

راهنمای کیت EGFR RQ

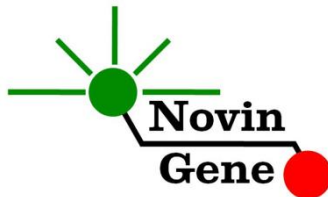
جهت بررسی جهش های EGFR
به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-42-102

ویرایش ۱/۲

پاییز ۱۴۰۰



فهرست مندرجات

۱. مقدمه ۲
۲. محتویات کیت ۴
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت ۴
۴. سایر موارد مورد نیاز ۵
۵. نکات قابل توجه ۵
۶. نمونه مناسب ۶
۷. استخراج DNA ۶
۸. روش کار: بررسی کیفیت DNA نمونه ۷
۹. تنظیم دستگاه Real-Time PCR ۸
۱۰. آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه ۸
۱۱. روش کار: بررسی جهش های EGFR ۱۱
۱۲. آنالیز نتایج برای جهش های EGFR ۱۳
۱۳. حساسیت ۲۳

کیت EGFR RQ جهت بررسی و تشخیص ۳۴ نوع جهش سوماتیک در انکوژن EGFR با استفاده از دستگاه Real-Time PCR طراحی شده است. این کیت مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

انکوژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)، یک گیرنده تیروزین کینازی است که نقش مهمی در تنظیم رشد بافت پوششی و تمایز سلولی دارد. جهش در این انکوژن سبب افزایش فعالیت آن شده و در انواعی از سرطان ها از جمله سرطان ریه و گلیوبلاستوما گزارش شده است. با توجه به اینکه جهش های EGFR نقش تعیین کننده ای در انتخاب درمان دارند، بررسی آنها به ویژه در سرطان ریه، برای انتخاب نوع درمان الزامی است. این جهش ها در اگزون های ۱۸، ۱۹، ۲۰ و ۲۱ اتفاق می افتد. کیت حاضر مواد لازم برای تشخیص ۳۴ نوع از مهمترین جهش های این اگزون ها را به روش Real-Time PCR فراهم می کند. این جهش ها شامل ۳ جهش نقطه ای در اگزون ۱۸ (G719A, G719S, G719C) بدون امکان تفکیک آنها از یکدیگر، ۲۴ جهش حذفی در اگزون ۱۹ (بدون امکان تفکیک آنها از یکدیگر)، سه نوع جهش (insertion) (بدون امکان تفکیک آنها از یکدیگر) و دو جهش نقطه ای در اگزون ۲۰ (T790M و S768I) و دو جهش نقطه ای در اگزون ۲۱ (L858R, L861Q) می باشد. این جهش ها در جدول شماره یک به تفکیک ذکر شده اند.

Exon	Mutation	Cosmic* ID	Base change
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Deletions	6210	2240_2251 del 12
		6218	2239_2247 del 9
		6220	2238_2255 del 18
		6223	2235_2249 del 15

		6225	2236_2250 del 15
		6254	2239_2253 del 15
		6255	2239_2256 del 18
		12367	2237_2254 del 18
		12369	2240_2254 del 15
		12370	2240_2257 del 18
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C
		12383	2239_2251>C
		12384	2237_2255>T
		12385	2235-2255delinsAAT
		12387	2239_2258>CA
		12403	2239-2256delinsCCA
		12419	2238_2252>GCA
		12422	2238_2248>GC
		12678	2237_2251 del 15
		12728	2236_2253 del 18
		13550	2235-2248delinsAATTC
		13551	2235_2252>AAT
		13552	2235-2251delinsAATTC
		23571	Del 2238-2252
20	S768I	6241	2303G>T
	Insertion	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
T790M	6240	2369C>T	
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

جدول ۱: جهش های قابل شناسایی EGFR با کیت نوین ژن

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

در روش Real-Time PCR با استفاده از پروب های نشان دار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. بنابراین علاوه بر کاهش زمان آزمایش،

امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از ناکارآمدی استخراج و یا مهار PCR پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل دفترچه راهنما، لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

حجم	تعداد	محتوا	برچسب
۴۸۰ میکرولیتر	۲	میکس PCR برای کنترل کیفی DNA	EGFR Ctrl Mix
۴۸۰ میکرولیتر	۱	میکس PCR برای بررسی جهش های G719A, G719S, G719C	G719X Mix
۴۸۰ میکرولیتر	۱	میکس PCR برای بررسی Exon 19 Deletions	19Del Mix
۴۸۰ میکرولیتر	۱	میکس PCR برای بررسی Exon 20 Insertions	20Ins Mix
۴۸۰ میکرولیتر	۱	میکس PCR برای جهش S768I	S768I Mix
۴۸۰ میکرولیتر	۱	میکس PCR برای جهش T790M	T790M Mix
۴۸۰ میکرولیتر	۱	میکس PCR برای جهش L858R	L858R Mix
۴۸۰ میکرولیتر	۱	میکس PCR برای جهش L861Q	L861Q Mix
۲۵۰ میکرولیتر	۱	شاهد مثبت	EGFR Pos
۲۵۰ میکرولیتر	۱	شاهد منفی	EGFR Neg
۲۰۰ میکرولیتر	۱	آب مخصوص PCR	Water

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت که در جدول بالا ذکر شده است باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضای کیت

که روی کیت و نیز روی هر تیوب درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر و بیش از سه بار این مواد به ویژه میکس PCR خودداری کنید، زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- ورتکس (Vortex Mixer)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA و تجهیزات و مواد مصرفی مورد نیاز
- میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به میکروتیوب های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به میکروتیوب PCR) می

باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آن ها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب

نمونه مناسب بلوک پارافینی (بافت فیکس شده در فرمالین) و یا بافت فیکس نشده می تواند باشد. توجه داشته باشید که بافت تومور نا همگن بوده و تجمع سلولهای جهش یافته در نقاط مختلف تومور یکسان نیست. بنابراین نتیجه آزمایش از نظر وجود جهش EGFR با این کیت برای نقاط مختلف بافت تومور یکسان نخواهد بود.

۷. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه بافتی از روش ها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می نمایم:

- QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Cat. no. 51404, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

- Roche; High Pure FFPE DNA Isolation Kit (Cat. No. 06 650 767 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

توجه داشته باشید که میزان DNA لازم برای انجام تست، حداقل ۴۰ میکرولیتر و ترجیحا ۱۰۰ میکرولیتر می باشد تا در صورت نیاز، امکان تکرار تست وجود داشته باشد. همچنین غلظت نمونه می باید ۵ تا ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر باشد.

۸. روش کار: بررسی کیفیت DNA نمونه

پیش از بررسی نمونه برای وجود جهش های EGFR، ابتدا باید از کیفیت DNA استخراج شده از نمونه بیمار اطمینان یافت و در صورتی که نتایج در محدوده مطلوب باشد آنگاه، آزمایش دوم که بررسی جهش های ژن EGFR می باشد انجام خواهد شد. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه بیمار به شرح زیر عمل نمایید.

توجه! حجم نمونه DNA را بررسی کنید و مطمئن شوید که بیش از ۴۰ میکرولیتر و ترجیحا حدود ۱۰۰ میکرولیتر می باشد. در صورتیکه میزان نمونه کمتر از ۴۰ میکرولیتر باشد امکان انجام آزمایش وجود ندارد!

ابتدا تیوب میکس کنترل (**EGFR Ctrl Mix**) را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آن ذوب شود. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن را در دور پایین، سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز میکروتیوب را بر روی بلوک سرد بگذارید. در این سری، علاوه بر یک میکروتیوب برای نمونه هر بیمار، دو میکروتیوب دیگر برای شاهد منفی و نمونه آب در نظر بگیرید.

