴性的临床样本DNA，进行不同建库起始量的检测，检

测结果均为阴性，说明产品对不同起始量的阴性临床样本DNA具有良好的耐受性。对于试剂盒检测范围内的基因变异阳性参考品，本试剂盒检测结果均为相应型别阳性，没有错检或漏检，说明本试剂盒能准确检测目标区域的碱基突变状态，检测的变异类型间不存在交叉反应。本试剂盒能对非人类基因组（大肠杆菌和肺炎链球菌）DNA进行正常建库，但不能对目标区域序列进行捕获富集，说明本试剂盒与非人类基因组DNA无交叉反应。

在干扰物质试验中，申请人在阳性临床样本和阴性临床样本中分别加入如下干扰物质：坏死组织（等体积）、乙醇（21.7 mmol/L）、二甲苯（35 mmol/L）、蛋白酶K（0.08 mg/mL）然后进行检测，样本检测结果均与预期一致，说明这些干扰物质在不高于上述浓度的情况下不会对该产品的结果产生影响。

在重复性试验中，申请人采用重复性参考品15份在3批成品试剂盒（P215071301Z、P215071501Z、P215071701Z）上分别完成20次重复检测，检测结果一致。同时选取了21份临床样本，在3批成品试剂盒（06018010501Z、06018032901Z、06018052101Z）上分别完成20次重复检测，检测结果一致。

针对核酸提取纯化步骤，申请人采用临床样本，平行比较了2种核酸提取试剂盒的提取效果，根据与该产品的组合性能研

究结果，确定了1种核酸提取试剂作为样本提取的推荐试剂盒。

在肿瘤组织细胞含量研究中，申请人对不同肿瘤细胞占比对检测结果的影响进行了研究。结果表明，肿瘤细胞占比5%以上的组织样本均可检出。结合临床样本的多样性和复杂性，建议组织样本肿瘤细胞占比 $\geq 20\%$ 。

申请人提供了3批产品（06216070401X，06216071101X，06216071801X）在其适用机型上的性能评估资料，结果均符合要求。

（四）阳性判断值

申请人首先采用少量临床样本进行了初步确定，然后采用不同基因不同变异类型的阳性临床样本进行阳性判断值验证，最终确定了阳性判断值标准。

申请人共采用了38个样本（16个商业化参考品及22个临床样本；包含了点突变、插入/缺失和融合三种类型）进行检测，分别统计其检出情况。通过ROC曲线方式确认采用突变频率0.4%可以有效检出突变。并对样本原始数据分别随机抽取测序深度为 $15000\times$ 、 $10000\times$ 、 $7500\times$ 、 $5000\times$ ，确定样品测序平均原始深度要求为 $10000\times$ ，并确定了位点有效深度的最低要求为 $500\times$ ，突变绝对拷贝数应不低于2，选择链平衡性0.1~0.9作为阳性判断值的要求（融合不适用）。

阳性判断值验证：采用10份阴性、10份灵敏度参考品、以及经数字PCR验证并稀释至1%的15例FFPE样本（包含不同基因不同区段的变异类型），分别测试阳性符合率、阴性符合率，结果表明，阳性符合率、阴性符合率都100%吻合，总体验证结果符合要求。

通过上述实验，最终确定该产品使用配套软件进行数据分析时的阳性判断值为：

- 1.突变比例不低于0.4%；
- 2.测序有效深度不低于500×；
- 3.突变绝对拷贝数不低于2；
- 4.链平衡性介于0.1~0.9之间（融合不适用）。

（五）稳定性研究

申请人对该产品实时稳定性、运输稳定性、冻融稳定性、开瓶稳定性进行了研究，确定了在各种条件下本产品的有效保存时间。同时对石蜡样本稳定性、核酸（DNA）溶液稳定性、文库稳定性等进行了研究，确定了检测过程中各种样本类型的有效保存时间。

实时稳定性研究：采用三批次试剂盒（P215090202Z、P215090603Z、P215100801Z）储存于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，分别在0、3月、6月和8月对物理性能、准确度、特异性、检测限和精密度

进行考察。结果显示，各项性能指标均符合要求，确定产品在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，可稳定保存6个月。

运输稳定性研究：采用三批试剂盒（P215090202Z、P215090603Z、P215100801Z）按运输要求完成运输试验，然后按要求储存至效期末，在运输前/后、储存至效期末时分别对物理性能、准确度、特异性、检测限和精密度进行考察。结果显示，各项性能指标均符合要求，确定了该产品的运输条件。

冻融稳定性研究：采用三批次试剂盒（P215090202Z、P215090603Z、P215100801Z）反复冻融10次，分别在反复冻融第5次和10次后对物理性能、准确度、特异性、检测限和精密度进行考察。结果显示，各项性能指标均符合要求。考虑到临床实际运用，为保证检测结果的准确性，建议冻融次数不超过5次。

开瓶稳定性研究：采用三批次试剂盒（P215090202Z、P215090603Z、P215100801Z）解冻后，拆开包装，将末端修复缓冲液、末端修复酶、连接缓冲液、连接增强子、接头、扩增反应缓冲液、LC-D5引物、LC-D7引物、封闭剂、捕获探针、杂交缓冲液、磁珠洗涤缓冲液、 $5\times$ 洗涤缓冲液、聚合酶、对照品等各组份震荡混匀、瞬时离心，在超净工作台中依次开盖后再盖紧，放置5分钟后置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 存储（模拟使用过程），分别在第3和6个月对物理性能、准确度、特异性、检测限和精密度

进行考察。结果显示，开瓶后的试剂盒在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存6个月，各项性能指标均满足要求。

申请人对石蜡包埋样本稳定性、核酸（DNA）样本冻融稳定性也进行了研究。研究确认石蜡组织样本保存期限不超过18个月；核酸（DNA）样本置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存期限可达到8个月。

三、临床评价摘要

临床试验在6家临床机构共同开展，共计完成有效样本2105例，包含1586例非小细胞肺癌样本（包括腺癌、鳞癌、腺鳞癌和大细胞癌等）、499例结直肠癌（包含左半结肠、右半结肠和直肠等）和20例干扰样本，样本类型为石蜡包埋组织。主要分为以下几部分：

（一）比较研究

申请人在福建医科大学附属协和医院、第四军医大学附属唐都医院、福建省立医院、首都医科大学附属北京胸科医院共4家临床机构完成了临床试验。采用考核试剂与组织检测的金标准Sanger测序法对临床样本进行比较研究，验证本产品的临床性能。入组样本为非小细胞肺癌样本1248例、结直肠癌样本295例和干扰样本20例，共计1563例有效样本。样本类型均为石蜡包埋组织。考核试剂与对比试剂检测结果不一致的样本采用

PCR方法进行验证。

本临床试验在1248例肺癌样本中共检出863例突变阳性样本，阳性率为69.15%。包括EGFR基因中335例L858R突变阳性、270例Exon19 deletion突变阳性、12例T790M突变阳性、14例L861Q突变阳性、6例S768I突变阳性、8例G719A突变阳性、9例G719S突变阳性；KRAS基因中33例G12D突变阳性、33例G12C突变阳性、29例G12V突变阳性、7例G12A突变阳性、4例G12S突变阳性、2例Q61H突变阳性；NRAS基因中G12D和Q61K突变阳性各1例；BRAF基因中13例V600E突变阳性；PIK3CA基因中17例H1047R突变阳性；MET基因中检出申报类型和非申报类型共20例MET Exon14 skipping阳性突变；HER2基因中24例A775_G776insYVMA突变阳性；ALK基因中检出申报类型和非申报类型共85例ALK基因重排（融合）阳性；ROS1基因中检出申报类型和非申报类型共13例ROS1基因重排（融合）阳性；RET基因中检出申报类型和非申报类型17例RET基因重排（融合）阳性。

与对比方法的研究结果显示，考核试剂的定性检测结果阳性符合率为98.99%（95%CI 98.02% ~ 99.56%），阴性符合率为82.49%（95%CI 78.69% ~ 85.87%），总符合率为92.95%（95%CI 91.38% ~ 94.31%）。进行Kappa一致性检验，Kappa值=0.8429，P

< 0.001, 显示二者具有良好的检测一致性。

在1248例肺癌样本中, 两种方法检测结果不一致或不完全一致共有109例。109例样本的第三方验证结果中, 有92例与考核试剂检测结果一致, 有14例与对照方法检测结果一致, 2例(双突变样本)与双方检测结果均不一致, 1例因特殊情况未进行验证。

本临床试验在295例结直肠癌样本中共检出111例突变阳性样本, 阳性率为37.63%。包括KRAS基因中45例G12D突变阳性、10例G12C突变阳性、17例G12V突变阳性、3例G12A突变阳性、3例G12S突变阳性; NRAS基因中8例G12D突变阳性、3例Q61K突变阳性、2例Q61R突变阳性; BRAF基因中13例V600E突变阳性; PIK3CA基因中9例H1047R突变阳性; 1例EGFR基因G719S突变阳性; 1例ROS1基因重排(融合)阳性。

与对比方法的研究结果显示, 考核试剂的定性检测结果阳性符合率为100% (95%CI 96.38% ~ 100%), 阴性符合率为94.36% (95%CI 90.13% ~ 97.15%), 总符合率为96.27% (95%CI 93.43% ~ 98.12%)。进行Kappa一致性检验, Kappa值=0.9190, $P < 0.001$, 显示二者具有良好的检测一致性。

在295例结直肠癌样本中, 两种方法检测结果不一致或不完全一致共有11例。11例样本的第三方验证结果中, 有7例与考核

试剂检测结果一致，有3例与对照方法检测结果一致，1例（双突变样本）与双方检测结果均不一致。

（二）伴随诊断比较研究

申请人在山西省肿瘤医院进行考核试剂与伴随诊断用途试剂的比较研究。

1. EGFR基因与已上市伴随诊断试剂盒的比较研究

EGFR基因突变对比试剂采用凯杰公司therascreen® EGFR RGQ PCR Kit试剂盒。本次对比研究共纳入220例福尔马林固定，石蜡包埋的晚期非小细胞肺癌组织样本。考核试剂在83例样本中检出阳性（其中19Del 41例、L858R 39例、T790M 3例、L861Q 3例、S768I 1例）。

