

EGFR 基因突变检测 PCR 技术规范

EGFR Mutation Detection PCR Technology Standard

2021 - 04 - 16 发布

2021 - 05 - 01 实施

吉林省市场监督管理厅 发 布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由吉林省卫生健康委员会提出并归口。

本文件起草单位：吉林大学

本文件主要起草人：姜艳芳、何佳雪、张鹏、刘思文、刘勇、邹红雁、胡馨元、胡欣彤。

EGFR 基因突变检测 PCR 技术规范

1 范围

本文件规定了EGFR基因突变检测的样本要求、检测方法、生物安全要求、材料与试剂、数据处理、结果判定、废弃物处理与防止污染的措施。

本文件适用于荧光PCR法检测组织样本中EGFR基因特定突变。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EGFR 表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor)

ctDNA 循环肿瘤脱氧核糖核酸 (Circulating Tumor Deoxyribo Nucleic Acid)

FFPE 福尔马林固定石蜡包埋组织 (Formalin-Fixed and Parrffin-Embedded)

NTC 无模板对照 (No Template Control)

5 生物安全要求

采样及检测过程所涉及的实验操作应按GB 19489规定执行。

6 材料与试剂

6.1 仪器与耗材

6.1.1 II 级生物安全柜。

6.1.2 涡旋混合仪。

6.1.3 恒温加热器 (56 ℃~90 ℃可调)。

6.1.4 恒温水浴锅 (可达 60 ℃)。

- 6.1.5 微量移液器：10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL。
- 6.1.6 微量带滤芯吸头：10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL。
- 6.1.7 医用冰箱：2℃~8℃、-20℃、-80℃。
- 6.1.8 离心机：10 mL 转子，转速不低于 10000 g/min，可低温离心。
- 6.1.9 离心机：1.5 mL 转子，转速不低于 13000 g/min，可低温离心。
- 6.1.10 实时荧光定量 PCR 仪。
- 6.1.11 离心管：200 μL、1.5 mL、2 mL、10 mL、15 mL。

6.2 试剂

- 6.2.1 除另有规定，本方法试验用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水，所用化学试剂均为分析纯。
- 6.2.2 核酸提取试剂。
- 6.2.3 荧光 PCR 试剂。
- 6.2.4 无水乙醇。
- 6.2.5 异丙醇。
- 6.2.6 二甲苯。
- 6.2.7 RNase A。
- 6.2.8 TE 缓冲液。

7 样本

7.1 采集

7.1.1 组织样本

石蜡包埋病理组织或切片样品应确定含有肿瘤病变细胞，将石蜡包埋病理组织或切片样品切成厚度为 5 μm 的切片，FFPE 样本的组织面积应介于 0.5 cm²~1 cm²，切片用量为 5 片。

7.1.2 外周血样本

10 mL，使用 Streck 管采集，不可使用肝素抗凝剂。

7.1.3 记录

样本接收记录表参见附录 A。

7.2 保存与运输

- 7.2.1 FFPE 样本保存在 2℃~8℃ 低温运输，最长可以保存 3 年。
- 7.2.2 Streck 管血液样本避光常温运输，忌暴晒、冷冻，在室温下最多可以保存 3 d。

8 检测

8.1 在试剂准备间生物安全柜内进行以下操作：

- a) 根据样本类型，按照样本数+2（阳性和阴性对照品各一）配制反应体系；
- b) 将配好的 PCR 体系转移至样本制备间；

8.2 在样本制备间生物安全柜内进行以下操作：

- a) 组织样本：刮取 5 片 FFPE 样品至 1.5 mL 离心管中，通过脱蜡、去除 RNA、柱提法等步骤提取 DNA 并进行洗脱及纯化，获得可用于荧光 PCR 反应的待检 DNA，待检的样品的 DNA 浓度为 1.5~3 ng/ μ L；
- b) 血液样本通过进行离心、去除 RNA、柱提法等步骤提取 ctDNA 并进行洗脱及纯化，获得可用于荧光 PCR 反应的待检 ctDNA；
- c) 根据样本类型，将适量已提取的 DNA 与 PCR 反应体系进行混合；同时设置 NTC 阴性和阳性对照；