به هر میکروتیوب، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از **EGFR Ctrl Mix** و سپس ۵ میکرولیتر از DNA نمونه، شاهد مثبت، شاهد منفی و آب اضافه کنید و

درپوش میکروتیوب ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

۹. تنظیم دستگاه Real-Time PCR

در صورتی که از دستگاه Rotor-Gene و یا StepOne استفاده می کنید، برای تنظیم دستگاه می توانید از فایل تمپلیت در لوح فشرده همراه کیت استفاده نمایید. همچنین می توانید این فایل ها را از وبسایت نوین ژن به آدرس www.novingene.com نیز دانلود نمایید. هنگام کار با RotorGene با توجه به نوع میکروتیوب استفاده شده، فایل "EGFR 0.2" و یا "EGFR 0.1" را انتخاب نمایید و اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید! برای تنظیم سایر دستگاه ها از جدول زیر استفاده نمایید.

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و در کانال های FAM/Green و VIC/Yellow تنظیم شود. میکس های کیت حاوی ROX می باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

۱۰. آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه

تحلیل نتایج آزمایش کنترل کیفیت DNA بیمار در دو مرحله انجام می شود. در مرحله نخست باید با بررسی نتایج شاهد های مثبت و منفی اطمینان یافت که آزمایش از نظر کیفی به نحو مطلوب انجام شده است و سپس می توان نتایج نمونه بیمار را آنالیز نمود.

برای تحلیل نتایج آستانه (threshold) را برای هر دو کانال FAM/Green و VIC/Yellow روی ۰/۰۵ قرار دهید.

در نظر داشته باشید که افزایش تابش FAM/Green مربوط به DNA نمونه بیمار و افزایش تابش VIC/Yellow حاصل از کنترل داخلی می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.

الف- بررسی شاهدهای منفی. در صورتی که:

- ۱) نمونه آب در کانال FAM/Green، منفی و در کانال VIC/Yellow، مثبت و دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد و
- ۲) نمونه شاهد منفی در کانال FAM/Green، مثبت و دارای CT بین ۲۳ تا ۲۸ و در کانال VIC/Yellow، مثبت و دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد،

آن گاه نتایج آزمایش معتبر است. اکنون می توانید نمونه بیمار را بررسی نمائید. نتایج بررسی نمونه های شاهد و شرایط اعتبار آزمایش به طور خلاصه در جدول یک آمده است.

VIC/Yellow	FAM/Green	نمونه
Pos (CT 27-33)	Neg	آب / NTC
Pos (CT 27-33)	Pos (CT 23-28)	شاهد منفی

جدول ۲. نتایج مورد انتظار در بررسی کیفیت DNA نمونه

توجه داشته باشید نمونه بیمار تنها زمانی قابل بررسی خواهد بود که نمونه های شاهد دارای شرایط فوق باشند. در غیر این صورت، آزمایش غیر معتبر بوده و کلیه نتایج فاقد ارزش می باشد.

ب- بررسی نمونه بیمار:

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال FAM/Green دارای CT بین ۲۲ تا ۳۰ و در کانال VIC/Yellow دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد، نتیجه قابل قبول است و می‌توانید آزمایش بررسی جهش EGFR را شروع نمایید. برای افزایش حساسیت تست، مطلوب آن است که نمونه بیمار در کانال FAM/Green دارای CT بین ۲۲ تا ۲۷ باشد.

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال FAM/Green دارای CT کمتر از ۲۲ و در کانال VIC/Yellow دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد، نمونه باید با آب رقیق شود تا CT آن در محدوده ۲۲ تا ۲۷ قرار گیرد. در نظر داشته باشید که به ازای دو برابر رقیق سازی نمونه، CT آن یک واحد افزایش می یابد. پس از رقیق سازی نمونه می‌توانید آزمایش بررسی EGFR را شروع نمایید.

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال FAM/Green دارای CT بالاتر از ۳۰ باشد، نتیجه قابل قبول نیست. در این حالت استخراج دوباره نمونه توصیه می شود.

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال VIC/Yellow دارای CT بالاتر از ۳۳ باشد، نتیجه نامعتبر است. این حالت می تواند ناشی از خطا در آزمایش و یا وجود عوامل مزاحم در نمونه استخراج شده باشد. خلاصه بررسی حالات مختلف نتایج نمونه بیمار در جدول سه آمده است.

	FAM/Green	VIC/Yellow	Result
1	+ CT: 22-30	+ CT: 27-33	Valid
2	+ CT<22	+ CT: 27-33	Sample dilution
3	+ CT>30	+ CT: 27-33	Invalid
4	+ CT: 22-30	+ CT>33	Invalid

جدول ۳. بررسی نتایج کنترل کیفی DNA نمونه

پس از بررسی کیفیت DNA نمونه، تحلیل داده ها و در موارد لازم، تنظیم غلظت نمونه ها، بررسی جهش های EGFR انجام می شود.

۱۱. روش کار: بررسی جهش های EGFR

برای بررسی جهش های EGFR، هر نمونه باید با هشت میکس آزمایش شود. در این آزمایش ۳۴ نوع جهش ژن EGFR (مطابق جدول ۱) با هفت میکس موجود در کیت، در میکروتیوب های جداگانه بررسی می شوند. علاوه بر هفت میکروتیوب مذکور، یک میکروتیوب نیز به بررسی نمونه با میکس کنترل اختصاص می یابد. بنابراین برای بررسی یک نمونه بیمار، ۸ میکروتیوب برای آزمایش نمونه، ۸ میکروتیوب برای آزمایش شاهد مثبت و ۸ میکروتیوب برای آزمایش شاهد منفی و ۸ میکروتیوب برای آزمایش بدون DNA یعنی آب مورد نیاز می باشد و مجموعاً ۳۲ میکروتیوب استفاده می شود. برای بررسی همزمان دو نمونه بیمار ۴۰ میکروتیوب و برای بررسی همزمان سه نمونه بیمار ۴۸ میکروتیوب مورد نیاز می باشد.

به عنوان مثال برای بررسی سه نمونه بیمار، مطابق تصویر یک، هشت ردیف شش تایی میکروتیوب مورد نیاز است. هر ردیف عمودی یا ستون برای یکی از شاهد های مثبت، منفی یا نمونه بیمار استفاده می شود و در مجموع برای

EGFR RQ (V1.2)

آزمایش ۳ نمونه، به ۲۴ میکروتیوب برای نمونه ها و ۲۴ میکروتیوب برای شاهد‌ها نیاز داریم که مجموعاً ۴۸ لوله خواهد بود که به صورت ۶ ستون ۸ تایی مرتب شده اند. بر این اساس، تعداد مورد نیاز لوله PCR را به صورت ستون‌های شش تایی روی بلوک سرد بگذارید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف اول ۲۰ میکرولیتر از **EGFR Ctrl Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف دوم ۲۰ میکرولیتر از **G719X Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف سوم ۲۰ میکرولیتر از **19Del Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف چهارم ۲۰ میکرولیتر از **20Ins Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف پنجم ۲۰ میکرولیتر از **S768I Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف ششم ۲۰ میکرولیتر از **T790M Mix** اضافه کنید.

