راهنما کیت EGFR RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۳

جهت بررسی جهش های EGFR به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# EGFRRQ24)

48 (Cat# EGFRRQ48)

NG-WI-ASL-42-103

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۳
۲. حیطه کاربرد ۳
۳. اطلاعات زمینه ای ۳
۴. اساس آزمایش ۵
۵. محتویات کیت ۵
۶. مدل های بسته بندی ۶
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت ۶
۸. محدودیت کاربرد ۷
۹. سایر موارد مورد نیاز ۷
۱۰. احتیاط و نکات لازم ۸
۱۱. نمونه مناسب ۸
۱۲. استخراج DNA ۹
۱۳. روش کار: بررسی کیفیت DNA نمونه ۹
۱۴. دستگاه ها و نرم افزارها ۱۰
۱۵. تنظیم دستگاه Real-Time PCR ۱۰
۱۶. آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه ۱۳
۱۷. روش کار: بررسی جهش های EGFR ۱۶
۱۸. آنالیز نتایج برای جهش های EGFR ۱۹
۱۹. حساسیت ۲۷

۲۰. روش امحاء ۲۸
۲۱. پشتیبانی فنی ۲۸
۲۲. اطلاعات تماس ۲۹
۲۳. منابع. ۲۹
۲۴. توضیحات برچسب ۳۰

۱. مقدمه

کیت EGFR RQ جهت بررسی جهش در انکوژن EGFR به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA انسانی از نظر وجود ۳۴ نوع جهش سوماتیک در انکوژن EGFR به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین کنترل میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک توالی سنتتیک به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت EGFR RQ امکان بررسی نمونه DNA انسانی را جهت تشخیص ۳۴ نوع جهش سوماتیک در اگزون‌های ۱۸، ۱۹، ۲۰ و۲۱ انکوژن EGFR با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

انکوژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمیEpidermal 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 سرطان‌ها از جمله سرطان ریه و گلیوبلاستوما گزارش شده است. با توجه به اینکه جهش های EGFR نقش تعیین کننده‌ای در انتخاب درمان دارند، بررسی آن‌ها به ویژه در سرطان ریه، برای انتخاب نوع درمان الزامی است. این جهش‌ها در اگزون‌های ۱۸، ۱۹، ۲۰ و۲۱ اتفاق می‌افتد. کیت حاضر مواد لازم برای تشخیص ۳۴ نوع از مهمترین جهش های این اگزون‌ها را به روش

Real-Time PCR فراهم می‌کند. این جهش‌ها 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) می‌باشد. این جهش‌ها 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

جدول۱: جهش های قابل شناسایی EGFR با کیت نوین ژن

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

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی توالی ژنتیکی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش، توالی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود توالی را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۵. محتویات کیت

این کیت شامل دفترچه راهنما، فلش کارت و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	تعداد	حجم

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

*۱یا ۲ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴و ۴۸ واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب بیست و چهار، چهل و هشت واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می‌باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می‌باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می‌شود.

همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می‌گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده نمود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی‌باشد.

۹. 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
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA و تجهیزات و مواد مصرفی مورد نیاز
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر

- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۱۰. احتیاط و نکات لازم

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 لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می‌باشند. 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.

۱۱. نمونه مناسب

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

۱۲. استخراج DNA

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

- QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Cat. no. 51404, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- Roche; High Pure FFPET 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 می‌باشد تا در صورت نیاز، امکان تکرار تست وجود داشته باشد. همچنین غلظت نمونه باید ۱۰ تا ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر باشد.

۱۳. 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 می‌باشد 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 می‌باشد. 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 برروی 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 منفی و آب اضافه کنید و درپوش میکروتیوب ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه StepOne لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۴. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت EGFR RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است.