考核试剂在220例样本中有6例样本定性检测结果与对照试剂不一致。其中5例为考核试剂检出阳性（其测序丰度均低于对照试剂检出限），对照试剂检出阴性。1例为考核试剂检出阴性，对照试剂检出阳性，可能原因为肿瘤组织异质性或检测方法学的差异。

考核试剂与对照试剂定性检测EGFR基因的阳性符合率为98.73%（95%CI 93.15% ~ 99.97%），阴性符合率为96.45%（95%CI 91.92% ~ 98.84%），总符合率为97.27%（95%CI 94.16% ~ 98.99%）。进行Kappa一致性检验，Kappa值=0.941， $P < 0.001$ ，

显示二者具有良好的检测一致性。

考核试剂与对照试剂定性检测 19Del 的阳性符合率为 95.00% (95%CI: 83.08% ~ 99.39%), 阴性符合率为 98.33% (95%CI: 95.21% ~ 99.65%), 总符合率为 97.73% (95%CI: 94.78% ~ 99.26%); EGFR L858R 检测结果的阳性符合率为 94.74% (95%CI: 82.25% ~ 99.36%), 阴性符合率为 98.35% (95%CI: 95.26% ~ 99.66%), 总符合率为 97.73% (95%CI: 94.78% ~ 99.26%); EGFR 稀有突变(包括 T790M、L861Q、S768I 等)检测结果的阳性符合率为 100.00% (95%CI: 54.07% ~ 100.00%), 阴性符合率为 100.00% (95%CI: 98.29% ~ 100.00%), 总符合率为 100.00% (95%CI: 98.34% ~ 100.00%)。

2. ALK 基因与已上市伴随诊断试剂盒的比较研究

ALK 基因融合(重排)对比试剂采用雅培公司 Vysis ALK Break Apart FISH 探针试剂盒和罗氏公司 VENTANA ALK 免疫组化(IHC)检测试剂盒。本次对比研究共纳入 228 例福尔马林固定,石蜡包埋的晚期非小细胞肺癌组织样本。228 例样本的 FISH 与 IHC 检测结果有 4 例不一致,224 例一致。考核试剂在 224 例样本中共检出 29 例阳性。

考核试剂在 224 例样本中有 2 例样本检测结果与对照试剂不一致。1 例为考核试剂检出阳性(其测序丰度较低),对照试剂

(IHC/FISH)均检出阴性。1例为考核试剂检出阴性，对照试剂(IHC/FISH)均检出阳性，可能原因为肿瘤组织异质性或检测方法学的差异。

考核试剂与对照试剂(IHC/FISH)定性检测ALK基因的阳性符合率为96.55%(95%CI: 82.24%~99.91%)，阴性符合率为99.49%(95%CI: 97.18%~99.99%)，总符合率为99.11%(95%CI: 96.81%~99.89%)。进行Kappa一致性检验，Kappa值=0.960， $P < 0.001$ ，显示二者具有良好的检测一致性。

3.ROS1基因与已上市伴随诊断试剂盒的比较研究

ROS1基因融合(重排)对比试剂采用厦门艾德生物人类ROS1基因融合检测试剂盒(荧光PCR法)。本次对比研究共纳入232例福尔马林固定，石蜡包埋的晚期非小细胞肺癌组织样本。考核试剂在7例样本中检出阳性。

考核试剂在232例样本中有1例样本检测结果与对照试剂不一致。可能原因为肿瘤组织异质性或检测方法学的差异。

考核试剂与对照试剂定性检测ROS1基因的阳性符合率为87.50%(95%CI 47.35%~99.68%)，阴性符合率为100.00%(95%CI 98.37%~100.00%)，总符合率为99.57%(95%CI 97.62%~99.99%)。进行Kappa一致性检验，Kappa值=0.931， $P < 0.001$ ，显示二者具有良好的检测一致性。

4. KRAS基因与已上市伴随诊断试剂盒的比较研究

KRAS基因突变对比试剂采用凯杰公司therascreen® KRAS RGQ PCR Kit试剂盒。本次对比研究共纳入204例福尔马林固定，石蜡包埋的晚期结直肠癌组织样本。考核试剂在68例样本中检出阳性。

考核试剂在204例样本中有5例样本检测结果与对照试剂不一致。5例不一致样本均为考核试剂检出阳性（其测序丰度均低于对照试剂检测限），对照试剂检出阴性。

考核试剂与对照试剂定性检测KRAS基因的阳性符合率为100.00%（95%CI: 94.31% ~ 100.00%），阴性符合率为96.45%（95%CI: 91.92% ~ 98.84%），总符合率为97.55%（95%CI: 94.37% ~ 99.20%）。进行Kappa一致性检验，Kappa值=0.944， $P < 0.001$ ，显示二者具有良好的检测一致性。

（三）TKI 药物疗效相关的回顾性临床研究

申请人在上海市肺科医院、北京胸科医院和山西省肿瘤医院进行靶向药物疗效相关的回顾性临床研究。3家研究中心合计完成162例靶向药物疗效相关研究。其中吉非替尼片53例、盐酸埃克替尼片6例、盐酸厄洛替尼片2例、甲磺酸奥西替尼片25例、克唑替尼胶囊53例、西妥昔单抗注射液23例。

1. 吉非替尼片药效相关性研究

合计纳入53例既往接受吉非替尼片治疗的局部晚期或转移性非小细胞肺癌患者进行回顾性疗效分析。考核试剂在53名患者治疗前的石蜡包埋组织样本中均检出EGFR敏感突变阳性，与临床既往分子检测结果一致。在53名患者吉非替尼片疗效评估中，38例评估部分缓解，14例评估疾病稳定，1例评估疾病进展，临床用药客观缓解率为71.70%（95%CI 57.65% ~ 83.21%），疾病控制率为98.11%（95%CI 89.93% ~ 99.95%），与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。

2.甲磺酸奥希替尼片药效相关性研究

合计纳入25例既往接受甲磺酸奥希替尼片治疗的局部晚期或转移性非小细胞肺癌患者进行回顾性疗效分析。考核试剂在25名患者治疗前的石蜡包埋组织样本中均检出EGFR基因T790M突变阳性，与临床既往分子检测结果一致。在25名患者甲磺酸奥希替尼片疗效评估中，16例评估部分缓解，8例评估疾病稳定，1例评估疾病进展，临床用药客观缓解率为64%（95%CI 42.52% ~ 82.03%），疾病控制率为96%（95%CI 79.65% ~ 99.90%），与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。

3.克唑替尼胶囊（ALK融合）药效相关研究

合计纳入41例既往接受克唑替尼胶囊治疗的局部晚期或转移性非小细胞肺癌患者进行回顾性疗效分析。考核试剂在41名

患者治疗前的石蜡包埋组织样本中均检出ALK基因重排(融合)阳性,与临床既往分子检测结果一致。在41名患者克唑替尼胶囊疗效评估中,30例评估部分缓解,9例评估疾病稳定,2例评估疾病进展,临床用药客观缓解率为73.17%(95%CI 57.06%~85.78%)、疾病控制率为95.12%(95%CI 83.47%~99.40%),与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。

4.克唑替尼胶囊(ROS1融合)药效相关研究

合计纳入12例既往接受克唑替尼胶囊治疗的局部晚期或转移性非小细胞肺癌患者进行回顾性疗效分析。考核试剂在12名患者治疗前的石蜡包埋组织样本中均检出ROS1重排(融合)阳性,与临床既往分子检测结果一致。在12名患者克唑替尼胶囊疗效评估中,9例临床评估部分缓解,3例评估疾病稳定,临床用药客观缓解率为75%(95%CI 42.81%~94.51%)、疾病控制率为100%(95%CI 73.54%~100%),与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。

5.西妥昔单抗注射液药效相关研究

合计纳入23例既往接受西妥昔单抗注射液治疗的晚期结直肠癌患者进行回顾性疗效分析。考核试剂在23名患者治疗前的石蜡包埋组织样本中的检测结果均为KRAS基因野生型,与临床既往分子检测结果一致。其中10名患者为初次治疗,与药物临

床试验入组人群相符。在这10名患者西妥昔单抗注射液疗效评估中，7例评估部分缓解，2例评估疾病稳定，1例评估疾病进展，临床用药客观缓解率为70%（95%CI 34.75% ~ 93.33%）、疾病控制率为90%（95%CI 55.50% ~ 99.75%），与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。另有11例为化疗后复发结直肠癌患者，治疗后疾病控制率为72.73%。其他2例为维持治疗。

综上所述，该产品临床试验资料对产品的临床性能进行了较全面研究，临床试验符合要求。

四、收益-风险评估

（一）收益评估

本产品用于定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）、结直肠癌（CRC）患者经中性福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）的组织样本中EGFR/ALK/ROS1/RET/KRAS/NRAS/PIK3CA/BRAF/HER2/MET基因变异。其中，针对NSCLC，EGFR基因中：19号外显子缺失（19del）、L858R点突变用于吉非替尼片的伴随诊断检测，T790M点突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测；ALK基因重排（融合）和ROS1基因重排（融合）用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测；针对CRC，KRAS基因野生型用于西妥昔单抗注射液的伴随诊断检测。

本试剂盒检测既适用于非小细胞肺癌（NSCLC）患者，亦适用于结直肠癌（CRC）患者。可一次性检测患者经中性福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）组织样本中的10种基因变异。患者通过检测结果可能受益于相应的靶向药物治疗，亦可能通过检测结果来辅助诊断，提示预后，获得更优的治疗方案。

（二）风险评估

本试剂盒检测结果会受到样本来源、样本采集过程、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到样本DNA提取质量、实验操作、实验环境等限制，导致可能得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在风险及检测的局限性。

不符合说明书中【样本要求】的样本和不恰当的实验操作会导致假阳性或假阴性结果，请严格按照产品说明书中【样本要求】及【检验方法】的要求操作和进行实验过程质控。同时由于肿瘤组织可能存在较大异质性，不同部位取样可能会得到不同的检测结果。