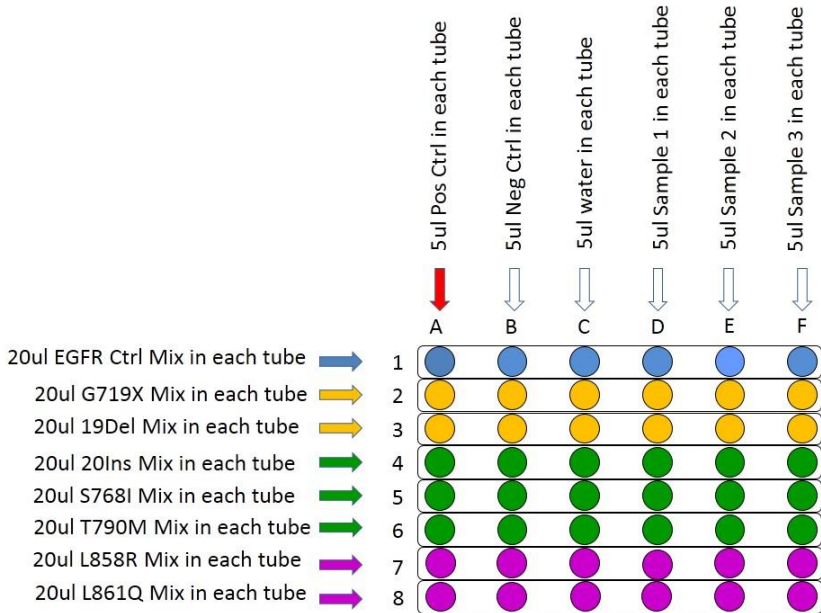
به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف هفتم ۲۰ میکرولیتر از **L858R Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف هشتم ۲۰ میکرولیتر از **L861Q Mix** اضافه کنید.

سپس ۵ میکرولیتر از **شاهد**، آب و DNA استخراج شده، به هر میکروتیوب اضافه کنید. به این منظور ستون اول را برای شاهد مثبت،

ستون دوم و سوم را برای شاهد منفی و آب و ستون های بعدی را برای نمونه های بیماران در نظر بگیرید.

چیدمان تیوب ها به طور خلاصه در تصویر یک نشان داده شده است.



تصویر ۱. چیدمان میکروتیوب ها و اضافه نمودن میکس، شاهد ها و نمونه های بیماران در پوش میکروتیوب ها را ببندید، سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید. دستگاه را مطابق توضیحات بخش ۹ دفترچه تنظیم نمایید.

۱۲. آنالیز نتایج برای جهش های EGFR

تحلیل نتایج آزمایش جهش های EGFR در دو مرحله انجام می شود. در مرحله نخست با توجه به نتایج شاهد های مثبت و منفی باید اطمینان یافت که آزمایش از نظر کیفی به نحو مطلوب انجام شده است، سپس می توان نتایج نمونه بیمار را آنالیز نمود. بنابراین ابتدا نتایج شاهد های مثبت و منفی و همچنین نتیجه نمونه

بیمار با میکس کنترل مورد بررسی قرار می گیرند و سپس نتایج هر یک از هفت میکس اختصاصی جهش ها برای نمونه بیمار تحلیل می شود. برای تحلیل نتایج آستانه (threshold) را برای هر دو کانال FAM/Green و VIC/Yellow روی ۰/۰۵ قرار دهید. در نظر داشته باشید که افزایش تابش FAM/Green مربوط به DNA نمونه بیمار و افزایش تابش VIC/Yellow حاصل از کنترل داخلی می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.

الف - کنترل کیفی آزمایش

در صورتی که:

- ۱) نمونه آب در کانال FAM/Green با کلیه میکس ها منفی باشد، و
- ۲) هر سه شاهد مثبت و منفی و شاهد آب در کانال VIC/Yellow با هر یک از میکس ها، دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشند، و
- ۳) شاهد مثبت با میکس کنترل در کانال FAM/Green دارای CT بین ۲۲ تا ۲۷ باشد و
- ۴) شاهد مثبت در کانال FAM/Green با همه میکس های اختصاصی دارای CT بین ۲۷ تا ۳۵ باشد،
- ۵) نمونه بیمار در کانال VIC/Yellow با میکس کنترل دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد،

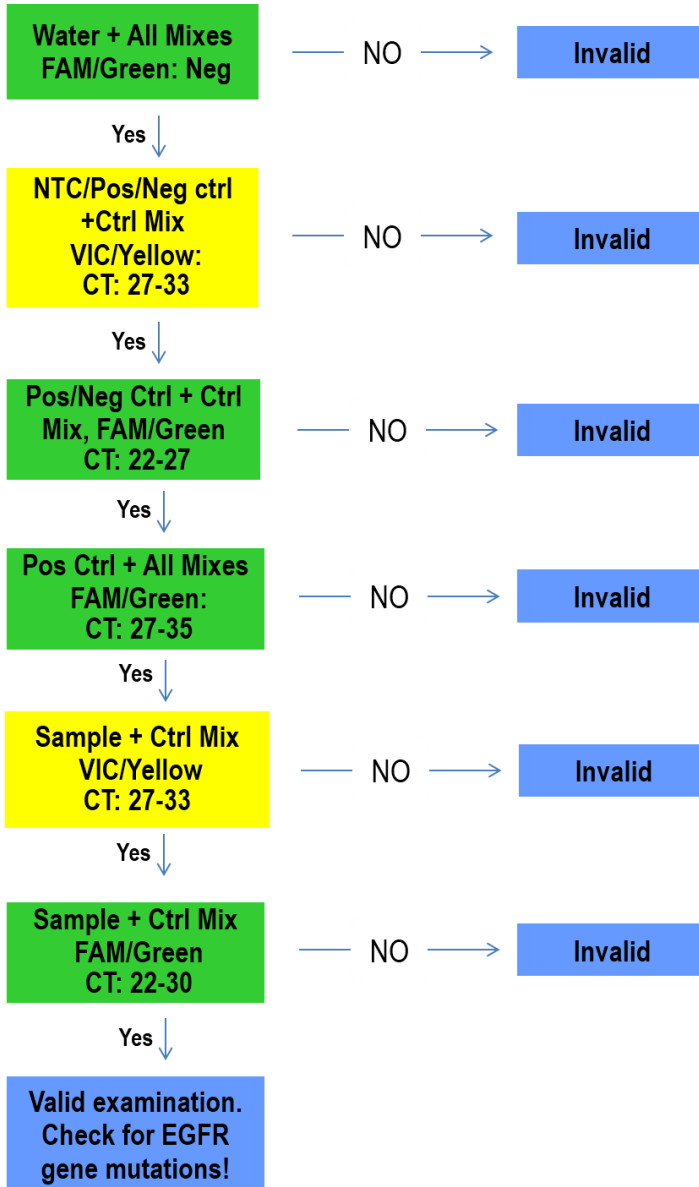
۶) نمونه بیمار در کانال FAM/Green با میکس کنترل دارای CT بین ۲۲ تا ۳۰ باشد،

آن گاه نتایج آزمایش معتبر است. اکنون می توانید نمونه بیمار را از نظر جهش های EGFR بررسی نمائید.

توجه داشته باشید جهش های EGFR تنها زمانی قابل بررسی خواهند بود که نمونه آب، شاهد مثبت و نمونه بیمار دارای شرایط فوق باشند. در غیر این صورت، آزمایش غیر معتبر بوده و کلیه نتایج فاقد ارزش می باشد.

توالی بررسی نمونه ها در کنترل کیفی تست بررسی جهش های EGFR به طور خلاصه در نمودار یک آمده است.