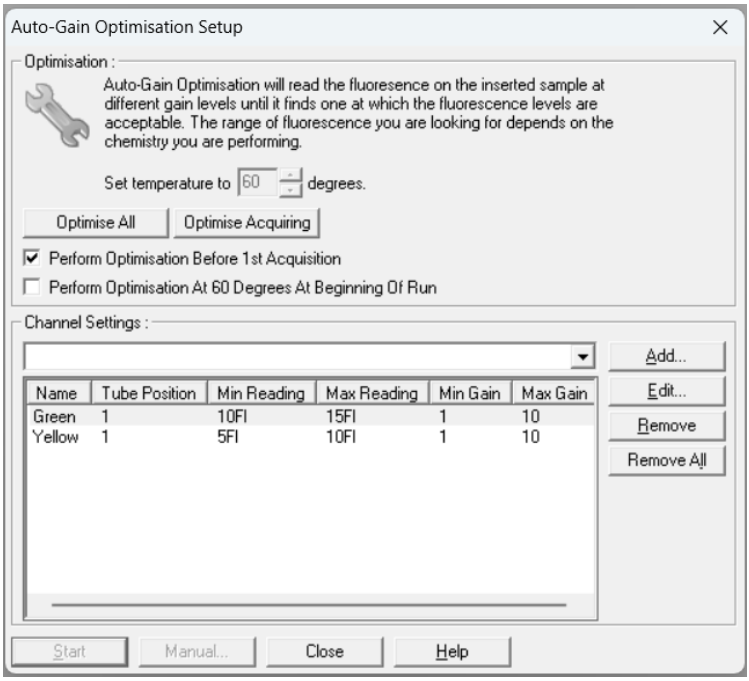
۱۵. تنظیم دستگاه Real-Time PCR

در صورتی که از دستگاه Rotor-Gene و یا StepOne استفاده می‌کنید، برای تنظیم دستگاه می‌توانید از فایل تمپلیت در فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). هنگام کار با RotorGene با توجه به نوع میکروتیوب استفاده شده، فایل "EGFR 0.1" و یا "EGFR 0.2" را انتخاب نمایید و اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقا مطابق تصویر زیر برای هر دو کانال انجام دهید.

Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی EGFR Ctrl Mix باشد).

گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

برای تنظیم سایر دستگاه ها از جدول زیر استفاده نمایید.

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و در کانال‌های FAM/Green و VIC/Yellow تنظیم شود. میکس‌های کیت حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای شاهدها Positive Control و برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۶. آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه

تحلیل نتایج آزمایش کنترل کیفیت DNA بیمار در دو مرحله انجام می‌شود. در مرحله نخست باید اطمینان یافت که آزمایش از نظر کیفی به نحو مطلوب انجام شده است و سپس می‌توان نتایج نمونه بیمار را آنالیز نمود. در ابتدا نتایج شاهدهای منفی مورد بررسی قرار می‌گیرند.

از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold، دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۰۵ قرار داده و دکمه OK را بزنید تا نتایج نشان داده شوند. سپس در منوی Analysis، مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کرده و آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

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 می‌شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. 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 می‌توانید نمونه بیمار را بررسی نمائید.

نتایج بررسی نمونه های شاهد و شرایط اعتبار آزمایش به طور خلاصه در جدول یک آمده است.

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

جدول۲. 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 نمائید. 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 می‌یابد. 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 و در کانال VIC/Yellow دارای CT بین ۳۳-۲۷ باشد، نتیجه قابل قبول نیست. در این حالت استخراج دوباره نمونه توصیه می‌شود.

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال VIC/Yellow دارای CT بالاتر از ۳۳ و در کانال FAM/Green دارای CT بین ۲۰ الی ۳۰ باشد، نتیجه نامعتبر است. این حالت می‌تواند 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

جدول۳. 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 می‌شود.

۱۷. 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 ازمایش شاهد مثبت و ۸ میکروتیوب برای آزمایش شاهد منفی و ۸ میکروتیوب برای آزمایش شاهد منفی بدون DNA یعنی آب مورد نیاز می باشد و مجموعا 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 شاهدهای مثبت، منفی یا نمونه بیمار استفاده می‌شود و در مجموع برای آزمایش ۳ نمونه، به ۲۴ میکروتیوب برای نمونه ها و ۲۴ میکروتیوب برای شاهدها نیاز داریم که مجموعا 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 ستون های شش تایی روی بلوک سرد بگذارید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف اول ۲۰ میکرولیتر از EGFR Ctrl Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف دوم ۲۰ میکرولیتر از G719X Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف سوم ۲۰ میکرولیتر از 19Del Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف چهارم ۲۰ میکرولیتر از 20Ins Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف پنجم ۲۰ میکرولیتر از S768I Mix اضافه کنید.

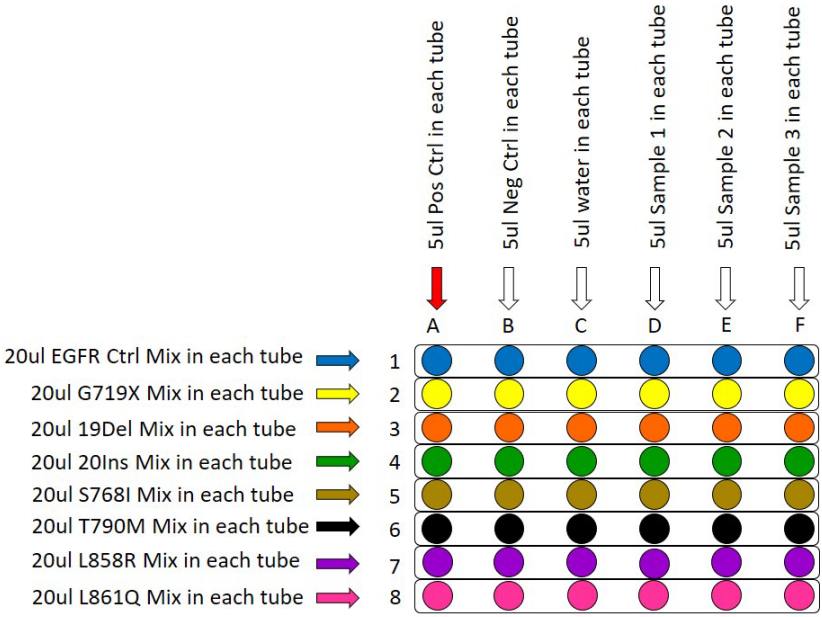
به هر یک از میکروتیوب های ردیف ششم ۲۰ میکرولیتر از T790M Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف هفتم ۲۰ میکرولیتر از L858R Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف هشتم ۲۰ میکرولیتر از L861Q Mix اضافه کنید.