本试剂盒阴性的检测结果不能完全排除靶基因突变的存在，样本中肿瘤细胞过少、过度降解、突变类型不在试剂盒检测范围内或靶基因浓度低于检测限亦可造成假阴性结果。

本试剂盒在检测过程中涉及基因扩增，在非可控的实验室

操作可能由于环境中气溶胶的存在导致结果不可靠，同时PCR操作过程中气溶胶的泄露可能会导致设备甚至实验室的污染。因此，请在可控的实验室进行检测操作，操作人员需根据《医疗机构临床基因扩增管理办法》进行专业培训，非专业的操作及操作不当会影响检测质量。

本试剂盒为基于二代测序平台的多基因位点的伴随诊断产品，检测过程主要包括FFPE样本中DNA提取、文库制备、杂交捕获、测序及数据分析等步骤。为确保检测全流程的质量得到有效控制，在产品的设计开发阶段对样本提取试剂、文库质控试剂及测序试剂进行了全流程匹配性验证，为了确保检测结果的准确性，配套开发了测序数据分析及结果判读的生物信息分析软件。请使用本试剂盒推荐使用的配套试剂盒及软件进行检测，本试剂盒未对其他配套试剂盒及软件进行对比验证。

（三）其他因素

申报产品对临床疾病治疗的临床指导价值仍需要进一步临床研究。其它稀有突变本产品检测试剂可以检出，但相关肿瘤药物安全性和有效性尚未确定。

（四）收益-风险的确定

通过在说明书等文档中详细规定操作流程和注意事项、对实验人员进行专业培训等防范措施，对该产品的已知和可预见

的安全风险进行控制和降低，剩余风险可以被控制在验收准则规定的可接受范围内，同时没有带来新的危害与安全风险。

考虑到风险控制措施已明确而且申报产品不是判断临床疾病的唯一依据，临床中还应结合患者的临床病史、症状、其他诊断结果和临床医生的专业判断来综合评价临床疾病，在权衡获得的收益以及对临床风险的容忍度后，申报产品的收益大于风险。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册，属于创新审批项目（编号：201600077）。申请人的注册申报资料符合

现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令 第680号）、《体外诊断试剂注册管理办法》（国家食品药品监督管理总局令2014年第5号）等相关医疗器械法规与配套规章，经系统评价后，建议准予注册。申请人在该产品上市后应继续对产品伴随诊断用途进行验证。请在至少两家临床机构随访收集伴随诊断4种药物（吉非替尼片、甲磺酸奥希替尼片、克唑替尼胶囊、西妥昔单抗注射液）的临床用药疗效随访数据，作为临床补充资料在产品下一次延续注册时提交。临床用药疗效随访数据应包括：病理诊断信息，应用本产品检测信息，患者用药疗效终点至最佳疗效的疗效数据，每种药物相关数据应满足统计学意义。该项临床资料应由出具数据的各临床试验机构签章。

2018年11月1日

附件：产品说明书

人类 10 基因突变联合检测试剂盒（可逆末端终止测序法）说明书

【产品名称】

通用名称：人类 10 基因突变联合检测试剂盒（可逆末端终止测序法）

【包装规格】

24 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）、结直肠癌（CRC）患者经中性福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）的组织样本中 *EGFR/ALK/ROS1/RET/KRAS/NRAS/PIK3CA/BRAF/HER2/MET* 基因变异（位点信息详见附件 1 和附表 2）。其中，针对 NSCLC，*EGFR* 基因中：19 号外显子缺失（19del）、L858R 点突变用于吉非替尼的伴随诊断检测，T790M 点突变用于甲磺酸奥希替尼的伴随诊断检测；*ALK* 基因重排（融合）和 *ROS1* 基因重排（融合）用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测；针对 CRC，*KRAS* 基因野生型用于西妥昔单抗注射液的伴随诊断检测；如表 1 所示。

表 1 伴随诊断用途的基因变异类型及相应的靶向药物

药物	基因及变异类型	癌种
吉非替尼片	<i>EGFR</i> : 19del、L858R	非小细胞肺癌
甲磺酸奥希替尼片	<i>EGFR</i> : T790M	
克唑替尼胶囊	<i>ALK</i> 重排（融合） <i>ROS1</i> 重排（融合）	
西妥昔单抗注射液	<i>KRAS</i> 野生型	结直肠癌

表 2 中为本试剂盒可以检出，但未经伴随诊断验证的基因变异类型。

表 2 未经伴随诊断用途验证的基因变异类型

基因名称	变异类型类型	癌种
<i>EGFR</i>	G719A、G719S、G719C、S768I、 D770_N771insG、L861Q	非小细胞肺癌
<i>RET</i>	<i>KIF5B</i> exon 15; <i>RET</i> exon 12	
<i>HER2</i>	A775_G776insYVMA	
<i>MET</i>	Intron14 c.3082+1G>T	
<i>KRAS</i>	G12D、G12A、G12V、G12S、 G12C、Q61H	非小细胞肺癌 结直肠癌
<i>BRAF</i>	V600E	
<i>NRAS</i>	G12D、Q61R、Q61K	
<i>PIK3CA</i>	H1047R	

其检测结果仅供临床参考，不应作为患者个体化治疗的唯一依据。临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

非小细胞肺癌患者：

肺癌是世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一，主要分为非小细胞肺癌（NSCLC）和小细胞肺癌（SCLC）这两类，其中 NSCLC 占 85% 以上，且 NSCLC 中以肺腺癌最常见^[1]。

NSCLC 患者中存在多种基因突变类型，近年来，针对 NSCLC 的靶向治疗进展迅速，已获批准的药物包括：EGFR 酪氨酸激酶抑制剂（TKI）

如吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥希替尼等；克唑替尼及其他 ALK/ROS1 抑制剂；BRAF/MEK 抑制剂、MET 抑制剂、RET 抑制剂、HER2 抑制剂等。这些靶向治疗药物均针对携带特定基因变异的 NSCLC 人群有效。因此，随着靶向治疗药物的发展，与之配合的分子伴随诊断变得必不可少。

EGFR 基因突变的发生率为 10~35%。*EGFR* 的热点敏感突变包括 19 号外显子缺失突变（19del）及 21 号外显子 L858R 点突变，其他如 18 号外显子 G719X 点突变、20 号外显子 S768I 点突变、21 号外显子 L861Q 点突变亦为已知敏感突变。并非所有 *EGFR* 突变均对所有 *EGFR*-TKI 敏感，如 20 号外显子 D770_N771insG 插入突变为 *EGFR*-TKI 的耐药突变；如 20 号外显子 T790M 点突变为第一/二代 *EGFR*-TKI 的耐药突变，但对第三代 *EGFR*-TKI 奥希替尼敏感^[1,2]。

ALK 基因重排（融合）是 NSCLC 中发现的第二个明确可靶向用药的驱动基因变异，发生率约为 3~7%，常见于年轻、不吸烟的肺腺癌患者。针对性靶向药物包括克唑替尼及其他新一代 ALK 抑制剂^[1,3]。

ROS1 基因重排（融合）也是 NSCLC 中可靶向用药的驱动基因变异，发生率约为 2%，针对性靶向药物包括克唑替尼及其他新一代 *ROS1* 抑制剂^[1,4]。

RET 基因重排（融合）也是 NSCLC 中可靶向用药的驱动基因变异，发生率约为 1~2%，针对性靶向药物包括 *RET* 抑制剂（卡博替尼、凡德他尼或 LOXO-292）^[1,5]。

BRAF 基因 V600E 突变是 NSCLC 中较罕见、但已被确认的可靶向用药的驱动基因变异，在 NSCLC 中发生率约为 1~4.9%。针对性靶向治疗包括 *BRAF* 抑制剂与 *MEK* 抑制剂的联合治疗^[1,6]。

HER2 基因突变发生率约为 2~4%，针对性靶向药物为曲妥珠单抗^[1,7]。

MET 基因突变发生率约为 1~5%，针对性靶向药物为克唑替尼^[1,8]。

KRAS 基因突变发生率约为 5~30%，*NRAS* 基因突变发生率约为 1%，*PIK3CA* 基因突变发生率约为 3~5%。携带 *KRAS*、*NRAS* 或 *PIK3CA* 基因突变的 NSCLC 患者可能对 *EGFR*-TKI 原发性耐药^[1,9,10]。

结直肠癌患者：

KRAS、*NRAS*、*PIK3CA* 和 *BRAF* 基因突变较为常见，突变率分别为 20~50%、1~6%、10~30% 及 8~15%^[11-13]。

KRAS 基因突变是西妥昔单抗注射液的耐药突变。*NRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* 基因突变可能是西妥昔单抗注射液的耐药突变^[12-16]。

【检验原理】

本试剂盒通过构建样本 DNA 测序文库，并使用特异探针针对文库进行目标区域捕获富集，捕获后的文库通过高通量测序，可实现多个基因多个突变的一次性检测。

首先，以 FFPE 样本提取的 DNA 为材料，进行 DNA 片段化处理，并使用磁珠对 DNA 进行片段选择，然后对所得片段进行末端修复和加 A 处理，使用 DNA 连接酶将接头连接到 DNA 模板的两端，再使用带有标签序列（Index）的引物和聚合酶进行 PCR 扩增得到扩增文库；扩增文库与带有生物素标记的寡核苷酸探针进行液相杂交，并用链霉素包被的磁珠对与探针结合的文库进行捕获富集，最后经过 PCR 扩增得到捕获文库。捕获文库通过高通量测序得到测序数据，经配套的数据分析软件分析后即可得到最终的基因变异信息。