8.3 在扩增间进行如下操作：

- a) 实时荧光定量 PCR 仪中进行 PCR 反应，组织样本检测参数见表 1。

表1 组织样本荧光 PCR 参数

步骤	温度 ℃	时间	循环数
1	95	5 min	1
2	95	25 s	15
	64	20 s	
	72	20 s	
3	93	25 s	31
	60	35 s	
	72	20 s	

- b) 实时荧光定量 PCR 仪中进行 PCR 反应，血液样本检测参数见表 2。

表2 血液样本荧光 PCR 参数

步骤	温度 ℃	时间	循环数
1	95	10 min	1
2	95	40 s	15
	64	40 s	
	72	30 s	
3	93	40 s	28
	60	45 s	
	72	30 s	

9 数据处理

检测完成后，计算机自动进行数据分析。

10 阴阳性对照

10.1 实验室对照品

10.1.1 阳性对照品为临床阳性样本合成的质粒 DNA 与血浆 DNA 混合样本；阴性对照品为超纯水。

10.1.2 阳性对照品检测结果为阳性；阴性对照品检测结果为阴性。

10.2 内标基因

检测试剂应自带内标基因，以确认PCR检测是否正确运行。

11 结果判定

11.1 当检测指标值大于该指标阳性判断值时，判定为阴性。

11.2 当检测指标值小于或等于该指标阳性判断值时，判定为阳性。

11.3 组织样本各指标阳性判断值见表 3。

表3 组织样本各指标的阳性判断值

指标名称	检测内容	阳性判断值
19-Del	E746_A750del (1) L747_T751>Q E746_A750del (2) L747_E749del L747_P753>S L747_T751del E746_T751>I L747_ S752del E746_T751del L747_A750>P E746_T751>A L747_P753>Q E746_ S752>A L747_T751>S E746_ S752>V L747_T751del E746_ S752>D L747_T751>P L747_A750>P	26或 ΔCt Cut-off值<11
L858R	L858R	26或 ΔCt Cut-off值<11
T790M	T790M	26或 ΔCt Cut-off值<7
20-Ins	H773_V774insH D770_N771insG V769_D770insASV	26或 ΔCt Cut-off值<9
G719X	G719A/ G719 S/G719C	26或 ΔCt Cut-off值<7
S768I	S768I	26或 ΔCt Cut-off值<8
L861Q	L861Q	26或 ΔCt Cut-off值<8

11.4 血液样本各指标阳性判断值见表 4。

表4 血液样本各指标的阳性判断值

指标名称	检测内容	阳性判断值
19-del	E746_A750del (1) L747_T751>Q E746_A750del (2) L747_E749del L747_P753>S L747_T751del E746_T751>I L747_ S752del E746_T751del L747_A750>P E746_T751>A L747_P753>Q E746_ S752>A L747_T751> S E746_ S752>V L747_T751del E746_ S752>D L747_T751>P L747_A750>P L747_ L747_T751del S752>Q E746_T751>V L747_A750>P E746_T751>T E746_A750>QP L747_K754>QL E746_T751>Q L747_ S752>Q E746_K754>EQHL	Ct值FAM - Ct值HEX <11
T790M	T790M	Ct值FAM - Ct值HEX <8
G719A/ G719 S/G719C	G719A/ G719 S/G719C	Ct值FAM - Ct值HEX <12
20-ins	H773_V774insH D770_N771insG V769_D770insASV D770_N771insSVD V769_D770insASV H773_V774insNPH	Ct值FAM - Ct值HEX <11
L858R	L858R	Ct值ROX- Ct值HEX <11
L861Q	L861Q	Ct值ROX- Ct值HEX <12
S768I	S768I	Ct值CY5 - Ct值HEX <12

12 废弃物处理和防止污染的措施

12.1 废弃物应经 121 ℃ 高压灭菌 30 min 后再弃置。

实验室废弃物处理和防止污染的措施应按SN/T 1193的规定执行。