سپس ۵ میکرولیتر از شاهدها، 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، شاهدها و نمونه های بیماران

تصویر ۱. چیدمان میکروتیوب ها و اضافه نمودن میکس، شاهدها و نمونه های بیماران
درپوش میکروتیوب ها را ببندید، سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید. دستگاه را مطابق توضیحات بخش ۱۵ دفترچه تنظیم نمائید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه StepOne لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۸. آنالیز نتایج برای جهش های EGFR

تحلیل نتایج آزمایش جهش های EGFR در دو مرحله انجام می‌شود. در مرحله نخست با توجه به نتایج شاهدهای مثبت و منفی باید اطمینان یافت که آزمایش از نظر کیفی به نحو مطلوب انجام شده است، سپس می‌توان 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 می‌شود.

از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold، دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۰۵ قرار داده و دکمه OK را بزنید تا نتایج نشان داده شوند. سپس در منوی Analysis، مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کرده و آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

بدر 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 می‌شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.

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،

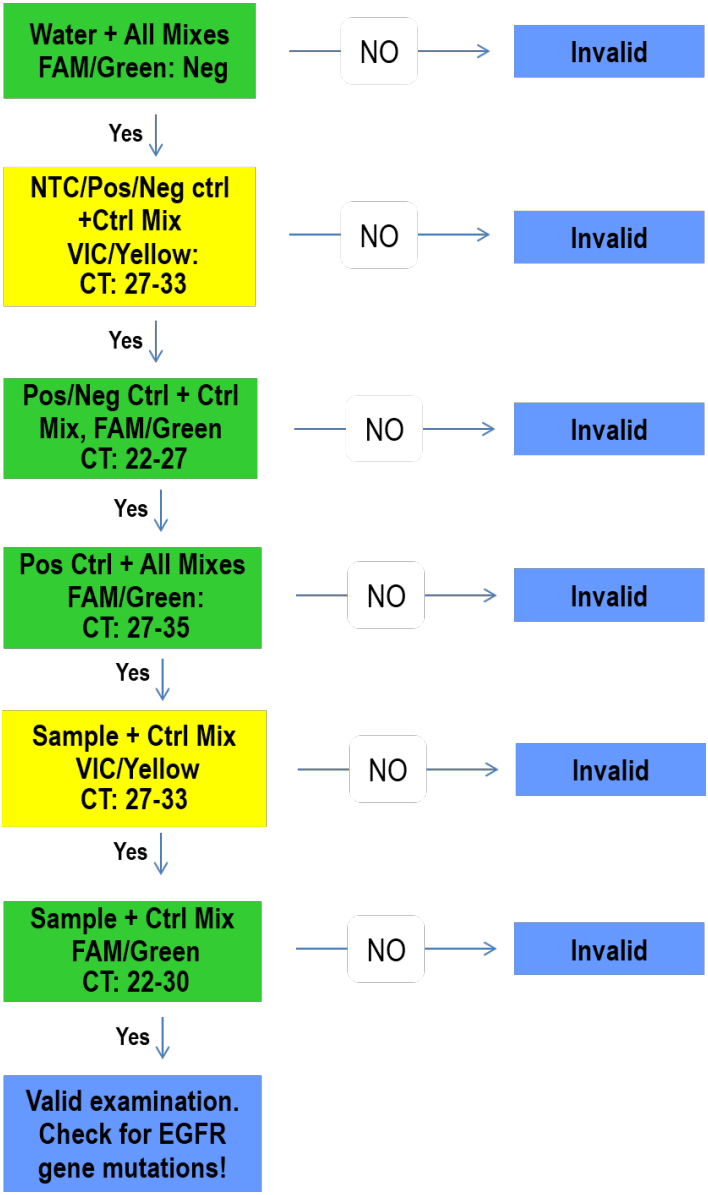
۵) نمونه بیمار در کانال VIC/Yellow با میکس کنترل دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد،

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 می‌باشد.

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



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 می‌باشد. به طور ساده:

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

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

میکس EGFR مورد بررسی	CT قابل قبول	CT نمونه	ΔCT قابل قبول	ΔCT نمونه	نتیجه
EGFR Ctrl Mix	۲۲-۳۰		-		
G719X Mix	۲۰-۴۰		≤۷/۴		
19Del Mix	۲۰-۴۰		≤۷/۵		
20Ins Mix	۲۰-۴۰		≤۶/۹		
S768I Mix	۲۰-۴۰		≤۱۰/۳		
T790M Mix	۲۰-۴۰		≤۸/۲		
L858R Mix	۲۰-۴۰		≤۱۰/۲		
L861Q Mix	۲۰-۴۰		≤۱۰		

جدول۴. مقادیر قابل قبول CT وΔCT 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 ۳۲/۳، با میکس 20Ins برابر