【主要组成成分】

本试剂盒中含有文库构建试剂、杂交捕获试剂、对照品等，详见表 3。

表 3 试剂盒组成

编号	试剂盒组成	主要成分	数量
1	LC-末端修复缓冲液	Tris、镁离子	105 μL×1 管
2	LC-末端修复酶	Klenow 酶	45 μL×1 管
3	LC-连接缓冲液	Tris、镁离子、ATP、二硫苏糖醇、连接酶	450 μL×1 管
4	LC-连接增强子	小分子连接增强子	15 μL×1 管
5	LC-接头	寡核苷酸	28 μL×1 管
6	LC-扩增反应缓冲液①	Tris、镁离子、dNTPs、DNA 聚合酶	750 μL×1 管
7	LC-D5 引物*	寡核苷酸	6 μL×8 管
8	LC-D7 引物*	寡核苷酸	4 μL×12 管
9	LC-封闭剂	寡核苷酸	70 μL×1 管
10	LC-捕获探针	寡核苷酸	50 μL×1 管
11	LC-杂交缓冲液	甲酰胺、钠离子、吐温、硫酸葡聚糖	100 μL×1 管
12	LC-磁珠洗涤缓冲液	Tris、EDTA-2Na、氯化钠	500 μL×1 管
13	5×洗涤缓冲液①	乙磺酸、氯化钠、吐温	880 μL×1 管
14	5×洗涤缓冲液②	氯化钠、十二烷基硫酸钠、二硫苏糖醇	660 μL×1 管
15	5×洗涤缓冲液③	钠离子、二硫苏糖醇	440 μL×1 管
16	5×洗涤缓冲液④	钠离子、二硫苏糖醇	440 μL×1 管
17	LC-扩增反应缓冲液②	Tris、引物、镁离子、dNTPs	290 μL×1 管
18	LC-聚合酶	DNA 聚合酶	15 μL×1 管
19	LC-阳性对照品	片段化 DNA（突变类型为 EGFR-T790M、EGFR-L858R、KRAS-G12V 及 GOPC(E8)-ROS1(E35)）	100 μL×1 管
20	LC-阴性对照品	片段化 DNA（试剂盒检测范围内基因变异阴性）	100 μL×1 管

注：标签引物序列见附表 3；不同批号试剂盒中各组分不可互相混用；连接缓冲液需-20±5℃保存，并且使用时需在冰盒上操作。

需自备的试剂、耗材和仪器等，详见表 4。

表 4 自备试剂、耗材和仪器

用途	试剂盒名称/仪器名称	货号
提取试剂	核酸提取试剂（型号：FFPE DNA/RNA）（备案号：闽厦械备 20150082）（厦门艾德）	ADx-FF03
核酸定量	试剂：QuantiFluor dsDNA System（Promega）， 配套仪器：Quantus™ Fluorometer	E2670
	试剂：Qubit dsDNA HS Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）， 配套仪器：Qubit 2.0 Fluorometer	Q32851/ Q32854

纯化磁珠	Agencourt AMPure XP Kit（Beckman Coulter）	A63880/A63881/A63882
捕获磁珠	Dynabeads MyOne™ Streptavidin T1（Thermo Fisher Scientific）	65601/65602
片段质控	试剂：DNA 1000 Kit（Agilent）， 配套仪器：Agilent 2100 Bioanalyzer system	5067-1504
	试剂：High Sensitivity DNA Kit（Agilent）， 配套仪器：Agilent 2100 Bioanalyzer system	5067-4626
	试剂：D1000 ScreenTape/Reagents（Agilent）， 配套仪器：Agilent 2200 TapeStation	5067-5582/ 5067-5583
	试剂：High Sensitivity D1000 ScreenTape/Reagents（Agilent）， 配套仪器：Agilent 2200 TapeStation	5067-5584/ 5067-5585
	试剂：DNA High Sensitivity Reagent Kit（PerkinElmer），配套仪器：LabChip GX Touch	CLS760672
测序试剂	Illumina NextSeq 500 Mid Output Reagent kit v2 (300 cycles) (illumina)	FC-404-2003
	Illumina NextSeq 500 High Output Reagent kit v2 (300 cycles) (illumina)	FC-404-2004
	Illumina PhiX Control v3 (illumina)	FC-110-3002
其他试剂	无 DNase 和 RNase 的纯化水	
	无水乙醇（分析纯）	
	TE-low 溶液（10 mM Tris 和 0.1 mM EDTA, pH 8.0）	
	2N NaOH 溶液	
	200 mM Tris 溶液	
数据分析	软件：高通量测序数据分析系统（厦门艾德）	
DNA 打断	仪器：M220 Focused-ultrasonicator（Covaris）	4482277
真空浓缩	仪器：Concentrator Plus™ complete system（Eppendorf）	5305000304
磁力架	16 孔磁力架：DynaMag™-2 Magnet（Thermo Fisher Scientific）	12321D
	96 孔磁力架：DynaMag™-96 Side Magnet（Thermo Fisher Scientific）	12331D
其他仪器	振荡型恒温金属浴（如博日公司的振荡型恒温金属浴 MB-102）或电热恒温水槽	
	漩涡混合器和微型离心机	
其他耗材	0.2 mL 和 1.5 mL 无色低吸附离心管（Axygen）	
	无 DNase 和 RNase 的移液器滤芯吸头	

【储存条件及有效期】

-20±5℃保存；有效期为 6 个月。开瓶使用完毕后-20±5℃保存，不影响产品有效期。避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。

生产日期及有效期至见标签。

【适用仪器】

建库/捕获：ABI 2720 PCR 仪

测序：基因测序仪（型号：NextSeq CN500，贝瑞和康公司生产）

【样本要求】

1. 检测样本类型为非小细胞肺癌或结直肠癌的 FFPE 样本。FFPE 样本应选用 10% 中性福尔马林缓冲液固定，固定时间应在 6 小时以内，最长不超过 48 小时。石蜡包埋样本切片之后建议立即进行检测。
2. 石蜡包埋病理组织或切片样本应确定含有肿瘤病变细胞，所取部分尽量在蜡块中部。建议肿瘤细胞含量不低于 20%。
3. 所用石蜡包埋病理组织或切片样本保存年限不超过 18 个月。
4. 选择适用的 DNA 提取试剂盒来提取样本 DNA。DNA 分离完毕后，使用核酸定量试剂盒测定 DNA 的浓度，FFPE 样本 DNA 总量应大于 100 ng。若浓度不符合要求，应重新取材或扩大样本量再进行分离。
5. 样本测定完毕后建议立即进行检测，否则请于 -20±5℃ 保存，保存期间避免反复冻融。

【检验方法】

建议每次实验中，样品与阳性对照品和阴性对照品共同进行文库构建、杂交捕获和分析。

一、核酸提取

用于核酸提取的 FFPE 样本的组织面积应介于 0.5~1 cm²，切片厚度应介于 5~10 μm，切片用量为 2~5 片。如果组织面积小于 0.5 cm²，核酸提取时，需增加 FFPE 切片的用量。

1. 脱蜡

- 1.1 根据 FFPE 切片组织面积的大小，刮取 2~5 片 FFPE 样品至 1.5 mL 离心管中。
- 1.2 加入 1 mL 二甲苯进行脱蜡，振荡混匀 10 秒；室温 13000×g 离心 2 分钟，小心去除上清（勿吸到沉淀）。
- 1.3 如脱蜡不完全，可重复步骤 1.2 一次。
- 1.4 加入 1 mL 无水乙醇，振荡混匀 10 秒；室温下 13000×g 离心 2 分钟，小心去除上清（勿吸到沉淀）。
- 1.5 室温开盖放置 10 分钟或在 37℃ 的振荡型恒温金属浴中开盖放置 5 分钟，使乙醇充分挥发。

2. 组织裂解

- 2.1 加入 200 μL Buffer RTL 及 25 μL Proteinase K Solution，使用移液器吹打混匀，放置在 56℃ 的振荡型恒温金属浴中消化 15 分钟；
- 2.2 13000×g 离心 2 分钟，吸弃 180 μL 上清，剩余液体及沉淀用于提取 DNA。

3. DNA 提取

- 3.1 加入 140 μL Buffer DTL 及 15 μL Proteinase K Solution 至剩余液体和沉淀中，使用移液器吹打混匀，放置在 56℃ 的振荡型恒温金属浴中消化 1 小时；
- 3.2 加入 10 μL Buffer DES，混匀后放入温度已升至 90℃ 的恒温加热器中，孵育 2 小时；
- 3.3 用微型离心机离心 5~10 秒。如有需要，可待液体温度降至室温，加入 2 μL 100 mg/mL RNase A，室温放置 5 分钟以去除 RNA；
- 3.4 加入 200 μL Buffer DTB 和 200 μL 无水乙醇，振荡混匀后用微型离心机离心 5~10 秒；
- 3.5 将全部液体转移至 DNA 吸附柱中，10000×g 离心 1 分钟，倒掉收集管中的液体；
- 3.6 往 DNA 吸附柱中加入 600 μL Buffer DW1，10000×g 离心 1 分钟，

倒掉收集管中的液体；

- 3.7 往 DNA 吸附柱中加入 600 μL Buffer DW2，10000×g 离心 1 分钟，丢弃收集管；
- 3.8 换用新的收集管，13000×g 离心 3 分钟，丢弃收集管；
- 3.9 将吸附柱小心转移至干净的 1.5 mL 离心管中；往 DNA 吸附膜中心滴加 30~100 μL Buffer DTE（勿碰到 DNA 吸附膜），室温静置 2~5 分钟，13000×g 离心 1 分钟，收集样品 DNA 并保存；
- 3.10 提取后的 FFPE 样本 DNA 使用核酸定量试剂盒 QuantiFluor dsDNA System 或 Qubit dsDNA HS Assay Kit 及其配套仪器测定 DNA 浓度，计算得到的 FFPE 样本 DNA 总量应大于 100 ng。

注：若不立即进行下一步操作，应保存于 -20±5℃。

二、文库构建

1. 片段化处理

- 1.1 在 DNA 打断仪的配套反应管中加入体积为 130 μL 的 DNA 样本（若 130 μL 的 DNA 总量大于或等于 500 ng，取 500 ng DNA 进行片段化，若 130 μL 的 DNA 总量大于 100 ng 且小于 500 ng，取 100 ng DNA 进行片段化，DNA 样本体积不足 130 μL 则用纯化水补齐），将反应管置于仪器上，按下表设置好各参数值后进行 DNA 片段化处理。也可采用片段化酶进行 DNA 片段化，请根据相应试剂使用说明操作。

表 5 DNA 打断仪仪器参数

参数	设定值
Duty Factor	20%
Peak Incident Power(W)	50
Cycles Burst	200
Time(s)	170-230

注：打断时间需根据样本质量调整。

- 1.2 片段化后的样本使用毛细管电泳试剂 High Sensitivity DNA Kit 或 High Sensitivity D1000 ScreenTape/Reagents 或 DNA High Sensitivity Reagent Kit 及配套仪器进行片段质控，要求主要片段约 220 bp，否则应重新打断或重新提取 DNA。