EGFR RQ (V1.2)



نمودار ۱. بررسی کنترل کیفی آزمایش جهش های EGFR

ب- تحلیل نتایج بررسی جهش های EGFR

- (۱) میکروتیوب هایی را که در آنها نمونه بیمار با یکی از میکس های اختصاصی در کانال FAM/Green مثبت شده و CT آن بین ۲۰ تا ۴۰ میباشد انتخاب نمائید و مقادیر آن را در جدول شماره سه ثبت نمائید.
- (۲) برای میکروتیوب های مشخص شده، ΔCT را محاسبه نمائید یعنی میزان اختلاف CT نمونه بیمار در میکس اختصاصی با CT آن در میکس کنترل. این محاسبه بر اساس مقادیر CT نمونه در کانال FAM/Green می باشد. به طور ساده:

$$\Delta CT = \text{Mutation Mix CT} - \text{Control Mix CT}$$

- (۳) سپس داده های بدست آمده را در جدول چهار ثبت نمائید. در صورتی که نتیجه در محدوده قابل قبول باشد، نمونه دارای جهش و مثبت می باشد.

نتیجه	ΔCT نمونه	ΔCT قابل قبول	CT نمونه	CT قابل قبول	میکس EGFR مورد بررسی
		-		۲۲-۳۰	EGFR Ctrl Mix
		$\leq 7/4$		۲۰-۴۰	G719X Mix
		$\leq 7/5$		۲۰-۴۰	19Del Mix
		$\leq 6/9$		۲۰-۴۰	20Ins Mix
		$\leq 10/3$		۲۰-۴۰	S768I Mix
		$\leq 8/2$		۲۰-۴۰	T790M Mix
		$\leq 10/2$		۲۰-۴۰	L858R Mix
		≤ 10		۲۰-۴۰	L861Q Mix

جدول ۴. مقادیر قابل قبول CT و ΔCT در بررسی نمونه های بیماران و تفسیر آن

به عنوان مثال، در صورتی که CT نمونه بیمار با میکس کنترل ۲۵/۳، با میکس G719X معادل ۳۸/۴، با میکس 19Del برابر ۳۳/۲، با میکس 20Ins برابر

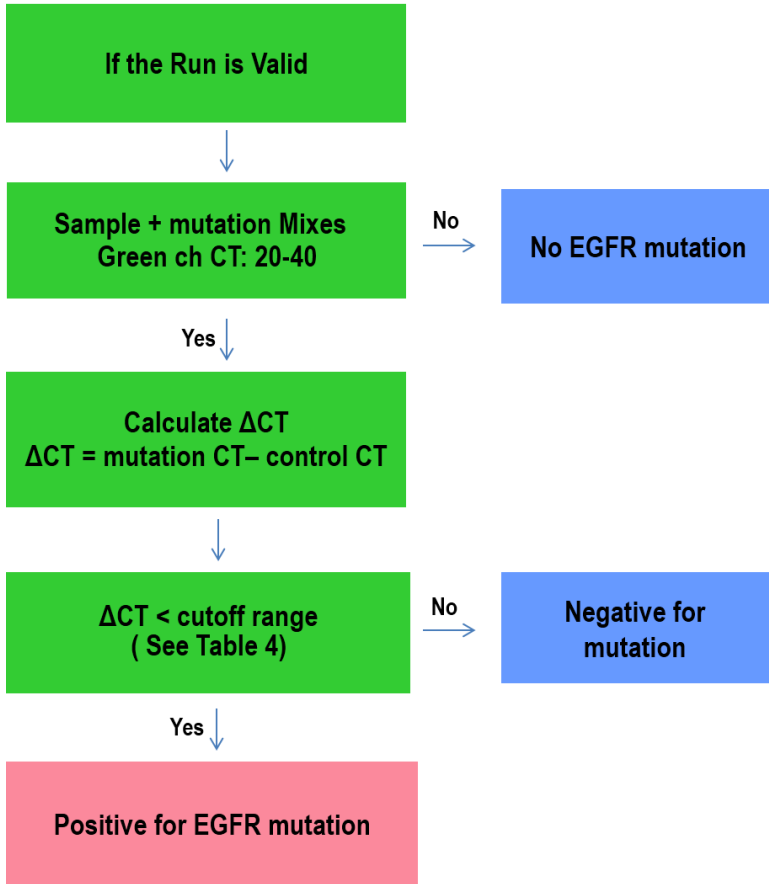
۳۶/۸، در میکس S768I برابر ۴۰، با میکس T790M برابر ۳۶/۹، با میکس L858R برابر ۴۰ و با میکس L861Q برابر ۴۰ باشد، اختلاف CT ها برای میکس G719X، ۱۳/۱ (۲۵/۳ - ۳۸/۴) و برای میکس 19Del ۷/۰ (۲۵/۳ - ۳۲/۳)، برای میکس 20Ins برابر با ۱۱/۵ (۲۵/۳ - ۳۶/۸)، برای میکس S768I معادل ۱۴/۷، برای میکس T790M، ۱۱/۶ و برای میکس L858R برابر ۱۴/۷ و برای میکس L861Q برابر با ۱۴/۷ خواهد بود (جدول چهارم). اکنون نتایج برای برای میکس 19Del در محدوده قابل قبول می‌باشد. در این حالت بیمار برای جهش 19Del مثبت است.

نتیجه	Δ CT نمونه	Δ CT قابل قبول	CT نمونه	CT قابل قبول	میکس EGFR مورد بررسی
قابل قبول	-	-	۲۵/۳	۲۲-۳۰	EGFR Ctrl Mix
منفی	۱۳/۱	$\leq 7/4$	۳۸/۴	۲۰-۴۰	G719X Mix
مثبت	۷/۰	$\leq 7/5$	۳۲/۳	۲۰-۴۰	19Del Mix
منفی	۱۱/۵	$\leq 6/9$	۳۶/۸	۲۰-۴۰	20Ins Mix
منفی	۱۴/۷	$\leq 10/3$	۴۰	۲۰-۴۰	S768I Mix
منفی	۱۱/۶	$\leq 8/2$	۳۶/۹	۲۰-۴۰	T790M Mix
منفی	۱۴/۷	$\leq 10/2$	۴۰	۲۰-۴۰	L858R Mix
منفی	۱۴/۷	≤ 10	۴۰	۲۰-۴۰	L861Q Mix

جدول ۵. نمونه ای از جدول ثبت داده ها برای یک نمونه بیمار.

نکته: Δ CT قابل قبول که در جدول ۴ ذکر شده تنها در صورتی معتبر است که در هر بار تکرار تست، کنترل مثبت و منفی کیت گذاشته شود. به این ترتیب مقادیر Δ CT را برای کنترل مثبت و کنترل منفی نیز محاسبه کرده تا از صحت جواب های تست اطمینان حاصل شود.

توجه داشته باشید در که نمونه طبیعی و فاقد جهش نیز می تواند با میکس های فوق، واکنش غیر اختصاصی داشته باشد، اما در این حالت، مقدار اختلاف CT آن (ΔCT) همواره از میزان قابل قبول ذکر شده در جدول چهار بیشتر خواهد بود. به عبارت دیگر، اگرچه وجود CT در محدوده ۲۰ تا ۴۰، شرط اولیه بررسی نمونه می باشد، اما در نهایت معیار مثبت یا منفی بودن نمونه، اختلاف CT (ΔCT) محاسبه شده برای آن است، نه مقدار CT. نمودار دو، مراحل بررسی نمونه بیمار را برای شناسایی جهش های EGFR نشان می دهد.



