受理号：CSZ2600003

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人肿瘤多基因突变检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：苏州吉因加生物医学工程有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

NMPA器审中心技术审评报告公开 www.cmde.org.cn

目　录

基本信息.....3
一、申请人名称.....3
二、申请人住所.....3
三、生产地址.....3
技术审评概述.....4
一、产品概述.....4
二、临床前研究概述.....9
三、临床评价概述.....13
四、产品受益风险判定.....18

基本信息

一、申请人名称

苏州吉因加生物医学工程有限公司

二、申请人住所

苏州工业园区星湖街218号生物纳米园B11栋101、201单元

三、生产地址

苏州工业园区星湖街 218 号生物纳米园 B11 栋 101、201 单元

技术审评概述

一、产品概述

（一）产品主要组成成分

试剂盒由包装 I 和包装 II 组成，详见表 1。

表1 主要组成成分

包装名称	组分名称	主要组成成分	数量
包装 I 文库构建和靶序列捕获试剂盒	末端修复缓冲液	Tris、镁离子、dNTP	336 μL/支×1 支
	末端修复反应酶	Taq DNA 聚合酶	144 μL/支×1 支
	连接缓冲液	Tris、镁离子、ATP	1.44 mL/支×1 支
	连接反应酶	DNA 连接酶	240 μL/支×1 支
	DNA 聚合酶反应液	DNA 聚合酶	1.2 mL/支×1 支
	接头	寡核苷酸	240 μL/支×1 支
	标签序列引物 7001-7048	寡核苷酸	5 μL/孔；48 种/板
	TD 探针	寡核苷酸	64 μL/支×1 支
	Cot-1 DNA	寡核苷酸	80 μL/支×1 支
	通用型 Blocker	寡核苷酸	32 μL/支×1 支
	杂交缓冲液 I	四甲基氯化铵、乙酸镁	272 μL/支×1 支
	杂交缓冲液 II	N-甲基吡咯烷酮	87 μL/支×1 支
	磁珠清洗液	Tris、EDTA、吐温 20	4.8 mL/瓶×1 瓶
	洗脱缓冲液 I	十二烷基硫酸钠	4.32 mL/瓶×1 瓶
	洗脱缓冲液 S	吐温 20	5.12 mL/瓶×1 瓶

	洗脱缓冲液 II	吐温 20	2.56 mL/支×1 支
	洗脱缓冲液 III	柠檬酸钠盐溶液	2.56 mL/支×1 支
	扩增引物	寡核苷酸	80 μL/支×1 支
	DNA 聚合酶反应液	DNA 聚合酶	400 μL/支×1 支
	阳性质控品	EGFR T790M、E746_A750del、KRAS G12C、EML4-ALK (E13:A20)、FGFR2-COL14A1 (F17:C34)突变细胞系 gDNA	20 μL/支×1 支
	阴性质控品	野生型细胞系 gDNA	20 μL/支×1 支
包装 II 核酸纯化试剂盒	磁珠 A	核酸纯化磁珠	8.88 mL/支×1 支
	磁珠 B	链霉亲和素磁珠	160 μL/支×1 支

备注：不同批次试剂盒各组分不可替换使用。

（二）产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测非小细胞肺癌患者经 10% 中性福尔马林固定的石蜡包埋组织（FFPE）样本中 EGFR/KRAS/ERBB2/PIK3CA/ALK/ROS1 的基因变异，和结直肠癌患者经 10% 中性福尔马林固定的石蜡包埋组织（FFPE）样本中 KRAS/BRAF/PIK3CA 的基因变异，和胆管癌患者经 10% 中性福尔马林固定的石蜡包埋组织（FFPE）样本中 FGFR2 基因

融合（重排），具体突变见附表。针对非小细胞肺癌患者，EGFR 基因中 19 号外显子缺失和 L858R 点突变用于盐酸厄洛替尼片的伴随诊断，T790M 点突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断；ALK 基因和 ROS1 基因融合（重排）用于克唑替尼胶囊的伴随诊断；针对结直肠癌患者，KRAS 基因野生型用于西妥昔单抗注射液的伴随诊断；针对胆管癌患者，FGFR2 基因融合（重排）用于酒石酸凡瑞格拉替尼片的伴随诊断。

伴随诊断用途的基因变异类型及相应的靶向药详细信息见表 2；表 3 为本试剂盒可检出，但未经伴随诊断验证的基因突变类型。

表 2 伴随诊断用途的基因变异类型及相应的靶向药

癌症类型	基因	突变		药物
非小细胞肺癌	EGFR	19 号外显子缺失	c.2240_2251delTAAGAGAAGCAA(p.Leu747_Thr751delinsSer)(COSM6210)	盐酸厄洛替尼片
			c.2239_2247delTTAAGAGAA(p.Leu747_Glu749del)(COSM6218)	
			c.2238_2255delATTAAGAGAAGCAACATC(p.Glu746_Ser752delinsAsp)(COSM6220)	
			c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC(p.Glu746_Ala750del)(COSM6223)	
			c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA(p.Glu746_Ala750del)(COSM6225)	
			c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT(p.Leu747_Thr751del)(COSM6254)	
			c.2239_2256delTTAAGAGAAGCAACATCT(p.Leu747_Ser752del)(COSM6255)	
			c.2237_2254delAATTAAGAGAAGCAACAT(p.Glu746_Ser752delinsAla)(COSM12367)	
			c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT(p.Leu747_Thr751del)(COSM12369)	

癌症类型	基因	突变	药物
		c.2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC(p.Leu747_Pro753delinsSer)(COSM12370)	
		c.2239_2248delinsC(p.Leu747_Ala750delinsPro)(COSM12382)	
		c.2239_2251delinsC(p.Leu747_Thr751delinsPro)(COSM12383)	
		c.2237_2255delinsT(p.Glu746_Ser752delinsVal)(COSM12384)	
		c.2235_2255delinsAAT(p.Glu746_Ser752delinsIle)(COSM12385)	
		c.2237_2252delinsT(p.Glu746_Thr751delinsVal)(COSM12386)	
		c.2239_2258delinsCA(p.Leu747_Pro753delinsGln)(COSM12387)	
		c.2239_2256delinsCAA(p.Leu747_Ser752delinsGln)(COSM12403)	
		c.2237_2253delinsTTGCT(p.Glu746_Thr751delinsValAla)(COSM12416)	
		c.2238_2252delinsGCA(p.Leu747_Thr751delinsGln)(COSM12419)	
		c.2238_2248delinsGC(p.Leu747_Ala750delinsPro)(COSM12422)	
		c.2237_2251delAATTAAGAGAAGCAA(p.Glu746_Thr751delinsAla)(COSM12678)	
		c.2236_2253delGAATTAAGAGAAGCAACA(p.Glu746_Thr751del)(COSM12728)	
		c.2235_2248delinsAATTC(p.Glu746_Ala750delinsIlePro)(COSM13550)	
		c.2235_2252delinsAAT(p.Glu746_Thr751delinsIle)(COSM13551)	
		c.2235_2251delinsAATTC(p.Glu746_Thr751delinsIlePro)(COSM13552)	
		c.2253_2276delATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAAT(p.Ser752_Ile759del)(COSM13556)	
		c.2237_2257delinsTCT(p.Glu746_Pro753delinsValSer)(COSM18427)	
		c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT(p.Leu747_Thr751del)(COSM23571)	
		c.2233_2247delAAGGAATTAAGAGAA(p.Lys745_Glu749del)(COSM26038)	
		L858R	盐酸厄洛替尼片

癌症类型	基因	突变	药物
		T790M	甲磺酸奥希替尼片
	ALK	融合（重排）	克唑替尼胶囊
	ROS1	融合（重排）	克唑替尼胶囊
结直肠癌	KRAS	野生型（G12A、G12C、G12S、G12V、G12D、G12R、G13D突变阴性）	西妥昔单抗注射液
胆管癌	FGFR2	融合（重排）	酒石酸凡瑞格拉替尼片

表 3 未经伴随诊断验证的基因变异类型

癌症类型	基因	突变
非小细胞肺癌	EGFR	G719A、G719C、G719S、S768I、L861Q
	ERBB2	Y772_A775dup
	KRAS	G12A、G12C、G12S、G12V、G12D、G12R、G13D
	PIK3CA	E542K、E545K、H1047R
结直肠癌	BRAF	V600E
	PIK3CA	E542K、E545K、H1047R

（三）产品包装规格

48 测试/盒

（四）产品检验原理

本试剂盒针对从肿瘤 FFPE 样本中提取的基因组 DNA（gDNA）经片段化后所得产物进行末端修复及加“A”处理，在修复后的 DNA 片段两端连上已知序列的接头，再使用标签序列

引物和聚合酶进行 PCR 扩增得到预文库。预文库与带有生物素标记的寡核苷酸探针进行杂交，并使用链霉素包被的磁珠捕获与探针结合的文库，最后经 PCR 扩增得到捕获文库。捕获文库通过高通量测序得到测序数据，经配套的信息分析软件分析后即可得到样本最终的基因变异信息。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

1.主要原材料的选择

主要原材料包括末端修复反应酶、连接反应酶、接头、扩增引物、TD 探针、链霉亲和素磁珠、DNA 聚合酶反应液、质控品。这些原材料均为外购方式获得。

其中接头、扩增引物、TD 探针为申请人自行设计后由合成公司合成并纯化获得。质控品由供应商提取纯化获得的细胞系 DNA。

申请人对主要原材料进行了供应商的选择，通过功能性试验，筛选出合格供应商，制定了各主要原材料的技术要求和质量标准并经检验合格。

2.企业参考品和对照品的设置情况

本产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品和重复性参考品。

阴性参考品 5 份，为检测范围内所有靶基因变异位点均无突变的样本；阳性参考品 14 份，包含检测范围内所有靶基因的代表性位点；重复性参考品 2 份，包含两个突变频率下检测范围内各靶基因代表性变异位点；检测限参考品 6 份，包含检测范围内所有靶基因的代表性变异位点检测限突变频率的样本。

本产品设置了阳性质控品和阴性质控品，阳性质控品由野生型细胞系与突变型细胞系混合制备而成，阴性质控品由野生型细胞系制备而成，用于检测过程的质量控制。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人根据试剂盒中试剂及组分的主要生产工艺的研究结果，确定了最佳的生产工艺。