2. 片段筛选

说明书中 DNA 纯化均采用核酸纯化磁珠 AMPure XP Beads。

对于 500 ng DNA 的打断后纯化，按步骤 2.1~2.11 进行操作；对于 100 ng DNA 的打断后纯化，参照步骤 2.1~2.11，省略步骤 2.3 且合并步骤 2.2 和步骤 2.4（即步骤 2.2~2.4 调整为：取 120 μL 打断产物转移到 1.5 mL 离心管中，并加入 144 μL AMPure XP Beads，吹打混匀，静置 5 分钟，然后置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清），以减少 DNA 纯化损失。

- 2.1 提前取出核酸纯化磁珠 AMPure XP Beads 室温平衡 30 分钟。
- 2.2 取 120 μL 打断产物转移到 1.5 mL 离心管中，并加入 96 μL AMPure XP Beads，吹打混匀，静置 5 分钟，然后置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清。
- 2.3 小心吸取液体至 1.5 mL 离心管中，弃磁珠。
- 2.4 往上述离心管中加入 48 μL AMPure XP Beads，吹打混匀，静置 5 分钟，然后置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清。
- 2.5 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），并加入 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇，静置 30 秒。

- 2.6 重复步骤 2.5 一次。
- 2.7 吸弃乙醇，室温晾干 2~3 分钟使残留乙醇挥发，以磁珠表面无光泽为准（过分晾干将导致 DNA 得率下降）。
- 2.8 从磁力架上取下离心管，加入 25 μ L 纯化水，重悬磁珠，室温静置 2 分钟。
- 2.9 将离心管重新放置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清。
- 2.10 小心打开管盖，吸取全部洗脱产物至 1.5 mL 离心管中，洗脱产物即为片段化 DNA。
- 2.11 使用核酸定量试剂盒测定 DNA 浓度，根据体积计算 DNA 总量应大于 30 ng。

注：若不立即进行下一步操作，应保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

3. 末端修复

- 3.1 取出以下组分，室温静置解冻后振荡混匀，每人份配制体系如下：

表 6 末端修复体系

组分	体积
片段化 DNA、对照品	χ μ L
纯化水	25- χ μ L
末端修复缓冲液	3.5 μ L
末端修复酶	1.5 μ L
合计	30 μ L

注：对于片段化 DNA 样本，“ χ ”表示 30~50 ng 片段化 DNA 样本体积（推荐 50 ng）；阳性对照品 DNA 和阴性对照品 DNA 浓度均为 1.2 ng/ μ L，加入体积 χ 均为 25 μ L。

- 3.2 吹打混匀，置于 PCR 仪上，20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟，65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟。
- 3.3 孵育完成后，立即进行下一步操作或于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存。

4. 接头连接

- 4.1 取出接头及以下组分，室温静置解冻后振荡混匀，每人份配制体系如下：

表 7 接头连接体系

组分	体积
连接缓冲液	15 μ L
连接增强子	0.5 μ L
合计	15.5 μ L

注：连接缓冲液需 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存，并且使用时需在冰盒上操作。

- 4.2 将 15.5 μ L 上述反应体系加入步骤 3.2 的 200 μ L PCR 管中，充分吹打混匀。
- 4.3 加入 1 μ L 接头，充分吹打混匀，置于 PCR 仪上，20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟（PCR 仪不使用热盖）。
- 4.4 孵育完成后，立即进行下一步操作。

5. 接头连接后纯化

- 5.1 提前取出核酸纯化磁珠 AMPure XP Beads 室温平衡 30 分钟。
- 5.2 将步骤 4.3 的连接产物分别转移至新的 1.5 mL 离心管中，在每个离心管中加入 42 μ L AMPure XP Beads，吹打混匀，静置 10 分钟，然后置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清。
- 5.3 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇，静置 30 秒。

- 5.4 重复步骤 5.3 一次。
- 5.5 吸弃乙醇，室温晾干 3~5 分钟使残留乙醇挥发，以磁珠表面无光泽为准（过分晾干将导致 DNA 得率下降）。
- 5.6 从磁力架上取下离心管，加入 21 μ L 纯化水，重悬磁珠，室温静置 2 分钟。
- 5.7 将离心管重新放置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清。
- 5.8 小心打开管盖，吸取全部洗脱产物至 200 μ L PCR 管中。

6. 文库扩增

- 6.1 取出以下组分，室温静置解冻后振荡混匀，每人份配制体系如下：

表 8 文库扩增体系

组分	体积
扩增反应缓冲液①	25 μ L
LC-D5 引物*	2 μ L
LC-D7 引物*	2 μ L
合计	29 μ L

注：LC-D5 引物共 8 管，每管引物含不同序列；LC-D7 引物共 12 管，每管引物含不同序列。不同样本文库请选用不同的 LC-D5 引物与 LC-D7 引物组合；同一次上机测序的样本文库不得使用相同的 D5+D7 编号组合。本试剂盒的 LC-D5 引物和 LC-D7 引物序列参考 TruSeq HT Sample Prep Kits 里的序列，序列具体信息详见附表 3。

- 6.2 将反应体系加入步骤 5.8 的 PCR 管中，充分吹打混匀并瞬时离心。
- 6.3 按以下程序进行扩增：

表 9 文库扩增程序

温度	时间	循环数
98 $^{\circ}\text{C}$	45 s	1
98 $^{\circ}\text{C}$	15 s	11
60 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	1 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	∞	1

7. 文库纯化

每个样品文库、阳性对照文库和阴性对照文库都需要单独进行纯化。

- 7.1 提前取出核酸纯化磁珠 AMPure XP Beads 室温平衡 30 分钟。
- 7.2 将全部扩增产物转移到 1.5 mL 离心管中，并加入 20 μ L 室温平衡过的 AMPure XP Beads，吹打混匀，静置 10 分钟，然后置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清。
- 7.3 小心吸取液体至新的 1.5 mL 离心管中，弃磁珠。
- 7.4 往上述离心管中加入 25 μ L AMPure XP Beads，吹打混匀，静置 5 分钟，然后置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清。
- 7.5 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇，静置 30 秒。
- 7.6 重复步骤 7.5 一次。
- 7.7 吸弃乙醇，室温晾干 2~3 分钟使残留乙醇挥发，以磁珠表面无光泽为准（过分晾干将导致 DNA 得率下降）。
- 7.8 从磁力架上取下离心管，加入 15 μ L 纯化水，重悬磁珠，室温静置 2 分钟。

7.9 将离心管重新放置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清。

7.10 小心打开管盖，吸取全部洗脱产物至 1.5 mL 离心管中，洗脱产物即为样本 DNA 文库。

注：若不立即进行下一步实验，应保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，建议保存时间不超过一周。

8. 文库质控

8.1 使用核酸定量试剂盒 QuantiFluor dsDNA System 或 Qubit dsDNA HS Assay Kit 及配套仪器测定样本 DNA 文库的浓度，计算得到的样本 DNA 文库、阳性对照文库、阴性对照文库总量均应大于 $0.5\ \mu\text{g}$ 。否则建库样品不符合要求，应重新建库。

8.2 取样本文库或对照品文库，使用毛细管电泳试剂 DNA 1000 Kit 或 D1000 ScreenTape/Reagents 或 DNA High Sensitivity Reagent Kit 及配套仪器进行片段质控，文库片段长度的主峰约为 380 bp，无明显小片段和大片段杂峰，如图 1 所示。否则建库样品不符合要求，应重新建库（图 1 中约 160 bp 的少量小片段为接头二聚体的扩增产物，不影响后续捕获）。

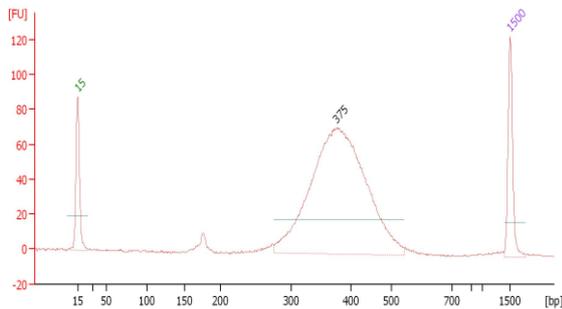


图 1 文库质控示意图

三、杂交捕获：

1. 试剂准备

1.1 取 200 μL PCR 八联管管盖，用注射器针头在离心管盖上戳一小孔，剪成单个独立的管盖待用。

1.2 取出以下组分，室温静置解冻后振荡混匀，瞬时离心；在 200 μL PCR 管中依次按量加入，吹打混匀，保持自带的管盖打开，盖上上述 1.1 制备的管盖。

表 10 准备体系

组分	体积
文库样品（4 个）	$\leq 60\ \mu\text{L}$
封闭剂	$7\ \mu\text{L}$
合计	$\leq 67\ \mu\text{L}$

注：“文库样品”推荐采用 4 个含有不同 Index 序列组合的文库进行混合杂交捕获，每个文库 DNA 用量范围为 $0.5\sim 1\ \mu\text{g}$ （推荐 $1\ \mu\text{g}$ ），4 个文库 DNA 用量相同；若样品数量不足 4 个，可减少混合杂交捕获的样品数量；阳性对照文库、阴性对照文库可与文库样品进行混合杂交捕获。本试剂盒分析性能评估基于每个杂交含 4 个文库进行，对于质量较差的样本，推荐使用 1 个文库单独进行杂交捕获，有利于提高捕获特异性及测序有效深度。

1.3 将含以上组分的离心管放置于真空浓缩仪中，设置温度为 60°C ，离心至管中的液体蒸干为止（约 30~60 分钟）。也可采用 AMPure XP Beads 对上述组分进行浓缩（采用 2 倍磁珠体积混合，80% 乙