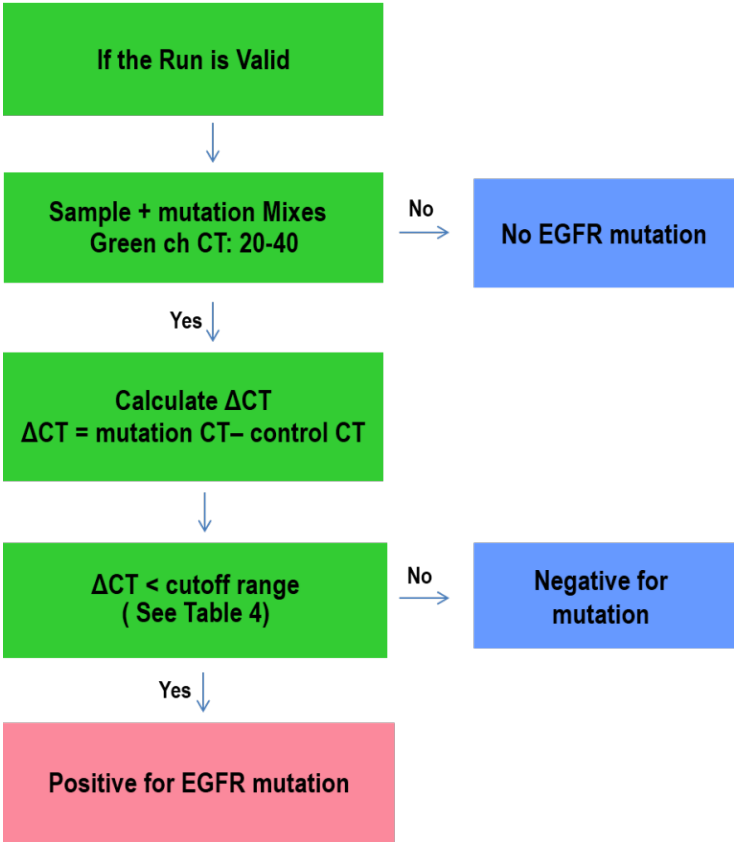
۳۶/۸، در میکس S768I برابر۴۰، با میکس T790M برابر ۳۶/۹، با میکس L858R برابر ۴۰ و با میکس L861Q برابر ۴۰ باشد، اختلاف CT ها برای میکس G719X، ۱۳/۱ (۲۵/۳- ۳۸/۴) و برای میکس 19Del ۷/۰ (۲۵/۳- ۳۲/۳) ، برای میکس 20Ins برابر با ۱۱/۵ (۲۵/۳-۳۶/۸) ، برای میکس S768I معادل ۱۴/۷ ، برای میکس T790M، ۱۱/۶ و برای میکس L858R برابر ۱۴/۷ و برای میکس L861Q برابر با ۱۴/۷ خواهد بود (جدول چهار). اکنون نتایج برای برای میکس 19Del در محدوده قابل قبول می‌باشد. در این حالت بیمار برای جهش 19Del مثبت است.

میکس EGFR مورد بررسی	CT قابل قبول	CT نمونه	ΔCT قابل قبول	ΔCT نمونه	نتیجه
EGFR Ctrl Mix	۲۲-۳۰	۲۵/۳	-	-	قابل قبول
G719X Mix	۲۰-۴۰	۳۸/۴	≤۷/۴	۱۳/۱	منفی
19Del Mix	۲۰-۴۰	۳۲/۳	≤۷/۵	۷/۰	مثبت
20Ins Mix	۲۰-۴۰	۳۶/۸	≤۶/۹	۱۱/۵	منفی
S768I Mix	۲۰-۴۰	۴۰	≤۱۰/۳	۱۴/۷	منفی
T790M Mix	۲۰-۴۰	۳۶/۹	≤۸/۲	۱۱/۶	منفی
L858R Mix	۲۰-۴۰	۴۰	≤۱۰/۲	۱۴/۷	منفی
L861Q Mix	۲۰-۴۰	۴۰	≤۱۰	۱۴/۷	منفی

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

نکته: ΔCT قابل قبول که در جدول۴ ذکر شده تنها در صورتی معتبر است که در هر بار تکرار تست، کنترل مثبت و منفی کیت گذاشته شود. به این ترتیب مقادیر ΔCT 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 می‌تواند با میکس‌های 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 می‌باشد، 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 شناسائی جهش های EGFR نشان می‌دهد.



نمودار۲. مراحل بررسی نتایج نمونه بیمار برای شناسائی 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 میکس‌های 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 ژن EGFR **مثبت** است. به طور خلاصه، اگر نمونه:
  - با میکس G719X دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۷/۴ باشد، دارای جهش G719X است. توجه داشته باشید این کیت جهش های G719A, G719C و G719S را از هم تفکیک نمی‌کند.
  - با میکس 19Del دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۷/۵ باشد، دارای جهش 19Del است. توجه داشته باشید این کیت قادر به تشخیص ۲۴ جهش حذفی در اگزون ۱۹ می‌باشد اما جهش های فوق را از هم تفکیک نمی‌کند (جدول ۱).
  - با میکس 20Ins دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۶/۹ 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 نمی‌کند (جدول ۱).
  - با میکس S768I دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۱۰/۳ باشد، دارای جهش S768I است.