申请人对反应体系的研究包括 DNA 样本用量、试剂用量、文库构建条件、文库富集条件、质控标准等，通过功能性试验，最终确定了最佳的反应体系。

（三）分析性能评估

本产品分析性能评估内容主要包括：准确度、最低检测限、精密度、分析特异性、核酸提取纯化性能等。申请人提交了有效质量管理体系下生产的三批产品在适用机型上的性能评估资料。

准确度研究中，使用三批成品试剂盒在适用机型上对企业

阳性参考品和阴性参考品进行检测，检测结果显示阳性符合率、阴性符合率均为100%。同时，申请人对产品检测范围内的不同突变频率临床样本进行检测，评估申报产品与对比方法的一致性，检测结果符合要求。

精密度研究中，对含有不同突变频率的临床样本和参考品进行检测，研究样本涵盖产品检测范围内所有伴随相关位点和覆盖预期癌种的不同变异类型和基因的二级位点。评价本产品批内、批间、日内、日间、人员间、仪器间和实验室间精密度，检测结果符合要求。

最低检测限研究中，使用临床样本建立并验证了各靶基因变异位点的最低检测限。再采用三批成品试剂盒对检测限进行验证，最终确定本产品最低检测限为在肿瘤细胞含量不低于10%，DNA总量不低于30 ng基因组DNA背景下，可检测的变异位点的最低突变频率为2%。

分析特异性研究，包含交叉反应研究和干扰研究。交叉反应研究样本包括序列相近和同源基因的高频突变位点、常见感染微生物（大肠杆菌、肺炎链球菌、洋葱伯克霍尔德菌）、检测范围外变异类型和人基因组。同源基因部分的交叉反应研究包含信息学比对分析和湿试验研究，其中湿试验研究样本包括ERBB3、ERBB4、HRAS、NRAS、PIK3CB、PIK3CD和ARAF

基因突变。研究结果显示本产品与上述交叉反应物均不产生交叉反应。干扰物质研究结果显示，临床 FFPE 样本可能存在的干扰物 1% V/V 无水乙醇、0.1% V/V 福尔马林、1% V/V 石蜡、0.08 mg/mL 蛋白酶 K、2 mg/mL 血红蛋白和坏死组织，对检测结果均无影响。

肿瘤组织细胞含量研究中，对不同肿瘤细胞含量进行了检测。结果表明，肿瘤细胞含量 10%以上的组织样本均可检出。结合临床样本的多样性和复杂性，建议组织样本肿瘤细胞含量≥20%。

申请人采用临床样本对核酸提取试剂盒进行了性能研究，根据与该产品的组合性能研究结果，确定配套的核酸提取试剂符合检测需求。

（四）阳性判断值研究

申请人采用受试者工作特征（ROC）曲线法确定阳性判断值。选取 786 例临床样本，使用本试剂盒进行检测，ROC 曲线建立本产品的阳性判断值，再采用临床样本进行验证，最终确定产品的阳性判断值如表 4:

表 4 阳性判断值标准

变异类型	阳性判断标准
点突变	突变 reads 数≥4，突变频率≥1%

插入缺失突变	突变 reads 数≥2，突变频率≥1%
融合/重排	SRCount[1]+DPCount[2]≥2，突变频率≥1%

[1]SRCount：Split Reads 计数

[2]DPCount：Discordant Pair 计数

（五）稳定性研究

稳定性研究包括实时稳定性、使用稳定性（开瓶和冻融稳定性）、运输稳定性和样本稳定性。

实时稳定性研究采用三批试剂盒置于规定储存条件下，在不同时间对试剂盒的性能进行检测，结果显示各项性能指标均符合要求，结果表明：产品在规定的条件下（包装 I：-20℃±5℃，包装 II：2～8℃）有效期为 12 个月。

此外，对产品的开瓶、冻融稳定性、运输稳定性和样本稳定性分别进行了研究。结果显示，产品性能均能满足产品说明书声称。

三、临床评价概述

申请人在中国医学科学院北京协和医院、浙江省肿瘤医院、河南省肿瘤医院、山西省肿瘤医院、吉林大学第一医院以及南京大学医学院附属鼓楼医院共6家临床试验机构进行临床试验。本次临床试验分为如下三部分。

第一部分：采用试验体外诊断试剂与实验室参比方法

（sanger 测序）及已上市同类产品进行对比试验，评价试验体外诊断试剂的临床检测性能。

针对非小细胞肺癌基因变异，采用试验体外诊断试剂与实验室参比方法（sanger 测序）及已上市同类产品进行对比试验。

对于 EGFR 基因变异，共 1182 例受试者样本纳入统计。其中 L858R 阳性 354 例、19Del 阳性 130 例、T790M 阳性 75 例、G719X 阳性 52 例，S768I 阳性 25 例，L861Q 阳性 33 例。结果显示，阳性符合率为 99.62% (95%CI：98.64%，99.90%)，阴性符合率为 95.88% (95%CI：93.73%，97.32%)。

对于KRAS基因变异，共纳入统计受试者953例，其中G12A阳性 5 例、G12C 阳性 27 例、G12D 阳性 27 例、G12S 阳性 1 例、G12V 阳性 10 例、G13D 阳性 3 例，阳性符合率 98.59% (95%CI: 93.61%，99.85%)，阴性符合率 99.32% (95%CI: 98.60%，99.72%)。

对于 ALK 基因融合，共纳入统计受试者 988 例，其中阳性 88 例。阳性符合率为 100.00% (95%CI:95.82%,100.00%)，阴性符合率为 99.89% (95%CI:99.37%,99.98%)。

对于 ROS1 基因融合，共纳入统计受试者 996 例，其中阳性 92 例。阳性符合率为 100.00% (95%CI:95.99%,100.00%)，阴性符合率为 99.45% (95%CI:98.71%,99.76%)。

对于 ERBB2 Y772_A775dup 基因变异，共纳入统计受试者 1136 例，其中阳性 81 例。阳性符合率为 100.00% (95%CI:95.47%,100.00%)，阴性符合率为 99.81% (95%CI:99.31%,99.95%)。

对于 PIK3CA 基因变异，共纳入统计受试者 1141 例。其中 E542K 阳性 23 例、E545K 阳性 36 例、H1047R 阳性 33 例。阳性符合率为 100.00% (95%CI: 95.95%，100.00%)，阴性符合率为 99.33% (95%CI: 98.62%，99.68%)。

针对结直肠癌相关基因变异，选择 sanger 测序作为对比方法。

对于 KRAS 基因变异，共纳入统计受试者 572 例，阳性 192 例，其中 KRAS G12A 阳性 12 例、KRAS G12C 阳性 9 例、KRAS G12D 阳性 65 例、KRAS G12S 阳性 14 例、KRAS G12V 阳性 38 例、KRAS G12R 阳性 4 例、KRAS G13D 阳性 50 例。阳性符合率为 100.00% (95%CI:98.04%，100.00%)，阴性符合率为 98.16% (95%CI:96.25%，99.10%)。

对于 PIK3CA 基因变异，共纳入统计受试者 573 例，其中 E542K 阳性 19 例、E545K 阳性 46 例、H1047R 阳性 26 例。阳性符合率为 98.90% (95%CI:94.03%,99.81%)，阴性符合率为 98.76% (95%CI:97.32%,99.43%)。

对于 BRAF V600E 基因变异，共纳入统计受试者 573 例，其中阳性 97 例。阳性符合率为 100.00% (95%CI:96.19%,100.00%)，阴性符合率为 99.37% (95%CI:98.16%,99.79%)。

针对胆管癌相关基因变异，选择 RNA-Seq 测序法作为对比方法。

对于 FGFR2 基因融合，共纳入统计受试者 453 例，其中阳性 58 例。阳性符合率为 100.00% (95%CI:93.79%,100.00%)，阴性符合率为 100.00% (95%CI:99.04%,100.00%)。

上述结果显示，试验体外诊断试剂与对比方法具有良好的一致性。

第二部分：采用试验体外诊断试剂与原研伴随诊断试剂进行对比研究，评价试验体外诊断试剂对于盐酸厄洛替尼片、甲磺酸奥希替尼片、克唑替尼胶囊和西妥昔单抗注射液的伴随诊断性能。

针对非小细胞肺癌，入组病例均为非小细胞肺癌患者，样本类型为 FFPE 样本。针对 EGFR 基因变异，共纳入统计受试者 340 例，其中 L858R 阳性 130 例、19Del 阳性 111 例、T790M 阳性 77 例。试验结果显示，阳性符合率为 99.37% (95%CI:97.74%,99.83%)，阴性符合率为 100.00%

(95%CI:96.19%,100.00%)。

针对 ALK 基因融合，临床试验纳入统计受试者共 245 例，其中阳性 109 例。试验结果显示，阳性符合率为 99.08% (95%CI:94.99%，99.84%)，阴性符合率为 98.53% (95%CI:94.80%，99.60%)。

针对 ROS1 基因融合，临床试验纳入统计受试者共 256 例，其中阳性 89 例。试验结果显示，阳性符合率为 98.88% (95%CI:93.91%,99.80%)，阴性符合率为 100.00% (95%CI:97.75%,100.00%)。

针对结直肠癌，入组病例均为结直肠癌患者，样本类型为 FFPE 样本。针对 KRAS 基因变异，临床试验纳入统计受试者共 226 例，其中阳性 146 例。试验结果显示，阳性符合率为 100.00% (95%CI:97.44%，100.00%)，阴性符合率为 100.00% (95%CI:95.42%，100.00%)。

第三部分：采用桥接试验评价试验体外诊断试剂对于酒石酸凡瑞格拉替尼片的伴随诊断性能。

针对该部分研究，采用试验体外诊断试剂与药物临床试验分析方法（CTA）的检测结果对比，共纳入 206 例肝内胆管癌患者的样本，包含药物临床试验中的 66 例样本。阳性符合率为 100.00% (95%CI:95.58%，100.00%)，阴性符合率为 100.00%

(95%CI:96.97%，100.00%)。对于药物临床试验中入组的 CTA 阳性样本，本次桥接试验纳入 40 例，试验体外诊断试剂检测阳性 40 例，药物临床试验主要评价指标客观缓解率（ORR）与药物临床试验结果基本一致。

综上所述，该产品临床试验设计符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的相关要求。临床试验结果显示该产品临床性能满足临床要求。