醇洗涤后用 $10\ \mu\text{L}$ 杂交缓冲液进行洗脱）。

2. 杂交

2.1 从真空浓缩仪中取出样品管，小心揭去带孔的管盖，加入杂交缓冲液 $10\ \mu\text{L}$ ，盖上自带的管盖，漩涡混匀，瞬时离心。

2.2 取出捕获探针，室温静置解冻后振荡混匀，瞬时离心，在上述样品管中加入捕获探针 $5\ \mu\text{L}$ ，振荡混匀，瞬时离心。将样品管置于 PCR 仪上，设置以下程序进行杂交： 95°C ，10 分钟； 48°C ，16~20 小时。

3. 捕获

3.1 提前取出链霉素修饰磁珠即 Dynabeads MyOne™ Streptavidin T1 磁珠室温平衡 30 分钟，振荡混匀，按每个杂交体系取 $10\ \mu\text{L}$ 磁珠的用量，取相应体积磁珠至 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中，加入等体积磁珠洗涤缓冲液，小心吹吸 10~20 次混匀。

3.2 将离心管置于磁力架上静置 1 分钟，至液体澄清。

3.3 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），从磁力架上取下离心管，加入 2 倍于原始磁珠体积的磁珠洗涤缓冲液，小心吹吸 10~20 次混匀。

3.4 将离心管置于磁力架上静置 1 分钟，至液体澄清。

3.5 重复步骤 3.3 一次。

3.6 将磁珠悬液按 $20\ \mu\text{L}/\text{管}$ 分装到 $200\ \mu\text{L}$ PCR 管中，并将 PCR 管置于 96 孔磁力架上静置 1 分钟，至液体澄清。

3.7 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），将步骤 2.2 杂交反应液全部转移至含磁珠的 PCR 管中，使用移液器吹打混匀或稍微振荡混匀（注意操作迅速，尽量避免杂交反应液温度下降），置于 PCR 仪中， 48°C 孵育 45 分钟，每隔 15 分钟取出混匀。

4. 洗涤

4.1 提前开启振荡型恒温金属浴，温度设置为 48°C 。

4.2 取出 $5\times$ 洗涤缓冲液①~④，室温静置解冻后振荡混匀，根据下表进行稀释（每个杂交体系用量）：

表 11 洗涤缓冲液稀释

经稀释的 洗涤缓冲液	对应浓缩液	浓缩液 用量	加水 体积	总体积
1 \times 洗涤缓冲液①	5 \times 洗涤缓冲液①	$88\ \mu\text{L}$	$352\ \mu\text{L}$	$440\ \mu\text{L}$
1 \times 洗涤缓冲液②	5 \times 洗涤缓冲液②	$66\ \mu\text{L}$	$264\ \mu\text{L}$	$330\ \mu\text{L}$
1 \times 洗涤缓冲液③	5 \times 洗涤缓冲液③	$44\ \mu\text{L}$	$176\ \mu\text{L}$	$220\ \mu\text{L}$
1 \times 洗涤缓冲液④	5 \times 洗涤缓冲液④	$44\ \mu\text{L}$	$176\ \mu\text{L}$	$220\ \mu\text{L}$

4.3 将 1 \times 洗涤缓冲液① $440\ \mu\text{L}$ 以及 1 \times 洗涤缓冲液② 分装出 $110\ \mu\text{L}$ 置于 48°C 预热 10 分钟以上，其余试剂室温放置待用。

4.4 待步骤 3.7 结束后，在含杂交体系和磁珠的 PCR 管中加入预热的 1 \times 洗涤缓冲液② $100\ \mu\text{L}$ ，小心吹吸 10 次混匀，并转移至 $1.5\ \text{mL}$ 离心管（低吸附管）中，将离心管置于磁力架上静置 1 分钟，至液体澄清。

4.5 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），从磁力架上取下离心管，加入预热的 1 \times 洗涤缓冲液① $200\ \mu\text{L}$ ，迅速吹打混匀（尽量避免温度下降）， 48°C 孵育 5 分钟。然后将离心管置于磁力架上静置 1 分钟，至液体澄清。

4.6 重复步骤 4.5 一次。

- 4.7 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），从磁力架上取下离心管，加入 1×洗涤缓冲液② 200 μL，48℃孵育 5 分钟。然后将离心管置于磁力架上静置 1 分钟，至液体澄清。
- 4.8 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），从磁力架上取下离心管，加入 1×洗涤缓冲液③ 200 μL，振荡混匀 1 分钟，瞬时离心，将离心管置于磁力架上静置 1 分钟，至液体澄清。
- 4.9 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），从磁力架上取下离心管，加入 1×洗涤缓冲液④ 200 μL，振荡混匀 30 秒，瞬时离心，将离心管置于磁力架上静置 1 分钟，至液体澄清。
- 4.10 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），从磁力架上取下离心管，加入 50 μL 纯化水，振荡混匀，瞬时离心。

注：若不立即进行下一步实验，应保存于 2~8℃，建议保存时间不超过一周。

5. 捕获产物扩增

- 5.1 取出扩增反应缓冲液②，室温静置解冻后振荡混匀。另取聚合酶涡旋混匀，瞬时离心，置于冰盒上待用。
- 5.2 取出步骤 4.10 含磁珠的捕获产物，振荡混匀后，按下表配制 PCR 扩增体系：

表 12 捕获产物扩增体系

组分	用量
扩增反应缓冲液②	29 μL
聚合酶	1 μL
捕获产物（含磁珠）	20 μL
合计	50 μL

- 5.3 混匀后，按以下程序进行扩增：

表 13 扩增产物程序

温度	时间	循环数
95℃	5 min	1
95℃	30 s	17
60℃	45 s	
60℃	2 min	1
4℃	∞	1

6. 扩增后纯化

- 6.1 提前取出核酸纯化磁珠即 AMPure XP Beads 室温平衡 30 分钟。
- 6.2 将步骤 5.3 的扩增产物全部转移到 1.5 mL 离心管中，并加入 20 μL AMPure XP Beads，吹打混匀，静置 5 分钟，然后置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清。
- 6.3 小心吸取液体至新的 1.5 mL 离心管中，弃磁珠。
- 6.4 往上述离心管中加入 30 μL AMPure XP Beads，吹打混匀，静置 5 分钟，然后置于磁力架上静置 3~5 分钟，至液体澄清。
- 6.5 小心吸弃液体（注意不要吸到磁珠），加入 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇，静置 30 秒。
- 6.6 重复步骤 6.5 一次。
- 6.7 吸弃乙醇，室温晾干 2~3 分钟使残留乙醇挥发，以磁珠表面无光泽为准（过分晾干将导致 DNA 得率下降）。
- 6.8 从磁力架上取下离心管，加入 20 μL TE-low 溶液（10 mM Tris 和 0.1 mM EDTA，pH 8.0），重悬磁珠，室温静置 2 分钟。

- 6.9 将离心管重新放置于磁力架上静置 5 分钟，至液体澄清。

- 6.10 小心打开管盖，吸取全部洗脱产物至 1.5 mL 离心管中，洗脱产物即为捕获文库。

注：若不立即进行下一步实验，应保存于 -20±5℃，建议保存时间不超过一周。

7. 捕获文库质检

使用核酸定量试剂盒 QuantiFluor dsDNA System 或 Qubit dsDNA HS Assay Kit 及配套仪器进行文库浓度质检，文库浓度应大于 2.5 ng/μL。使用毛细管电泳试剂 DNA 1000 Kit 或 D1000 ScreenTape/Reagents 或 DNA High Sensitivity Reagent Kit 及配套仪器进行文库片段质检，文库主要片段应与捕获前片段分布保持一致且无明显小片段和大片段杂峰。满足上述条件则文库合格；否则为不合格。

四、 上机测序

建议在基因测序仪 NextSeq CN500 上选用测序读长为 300 cycles（Paired-End Reads，2×150 cycles）的测序试剂进行测序，建议每个样品文库测序数据量不低于 1 Gb，PhiX 对照品掺入比例为 1%。

1. 通量选择

- 1.1 待测序样本文库数量不高于 35 个，推荐使用 Illumina NextSeq 500 Mid Output v2 Reagent kit (300 cycles) 试剂检测。

- 1.2 待测序样本文库数量高于 35 个且不高于 96 个，推荐使用 Illumina NextSeq 500 High Output v2 Reagent kit (300 cycles) 试剂检测。

注：每个样品文库平均的测序数据量=所选测序试剂通量÷测序样本文库数量，Illumina NextSeq 500 Mid Output v2 Reagent kit (300 cycles) 试剂通量为 40 Gb，Illumina NextSeq 500 High Output v2 Reagent kit (300 cycles) 试剂通量为 120 Gb。

2. 文库稀释及变性

- 2.1 提前取出 Reagent Cartridge、HT1 和 Flow Cell，Flow Cell 置于室温平衡 30 分钟，Reagent Cartridge 置于室温水浴 1 小时，HT1 室温静置解冻后振荡混匀。

- 2.2 将所有待测序样本文库按测序数据量需求进行混合，使用核酸定量试剂盒 QuantiFluor dsDNA System 或 Qubit dsDNA HS Assay Kit 及配套仪器测定混合文库浓度，将混合文库用 HT1 稀释到 4 nM；

- 2.3 配制新鲜的 0.2N NaOH，由 2 μL 2N NaOH 加入到 18 μL 纯化水中混匀得到；

- 2.4 取 5 μL 4 nM 混合文库至新的 1.5 mL 离心管中，加入 5 μL 新鲜配制的 0.2N NaOH，吹打混匀室温静置 5 分钟进行 4 nM 混合文库变性，变性后加入 5 μL 200 mM Tris 对 NaOH 进行中和，混匀后加入 985 μL HT1 将混合文库稀释至 20 pM；

- 2.5 取 1 μL 10 nM PhiX 对照品至新的 1.5 mL 离心管中，加入 4 μL HT1 稀释到 2 nM，加入 5 μL 新鲜配制的 0.2N NaOH，吹打混匀室温静置 5 分钟进行 PhiX 对照品变性，变性后加入 5 μL 200 mM Tris 对 NaOH 进行中和，混匀后加入 985 μL HT1 将 PhiX 对照品稀释至 10 pM；