- با میکس T790M دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۸/۲ باشد، دارای جهش T790M است.
- با میکس L858R دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۱۰/۲ باشد، دارای جهش L858R است.
- با میکس L861Q دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۱۰ باشد، دارای جهش L861Q است.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش EGFR در جدول شش آمده است.

میکس EGFR	CT نمونه	ΔCT نمونه	نتیجه گیری
G719X Mix	>۴۰	-	برای جهش های G719A/ G719S/ G719C منفی
	۲۰-۴۰	>۷/۴	برای جهش های G719A/ G719S/ G719C منفی
	۲۰-۴۰	≤۷/۴	برای جهش های G719A/ G719S/ G719C مثبت
19Del Mix	>۴۰	-	برای Exon 19 Deletions منفی
	۲۰-۴۰	>۷/۵	برای Exon 19 Deletions منفی
	۲۰-۴۰	≤۷/۵	برای Exon 19 Deletions مثبت
20Ins Mix	>۴۰	-	برای Exon 20 Insertions منفی
	۲۰-۴۰	>۶/۹	برای Exon 20 Insertions منفی
	۲۰-۴۰	≤۶/۹	برای Exon 20 Insertions مثبت
S768I Mix	>۴۰	-	برای جهش S768I منفی
	۲۰-۴۰	>۱۰/۳	برای جهش S768I منفی
	۲۰-۴۰	≤۱۰/۳	برای جهش S768I مثبت
T790M Mix	>۴۰	-	برای جهش T790M منفی
	۲۰-۴۰	>۸/۲	برای جهش T790M منفی

	۲۰-۴۰	≤۸/۲	برای جهش T790M مثبت
L858R Mix	>۴۰	-	برای جهش L858R منفی
	۲۰-۴۰	>۱۰/۲	برای جهش L858R منفی
	۲۰-۴۰	≤۱۰/۲	برای جهش L858R مثبت
L861Q Mix	>۴۰	-	برای جهش L861Q منفی
	۲۰-۴۰	>۱۰	برای جهش L861Q منفی
	۲۰-۴۰	≤۱۰	برای جهش L861Q مثبت

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 می‌باشد.
- نمونه از نظر جهش های بررسی شده (مطابق جدول ۱) منفی است اما می‌تواند برای سایر جهش های EGFR مثبت می‌باشد.

۱۹. حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت معادل درصدی از DNA جهش یافته است که قابل شناسائی 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 می‌یابد. 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٪

جدول۷. میزان حساسیت بر حسب درصد DNA جهش یافته

۲۰. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۱. پشتیبانی فنی

برای پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱
Info@novingene.com

۲۲. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

۲۳. منابع

- Hu, S. ed., 2022. Novel Sensitizing Agents for Therapeutic Anti-EGFR Antibodies (Vol. 1). Academic Press.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Rotow, J., Cheema, P., Pisapia, P. and Troncone, G. 2022. Fast Facts: EGFR Exon 20 Insertion Mutations in NSCLC. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Zhang, Y.L., Yuan, J.Q., Wang, K.F., Fu, X.H., Han, X.R., Threapleton, D., Yang, Z.Y., Mao, C. and Tang, J.L., 2016. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget, 7(48), p.78985.

۲۴. توضیحات برچسب

RUO	جهت مصارف پژوهشی		تولید کننده		دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید
LOT	کدبهر (شماره بچ)	Σ	تعداد <n> آزمون کافی		تاریخ انقضاء
REF	شماره کاتالوگ	SN	شماره سریال	-10°C -30°C	محدوده دمایی

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

EGFR RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.3

For Real-Time PCR Detection of EGFR Mutations
For use with Rotor-Gene or StepOne
For Research Use Only

24 (Cat# EGFRRQ24)
48 (Cat# EGFRRQ48)
NG-WI-ASL-42-103

RUO

NovinGene ParsVira
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Novin Gene

Table of Contents

1. Introduction 3
2. Intended Use 3
3. Background Information 3
4. Test Principle 5
5. Kit Contents 5
6. Packaging models 5
7. Storage and Stability 6
8. Product Use Limitations 6
9. Additionally Required Items 6
10. General Precautions 7
11. Specimen 7
12. DNA Extraction 7
13. Protocol: DNA Sample Assessment 8
14. Programming Real-time PCR 8
15. Devices and software 8
16. Analysis: Sample Assessment 10
17. Protocol: Detection of EGFR mutations 12
18. EGFR Mutation Detection Analysis 14

19. Analytical Sensitivity 20
20. Disposal Method 21
21. Technical Support 21
22. Contact Information 21
23. References 22
24. Symbols 22

1. Introduction

EGFR RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detection of 34 somatic mutations in the EGFR gene. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. Control Mix also contains a different series of primers and probe for detecting a synthetic DNA sequence. The kit supplies this synthetic DNA sequence as an Internal Control (IC).
This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

EGFR RQ kit is intended for the detection of 34 somatic mutations in EGFR exons 18, 19, 20 and 21. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene or StepOne machines.