四、产品受益风险判定

根据 GB/T 42062-2022 标准的要求对产品进行受益风险分析。

（一）受益评估

本试剂盒用于体外定性检测非小细胞肺癌患者经 10% 中性福尔马林固定的石蜡包埋组织（FFPE）样本中 EGFR/KRAS/ERBB2/PIK3CA/ALK/ROS1 的基因变异，和结直肠癌患者经 10%中性福尔马林固定的石蜡包埋组织（FFPE）样本中 KRAS/BRAF/PIK3CA 的基因变异，和胆管癌患者经 10%中性福尔马林固定的石蜡包埋组织（FFPE）样本中 FGFR2 基因融合（重排）。具体突变位点信息详见产品说明书。其中针对非小细胞肺癌患者，EGFR 基因中 19 号外显子缺失和 L858R 点突变用于盐酸厄洛替尼片的伴随诊断，T790M 点突变用于甲磺酸

奥希替尼片的伴随诊断，ALK 基因和 ROS1 基因融合（重排）用于克唑替尼胶囊的伴随诊断；针对结直肠癌患者，KRAS 基因野生型用于西妥昔单抗注射液的伴随诊断；针对胆管癌患者，FGFR2 基因融合（重排）用于酒石酸凡瑞格拉替尼片的伴随诊断。

本产品临床应用的主要受益在于：可以作为盐酸厄洛替尼片、甲磺酸奥希替尼片、克唑替尼胶囊的伴随诊断试剂对靶向药物人群进行筛选，从而让非小细胞肺癌患者获得及时的治疗。作为西妥昔单抗注射液的伴随诊断试剂对靶向药物人群进行筛选，从而让结直肠癌患者获得及时的治疗。作为酒石酸凡瑞格拉替尼片的伴随诊断试剂对靶向药物人群进行筛选，从而让胆管癌患者获得及时的治疗。

（二）风险评估

申请人对已知危险进行风险评价，按照风险可接受准则判断每个危险的风险是否达到可接受水平，经综合评价，目前认为该产品的受益大于风险，但为保证产品使用安全，基于对主要剩余风险的考虑，已对产品说明书中的风险提示进行了更新。具体如下：

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况

综合考虑。

2. 阴性结果不能完全排除靶基因突变的存在，样本中核酸过度降解或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成阴性结果。

3. 肿瘤组织（细胞）可能存在较大异质性，不同部位取样可能会得到不同的检测结果。

4. 不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

附件：产品说明书

人肿瘤多基因突变检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

说明书

【产品名称】

通用名称：人肿瘤多基因突变检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

【包装规格】

48 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测非小细胞肺癌患者经 10% 中性福尔马林固定的石蜡包埋组织（FFPE）样本中 EGFR/KRAS/ERBB2/PIK3CA/ALK/ROS1 的基因变异，和结直肠癌患者经 10% 中性福尔马林固定的石蜡包埋组织（FFPE）样本中 KRAS/BRAF/PIK3CA 的基因变异，和胆管癌患者经 10% 中性福尔马林固定的石蜡包埋组织（FFPE）样本中 FGFR2 基因融合（重排），具体突变见附表。针对非小细胞肺癌患者，EGFR 基因中 19 号外显子缺失和 L858R 点突变用于盐酸厄洛替尼片的伴随诊断，T790M 点突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断；ALK 基因和 ROS1 基因融合（重排）用于克唑替尼胶囊的伴随诊断；针对结直肠癌患者，KRAS 基因野生型用于西妥昔单抗注射液的伴随诊断；针对胆管癌患者，FGFR2 基因融合（重排）用于酒石酸凡瑞格拉替尼片的伴随诊断。

伴随诊断用途的基因变异类型及相应的靶向药详细信息见表 1；表 2 为本试剂盒可检出，但未经伴随诊断验证的基因突变类型。

表 1 伴随诊断用途的基因变异类型及相应的靶向药

癌症类型	基因	突变		药物
非小细胞肺癌	EGFR	19号外显子缺失	c.2240_2251delTAAGAGAAGCAA(p.Leu747_Thr751delinsSer)(COSM6210)	盐酸厄洛替尼片
			c.2239_2247delTTAAGAGAA(p.Leu747_Glu749del)(COSM6218)	
			c.2238_2255delATTAAGAGAAGCAACATC(p.Glu746_Ser752delinsAsp)(COSM6220)	
			c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC(p.Glu746_Ala750del)(COSM6223)	
			c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA(p.Glu746_Ala750del)(COSM6225)	
			c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT(p.Leu747_Thr751del)(COSM6254)	
			c.2239_2256delTTAAGAGAAGCAACATCT(p.Leu747_Ser752del)(COSM6255)	
			c.2237_2254delAATTAAGAGAAGCAACAT(p.Glu746_Ser752delinsAla)(COSM12367)	
			c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT(p.Leu747_Thr751del)(COSM12369)	

癌症类型	基因	突变	药物
		c.2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC(p.Leu747_Pro753delinsSer)(COSM12370)	
		c.2239_2248delinsC(p.Leu747_Ala750delinsPro)(COSM12382)	
		c.2239_2251delinsC(p.Leu747_Thr751delinsPro)(COSM12383)	
		c.2237_2255delinsT(p.Glu746_Ser752delinsVal)(COSM12384)	
		c.2235_2255delinsAAT(p.Glu746_Ser752delinsIle)(COSM12385)	
		c.2237_2252delinsT(p.Glu746_Thr751delinsVal)(COSM12386)	
		c.2239_2258delinsCA(p.Leu747_Pro753delinsGln)(COSM12387)	
		c.2239_2256delinsCAA(p.Leu747_Ser752delinsGln)(COSM12403)	
		c.2237_2253delinsTTGCT(p.Glu746_Thr751delinsValAla)(COSM12416)	
		c.2238_2252delinsGCA(p.Leu747_Thr751delinsGln)(COSM12419)	
		c.2238_2248delinsGC(p.Leu747_Ala750delinsPro)(COSM12422)	
		c.2237_2251delAATTAAGAGAAGCAA(p.Glu746_Thr751delinsAla)(COSM12678)	
		c.2236_2253delGAATTAAGAGAAGCAACA(p.Glu746_Thr751del)(COSM12728)	
		c.2235_2248delinsAATTC(p.Glu746_Ala750delinsIlePro)(COSM13550)	
		c.2235_2252delinsAAT(p.Glu746_Thr751delinsIle)(COSM13551)	
		c.2235_2251delinsAATTC(p.Glu746_Thr751delinsIlePro)(COSM13552)	
		c.2253_2276delATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAAT(p.Ser752_Ile759del)(COSM13556)	
		c.2237_2257delinsTCT(p.Glu746_Pro753delinsValSer)(COSM18427)	
		c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT(p.Leu747_Thr751del)(COSM23571)	
		c.2233_2247delAAGGAATTAAGAGAA(p.Lys745_Glu749del)(COSM26038)	
		L858R	盐酸厄洛替尼片
		T790M	甲磺酸奥希替尼片
	ALK	融合（重排）	克唑替尼胶囊
	ROS1	融合（重排）	克唑替尼胶囊
结直肠癌	KRAS	野生型（G12A、G12C、G12S、G12V、G12D、G12R、G13D 突变阴性）	西妥昔单抗注射液
胆管癌	FGFR2	融合（重排）	酒石酸凡瑞格拉替尼片

表 2 未经伴随诊断验证的基因变异类型

癌症类型	基因	突变
非小细胞肺癌	EGFR	G719A、G719C、G719S、S768I、L861Q
	ERBB2	Y772_A775dup
	KRAS	G12A、G12C、G12S、G12V、G12D、G12R、G13D
	PIK3CA	E542K、E545K、H1047R
结直肠癌	BRAF	V600E

	PIK3CA	E542K、E545K、H1047R

全球癌症统计结果显示，我国的癌症发病率处于较高水平，尤其是非小细胞肺癌和结直肠癌。胆管癌虽然少见，但其发病率和死亡率正逐年上升，成为全球健康问题，我国也是胆管癌发病率最高的国家之一[1]。

非小细胞肺癌

肺癌是最常见的肺部原发性恶性肿瘤，占全球癌症总发病人口的 11.6%，也是我国最常见的恶性肿瘤之一[1]。主要分为非小细胞肺癌（NSCLC）和小细胞肺癌（SCLC）这两类，其中 NSCLC 占 85%以上，且 NSCLC 中以肺腺癌最常见[2]。

EGFR、ALK、ROS1、ERBB2 是 NSCLC 常见的驱动基因[3, 4]，近年来，针对 NSCLC 的靶向治疗进展迅速，已获批的靶向药物包括：EGFR 酪氨酸激酶抑制剂（TKI），如吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥希替尼等；ALK 抑制剂，如克唑替尼、塞瑞替尼、阿来替尼等；ROS1 抑制剂，如克唑替尼等。ERBB2 与 EGFR 同为 ErbB 受体家族成员，最常见的变异为 20 外显子插入突变，多项临床指南推荐应在临床诊断和治疗或临床试验中进行 ERBB2 检测。此外，KRAS 基因突变和 PIK3CA 基因突变与 EGFR-TKI 药物的耐药十分相关[5]。

结直肠癌

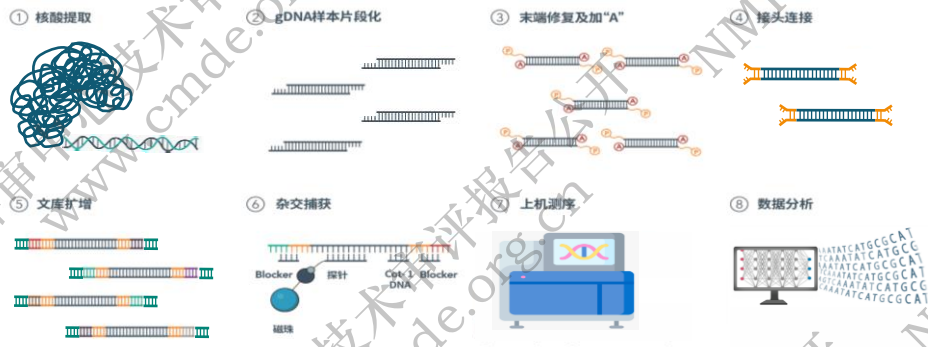
结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一，占癌症总发病人口的 10.2%[1]。KRAS、BRAF 和 PIK3CA 是结直肠癌常见的驱动基因[6, 7]。针对结直肠癌已获批的靶向药物包括 EGFR 抑制剂，如西妥昔单抗、帕尼单抗。KRAS 基因突变和 BRAF 基因突变是西妥昔单抗的耐药突变，PIK3CA 基因突变可能也是引起西妥昔单抗耐药的因素[8]。