نمودار ۲. مراحل بررسی نتایج نمونه بیمار برای شناسایی جهش های ژن EGFR در کانال FAM/Green

بر این اساس نتایج هر واکنش به صورت زیر تفسیر می شود:

- در صورتی که یک نمونه در همه میکس های EGFR در کانال FAM/Green، منفی یا دارای CT بالاتر از ۴۰ باشد، نمونه از نظر جهش EGFR منفی است.

- در صورتی که نمونه در یک یا چند میکس EGFR در کانال FAM/Green دارای CT بین ۲۰ تا ۴۰ و ΔCT بیشتر از مقدار قابل قبول (مقادیر جدول چهار) باشد، نمونه از نظر جهش EGFR **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در کانال FAM/Green با یکی از میکس های هفت گانه EGFR دارای CT و ΔCT قابل قبول (مقادیر جدول چهار) باشد، از نظر جهش مورد نظر **مثبت** است. به طور خلاصه، اگر نمونه:
 - با میکس G719X دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 7/4$ باشد، دارای جهش G719X است. توجه داشته باشید این کیت جهش های G719A, G719C و G719S را از هم تفکیک نمی کند.
 - با میکس 19Del دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 7/5$ باشد، دارای جهش 19Del است. توجه داشته باشید این کیت قادر به تشخیص ۲۴ جهش حذفی در اگزون ۱۹ می باشد اما جهش های فوق را از هم تفکیک نمی کند (جدول ۱).
 - با میکس 20Ins دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 6/9$ باشد، دارای جهش 20Ins است. توجه داشته باشید این کیت قادر به تشخیص ۳ جهش Insertion در اگزون ۲۰ می باشد اما جهش های فوق را از هم تفکیک نمی کند (جدول ۱).
 - با میکس S768I دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 10/3$ باشد، دارای جهش S768I است.
 - با میکس T790M دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 8/2$ باشد، دارای جهش T790M است.

EGFR RQ (V1.2)

○ با میکس L858R دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 10/2$ باشد، دارای جهش L858R است.

○ با میکس L861Q دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 10$ باشد، دارای جهش L861Q است.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش EGFR در جدول شش آمده است.

نتیجه گیری	ΔCT نمونه	CT نمونه	میکس EGFR
برای جهش های G719A/ G719S/ منفی G719C	-	>40	G719X Mix
برای جهش های G719A/ G719S/ منفی G719C	$>7/4$	20-40	
برای جهش های G719A/ G719S/ مثبت G719C	$\leq 7/4$	20-40	
برای Exon 19 Deletions منفی	-	>40	19Del Mix
برای Exon 19 Deletions منفی	$>7/5$	20-40	
برای Exon 19 Deletions مثبت	$\leq 7/5$	20-40	
برای Exon 20 Insertions منفی	-	>40	20Ins Mix
برای Exon 20 Insertions منفی	$>6/9$	20-40	
برای Exon 20 Insertions مثبت	$\leq 6/9$	20-40	
برای جهش S768I منفی	-	>40	S768I Mix
برای جهش S768I منفی	$>10/3$	20-40	
برای جهش S768I مثبت	$\leq 10/3$	20-40	
برای جهش T790M منفی	-	>40	T790M Mix
برای جهش T790M منفی	$>8/2$	20-40	
برای جهش T790M مثبت	$\leq 8/2$	20-40	
برای جهش L858R منفی	-	>40	L858R Mix

برای جهش L858R منفی	$>10/2$	۲۰-۴۰	
برای جهش L858R مثبت	$\leq 10/2$	۲۰-۴۰	
برای جهش L861Q منفی	-	>40	L861Q Mix
برای جهش L861Q منفی	>10	۲۰-۴۰	
برای جهش L861Q مثبت	≤ 10	۲۰-۴۰	

جدول ۶. تفسیر نتایج آزمایش EGFR

توجه داشته باشید در صورتیکه نمونه با این کیت از نظر جهش های EGFR منفی باشد حالات زیر را نیز باید در نظر گرفت:

- نمونه از نظر جهش های بررسی شده EGFR منفی است.
- نمونه از نظر جهش های بررسی شده EGFR مثبت است اما درصد آن کمتر از حساسیت کیت می باشد.
- نمونه از نظر جهش های بررسی شده (مطابق جدول ۱) منفی است اما می تواند برای سایر جهش های EGFR مثبت می باشد.

۱۳. حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت معادل درصدی از DNA جهش یافته است که قابل شناسایی می باشد. برای ارزیابی حساسیت این کیت، پلاسمید حاوی جهش مورد نظر در DNA انسانی رقیق شده و سپس مورد آزمایش قرار گرفته است. توجه داشته باشید در صورت کاهش غلظت DNA نمونه، حساسیت نیز کاهش می یابد و حداکثر حساسیت کیت زمانی قابل وصول است که CT نمونه در کانال FAM/Green با میکس کنترل بین ۲۲ تا ۲۷ باشد. در صورتی که این مقدار بین ۲۸ تا ۳۰ باشد برای برخی از جهش ها میزان حساسیت کاهش می یابد. برای جزئیات بیشتر به جدول هفت مراجعه نمائید.

واکنش مورد بررسی	CT در میکس کنترل: ۲۲ تا ۲۷
G719X Mix	۲٪
19Del Mix	۱٪
20Ins Mix	۲٪
S768I Mix	۱٪
T790M Mix	۸٪
L858R Mix	۱٪
L861Q Mix	۱٪

جدول ۷. میزان حساسیت بر حسب درصد DNA جهش یافته

EGFR RQ Kit Manual

**For Real-Time PCR
Detection of EGFR Mutations**

Research use only

NG-WI-ASL-42-102
Version 1.2
Autumn 2021

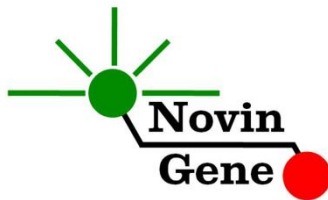


Table of Contents:

1. Introduction.....	2
2. Kit Contents.....	4
3. Storage and Stability	4
4. General Precautions.....	5
5. Additionally Required Items.....	5
6. Specimen	5
7. DNA Extraction	6
8. Protocol: DNA Sample Assessment.....	6
9. Programming Real-Time PCR.....	7
10. Analysis: Sample Assessment.....	7
11. Protocol: Detection of EGFR mutation.....	9
12. EGFR Mutation Detection Analysis.....	11
13. Analytical Sensitivity	19

EGFR RQ kit is intended for the detection of 34 somatic mutations in the EGFR gene. This kit is designed for use with Real-Time PCR machine. This kit is for research use only!

1- Introduction

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), is a tyrosine kinase receptor and is considered as an oncogene. EGFR is involved in regulation of cellular proliferation, differentiation and survival. Mutations in EGFR exons 18, 19, 20 and 21 are associated with the development of different human cancers specially None Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC), and glioblastoma. Since, the choice of anti-EGFR therapies are highly dependent on the EGFR mutations, it is essential that patients are tested for these mutations.

This kit provides ready to use reagents for detection of 34 mutations. Detected mutations include three point mutations in exon 18 (G719A, G719S and G719C without differentiating them), 24 deletions in exon 19 (without differentiation between them), three insertion (without differentiation between them) and two point mutation in exon 20 (S768I and T790M) and two point mutations in exon 21 (L858R, L861Q). For more information see table1.