- 2.6 取 10 μL 10 pM PhiX 对照品至新的 1.5 mL 离心管中，加入 40 μL HT1 稀释到 2 pM；

- 2.7 选择合适的上机终浓度，按下表进行混合及稀释，使最终上机混

合文库总体积为 1300 μL ，其中 PhiX 对照品含量为 1%，稀释后振荡混匀，快速离心后用于上样。

表 14 上机混合文库

上机浓度 (pM)	20 pM 混合文库体积 (μL)	2 pM PhiX 文库体积 (μL)	HT1 缓冲液体积 (μL)
1.30	83.7	8.45	1208
1.20	77.2	7.80	1215
1.10	70.8	7.15	1222
1.00	64.4	6.50	1229
0.90	57.9	5.85	1236
0.80	51.5	5.20	1243

3. 上样及测序

- 3.1 取出室温水浴解冻的 Reagent Cartridge，用无尘纸擦干，翻转 5 次混匀其中试剂。
- 3.2 使用干净的 1 mL 移液器吸头戳破 Reagent Cartridge 上带有 Load Samples 标签的 10 号孔封箔口，将 1300 μL 混合有 PhiX 对照品的最终上机混合文库注入 10 号孔；
- 3.3 根据测序仪运行设置提示进行试剂加载操作，测序仪自检完成后，点击“开始”按钮进行测序。
- 3.4 Illumina NextSeq 500 Mid Output v2 Reagent kit (300 cycles) 试剂测序时长约为 26 小时，Illumina NextSeq 500 High Output v2 Reagent kit (300 cycles) 试剂测序时长约为 29 小时。

五、生物信息分析

测序完成后，使用厦门艾德“高通量测序数据分析系统”（以下简称分析系统）对检测数据进行分析，得到相关多基因的突变结果。

1. 质量评估

- 1.1 分析系统后台监测程序可自动监测与系统连接的测序仪运行状态，当检测到新的已完成测序时，分析系统将启动数据处理程序，使用 illumina 公司的 bcl2fastq v2.17 软件将测序生成的 BCL 文件转化成样本对应的 fastq 文件。
- 1.2 使用 illuminate v0.6 软件读取测序文件中 InterOp 目录的记录信息，对本次测序进行质量分析与评估。要求 Q30 质量值大于 75%。

2. 创建分析

- 2.1 质量评估完成后，在分析系统的分析中心页面，点击“创建分析”按钮，并在弹出的对话框中选择“ADXLC10”模块，进入样品选择页面。
- 2.2 在样品选择页面，首先在“选择 RUN”条目中选择包含待分析样品的测序批次，然后在样品对话框勾选待分析样品并添加至分析列表。
- 2.3 样品选择完成后，点击“创建分析”按钮，进入分析预览页面。确认无误后，点击“开始分析”按钮，即开始 ADXLC10 自动化分析流程。
- 2.4 自动化分析流程开始后，分析系统通过以下步骤完成数据分析过程：
 - a) 数据预处理：根据文库结构信息，识别文件中的 UMI (Unique Molecular Identity) 格式和序列（基于 FormatFastQ v1 软件）。

- b) 序列比对：将 fastq 文件中的碱基序列比对至人类参考基因组 hg19 (GRCh37) 上生成 bam 文件（基于 BWA v0.7 和 samtools v1.3 软件）。
- c) 碱基校正：使用碱基序列校正模块（基于 SSBC v1 软件），根据 UMI 序列信息，将测序序列中的同源序列聚类，进行碱基校正，去除 PCR 及测序过程中的随机错误。
- d) 突变分析：使用变异检测模块（基于 SSBC-VarScan v1 软件），通过碱基校正后的序列比对文件分析样本中的点突变和插入缺失突变；使用融合检测模块（基于 FusionCaller v1 软件），通过将比对文件中疑似携带融合信号的序列进行拆分、校正，分析样本中的基因融合。
- e) 突变注释：使用变异注释模块（基于 Annotator_v0.2 和 FusionAnnotator_v0.1 软件），对检测到的点突变、插入缺失和基因融合进行 HGVS 格式和 COSMIC 数据库（v77）、CLINVAR 数据库（v20160601）、dbSNP 数据库（v147）、1000Genomes 数据库（v201305）的注释。

3. 结果查看

- 3.1 在分析中心页面，可查看已创建分析的运行进度及状态。待分析完成后，可查看及下载分析结果。
- 3.2 数据质控标准：要求样品覆盖度 (Coverage) 应大于 98%，平均原始深度 (MeanDepth，即原始测序深度) 应大于 10000 \times ，平均有效深度 (SSBCDepth，即单链校正后深度) 应大于 500 \times 。
- 3.3 阳性判断标准：分析结果中，测序有效深度不低于 500 \times ，突变比例不低于 0.4%，突变绝对拷贝数不低于 2，链平衡性介于 0.1-0.9 之间（融合不适用），以上条件同时满足时判断为阳性，否则为阴性或低于试剂盒的检测下限。

【检验结果的解释】

1. 构建好的 DNA 文库总量应大于 0.5 μg ，文库片段长度的主峰应约为 380 bp，否则建库样品不符合要求，应重新建库。
2. 捕获后的样品 DNA 文库总量应大于 50 ng，文库主要片段应与捕获前片段分布保持一致，否则捕获失败，应重新捕获。
3. 测序得到的覆盖度 (Coverage) 应大于 98%，否则实验失败，应重复实验。
4. 测序得到的平均原始深度 (MeanDepth，即原始测序深度) 应大于 10000 \times ，平均有效深度 (SSBCDepth，即单链校正后深度) 应大于 500 \times ，否则测序数据量不足，应重新测序。
5. 阴性对照品的检测结果应为附表 1 和附表 2 所示相应突变类型阴性，若有相关突变检出，说明环境中可能存在 DNA 污染源。
6. 阳性对照品的检测结果应为附表 1 和附表 2 所示 EGFR-T790M、EGFR-L858R、KRAS-G12V 及 GOPC(E8)-ROS1(E35) 对应突变阳性，如果突变未检出，说明试剂盒性能不理想或操作过程有误，此次检测结果无效。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者用药治疗的选择应结合其症状、体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 阴性结果不能完全排除突变或融合基因的存在，样本中肿瘤细胞过少，过度降解或文库中突变或融合的 DNA 浓度低于检测限亦可造成阴性

结果。

- 不合理的样本采集、转运及处理、以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或者假阳性结果。
- 肿瘤组织（细胞）可能存在较大异质性，不同部位取样可能会得到不同的检测结果。
- 本试剂盒仅用于检测保存年限不超过 18 个月的石蜡组织样本，对于超过 18 个月的石蜡组织样本，其提取的 DNA 的检测结果可能受影响。
- 本试剂盒分析性能评估基于每个杂交含 4 个文库进行，对于质量较差的样本，推荐使用 1 个文库单独进行杂交捕获，有利于提高捕获特异性及测序有效深度。
- 本试剂盒仅对目标区域中人类 *EGFR*、*KRAS*、*NRAS*、*PIK3CA*、*BRAF*、*HER2* 和 *MET* 基因突变位点及 *ALK*、*ROS1* 和 *RET* 基因融合位点进行检测（详见附表 1 和附表 2），若检测结果为阴性，不排除检测者带有这些基因的其他突变或融合类型。
- 该检测仅限于规定的样本类型及检测系统。
- 若基因融合发生在高度重复区域中，则存在漏检的可能。

【产品性能指标】

- 试剂盒外观整洁，标记清晰，无漏液。试剂融化后，应澄清，无浑浊，无沉淀。
- 可检测 30 ng 片段化 DNA 样本中含量低至 1% 的基因突变。在 0.5%、1% 和 5% 的突变比例及 10 ng、30 ng 和 50 ng 片段化 DNA 用量下重复检测 20 次，经考察，本试剂盒对 10 ng、30 ng 和 50 ng 片段化 DNA 中含量 1% 和 5% 的突变检出率均高于 95%；采用 3 批试剂对 10 ng 片段化 DNA 中含量为 1% 的突变重复检测 20 次，检出率高于 95%。
- 检测阳性参考品，阳性参考品符合率 100%；检测阴性参考品，阴性参考品符合率 100%。阳性参考品为细胞系 DNA、质粒 DNA 和临床阳性样本，阴性参考品为临床阴性样本和非人类基因组样本。
- 对同一份精密度参考品重复检测 5 次，检测到的突变信息符合率 100%。采用 3 批试剂对强阳性精密度参考品、中阳性精密度参考品、弱阳性精密度参考品和阴性精密度参考品，每天检测 1 次，重复检测 20 次，结果符合率 100%。
- 检测非人类基因组（大肠杆菌）DNA，测序结果显示无相应类型突变，表明本试剂盒与非人类基因组 DNA 无交叉反应。检测涵盖试剂盒所涵盖 33 个位点的 10 份参考品，均检出相应突变类型阳性，不存在交叉反应。
- 临床试验结果：临床试验在 6 家临床机构共同开展，共计完成有效样本 2105 例，包含 1586 例非小细胞肺癌样本（包括腺癌、鳞癌、腺鳞癌和大细胞癌等）、499 例结直肠癌（包含左半结肠、右半结肠和直肠等）和 20 例干扰样本，样本类型为石蜡包埋组织。

（1）合计 1563 例有效样本（含 1248 例非小细胞肺癌、295 例结直肠癌和 20 例干扰样本）参与方法学对比研究。分别考察 *EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*RET*、*KRAS*、*NRAS*、*PIK3CA*、*BRAF*、*HER2*、*MET* 基因的多个突变类型。本试剂盒在非小细胞肺癌样本中共检测出 863 例突变阳性，与对比方法相比，所有突变位点的定性检测结果阳性符合率为 98.99%，阴性符合率为 82.49%，总符合率为 92.95%，Kappa 值=0.8429。结果显示两者具有较好的检测一致性。本试剂盒在结直肠癌样本中共检测出 111 例突变阳性，与对比方法相比，所有突变位点的定性检测

结果阳性符合率为 100%，阴性符合率为 94.36%，总符合率为 96.27%，Kappa 值=0.9190。结果显示两者具有较好的检测一致性。

（2）用已上市的伴随诊断试剂进行比较研究，考察非小细胞肺癌样本中 *EGFR*、*ALK* 及 *ROS1* 基因的多个突变类型以及结直肠癌样本中的 *KRAS* 基因的多个突变类型，与对比方法相比，所有基因的定性检测结果见下表，结果显示两者具有较好的检测一致性。