胆管癌

胆管癌又称胆管细胞癌，术后 5 年生存率低于 10%，一直以来，关于胆管癌的系统性治疗手段十分有限。FGFR2 融合（重排）发生率约为 3%～11%，是胆管癌患者中比较典型发生的基因变异，亦是胆管癌目前重要的治疗靶点[9]。佩米替尼片是 FGFR 抑制剂，2022 年 3 月获得 NMPA 批准用于既往至少接受过一种系统性治疗，且经检测确认存在有 FGFR2 融合（重排）的晚期、转移性或不可手术切除的胆管癌成人患者的治疗。另有 HMPL-453 等多个针对 FGFR2 融合或重排胆管癌的 FGFR 抑制剂正在开展临床试验。

【检验原理】

本试剂盒针对从肿瘤 FFPE 样本中提取的基因组 DNA（gDNA）经片段化后所得产物进行末端修复及加“A”处理，在修复后的 DNA 片段两端连上已知序列的接头，再使用标签序列引物和聚合酶进行 PCR 扩增得到预文库。预文库与带有生物素标记的寡核苷酸探针进行杂交，并使用链霉素包被的磁珠捕获与探针结合的文库，最后经 PCR 扩增得到捕获文库。捕获文库通过高通量测序得到测序数据，经配套的信息分析软件分析后即可得到样本最终的基因变异信息（如图 1 所示）。



【主要组成成分】

本试剂盒包含：末端修复缓冲液、末端修复反应酶、连接缓冲液、连接反应酶、DNA 聚合酶反应液、接头、标签序列引物、TD 探针、Cot-1 DNA、通用型 Blocker、杂交缓冲液 I、杂交缓冲液 II、磁珠清洗液、洗脱缓冲液 I、洗脱缓冲液 S、洗脱缓冲液 II、洗脱缓冲液 III、扩增引物、阳性质控品、阴性质控品、磁珠 A、磁珠 B。具体内容详见表 3.

表 3 试剂盒主要组成成分

包装名称	组分名称	主要组成成分	数量（48 测试/盒）
包装 I 文库构建和靶序列捕获试剂盒	末端修复缓冲液	Tris、镁离子、dNTP	336 μL/支×1 支
	末端修复反应酶	Taq DNA 聚合酶	144 μL/支×1 支
	连接缓冲液	Tris、镁离子、ATP	1.44 mL/支×1 支
	连接反应酶	DNA 连接酶	240 μL/支×1 支
	DNA 聚合酶反应液	DNA 聚合酶	1.2 mL/支×1 支
	接头	寡核苷酸	240 μL/支×1 支
	标签序列引物 7001-7048	寡核苷酸	5 μL/孔；48 种/板
	TD 探针	寡核苷酸	64 μL/支×1 支

	Cot-1 DNA	寡核苷酸	80 μL/支×1 支
	通用型 Blocker	寡核苷酸	32 μL/支×1 支
	杂交缓冲液 I	四甲基氯化铵、乙酸镁	272 μL/支×1 支
	杂交缓冲液 II	N-甲基吡咯烷酮	87 μL/支×1 支
	磁珠清洗液	Tris、EDTA、吐温 20	4.8 mL/瓶×1 瓶
	洗脱缓冲液 I	十二烷基硫酸钠	4.32 mL/瓶×1 瓶
	洗脱缓冲液 S	吐温 20	5.12 mL/瓶×1 瓶
	洗脱缓冲液 II	吐温 20	2.56 mL/支×1 支
	洗脱缓冲液 III	柠檬酸钠盐溶液	2.56 mL/支×1 支
	扩增引物	寡核苷酸	80 μL/支×1 支
	DNA 聚合酶反应液	DNA 聚合酶	400 μL/支×1 支
	阳性质控品	EGFR T790M、E746_A750del、KRAS G12C、EML4-ALK (E13:A20)、FGFR2-COL14A1 (F17:C34)突变细胞系 gDNA	20 μL/支×1 支
	阴性质控品	野生型细胞系 gDNA	20 μL/支×1 支
包装 II 核酸纯化试剂盒	磁珠 A	核酸纯化磁珠	8.88 mL/支×1 支
	磁珠 B	链霉亲和素磁珠	160 μL/支×1 支

注：接头序列见附表 6、标签引物序列见附表 7；不同批次试剂盒各组分不可替换使用。

需自备的试剂、仪器等，详见表 4。

表 4 自备试剂、仪器和软件

用途	名称	注册/备案证号/货号
核酸提取	GeneRead™ DNA FFPE Kit（Qiagen）	货号：180134
	核酸提取或纯化试剂（磁珠法）（吉因加）	苏苏械备 20241394
核酸定量	试剂：1×dsDNA HS Assay Kit for Qubit（翌圣生物）	货号：12642ES76
	Qubit® dsDNA BR Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）	货号：Q32853
	Qubit® ssDNA Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）	货号：Q10212

	配套仪器：Qubit Fluorometer（Thermo Fisher Scientific）	
片段质控	试剂：S2 标准卡夹（光鼎生物） N1 高灵敏度卡夹（光鼎生物） 配套仪器：生物片段分析仪（光鼎生物，型号：Qsep 系列）	货号：C405101 货号：C405105
	试剂：NGS 3K Reagent Kit（PerkinElmer） 配套仪器：LabChip GX Touch（PerkinElmer，型号：HT）	货号：CLS960013
	试剂：Agilent DNA 1000 Reagents（Agilent） 配套仪器：生物芯片分析系统（Agilent，型号：2100）	货号：5067-1505
测序试剂	测序反应通用试剂盒（吉因加）（芯片型号：G2000）	苏苏械备 20251207
分析软件	基因检测数据分析软件（型号：OncoTOP；版本 V1.0）（吉因加）	湘械注准 20222212205

【储存条件及有效期】

1．本试剂盒除磁珠以外的其他试剂置于-20±5℃条件下保存，磁珠置于 2-8℃条件下保存，有效期为 12 个月。

2．试剂盒反复冻融次数建议不超过 6 次，其中磁珠不可冻融；开封使用后应尽快用完。

3．生产日期及失效日期见试剂盒标签。

【适用仪器】

基因测序仪（型号：Gene^{+}Seq-2000；注册证编号：国械注准 20193220614）

【样本要求】

1．检测样本类型为非小细胞肺癌、结直肠癌和胆管癌患者的经 10%中性福尔马林固定的石蜡包埋组织样本。石蜡包埋组织样本室温保存年限建议不超过 5 年。

2．石蜡包埋组织切片后建议尽快进行检测；如不能及时检测，切片应于-20±5℃条件下保存，保存期限不超过 12 个月。

3．组织样本检测前需确定肿瘤细胞含量，应不低于 10%，建议不低于 20%。

4．提取后的 DNA 建议及时构建文库；如需储存，建议置于−20±5℃条件下，储存期限不超过 5 年，且应避免反复冻融。

【检验方法】

1. 核酸提取

石蜡包埋组织块建议切成 5-10 μm 厚度，切片数量建议≥5 片。按照推荐 GeneRead™ DNA FFPE Kit 或核酸提取或纯化试剂（磁珠法）操作说明进行 DNA 的提取。

2. 预文库构建

2.1 片段化处理

2.1.1 在 DNA 打断管（自备）中加入 30 ng-400 ng 待测样本 DNA，同时取试剂盒中的阳性质控品和阴性质控品各 5 μL 与待测样本同步检测，使用 TE（需自备）补充至 55 μL 打断体积，使用 Diagenode Bioruptor Pico 超声打断仪、Covaris LE220 超声打断仪或苏州吉因加 GIN Sonics8P 样品前处理系统进行超声打断。

2.1.2 推荐打断条件如下：

表 5 推荐打断条件

Diagenode Bioruptor 超声打断					
On Time (s)	Off Time (s)		Cycles		Temperature (℃)
30	30		30		4
Covaris LE220 超声打断					
Peak Power (W)	Duty Factor(%)	Cycles/Burst	Cycles	Treatment Time(s)	Temperature (℃)
500	20	1000	19	22	4
GIN sonics 8P 超声打断					
打断时间 (s)	间隔时间 (s)		循环次数		温度(℃)
36	60		10		4

2.1.3 采用光鼎生物 Qsep 系列生物片段分析仪、PerkinElmer LabChip GX Touch HT 或 Agilent 2100 生物芯片分析系统及配套的试剂对打断后的 DNA 片段进行检测，主峰位置应在 150-300 bp 范围内。

2.2 末端修复及加“A”

2.2.1 取出末端修复反应酶轻弹管壁 3-5 次混匀，末端修复缓冲液常温解冻后涡旋混匀，置于冰盒上。

2.2.2 在 PCR 管中按表 6 配制末端修复及加“A”反应体系，涡旋 10s 混匀，瞬时离心。

表 6 末端修复及加“A”体系

组分	单反应体积（μL）
末端修复缓冲液	7
末端修复反应酶	3
片段化产物	50
总体积	60

2.2.3 置于 PCR 仪中，运行如下程序：

表 7 末端修复及加“A”程序

温度（℃）	时间
热盖（85）	On
30	20min
72	20min
4	Hold

2.3 接头连接

2.3.1 取出连接反应酶轻弹 3-5 次混匀、连接缓冲液置于常温解冻后涡旋混匀，置于冰盒上，按照表 8 配制接头连接反应体系混合液，涡旋 10s 混匀，瞬时离心。

表 8 接头连接体系

组分	单反应体积（μL）
连接缓冲液	30

连接反应酶	5
总体积	35

2.3.2 依次将 5 μL 接头和 35 μL 步骤 2.3.1 的混合液加入到步骤 2.2 的产物中，涡旋 10s 混匀，瞬时离心。

***注：**接头与接头连接体系不可直接配制为混合液，需分别加入步骤 2.2 产物中。

2.3.3 置于 PCR 仪中，运行如下程序：

表 9 接头连接程序

温度（℃）	**时间**
热盖	Off
20	15min
4	Hold

2.4 接头连接后纯化

2.4.1 提前取出磁珠 A 充分涡旋混匀后室温平衡至少 30min，使用前再次充分涡旋混匀。

2.4.2 取 120 μL 均一化磁珠 A 至步骤 2.3 的接头连接产物中，涡旋 10s 混匀，室温孵育 10min。

2.4.3 将 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上静置约 5min，直至液体完全澄清，小心移弃上清，勿吸到磁珠。