Exon	Mutation	Cosmic* ID	Base change
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Deletions	6210	2240_2251 del 12
		6218	2239_2247 del 9

		6220	2238_2255 del 18
		6223	2235_2249 del 15
		6225	2236_2250 del 15
		6254	2239_2253 del 15
		6255	2239_2256 del 18
		12367	2237_2254 del 18
		12369	2240_2254 del 15
		12370	2240_2257 del 18
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C
		12383	2239_2251>C
		12384	2237_2255>T
		12385	2235-2255delinsAAT
		12387	2239_2258>CA
		12403	2239-2256 delinsCCA
		12419	2238_2252>GCA
		12422	2238_2248>GC
		12678	2237_2251 del 15
		12728	2236_2253 del 18
		13550	2235-2248delinsAATTC
		13551	2235_2252>AAT
		13552	2235-2251delinsAATTC
		23571	Del 2238-2252
20	S768I	6241	2303G>T
	Insertion	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
T790M	6240	2369C>T	
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

Table1: EGFR mutations detected by NovinGene kit.

* COSMIC:Catalogue of somatic mutations in cancer: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

This kit is based on based on Real-Time PCR technology. In this method application of fluorescent probes and analysis of

fluorescent kinetics allows detection of amplified product without requiring post-amplification analysis. Therefore, test is accomplished much faster and possibility of contamination with the PCR product is reduced sharply. This kit also includes internal control for preventing false negative results due to failure in DNA extraction or PCR reaction.

2- Kit Contents

The kit contains a manual and CD and following reagents:

Lable	Content	Quantity	Volume
EGFR Ctrl Mix	PCR Mix for quality control	2	480 µl
G719X Mix	PCR Mix for G719A/G719SIG719C	1	480 µl
19Del Mix	PCR Mix for exon 19 Deletions	1	480 µl
20Ins Mix	PCR Mix for exon 20 insertions	1	480 µl
S768I Mix	PCR Mix for S768I	1	480 µl
T790M Mix	PCR Mix for T790M	1	480 µl
L858R Mix	PCR Mix for L858R	1	480 µ
L861Q Mix	PCR Mix for L861Q	1	480 µ
EGFR Pos	Positive control	1	250 µl
EGFR Neg	Negative control	1	250 µl
Water	PCR Grade Water	1	200 µl

3- Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws especially for PCR Mix more than few times to prevent reduced sensitivity.

4- General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious.**
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction; b) Reagent preparation where the Master Mix is aliquoted into tubes; and c) Reaction preparation area for addition of templates to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

5- Additionally Required Items

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- Vortex Mixer
- DNA extraction kit and required equipment/items
- PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

6- Specimen

Sections of formalin-fixed tissue (paraffin block) or unfixed tissue can be examined. Note that tumor tissue is heterogeneous with

uneven distribution of mutant cells; therefore different parts of tissue may produce different results.

7- DNA Extraction

DNA extraction can be performed with different kits from various manufacturers. We recommend using:

- QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Cat. no. 51404, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- Roche; High Pure FFPE DNA Isolation Kit (Cat. No. 06 650 767 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

Note that, the minimum volume of DNA required for the test is 40 microliters of 5-30 ng/ul. We recommend extracting 100 microliters or higher volume of DNA, enough to repeat the test if necessary.

8- Protocol: DNA Sample Assessment

Before examining a sample for EGFR mutations, quality of DNA should be assessed. If the results are within the desired range, then the second test for detecting EGFR mutations will be performed. To qualify DNA extraction, follow steps below.

Note! Check the volume of extracted DNA sample and make sure it is more than 40 microliters and preferably about 100 microliters. Volumes less than 40 microliters are not enough to proceed.

First, thaw the **EGFR Ctrl Mix** on ice completely, mix by inversion followed by a quick spin and store on crushed ice after. Place the required number of microtubes on cold block including one for each sample, plus two for negative control and water.

Pipette 20µl of EGFR Ctrl Mix to each microtube. Continue by adding 5µl of DNA sample, Negative control and Water to each tube.

Cap the tubes and inspect visually to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

9- Programming Real-time PCR

Rotor-Gene or StepOne could be setup using templates provided in the CD. Templates may also be downloaded from our website www.novingene.com. For Rotor-Gene, select “EGFR 0.2” or “EGFR 0.1” according to the PCR tubes.

You may also set up the machine as below.

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM/Green and VIC/Yellow dyes/channels.

All mixes contain ROX with final concentration of 300nM in the reaction.

10-Analysis: Sample Assessment

Data Analysis is performed in two steps. First, the test validity is assessed and then DNA sample analysis. As the initial step, results of negative control will be evaluated.

Perform quantitative analysis for both **DNA sample (FAM/Green channel)** and **internal control (VIC/Yellow channel)** with the threshold set at 0.05 for both channels.

Note that, a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of sigmoid graph and log phase, sample can not be considered as positive (even CT present) result is not reliable.

If above are met, then the test results are valid and may proceed to DNA sample assessment.

Test is valid only if:

- 1) Water sample is **Negative** in FAM/Green channel and it is **Positive** in VIC/Yellow channel with CT of 27-33.
- 2) Negative controls is **Positive** in VIC/Yellow channel with CT of 27-33.
- 3) Negative control is **Positive** in FAM/Green channel with CT of 23-28.

Expected results for a valid test are summarized in Table2.

Sample	VIC/Yellow	FAM/Green
NTC	Pos (CT: 27-33)	Neg
Negative Ctrl	Pos (CT: 27-33)	Pos (CT: 23-28)

Table2. Expected results for valid Sample Assessment.

B) DNA sample Quality Analysis:

DNA sample is qualified only if sample is positive in FAM/Green channel with CT of 22-30 and positive in VIC/Yellow

channel with CT of 27-33. This sample can be further examined for EGFR mutations.

Sample should be diluted with water, if a sample is positive in FAM/Green channel with CT of less than 22 and positive in VIC/Yellow channel with CT of 27-33. Dilute the sample to reach CT of 22-27. By 2X dilution of sample, CT is increased one cycle. After diluting the sample, proceed to the EGFR mutation test.

Result is invalid, if a sample in FAM/Green channel has CT above 30 and in VIC/Yellow channel CT of 27-33. Also result is invalid if a sample in VIC/Yellow channel has CT above 33 and in FAM/Green channel has CT of 22-30. In this case, repeating DNA extraction is recommended.

DNA sample Quality Analysis is summarized in Table 3.

	FAM/Green	VIC/Yellow	Result
1	+ CT: 22-30	+ CT: 27-33	Valid
2	+ CT<22	+ CT: 27-33	Sample dilution
3	+ CT>30	+ CT: 27-33	Invalid
4	+ CT: 22-30	+ CT>33	Invalid

Table3. DNA Quality Analysis

11-Protocol: Detection of EGFR mutations

To detect EGFR mutations, each sample should be examined with eight mixes, one mix for DNA quantitation and seven mixes for detection of 34 mutations. Therefore, to examine only one

EGFR RQ (V1.2)

sample, 32 microtubes are required; 8 for the Positive control, 8 for the Negative control and 8 for NTC and 8 for the sample. Respectively for each extra sample, 8 microtubes will be added. Therefore, for two samples, 40 microtubes and for three samples 48 microtubes are required. Figure1 shows tube setup for three samples.

To start, Place required number of tubes on cold block organized in series of six each.

Pipette 20 μ l of EGFR Ctrl Mix to each tube in the first series.

Pipette 20 μ l of G719X Mix to each tube in the second series.

Pipette 20 μ l of 19Del Mix to each tube in the third series.

Pipette 20 μ l of 20Ins Mix to each tube in the fourth series.

Pipette 20 μ l of S768I Mix to each tube in the fifth series.