表 15 伴随诊断试剂对比研究结果

癌症类型	基因型别	阳性符合率	阴性符合率	总符合率	Kappa 值
非小细胞肺癌	<i>EGFR</i>	98.73%	96.45%	97.27%	0.941
非小细胞肺癌	<i>ALK</i>	96.55%	99.49%	99.11%	0.960
非小细胞肺癌	<i>ROS1</i>	87.50%	100.00%	99.57%	0.931
结直肠癌	<i>KRAS</i>	100.00%	96.45%	97.55%	0.944

注：对比研究中，*EGFR* 基因检测对比方法为凯杰公司生产的 *therascreen*[®] *EGFR* RGQ PCR Kit 试剂盒、*ALK* 基因检测对比方法为雅培公司生产的 *Vysis ALK Break Apart FISH* 探针试剂盒及罗氏公司生产的 *VENTANA ALK* 免疫组化（IHC）检测试剂盒、*ROS1* 基因检测对比方法为艾德公司生产的人类 *ROS1* 基因融合检测试剂盒（荧光 PCR 法）、*KRAS* 基因检测对比方法为凯杰公司生产的 *therascreen*[®] *KRAS* RGQ PCR Kit 试剂盒。

（3）回溯性样本药效研究共计 154 例有效样本，包括 131 例非小细胞肺癌和 23 例结直肠癌，其中既往治疗中使用靶向药物吉非替尼片（易瑞沙）治疗 53 例、甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）25 例、克唑替尼胶囊（赛可瑞，*ALK* 阳性）41 例、克唑替尼胶囊（赛可瑞，*ROS1* 阳性）12 例、西妥昔单抗注射液（爱必妥）23 例，本试剂盒检测结果与回溯性病例用药前靶点检测结果均一致，且各靶点人群接受相应靶向药物治疗的客观缓解率均达到了预期临床疗效，结果表明本试剂盒可以帮助 NSCLC 患者和结直肠癌患者选择上述靶向药物的肿瘤靶向治疗方式。

【注意事项】

- 实验前请仔细阅读本说明书，并确定已准备相应试剂及仪器。
- 本试剂盒结果会受到样本本身的来源、样本采集过程、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到样本 DNA 提取质量、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等限制，导致可能得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在风险及检测的局限性。
- 使用前根据样本量只拿出所需数量的试剂，避免在不必要的情况下冻融试剂盒中的试剂。
- 一般 DNA 样本用量以片段化处理并纯化的片段化 DNA 样本 30~50 ng（推荐 50 ng）为宜，但对于质量较差的样本应相应增加 DNA 用量。不同定量方式定量结果相差较大，使用本试剂盒检测时应以核酸定量试剂盒定量为准。
- 检测样本 DNA 的质量非常重要，样本 DNA 提取后应进行质控确定提取质量，并应尽快进行文库构建，否则，所提 DNA 应立即放置于 -20±5℃ 保存。
- 本试剂盒所有试剂均经过特别配制，以用于上述检测。随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能影响使用效果。不同批号试剂盒成分不可相

- 互混用。不要使用超过有效期的试剂。
- 应该严格区分阳性对照试剂和反应试剂的使用，防止污染试剂，造成假阳性。
 - 实验时注意防止外源 DNA 对试剂的污染，注意先加完样品 DNA 后再进行对照品的操作。推荐在制备反应试剂和添加 DNA 模板时，使用单独、专用的移液器和滤芯吸头。
 - 实验完毕用 10% 次氯酸、75% 酒精或紫外灯处理工作台和移液器。
 - 所有化学药品都具有潜在的危险性。操作时，请穿着合适的实验室工作服、并佩戴一次性手套等防护性措施。产品在正确使用过程中不慎溅入眼内应立即用冲眼器或大量清水冲洗眼睛。
 - 所有检测样本和试剂盒中的阳性对照试剂应视为具有传染性的物质，操作和废弃物处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
 - 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194 号或现行有效版本）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。

【标识的解释】

：保持干燥；：向上；：易碎，小心轻放。

【参考文献】

- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-Small Cell Lung Cancer. Version 5. 2018.
- Reungwetwattana T, Dy GK. Targeted therapies in development for non-small cell lung cancer. *J Carcinog*. 2013, 12:22.
- Gridelli C, Peters S, et al. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat Rev*. 2014, 40(2):300-6.
- Katayama R, Kobayashi Y, et al. Cabozantinib overcomes crizotinib resistance in ROS1 fusion-positive cancer. *Clin Cancer Res*. 2015, 21(1):166-74.
- Drilon A, Wang L, et al. Response to Cabozantinib in Patients with RET Fusion-Positive Lung Adenocarcinomas. *Cancer Discov*. 2013, 3(6):630-5.
- Sánchez-Torres JM, Viteri S, et al. BRAF mutant non-small cell lung cancer and treatment with BRAF inhibitors. *Transl Lung Cancer Res*. 2013, 2(3):244-50.
- Stephens P, Hunter C, et al. Lung cancer: Intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature*. 2004, 431(7008):525-6.
- Paik PK, Drilon A, Fan PD, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov*. 2015;5(8):842-849.

- Califano R, Landi L, et al. Prognostic and predictive value of K-RAS mutations in non-small cell lung cancer. *Drugs*. 2012, 72 Suppl 1:28-36.
- Chen JY, Cheng YN, et al. Predictive value of K-ras and PIK3CA in non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs: a systemic review and meta-analysis. *Cancer Biol Med*. 2015, 12(2):126-39.
- National Comprehensive Cancer Network: NCCN Guidelines Colon Cancer (version 3.2018).
- Chan, E. 2018. Molecular Profiling of Colorectal Cancer. *My Cancer Genome* <http://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/> (Updated March 16, 2018).
- Douillard JY, Oliner KS, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013, 369(11):1023-34.
- Di Bartolomeo M, Pietrantonio F, et al. Lack of KRAS, NRAS, BRAF and TP53 mutations improves outcome of elderly metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab, oxaliplatin and UFT. *Target Oncol*. 2014, 9(2):155-62.
- Heinemann V, von Weikersthal LF, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014, 15(10):1065-75.
- De Roock W, Claes B, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010, 11(8):753-62.

【基本信息】

注册人/生产企业/售后服务单位名称：厦门艾德生物医药科技股份有限公司

住所/生产地址：厦门市海沧区鼎山路 39 号

邮编：

电话：

传真：

网址：

E-mail：

生产许可证编号：闽食药监械生产许 20090237 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】

附表 1 试剂盒检测的基因突变类型信息

突变命名	外显子	突变名称	碱基变化	Cosmic ID
Ex18-M1	EGFR 18 号外显子	G719A	2156G>C	6239
Ex18-M2		G719S	2155G>A	6252
Ex18-M3		G719C	2155G>T	6253

Ex19-M1	EGFR 19 号外显子	E746_A750del	2235_2249del15	6223
Ex19-M2		E746_A750del	2236_2250del15	6225
Ex19-M3		L747_P753delinsS	2240_2257del18	12370
Ex19-M8		E746_S752delinsV	2237_2255delinsT	12384
Ex19-M15		L747_A750delinsP	2239_2248delinsC	12382
Ex19-M18		L747_T751del	2240_2254del15	12369
Ex20-M1	EGFR 20 号外显子	T790M	2369C>T	6240
Ex20-M2		S768I	2303G>T	6241
Ex20-M4		D770_N771insG	2310_2311insGGT	12378
Ex21-M1	EGFR 21 号外显子	L858R	2573T>G	6224
Ex21-M2		L861Q	2582T>A	6213
KRAS-M1	KRAS 2 号外显子	G12D	35G>A	521
KRAS-M2		G12A	35G>C	522
KRAS-M3		G12V	35G>T	520
KRAS-M4		G12S	34G>A	517
KRAS-M6		G12C	34G>T	516
KRAS-M17	KRAS 3 号外显子	Q61H	183A>C	554
NRAS-M3	NRAS 2 号外显子	G12D	35G>A	564
NRAS-M1	NRAS 3 号外显子	Q61R	182A>G	584
NRAS-M2		Q61K	181C>A	580
PI-M1	PIK3CA 21 号外显子	H1047R	3140A>G	775
BRAF-M1	BRAF 15 号外显子	V600E	1799T>A	476
HER-M2	HER2 20 号外显子	A775_G776insYVMA	2324_2325ins12*	20959
MET-M2	MET 14 号内含子	-	3082+1G>T	24687

注: HER-M2 的 12 bp 插入碱基为 ATACGTGATGGC。

附表 2 试剂盒检测的基因融合类型信息

融合命名	融合基因	融合类型	Cosmic ID
EA-M1	ALK	EML4 exon 13; ALK exon 20	463
EA-M2		EML4 exon 6; ALK exon 20	474
EA-M3		EML4 exon 20; ALK exon 20	465
ROS1-M8	ROS1	CD74 exon6; ROS1 exon 34	1201
ROS1-M13		GOPC exon 8; ROS1 exon 35	1251
RET-M15	RET	KIF5B exon 15; RET exon 12	1233

附表 3 序列信息

名称	Sample Sheet Index 信息 (NextSeq)	对应 TruSeq HT Sample Prep Kits 编号	名称	Sample Sheet Index 信息 (NextSeq)	对应 TruSeq HT Sample Prep Kits 编号
LC-D701	ATTACTCG	D701	LC-D501	AGGCTATA	D501
LC-D702	TCCGGAGA	D702	LC-D502	GCCTCTAT	D502
LC-D703	CGCTCATT	D703	LC-D503	AGGATAGG	D503
LC-D704	GAGATTCC	D704	LC-D504	TCAGAGCC	D504
LC-D705	ATTCAGAA	D705	LC-D505	CTTCGCCT	D505
LC-D706	GAATTCGT	D706	LC-D506	TAAGATTA	D506
LC-D707	CTGAAGCT	D707	LC-D507	ACGTCCTG	D507
LC-D708	TAATGCGC	D708	LC-D508	GTCAGTAC	D508
LC-D709	CGGCTATG	D709			
LC-D710	TCCGCGAA	D710			
LC-D711	TCTCGCGC	D711			
LC-D712	AGCGATAG	D712			