2.4.4 保持于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇，静置 30s，小心移弃上清。

2.4.5 重复步骤 2.4.4 一次，并尽量去除所有残留乙醇溶液。

2.4.6 置于磁力架上室温开盖干燥约 2-5min，以磁珠表面不反光，磁珠块没有裂纹为准。

***注：**磁珠不可过度干燥，过度干燥会降低文库产量。

2.4.7 将 PCR 管从磁力架上移出，加 22 μL 无酶水（需自备），涡旋 10s 混匀，室温孵育 5min。

2.4.8 瞬时离心后置于磁力架上静置约 3-5min，直至液体完全澄清后，取 20 μL 上清至新的 PCR 管中进入下一步预文库扩增。

2.5 预文库扩增

2.5.1 将所需标签序列引物列置于 2-8℃解冻，混匀后瞬时离心，穿刺铝膜后使用。

表 10 标签序列引物位置信息

标签序列引物						
孔位	1	2	3	4	5	6
A	7001	7009	7017	7025	7033	7041
B	7002	7010	7018	7026	7034	7042
C	7003	7011	7019	7027	7035	7043
D	7004	7012	7020	7028	7036	7044
E	7005	7013	7021	7029	7037	7045
F	7006	7014	7022	7030	7038	7046
G	7007	7015	7023	7031	7039	7047
H	7008	7016	7024	7032	7040	7048

2.5.2 取出 DNA 聚合酶反应液，解冻后轻弹 3-5 次混匀，瞬时离心，置于冰盒上，按照表 11 配制预文库扩增体系，涡旋 10s 混匀，瞬时离心。

表 11 预文库扩增体系

组分	单反应体积（μL）
标签序列引物	5
DNA 聚合酶反应液	25
接头连接后纯化产物	20
总体积	50

2.5.3 置于 PCR 仪中，运行如下程序：

表 12 预文库扩增程序

步骤	温度（℃）	时间	循环数
热盖	105	On	/
预变性	98	45s	1
变性	98	15s	见表 13
复性	60	30s	
延伸	72	30s	

最后延伸	72	60s	1
Hold	4	∞	1

表 13 扩增循环数与建库起始量的关系

建库起始量 X（ng）	扩增循环数
30≤X<100	9
100≤X＜150	8
150≤X≤400	7

2.6 预文库纯化

2.6.1 提前取出磁珠 A 充分涡旋混匀后室温平衡至少 30min，使用前再次充分涡旋混匀。

2.6.2 取 45 μL 均一化磁珠 A 至步骤 2.5 的扩增产物中，涡旋 10s 混匀，室温孵育 10min。

2.6.3 将 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上静置约 5min，直至液体完全澄清，小心移弃上清，勿吸到磁珠。

2.6.4 保持于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇，静置 30s，小心移弃上清。

2.6.5 重复步骤 2.6.4 一次，并尽量去除所有残留乙醇溶液。

2.6.6 置于磁力架上室温开盖干燥约 2-5min，以磁珠表面不反光，磁珠块没有裂纹为准。

***注：**磁珠不可过度干燥，过度干燥会降低文库产量。

2.6.7 将 PCR 管从磁力架上移出，加入 62 μL Low TE（需自备），涡旋 10s 混匀，室温孵育 5min。

2.6.8 瞬时离心后置于磁力架上静置约 3-5min，直至液体完全澄清后，小心移取 60 μL 上清至新的 1.5 mL 离心管中。

2.7 预文库质控

使用 1×dsDNA HS Assay Kit for Qubit 检测预文库浓度，计算预文库总量应≥500 ng。

3. 杂交捕获

3.1 杂交规则

杂交捕获时通常将多个预文库混合至一个文库池进行，根据单个预文库浓度计算杂交投入量，详细的文库池制备规则见下表：

表 14 文库池制备规则

	建议标准
文库池总量	500 ng-6000 ng
单个预文库杂交投入量	最低 500ng，推荐 1000 ng
杂交样本数/组	1-6
注意事项	单个预文库总量小于1000 ng时，应全投并单独进行杂交捕获

***注：**

1. 保存超过一周的预文库，杂交前需要重新定量，杂交使用量以最新定量检测结果为准。

2. 当杂交样本数/组<3时，会有杂交试剂不足12或48反应的风险。

3. 相同标签序列引物的预文库不可混合至同一个文库池。

3.2 杂交

3.2.1 取出 Cot-1 DNA、通用型 Blocker 解冻后涡旋混匀，瞬时离心，置于冰盒上，按照表 15 配制文库浓缩体系，涡旋混匀。

表 15 文库浓缩体系

组分	单反应用量
Cot-1 DNA	5 μL
通用型Blocker	2 μL
文库池	500 ng-6000 ng

3.2.2 打开管盖后置于真空浓缩仪中，60℃浓缩干燥约 10-40min，液体完全蒸干后取出，瞬时离心。

***注：**文库浓缩时间视体积而定，确保完全蒸干无液体残留。

3.2.3 取出杂交缓冲液I、杂交缓冲液II、TD探针，解冻后涡旋混匀，瞬时离心，置于冰盒上，按照表16配制杂交反应液。

表 16 杂交反应液

组分	单反应体积（μL）
杂交缓冲液I	8.5
杂交缓冲液II	2.7

无酶水（需自备）	1.8
TD探针	4
总体积	17

3.2.4 将杂交反应液混合均匀后，加入到浓缩干燥后的离心管底部，涡旋混匀，瞬时离心，室温孵育 10min 后再次涡旋混匀，瞬时离心。

3.2.5 将产物全部转移至新的 0.2 mL PCR 管中，瞬时离心，置于 PCR 仪中，运行如下程序：

表 17 杂交程序

温度（℃）	时间
热盖（100）	On
95	30s
65	4-16h
65	Hold

3.3 捕获和洗脱

3.3.1 试剂准备

（1）打开恒温混匀仪，设置为65℃；打开PCR仪设置如下程序：

表18 杂交捕获程序

温度（℃）	时间
热盖（70）	On
65	Hold

（2）提前取出磁珠清洗液和洗脱缓冲液I、II、III、S解冻，洗脱缓冲液解冻后需依据反应数量按如下表格所示分装至PCR八连管中，并置于相应的温度条件下提前预热。

表19 洗脱缓冲液准备

组分	单反应体积（μL）	使用温度
洗脱缓冲液 I	160	室温
	110	65℃
洗脱缓冲液 S	160	65℃

	160	65℃
洗脱缓冲液 II	160	室温
洗脱缓冲液 III	160	室温

注：其中洗脱缓冲液 I 易产生难溶结晶，可于65℃孵育至完全溶解，洗脱缓冲液 S 和部分洗脱缓冲液 I 至少于65℃孵育30min 后使用。

（3）取出杂交缓冲液 I、杂交缓冲液 II，解冻后涡旋混匀，瞬时离心，置于冰盒上，配制磁珠悬浮液，涡旋混匀，瞬时离心。

表20 磁珠悬浮液

组分	单反应体积（μL）
杂交缓冲液I	8.5
杂交缓冲液II	2.7
无酶水（需自备）	5.8
总体积	17

3.3.2 洗涤磁珠B

（1）提前取出磁珠B充分涡旋混匀后室温平衡至少30min，使用前再次充分涡旋混匀。

（2）按10 μL/反应的均一化磁珠B使用量加到新的1.5 mL离心管中，可合并3个捕获反应的磁珠B（30μL）进行洗涤。

（3）每 10 μL 磁珠 B 加入 100 μL 磁珠清洗液（3 个捕获反应加入 300 μL），涡旋混匀 15s，瞬时离心，置于磁力架上约 1min，直至液体完全澄清，小心移弃上清，勿吸到磁珠。

（4）重复步骤（3）两次，共完成3次洗涤，尽量完全弃去残留液体。

（5）每10 μL磁珠B加入17 μL磁珠悬浮液重悬（3个捕获反应加入51 μL），涡旋混匀15s，按每反应17 μL分装到新的PCR管中。

3.3.3 放入 PCR 仪中，运行表18 杂交捕获程序预热5min。

3.3.4 终止杂交反应，迅速将步骤3.2的杂交产物转移至预热的磁珠 B 中，盖上管盖迅速涡旋3s，充分混匀后继续放于 PCR 仪中，进行捕获反应。

***注：**此步骤操作要迅速，避免反应温度下降。

3.3.5 捕获反应需于65℃孵育15min，期间每间隔7.5min 快速涡旋3s，以确保磁珠完全重悬，尽量避免液体震到管盖上。

***注：**如果液体震到管盖上，可以进行短暂轻微的离心并再次重悬磁珠，操作应迅速，以避免温度降低。

3.3.6 热洗脱

*热洗脱关键事项：

1. 热洗脱开始前务必保证洗脱试剂温度达到65℃。

2. 热洗脱过程尽量保持样本温度在65℃，操作要迅速避免温度下降。

3. 吹吸混匀过程中尽量避免产生气泡。

（1）捕获反应结束后，加入 100 μL 预热的洗脱缓冲液 I，使用移液器上下吹吸混匀 10 次。

（2）将 PCR 管置于磁力架上约 3-5s，直至液体完全澄清后，弃上清。

（3)将 PCR 管从磁力架上转移至 65℃恒温混匀仪中，加入 150 μL 预热的洗脱缓冲液 S，1200 rpm 振荡孵育 5min。

（4）将 PCR 管置于磁力架上约 3-5s，直至液体完全澄清后，弃上清。

（5）重复步骤（3）和（4），完成两次洗脱缓冲液 S 的洗涤。

3.3.7 常温洗脱

（1）设置恒温混匀仪1200 rpm，25℃。

（2）加入150 μL室温洗脱缓冲液I，置于恒温混匀仪上1200 rpm，25℃振荡混匀2min，将PCR管瞬时离心后置于磁力架上约1min，直至液体完全澄清后，弃上清。

（3）加入150 μL室温洗脱缓冲液II，置于恒温混匀仪上1200 rpm，25℃振荡混匀2min，将PCR管瞬时离心后置于磁力架上约1min，直至液体完全澄清后，弃上清。