3. Background Information

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a tyrosine kinase receptor and is considered as an oncogene. EGFR is involved in the 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, especially Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC), and galioblastoma. 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/.

4. Test Principle

The target is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card and the following reagents:

Lable	Content	Quantity	Volume
EGFR Ctrl Mix	PCR Mix for quality control	2	480 µl
G719X Mix	PCR Mix for G719A/G719SG719C	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

6. Packaging models

The kit is available in 24 and 48 reactions of 25 microliters.

7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The user manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

9. Additionally Required Items

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease-free filtered tips
- DNA extraction kit and required equipment/items
- Nuclease-free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

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.

11. 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.

12. 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 FFPET 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 10-50 ng/ul. We recommend extracting 100

microliters or higher volume of DNA, enough to repeat the test if necessary.

13. 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 caped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

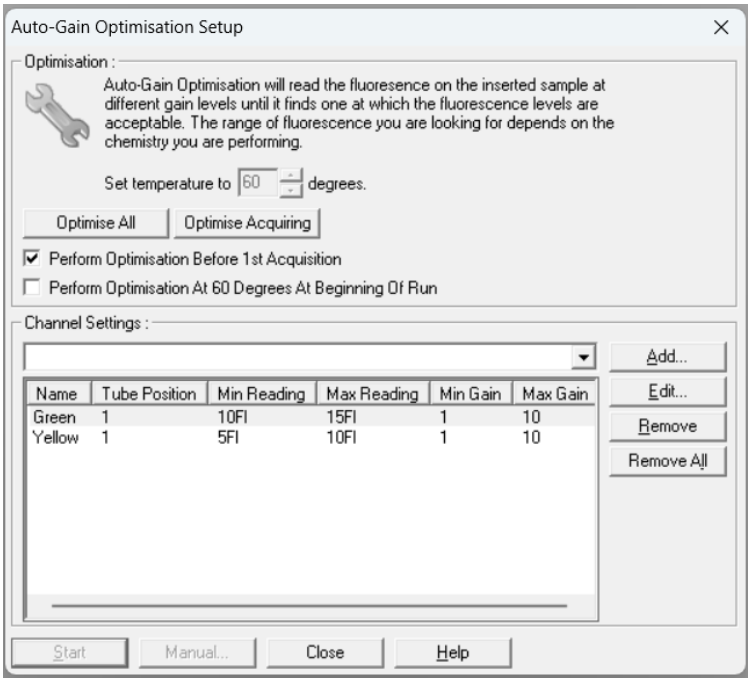
14. Devices and software

EGFR RQ kit is designed to work with Rotor-Gene and StepOne.

15. Programming Real-time PCR

Rotor-Gene or StepOne could be setup using templates provided in the flash card, or accessible by kit QR code. For the Rotor-Gene, select “EGFR 0.1” is for strip tubes and “EGFR 0.2” is for 0.2ml tubes, ensuring that the locking ring is attached to the rotor.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain EGFR Ctrl Mix).



Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine. You may also set up the machine as below.

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 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.
Make sure that in the sample menu, the Positive controls have been defined as “Positive control”. Patient samples are defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.

16. 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 (the FAM/Green channel)** and **internal control (the VIC/Yellow channel)**. Briefly, click on Analysis menu and then, under Quantitation tab double click on “Cycling A. Green”. Close the pop-up window and manually set threshold at 0.05. Repeat above for the Yellow channel and set the threshold at 0.05.

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 a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.
If the above are met, then the test results are valid and may proceed to DNA sample assessment.

A) Test is valid only if:

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

3) Negative control is **Positive** in the FAM/Green channel with CT of 23-28.

Expected results for a valid test are summarized in the 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 the 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 the FAM/Green channel with CT of less than 22 and positive in the 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 the FAM/Green channel has CT above 30 and, in the VIC/Yellow channel CT of 27-33. Also, the result is invalid if a sample in the VIC/Yellow channel has CT above 33 and in the FAM/Green channel has CT of 22-30. In this case, repeating DNA extraction is recommended.

DNA sample Quality Analysis is summarized in the 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

17. 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 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 a cold block organized in series of six each.

Pipette 20µl of EGFR Ctrl Mix to each tube in the first series.
Pipette 20µl of G719X Mix to each tube in the second series.
Pipette 20µl of 19Del Mix to each tube in the third series.
Pipette 20µl of 20Ins Mix to each tube in the fourth series.
Pipette 20µl of S768I Mix to each tube in the fifth series.
Pipette 20µl of T790M Mix to each tube in the sixth series.
Pipette 20µl of L858R Mix to each tube in the sixth series.