Pipette 20 μ l of T790M Mix to each tube in the sixth series.

Pipette 20 μ l of L858R Mix to each tube in the sixth series.

Pipette 20 μ l of L861Q Mix to each tube in the sixth series.

Continue by adding 5 μ l of Positive control, Negative Control, water and extracted DNA to each tube. Consider the first and second tube in each series for positive control and Negative control and the third for water/NTC. The next tubes would be for samples.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine and program it according to the section 9.

Note: if using Rotor-Gene attach the locking ring too.

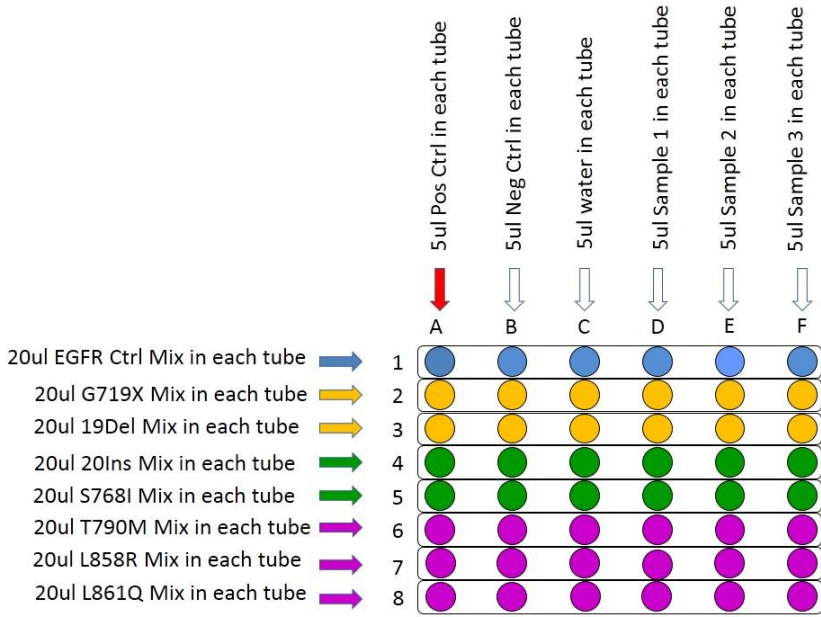


Fig1. Tubes setup for Mixes and samples.

12-EGFR Mutation Detection Analysis

Before analyzing results for EGFR mutations, test validity should be verified. To do so, results of positive and negative controls and samples with Control Mix will be examined. If the test is valid, then may proceed to EGFR mutation analysis.

To analyze results, set threshold at 0.05 for FAM/Green and VIC/Yellow channel.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable. In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

A) Test is valid only if:

- 1) NTC is Negative in FAM/Green channel with all Mixes, and
- 2) Positive Ctrl, Negative Ctrl and NTC are Positive in VIC/Yellow channel with each Mix with a CT of 27-33, and
- 3) Positive control in FAM/Green channel with Control Mix with a CT of 22-27, and
- 4) Positive control is Positive in FAM/Green channel with all mixes with of 27-35,
- 5) Sample is Positive in VIC/Yellow channel with Control Mix with a CT of 27-33,
- 6) Sample is Positive in FAM/Green channel with Control Mix with a CT of 22-30,

If all above are met, then the Test is valid and results can be analyzed further for EGFR mutations.

Above steps for Test validation are summarized in Figure 2.

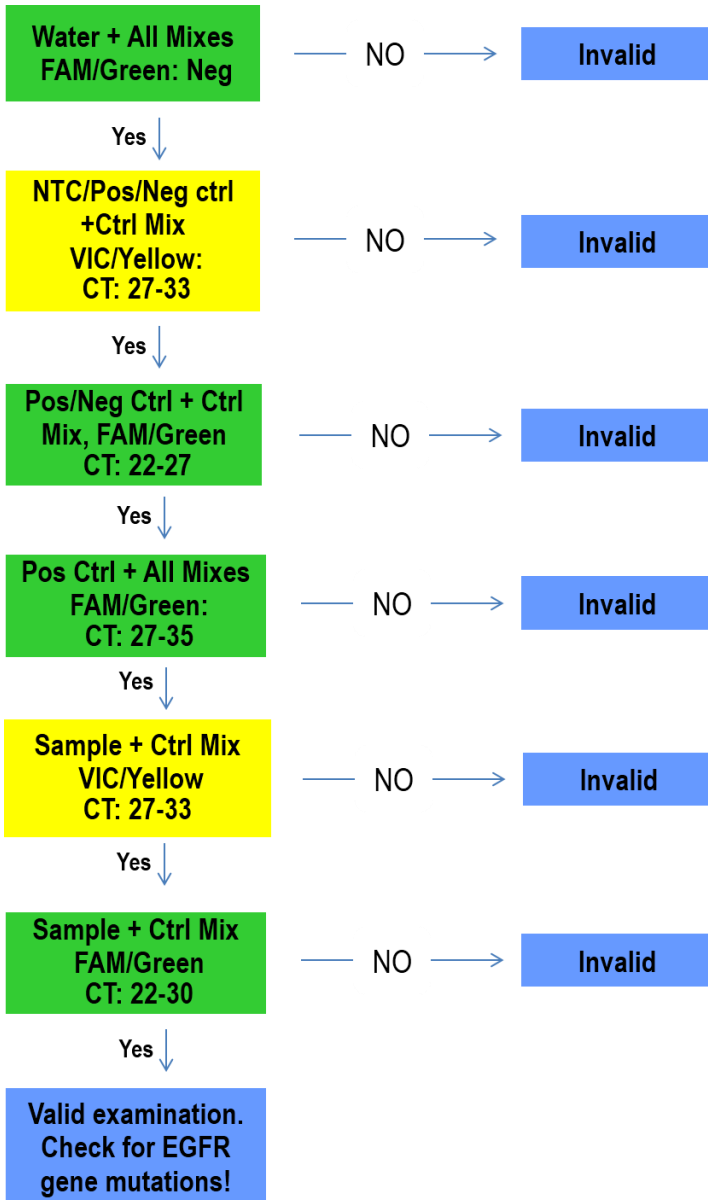


Fig 2. Test validation flowchart

B) Data analysis for EGFR mutations

- 1) Select the patient’s samples, which are positive in FAM/Green channel with EGFR specific mixes with a CT of 20-40, and document the CTs in the Table 4.
- 2) Calculate ΔCT for the above selected samples through the following equation.

$$\Delta CT = \text{Mutation Mix CT} - \text{Control Mix CT}$$

- 3) Document the ΔCT in the Table 4 too.
- 4) If the ΔCT is within the valid range as mentioned in the Table 4, the sample has the EGFR mutation and Positive.

Above steps for detection of EGFR mutations are summarized in Figure 3.

EGFR Mix	Valid CT	Sample CT	Valid ΔCT	Sample ΔCT	Result
EGFR Ctrl Mix	22-30		-		-
G719X Mix	20-40		≤ 7.4		
19Del Mix	20-40		≤ 7.5		
20Ins Mix	20-40		≤ 6.9		
S768I Mix	20-40		≤ 10.3		
T790M Mix	20-40		≤ 8.2		
L858R Mix	20-40		≤ 10.2		
L861Q Mix	20-40		≤ 10		

Table 4. Valid CT and ΔCT ranges for EGFR Mixes.