（4）加入150 μL室温洗脱缓冲液III，置于恒温混匀仪上1200 rpm，25℃振荡混匀2min，将PCR管瞬时离心后置于磁力架上约1min，直至液体完全澄清后，弃上清，尽量弃去全部残留液体。

（5）加入20 μL无酶水（需自备），涡旋混匀10s，瞬时离心。

***注：**切勿丢弃磁珠。

3.4 捕获文库扩增

3.4.1 取出以下组分，解冻后将DNA聚合酶反应液轻弹3-5次混匀，扩增引物涡旋混匀，瞬时离心，置于冰盒上，按照表21配制捕获文库扩增体系。

表21 捕获文库扩增体系

组分	单反应体积（μL）
DNA 聚合酶反应液	25
扩增引物	5
含磁珠 B 洗脱产物	20
总体积	50

3.4.2 将捕获文库扩增体系涡旋混匀并瞬时离心，置于 PCR 仪中，运行如下程序：

表22 捕获文库扩增程序

步骤	温度（℃）	时间	循环数
热盖	105	On	/
预变性	98	45s	1
变性	98	15s	表 23
复性	60	30s	
延伸	72	30s	
最后延伸	72	60s	1
Hold	4	∞	1

表 23 扩增循环数与文库池总量的关系

文库池总量（ng）	扩增循环数
500-1500	16
1500-3000	15
≥3000	14

3.5 捕获文库纯化

3.5.1 提前取出磁珠A充分涡旋混匀后室温平衡至少30min，使用前再次充分涡旋混匀。

3.5.2 吸取60 μL均一化磁珠A至新的PCR管或1.5 mL离心管中，备用。

3.5.3 将步骤3.4的扩增产物取出，瞬时离心后置于磁力架上静置约3-5min，直至溶液澄清。

3.5.4 转移全部上清至含有60 μL均一化磁珠A的管中，涡旋10s混匀，室温孵育10min。

3.5.5 瞬时离心后置于磁力架上静置约5min，直至液体完全澄清后，小心移弃上清，勿吸到磁珠。

3.5.6 保持在磁力架上，加入200 μL新鲜配制的80%乙醇，静置30s，小心移弃上清。

3.5.7 重复步骤3.5.6一次，并尽量去除所有残留乙醇溶液。

3.5.8 置于磁力架上室温开盖干燥约2-5min，以磁珠表面不反光，磁珠块没有裂纹为准。

*注：磁珠不可过度干燥，过度干燥会降低捕获文库产量。

3.5.9 将PCR管从磁力架上移出，加入22 μL TE（需自备），涡旋10s混匀，室温孵育5min。

3.5.10 瞬时离心后于磁力架上静置约3-5min，直至液体完全澄清后，小心移取20 μL上清至新的1.5 mL离心管中，置于-20±5℃条件下保存。

3.6 捕获文库质控

使用 1×dsDNA HS Assay Kit for Qubit 检测捕获文库浓度，计算捕获文库总量应≥60 ng，否则捕获失败，应重新捕获；采用光鼎生物 Qsep 系列生物片段分析仪、PerkinElmer LabChip GX Touch HT 或 Agilent 2100 生物芯片分析系统及配套的试剂检测文库片段长度分布，片段主峰应在250-500 bp，无明显小片段和大片段杂峰。

4. 测序

按照数据分配需要，混合捕获文库 DNA，每个样本保证至少 0.3 G 的上机数据量。按照推荐配套的测序反应通用试剂盒说明书进行上机操作。

5. 数据分析

本产品结果分析采用《基因检测数据分析软件》（型号：OncoTop；版本号：V1.0，以下简称分析软件）对原始数据进行分析，得到相关基因的突变结果。相关数据具体分析流程如下：

（1）数据预处理：对下机数据进行拆分，将拆分好的数据转化成 Fastq 文件，使用分析软件中数据预处理模块（基于 realSeq2 readsprofiler v 3.0.6 软件）去除建库过程中引入的接头序列及低质量碱基片段；

（2）序列比对：使用分析软件中的数据比对模块（基于 BWA MEM2 v2.2.1 软件）将过滤得到的高质量碱基序列比对到 hg19（GRCh37）人类参考基因组生成初始比对 BAM 文件；

（3）序列去重：对初始比对 BAM 文件（基于 realSeq2 readscleaner v3.0.6 软件）去除 PCR 重复序列并生成去重的 BAM 文件；

（4）序列重比对：对去重 BAM 文件进行 Indel 区域的序列比对优化（基于 abra2 软件，版本号 v2.23），生成重比对的 BAM 文件；

（5）数据质控：使用分析软件中的数据质控模块（基于 NCBamInfo v1.0.1 软件）计算并汇总数据的平均测序深度、Q30 碱基占比等参数，如果平均测序深度≥500×，Q30≥80%则数据质控通过，否则判定实验失败，需重新实验；

（6）突变分析：使用分析软件中的变异鉴定模块（基于 realDcaller2 v2.0.9 软件和 GATK mutect2 v4.1.4.1 软件）分析样本中的点突变和插入缺失突变，使用分析软件中的融合分析模块（基于 NCsv2 v1.2.0 软件）分析样本中的基因融合（重排）。

（7）突变注释：使用分析软件中的突变注释模块（基于 SomVAS v1.101 和 somSvAnno v1.0 软件）分别对点突变、插入缺失突变、基因融合（重排）结果进行 HGVS 格式和 COSMIC 数据库（v80）注释。

【阳性判断值】

本产品阳性判断值基于临床样本研究确定。研究采用非小细胞肺癌、结直肠癌及胆管癌患者的 FFPE 组织样本，共纳入 1131 例样本，通过与参比方法（已上市同类产品或诊断金标准方法）进行比对，采用 ROC 曲线以约登指数最大值分别确定了每个基因每种突变类型的阳性判断值，并在独立样本集中进行验证，最终确定针对 3 种不同突变类型，阳性判断值标准如下表：

表 24 阳性判断值标准

变异类型	阳性判断标准
点突变	突变 reads 数≥4，突变频率≥1%
插入缺失突变	突变 reads 数≥2，突变频率≥1%
融合/重排	SRCount[1]+DPCount[2]≥2 ，突变频率≥1%

[1]SRCount：Split Reads 计数

[2]DPCount：Discordant Pair 计数

其中，针对伴随诊断用途的 5 个基因：EGFR、ALK、ROS1、KRAS、FGFR2 阳性判断值标准同上。阳性结果提示样本中存在相应基因突变或融合，可为靶向治疗提供参考依据；阴性结果提示在本试剂检测范围内未检出相应变异。检测结果仅供临床参考，应结合患者具体情况由临床

医生综合判断。

【检测结果的解释】

1. 阳性质控品（PC）的检测结果应为对应突变阳性（见附表 1），若有突变未检出，则此次实验结果无效。

2. 阴性质控品（NC）的检测结果应为阴性，若有试剂盒检测范围内的突变检出，则此次实验结果无效。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

2. 阴性结果不能完全排除靶基因突变的存在，样本中核酸过度降解或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成阴性结果。

3. 肿瘤组织（细胞）可能存在较大异质性，不同部位取样可能会得到不同的检测结果。

4. 不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 阳性符合率：检测企业阳性参考品和试剂盒检测范围内的阳性临床样本，阳性符合率为 100%。

2. 阴性符合率：检测企业阴性参考品和试剂盒检测范围内的阴性临床样本，阴性符合率为 100%。

3. 重复性：对 3 例包含中强阳、弱阳、阴性的企业重复性参考品和 32 例阴性、弱阳性和中强阳性临床样本，通过两种模型进行批内、批间、日间、不同仪器间、操作人员间、实验室间等多维度进行研究。阴性参考品结果试剂盒检测范围内所标注的位点均不检出，重复性参考品结果试剂盒检测范围内所标注的位点均检出；阴性临床样本结果试剂盒检测范围内所标注的位点均不检出；弱阳性和中强阳性临床样本结果试剂盒检测范围内所标注的位点均应检出。

4. 最低检出限：对 30 ng 和 10%最低肿瘤细胞含量基因组 DNA 背景中突变频率不高于 2%的 EGFR、KRAS、PIK3CA、BRAF、ERBB2、ALK、ROS1、FGFR2 基因变异和基因融合的临床样本和企业参考品进行检测，结果为对应基因位点突变阳性，最终确定点突变、插入缺失突变、融合/重排突变 2%突变水平作为申报试剂盒的最低检出限。

5. 干扰分析：临床 FFPE 样本可能存在的干扰物，如酒精、福尔马林、石蜡、蛋白酶 K、血红蛋白、坏死组织，使用预期的最高浓度（1% V/V 无水乙醇、0.1% V/V 福尔马林、1% V/V 石蜡、0.08 mg/mL 蛋白酶 K 和 2 mg/mL 血红蛋白）加入样本反应物质中后不会对本试剂盒的检测结果造成干扰；坏死组织比例在 3%～80%的阳性样本不影响突变的检出，坏死组织比例在 5%～60%的阴性样本不影响突变的检出。

6. 交叉反应：检测同源基因（如 EGFR 和 ERBB2 的同源基因 ERBB3、ERBB4；KRAS 同源基因 HRAS、NRAS；PIK3CA 同源基因 PIK3CB、PIK3CD；BRAF 同源基因 ARAF）、具有一定同源性的试剂盒检测范围外其他基因及高浓度基因组均不会与本产品产生交叉反应。试剂盒检测过程可能存在于 FFPE 样本中的常见病原核酸（大肠杆菌、肺炎链球菌、洋葱伯克霍尔德菌）均不影响试剂盒结果的正常检出。

7. 临床试验结果

本试剂盒的临床试验在 6 家机构共同开展，共计完成有效样本 2509 例，包含 1424 例非小细胞肺癌，613 例结直肠癌、472 例胆管癌。

（1）临床性能研究：与参考方法相比，非小细胞肺癌中，EGFR 基因的阳性符合率为 99.62%，阴性符合率为 95.88%；ERBB2 基因的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.81%；ALK 基因的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.89%；ROS1 基因的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.45%；KRAS 基因的阳性符合率为 98.59%，阴性符合率为 99.32%；PIK3CA 基因的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.33%。结直肠癌中，BRAF 基因的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.37%；KRAS 基因的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 98.16%；PIK3CA 基因的阳性符合率为 98.90%，阴性符合率为 98.76%。胆管癌中 FGFR2 基因的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%。