Pipette 20µl of L861Q Mix to each tube in the sixth series. Continue by adding 5µl 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 ensure all are caped securely. Place tubes in the machine and program it according to the section 15.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

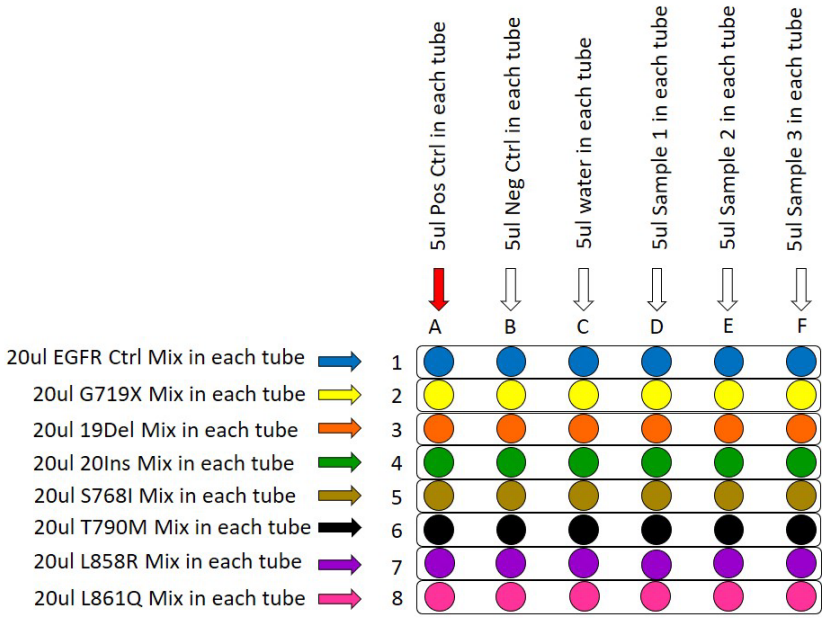


Fig1. Tubes setup for Mixes and samples.

18. 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.

Briefly, click on Analysis menu and then, under Quantitation tab double click on "Cycling A. Green". Close the pop-up window and manually set threshold at 0.05. Repeat above for the Yellow channel and set the threshold at 0.05.

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 a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

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

A) Test is valid only if:

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

Above steps for Test validation are summarized in Figure 2.

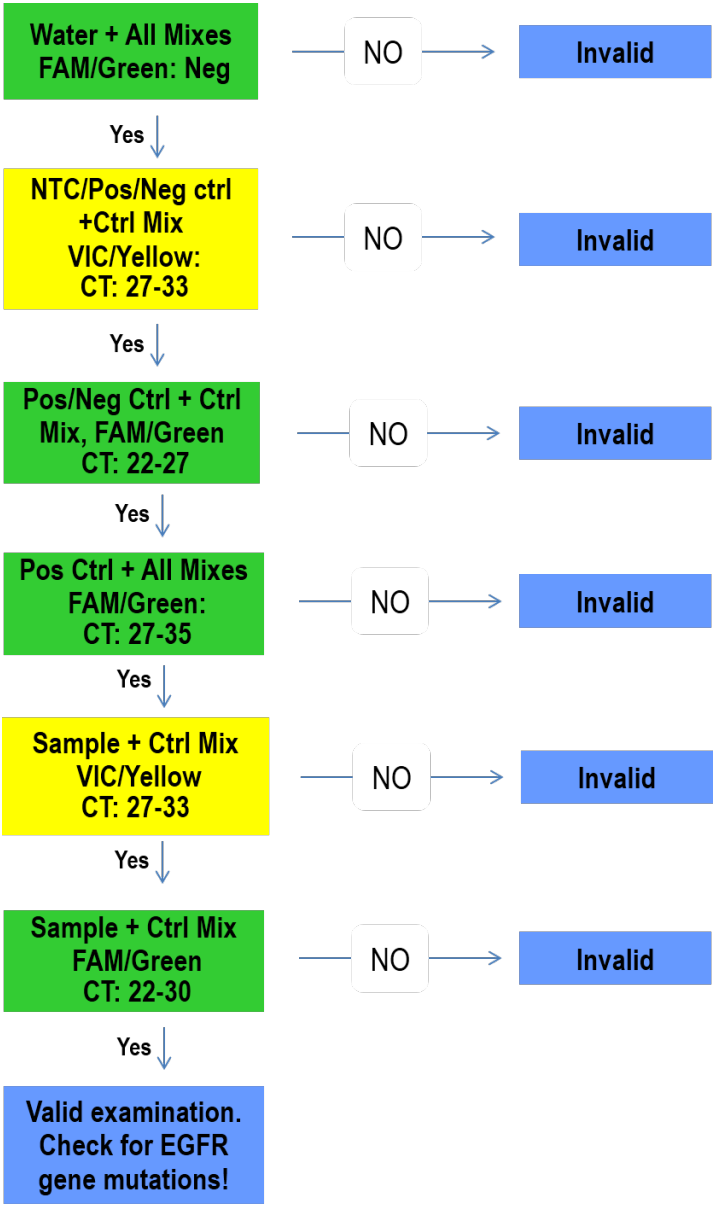


Fig 2. Test validation flowchart

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.

   ΔCT = Mutation Mix CT – 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 Mix, 36.9 for T790M mix, 40 with L858R Mix and 40 with L861Q Mix, then ΔCT 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 ΔCT	Sample ΔCT	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 ΔCTs 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 ΔCT will always fall outside the valid range. Therefore, a sample with CT of 20-40 in the FAM/Green channel for EGFR mutation mixes, will only be considered positive only if ΔCT is within the valid range.