As an example, If CT of a sample is 25.3 with Control Mix, 38.4 with G719X Mix, 33.2 with 19Del Mix, 36.8 with 20Ins Mix, 40 with S768I

EGFR RQ (V1.2)

Mix, 36.9 for T790M mix, 40 with L858R Mix and 40 with L861Q Mix, then Δ CT is 13.1 for G719X (38.4-25.3), 7.0 for 19Del (32.3-25.3), 11.5 for 20Ins and 14.7 for S768I, 11.6 for T790M, 14.7 for L858R and 14.7 for L861Q. (Table. 5). According to table 5, delta CT for 19Del is in valid range, and patient is Positive for 19Del.

EGFR Mix	Valid CT	Sample CT	Valid Δ CT	Sample Δ CT	Result
EGFR Ctrl Mix	22-30	25.3	-	-	Valid
G719X Mix	20-40	38.4	≤ 7.4	13.1	Neg
19Del Mix	20-40	32.3	≤ 7.5	7.0	Positive
20Ins Mix	20-40	36.8	≤ 6.9	11.5	Neg
S768I Mix	20-40	40	≤ 10.3	14.7	Neg
T790M Mix	20-40	36.9	≤ 8.2	11.6	Neg
L858R Mix	20-40	40	≤ 10.2	14.7	Neg
L861Q Mix	20-40	40	≤ 10	14.7	Neg

Table 5. EGFR mutation analysis for a specific sample.

Note: above Δ CTs should be validated each run by using Positive and Negative Control which provided in the kit.

Note that a normal sample may cross-react with some of the mutation specific mixes. However, the calculated Δ CT will always fall outside the valid range. Therefore, a sample with CT of 20-40 in FAM/Green channel for EGFR mutation mixes, will only considered positive only if Δ CT is within the valid range.

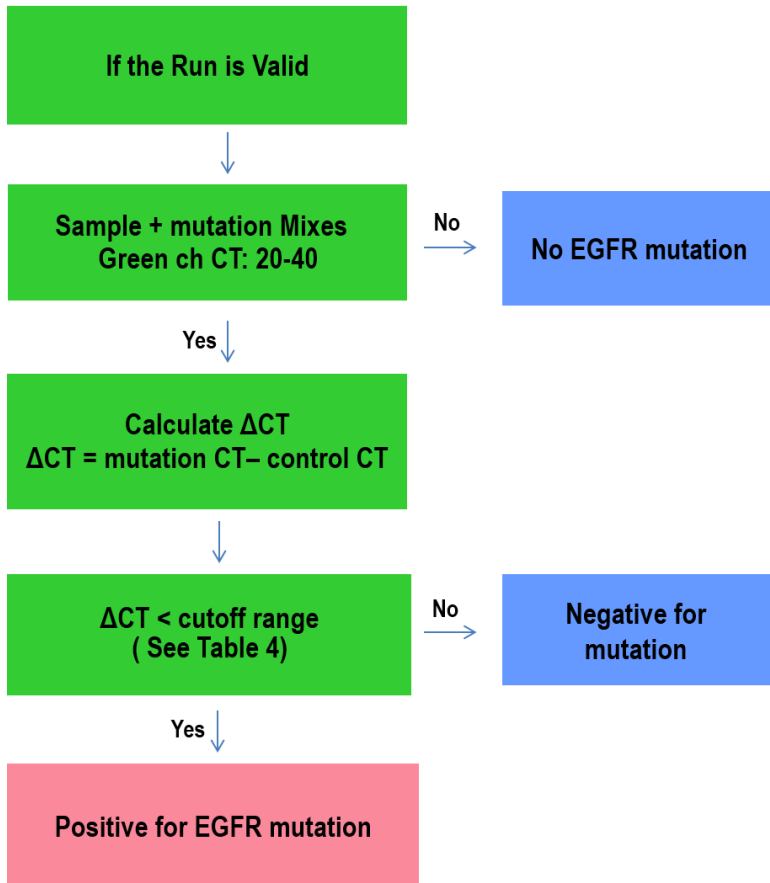


Fig 3. Sample analysis flowchart for EGFR mutation detection

Results can also be interpreted as below

- Sample is **Negative** for EGFR mutations, if it is negative in FAM/Green channel with all mixes or has CT above 40.
- Sample is **Negative** for EGFR mutations if it is positive in FAM/Green channel with CT of 20-40 for one or more EGFR mixes, but ΔCT is higher than cutoff range (Table 4).

- Sample is **Positive** for EGFR mutations, if sample has a valid CT and Δ CT is lower than cutoff range (Table 4) in FAM/Green channel for one of the seven EGFR mixes. Briefly,
 - It is Positive for G719X if with G719X Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 7.4$. Note that, this kit doesn't differentiate between G719A, G719S and G719C mutations.
 - It is Positive for 19Del if with 19Del Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 7.5$. Note that this kit detects 24 deletion mutations (Table1) but not distinguish between them.
 - It is Positive for 20Ins if with 20Ins Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 6.9$. Note that this kit detects 3 insertion mutations (Table1) but not distinguish between them.
 - It is Positive for S768I if with S768I Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 10.3$.
 - It is Positive for T790M if with T790M Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 8.2$.
 - It is Positive for L858R if with L858R Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 10.2$.
 - It is Positive for L861Q if with L861Q Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 10$.

Interpretation of results for EGFR mutation test are summarized in Table 6.

Note that, if a sample is Negative with this kit in terms of EGFR mutations, the following conditions should be considered:

- Sample is Negative only for EGFR mutations which was mentioned in Table1 and it could be Positive for other EGFR mutations.

- Sample is Positive for EGFR mutations in quantities below the sensitivity of the kit.

EGFR Mix	Sample CT	Sample Δ CT	Conclusion
G719X Mix	>40	-	Neg for G719A/ G719S/ G719C mutations
	20-40	>7.4	Neg for G719A/ G719S/ G719C mutations
	20-40	\leq 7.4	Pos for G719A/ G719S/ G719C mutations
19Del Mix	>40	-	Neg for Exon 19 Deletions
	20-40	>7.5	Neg for Exon 19 Deletions
	20-40	\leq 7.5	Pos for Exon 19 Deletions
20Ins Mix	>40	-	Neg for Exon 20 Insertions
	20-40	>6.9	Neg for Exon 20 Insertions
	20-40	\leq 6.9	Pos for Exon 20 Insertions
S768I Mix	>40	-	Neg for S768I mutation
	20-40	>10.3	Neg for S768I mutation
	20-40	\leq 10.3	Pos for S768I mutation
T790M Mix	>40	-	Neg for T790M mutation
	20-40	>8.2	Neg for T790M mutation
	20-40	\leq 8.2	Pos for T790M mutation
L858R Mix	>40	-	Neg for L858R mutation
	20-40	>10.2	Neg for L858R mutation
	20-40	\leq 10.2	Pos for L858R mutation
L861Q Mix	>40	-	Neg for L861Q mutation
	20-40	>10	Neg for L861Q mutation
	20-40	\leq 10	Pos for L861Q mutation

Table 6. Interpretation of results for EGFR mutation.

13-Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of this assay is equivalent to the percentage of mutated EGFR DNA that can be identified in the background of wild-type DNA. Sensitivity of the assay is determined by dilution of plasmids containing target sequence in human genomic DNA and is mentioned in Table 7. The sensitivity depends on the DNA quality and quantity. Maximum sensitivity is achieved when a sample with Control Mix has a CT of 22-27 in FAM/Green channel.

Reaction	Ctrl Mix CT: 22-27
G719X Mix	2%
19Del Mix	1%
20Ins Mix	2%
S768I Mix	1%
T790M Mix	8%
L858R Mix	1%
L861Q Mix	1%

Table 7. Sensitivity of the EGFR mutation detection assay.