（2）伴随诊断性能：与已上市的原研伴随诊断试剂进行比较，非小细胞肺癌中，EGFR 基因的阳性符合率为 99.37%，阴性符合率为 100%；ALK 基因的阳性符合率为 99.08%，阴性符合率为 98.53%；ROS1 基因的阳性符合率为 98.88%，阴性符合率为 100%；结直肠癌中，KRAS 基因的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%。

（3）酒石酸凡瑞格拉替尼片的伴随诊断研究：与酒石酸凡瑞格拉替尼片的临床试验分析方法（CTA）进行比较，阳性符合率、阴性符合率和总符合率均为 100%；采用本试剂盒对药物临床试验剩余样本进行桥接试验和敏感性分析，与药物临床试验结果基本一致。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外辅助诊断，实验前请仔细阅读本说明书。

2. 临床基因扩增实验室及实验室操作人员培训应当严格执行《医疗机构临床基因扩增管理办法》等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。

3. 本试剂盒内质控品不具有传染性，不会对实验人员造成直接伤害。

4. 标本的处理和检测标本的容器、检验过程中使用的材料的处理要符合《医疗废物管理条例》和《医疗卫生机构医疗废物管理办法》以及国家、地区的相关要求。

【标识的解释】

：体外诊断医疗器械；：生产日期；：有效期；：批次代码；：产品编号；：温度限制；：查阅说明书；：易碎物品、小心搬运；：怕晒；：怕雨。

【参考文献】

[1] Freddie B, Ferlay J, et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.CA Cancer J Clin 2018;68:394–424.

[2] Chen Z, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. Nat Rev Cancer. 2014 Aug;14(8):535-46.

[3] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-Small Cell Lung Cancer. Version 5. 2024.

[4] 中国临床肿瘤学会（CSCO）非小细胞肺癌诊疗指南（2024 版）. 北京：人民卫生出版社.

[5] Chen JY, Cheng YN, et al. Predictive value of K-ras and PIK3CA in non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs: a systemic review and meta-analysis. Cancer Biol Med. 2015;12:126-39.

[6] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Colon Cancer. Version 2. 2024.

[7] 中国临床肿瘤学会（CSCO）结直肠癌诊疗指南（2024 版）. 北京：人民卫生出版社.

[8] De Roock W, Claes B, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the

efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010, 11(8):753-62.

[9] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Biliary Tract Cancers. Version 2. 2024.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州吉因加生物医学工程有限公司

住所：苏州工业园区星湖街 218 号生物纳米园 B11 栋 101、201 单元

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：苏州工业园区星湖街 218 号生物纳米园 B11 栋 101、201 单元

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

医疗器械注册证编号：

产品技术要求编号：

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】

批准日期：

生效日期：

修改日期：

附表 1：阳性质控品位点

基因	突变	COSMIC号	HGVS格式
EGFR	T790M	COSM6240	NM_005228.3 (EGFR): c.2369C>T (p. Thr790Met)
	E746_A750del	COSM6223	NM_005228.3(EGFR): c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC (p.Glu746_Ala750del)
KRAS	G12C	COSM516	NM_033360.2 (KRAS): c.34G>T (p. Gly12Cys)
ALK	EML4-ALK（E13:A20）	COSF408	N/A
FGFR2	FGFR2-COL14A1（F17:C34）	N/A	N/A

附表2：临床前性能研究及临床试验已验证和确认的突变（点突变/插入缺失突变）

基因	外显子	突变	HGVS 格式	Cosmic ID
EGFR	21	L858R	NM_005228.3(EGFR):c.2573T>G (p.Leu858Arg)	COSM6224
	20	T790M	NM_005228.3(EGFR):c.2369C>T (p.Thr790Met)	COSM6240
	19	Exon 19 Deletion*	NM_005228.3(EGFR):c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC (p.Glu746_Ala750del)	COSM6223
			NM_005228.3(EGFR):c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA (p.Glu746_Ala750del)	COSM6225
			NM_005228.3(EGFR):c.2237_2257delinsTCT (p.Glu746_Pro753delinsValSer)	COSM18427
			NM_005228.3(EGFR):c.2237_2255delinsT (p.Glu746_Ser752delinsVal)	COSM12384
			NM_005228.3(EGFR):c.2236_2253delGAATTAAGAGAAGCAACA (p.Glu746_Thr751del)	COSM12728

			NM_005228.3(EGFR):c.2237_2251delAATTAAGAGAAGCAA (p.Glu746_Thr751delinsAla)	COSM12678
			NM_005228.3(EGFR):c.2237_2253delinsTTGCT (p.Glu746_Thr751delinsValAla)	COSM12416
			NM_005228.3(EGFR):c.2239_2248delTTAAGAGAAGinsC (p.Leu747_Ala750delinsPro)	COSM12382
			NM_005228.3(EGFR):c.2239_2247delTTAAGAGAA (p.Leu747_Glu749del)	COSM6218
			NM_005228.3(EGFR):c.2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC (p.Leu747_Pro753delinsSer)	COSM12370
			NM_005228.3(EGFR):c.2239_2256delTTAAGAGAAGCAACATCT (p.Leu747_Ser752del)	COSM6255
			NM_005228.3(EGFR):c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT (p.Leu747_Thr751del)	COSM12369
			NM_005228.3(EGFR):c.2239_2251delinsC (p.Leu747_Thr751delinsPro)	COSM12383
			NM_005228.3(EGFR):c.2253_2276delATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAAT (p.Ser752_Ile759del)	COSM13556
	18	G719A	NM_005228.3(EGFR):c.2156G>C (p.Gly719Ala)	COSM6239
		G719C	NM_005228.3(EGFR):c.2155G>T (p.Gly719Cys)	COSM6253
		G719S	NM_005228.3(EGFR):c.2155G>A (p.Gly719Ser)	COSM6252
	21	L861Q	NM_005228.3 (EGFR):c.2582T>A (p.Leu861Gln)	COSM6213
	20	S768I	NM_005228.3 (EGFR):c.2303G>T (p.Ser768Ile)	COSM6241
ERBB2	20	Y772_A775dup	NM_004448.2(ERBB2):c.2314_2325dup (p.Tyr772_Ala775dup)	COSM12558
			NM_004448.2 (ERBB2):c.2313_2324dup (p.Tyr772_Ala775dup)	COSM20959
KRAS	2	G12A	NM_033360.2(KRAS):c.35G>C (p.Gly12Ala)	COSM522
		G12C	NM_033360.2(KRAS):c.34G>T (p.Gly12Cys)	COSM516
		G12S	NM_033360.2(KRAS):c.34G>A (p.Gly12Ser)	COSM517
		G12D	NM_033360.2(KRAS):c.35G>A (p.Gly12Asp)	COSM521

		G12V	NM_033360.2(KRAS):c.35G>T (p.Gly12Val)	COSM5204
		G12R	NM_033360.2(KRAS):c.34G>C (p.Gly12Arg)	COSM518
		G13D	NM_033360.2(KRAS):c.38G>A (p.Gly13Asp)	COSM532
PIK3CA	10	E542K	NM_006218.2(PIK3CA):c.1624G>A (p.Glu542Lys)	COSM760
		E545K	NM_006218.2(PIK3CA):c.1633G>A (p.Glu545Lys)	COSM763
	21	H1047R	NM_006218.2(PIK3CA):c.3140A>G (p.His1047Arg)	COSM775
BRAF	15	V600E	NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (p.Val600Glu)	COSM476

*可检测多种相关突变。

附表3：临床前性能研究及临床试验已验证和确认的基因融合（重排）

融合基因	突变	融合类型	Cosmic ID
ALK	19 号外显子至 20 号外显子范围内的融合（重排）*	EML4-ALK (E2:A20)	COSF479
		EML4-ALK (E6:A20)	COSF474
		EML4-ALK (E7:A20)	不适用
		EML4-ALK (E13:A20)	COSF408
		EML4-ALK (E14:A20)	COSF1065
		EML4-ALK (E17:A20)	COSF732
		EML4-ALK (E18:A20)	COSF488
		EML4-ALK (E20:A20)	COSF409
		EML4-ALK (E21:A20)	不适用
		DOCK2-ALK (D28:A20)	不适用
		FLJ35282-ALK (F5:A20)	不适用
		HIP1-ALK (H20:A20)	不适用
		HIP1-ALK (H23:A20)	不适用
		HIP1-ALK (H28:A20)	COSF1620
		KLC1-ALK (K9:A20)	不适用
		SLC8A1-ALK (S1:A20)	不适用
		STRN-ALK (S4:A20)	不适用
		TET3-ALK (T9:A20)	不适用
		TPM3-ALK (T7:A20)	COSF439
		WDR43-ALK (W4:A20)	不适用
		ZNF330-ALK (Z4:A20)	不适用
		ALK 20 号外显子重排	不适用
ROS1	32 号外显子至 36 号外显子范围内的融合（重排）*	CD74-ROS1 (C6:R32)	COSF1202
		CD74-ROS1 (C6:R33)	不适用
		CD74-ROS1 (C6:R34)	COSF1200
		CD74-ROS1 (C7:R32)	不适用

		CD74-ROS1 (C7:R33)	不适用
		CD74-ROS1 (C7:R34)	不适用
		CD74-ROS1 (C8:R32)	不适用
		CD74-ROS1 (C8:R33)	不适用
		CD74-ROS1 (C8:R34)	不适用
		EZR-ROS1 (E10:R32)	不适用
		EZR-ROS1 (E10:R33)	不适用
		EZR-ROS1 (E10:R34)	不适用
		GOPC-ROS1 (G8:R35)	COSF1140
		GOPC-ROS1 (G5:R36)	不适用
		SDC4-ROS1 (S2:R32)	COSF1265
		SDC4-ROS1 (S4:R32)	COSF1278
		SDC4-ROS1 (S4:R34)	不适用
		SLC34A2-ROS1 (S13:R32)	COSF1259
		TPM3-ROS1 (T8:R35)	不适用
FGFR2	17 号外显子至 18 号外显子范围内的融合（重排）*	FGFR2-AHCYL1 (F18:A2)	不适用
		FGFR2-BFSP2 (F17:B5)	不适用
		FGFR2-BICC1 (F17:B16)	不适用
		FGFR2-BICC1 (F17:B18)	不适用
		FGFR2-BICC1 (F17:B3)	不适用
		FGFR2-BICC1 (F17:B5)	不适用
		FGFR2-BICC1 (F17:B10)	不适用
		FGFR2-BICC1 (F18:B3)	不适用
		FGFR2-CCDC6 (F17:C2)	不适用
		FGFR2-CCDC6 (F17:C4)	不适用
		FGFR2-CCDC41 (F17:C7)	不适用
		FGFR2-CDYL (F18:C4)	不适用
		FGFR2-DBP (F17:D4)	不适用
		FGFR2-DDX21 (F17:D2)	不适用
		FGFR2-DST (F17:D70)	不适用
		FGFR2-DOCK1 (F17:D26)	不适用
		FGFR2-EEA1 (F17:E23)	不适用
		FGFR2-ERC1 (F17:E2)	不适用
		FGFR2-EVI5 (F17:E12)	不适用
		FGFR2-FLNA (F17:F29)	不适用
		FGFR2-GNAT2 (F17:G3)	不适用
		FGFR2-GRSF1 (F17:G2)	不适用
		FGFR2-HIP1 (F17:H23)	不适用
		FGFR2-INADL (F18:I40)	不适用