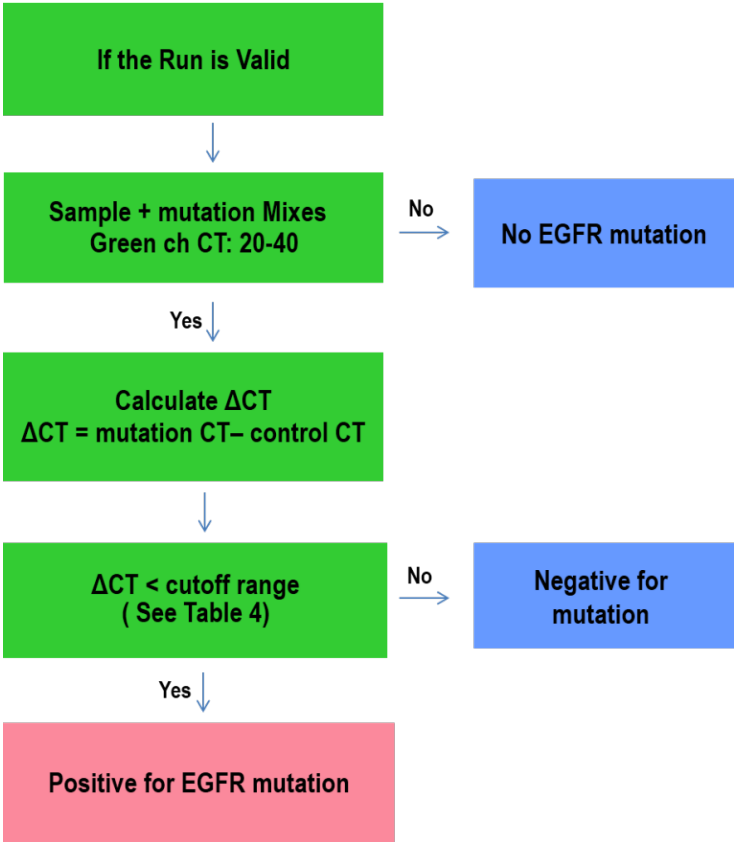


Fig 3. Sample analysis flowchart for EGFR mutation detection

Results can also be interpreted as below:

- Sample is **Negative** for EGFR mutations, if it is negative in the FAM/Green channel with all mixes or has CT above 40.
- Sample is **Negative** for EGFR mutations if it is positive in the 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 ΔCT is lower than cutoff range (Table 4) in the FAM/Green channel for one of the seven EGFR mixes. Briefly,
  - It is Positive for G719X if with G719X Mix has a CT≤40 and ΔCT≤7.4. Note that, this kit doesnt differentiate between G719A, G719S and G719C mutations.
  - It is Positive for 19Del if with 19Del Mix has a CT≤40 and ΔCT≤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≤40 and ΔCT≤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≤40 and ΔCT≤10.3.
  - It is Positive for T790M if with T790M Mix has a CT≤40 and ΔCT≤8.2.
  - It is Positive for L858R if with L858R Mix has a CT≤40 and ΔCT≤10.2.
  - It is Positive for L861Q if with L861Q Mix has a CT≤40 and ΔCT≤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 ΔCT	Conclusion
G719X Mix	>40	-	Neg for G719A/ G719S/ G719C mutations
	20-40	>7.4	Neg for G719A/ G719S/ G719C mutations
	20-40	≤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	≤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	≤6.9	Pos for Exon 20 Insertions
S768I Mix	>40	-	Neg for S768I mutation
	20-40	>10.3	Neg for S768I mutation
	20-40	≤10.3	Pos for S768I mutation
T790M Mix	>40	-	Neg for T790M mutation
	20-40	>8.2	Neg for T790M mutation
	20-40	≤8.2	Pos for T790M mutation
L858R Mix	>40	-	Neg for L858R mutation
	20-40	>10.2	Neg for L858R mutation
	20-40	≤10.2	Pos for L858R mutation
L861Q Mix	>40	-	Neg for L861Q mutation
	20-40	>10	Neg for L861Q mutation
	20-40	≤10	Pos for L861Q mutation

Table 6. Interpretation of results for EGFR mutation.

19. 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 the 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.

20. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

21. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98 993-6223241
Email: info@novingene.com

22. Contact Information

NovinGene ParsVira

Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21-88837393
+98 990-1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

23. References

- Hu, S. ed., 2022. Novel Sensitizing Agents for Therapeutic Anti-EGFR Antibodies (Vol. 1). Academic Press.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Rotow, J., Cheema, P., Pisapia, P. and Troncone, G. 2022. Fast Facts: EGFR Exon 20 Insertion Mutations in NSCLC. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Zhang, Y.L., Yuan, J.Q., Wang, K.F., Fu, X.H., Han, X.R., Threapleton, D., Yang, Z.Y., Mao, C. and Tang, J.L., 2016. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget, 7(48), p.78985.

24. Symbols

RUO	Research use only		Manufacturer		Consult instructions for use
LOT	Lot number	Σ	Content sufficient for <n> tests		Use-by date
REF	Catalogue number	SN	Serial number	-10°C -30°C	Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com