		FGFR2-KIAA1217 (F17:K3)	不适用
		FGFR2-KIAA1598 (F17:K5)	不适用
		FGFR2-KIAA1598 (F17:K7)	不适用
		FGFR2-KIF2C (F17:K3)	不适用
		FGFR2-LOC401320 (F17:L6)	不适用
		FGFR2-LOC100506675 (F17:L2)	不适用
		FGFR2-MAP3K5 (F17:M15)	不适用
		FGFR2-MCU (F17:M2)	不适用
		FGFR2-NRAP (F17:N28)	不适用
		FGFR2-NRAP (F17:N32)	不适用
		FGFR2-OPTN (F17:O7)	不适用
		FGFR2-PAWR (F18:P3)	不适用
		FGFR2-PCM1 (F17:P7)	不适用
		FGFR2-PKD2L1 (F17:P10)	不适用
		FGFR2-PPP1R21 (F17:P18)	不适用
		FGFR2-PTK2 (F18:P24)	不适用
		FGFR2-RBFOX2 (F17:R2)	不适用
		FGFR2-RPAP3 (F17:R9)	不适用
		FGFR2-SCLT1 (F17:S3)	不适用
		FGFR2-SORBS1 (F17:S19)	不适用
		FGFR2-SORBS1 (F17:S8)	不适用
		FGFR2-SPECC1 (F17:S2)	不适用
		FGFR2-SHROOM3 (F17:S6)	不适用
		FGFR2-TACC1 (F17:T7)	不适用
		FGFR2-TACC2 (F17:T17)	不适用
		FGFR2-TBL1X (F17:T4)	不适用
		FGFR2-TDO2 (F17:T3)	不适用
		FGFR2-TDRD1 (F17:T2)	不适用
		FGFR2-TFEC (F17:T3)	不适用
		FGFR2-TRAPPC2 (F17:Promoter)	不适用
		FGFR2-UBP1 (F17:U9)	不适用
		FGFR2-WAC (F17:W13)	不适用
		FGFR2 17 号外显子重排	不适用
		FGFR2 17 号内含子重排	不适用
		FGFR2 18 号外显子重排	不适用

*可检测多种相关基因融合（重排）。

附表4：临床试验已确认的突变（点突变/插入缺失突变）

基因	外显子	突变	HGVS 格式	Cosmic ID
EGFR	21	L858R	NM_005228.3(EGFR):c.2573T>G (p.Leu858Arg)	COSM6224
	20	T790M	NM_005228.3(EGFR):c.2369C>T (p.Thr790Met)	COSM6240
	19	Exon 19 Deletion*	NM_005228.3(EGFR):c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC (p.Glu746_Ala750del)	COSM6223
			NM_005228.3(EGFR):c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA (p.Glu746_Ala750del)	COSM6225
			NM_005228.3(EGFR):c.2237_2257delinsTCT (p.Glu746_Pro753delinsValSer)	COSM18427
			NM_005228.3(EGFR):c.2237_2255delinsT (p.Glu746_Ser752delinsVal)	COSM12384
			NM_005228.3(EGFR):c.2236_2253delGAATTAAGAGAAGCAACA (p.Glu746_Thr751del)	COSM12728
			NM_005228.3(EGFR):c.2237_2251delAATTAAGAGAAGCAA (p.Glu746_Thr751delinsAla)	COSM12678
			NM_005228.3(EGFR):c.2237_2253delinsTTGCT (p.Glu746_Thr751delinsValAla)	COSM12416
			NM_005228.3(EGFR):c.2239_2248delTTAAGAGAAGinsC (p.Leu747_Ala750delinsPro)	COSM12382
			NM_005228.3(EGFR):c.2239_2247delTTAAGAGAA (p.Leu747_Glu749del)	COSM6218
			NM_005228.3(EGFR):c.2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC (p.Leu747_Pro753delinsSer)	COSM12370
			NM_005228.3(EGFR):c.2239_2256delTTAAGAGAAGCAACATCT (p.Leu747_Ser752del)	COSM6255
			NM_005228.3(EGFR):c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT (p.Leu747_Thr751del)	COSM12369
			NM_005228.3(EGFR):c.2239_2251delinsC (p.Leu747_Thr751delinsPro)	COSM12383
			NM_005228.3(EGFR):c.2253_2276delATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAAT (p.Ser752_Ile759del)	COSM13556
	18	G719A	NM_005228.3(EGFR):c.2156G>C (p.Gly719Ala)	COSM6239
		G719C	NM_005228.3(EGFR):c.2155G>T (p.Gly719Cys)	COSM6253
		G719S	NM_005228.3(EGFR):c.2155G>A (p.Gly719Ser)	COSM6252
	21	L861Q	NM_005228.3(EGFR):c.2582T>A (p.Leu861Gln)	COSM6213

	20	S768I	NM_005228.3(EGFR):c.2303G>T (p.Ser768Ile)	COSM6241
ERBB2	20	Y772_A775dup	NM_004448.2(ERBB2):c.2314_2325dup (p.Tyr772_Ala775dup)	COSM12558
			NM_004448.2(ERBB2):c.2313_2324dup (p.Tyr772_Ala775dup)	COSM20959
KRAS	2	G12A	NM_033360.2(KRAS):c.35G>C (p.Gly12Ala)	COSM522
		G12C	NM_033360.2(KRAS):c.34G>T (p.Gly12Cys)	COSM516
		G12S	NM_033360.2(KRAS):c.34G>A (p.Gly12Ser)	COSM517
		G12D	NM_033360.2(KRAS):c.35G>A (p.Gly12Asp)	COSM521
		G12V	NM_033360.2(KRAS):c.35G>T (p.Gly12Val)	COSM5204
		G12R	NM_033360.2(KRAS):c.34G>C (p.Gly12Arg)	COSM518
		G13D	NM_033360.2(KRAS):c.38G>A (p.Gly13Asp)	COSM532
PIK3CA	10	E542K	NM_006218.2(PIK3CA):c.1624G>A (p.Glu542Lys)	COSM760
		E545K	NM_006218.2(PIK3CA):c.1633G>A (p.Glu545Lys)	COSM763
	21	H1047R	NM_006218.2(PIK3CA):c.3140A>G (p.His1047Arg)	COSM775
BRAF	15	V600E	NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (p.Val600Glu)	COSM476

*可检测多种相关突变。

附表5：临床试验已确认的基因融合（重排）

融合基因	突变	融合类型	Cosmic ID
ALK	19 号外显子至 20 号外显子范围内的融合（重排）*	EML4-ALK (E2:A20)	COSF479
		EML4-ALK (E6:A20)	COSF474
		EML4-ALK (E7:A20)	不适用
		EML4-ALK (E13:A20)	COSF408
		EML4-ALK (E14:A20)	COSF1065
		EML4-ALK (E17:A20)	COSF732
		EML4-ALK (E18:A20)	COSF488
		EML4-ALK (E20:A20)	COSF409
		EML4-ALK (E21:A20)	不适用
		DOCK2-ALK (D28:A20)	不适用
		FLJ35282-ALK (F5:A20)	不适用
		HIP1-ALK (H20:A20)	不适用
		HIP1-ALK (H23:A20)	不适用
		HIP1-ALK (H28:A20)	COSF1620
		KLC1-ALK (K9:A20)	不适用
		SLC8A1-ALK (S1:A20)	不适用

		STRN-ALK (S4:A20)	不适用
		TET3-ALK (T9:A20)	不适用
		TPM3-ALK (T7:A20)	COSF439
		WDR43-ALK (W4:A20)	不适用
		ZNF330-ALK (Z4:A20)	不适用
		ALK 20 号外显子重排	不适用
ROS1	32 号外显子至 36 号外显子范围内的融合（重排）*	CD74-ROS1 (C6:R32)	COSF1202
		CD74-ROS1 (C6:R33)	不适用
		CD74-ROS1 (C6:R34)	COSF1200
		CD74-ROS1 (C7:R33)	不适用
		CD74-ROS1 (C7:R34)	不适用
		CD74-ROS1 (C8:R32)	不适用
		CD74-ROS1 (C8:R33)	不适用
		CD74-ROS1 (C8:R34)	不适用
		EZR-ROS1 (E10:R32)	不适用
		EZR-ROS1 (E10:R33)	不适用
		EZR-ROS1 (E10:R34)	不适用
		SDC4-ROS1 (S2:R32)	COSF1265
		SDC4-ROS1 (S4:R32)	COSF1278
		SDC4-ROS1 (S4:R34)	不适用
		SLC34A2-ROS1 (S13:R32)	COSF1259
		TPM3-ROS1 (T8:R35)	不适用
FGFR2	17 号外显子至 18 号外显子范围内的融合（重排）*	FGFR2-AHCYL1 (F18:A2)	不适用
		FGFR2-BFSP2 (F17:B5)	不适用
		FGFR2-BICC1 (F17:B18)	不适用
		FGFR2-BICC1 (F17:B3)	不适用
		FGFR2-BICC1 (F18:B3)	不适用
		FGFR2-CCDC6 (F17:C2)	不适用
		FGFR2-CCDC6 (F17:C4)	不适用
		FGFR2-CDYL (F18:C4)	不适用
		FGFR2-DBP (F17:D4)	不适用
		FGFR2-DDX21 (F17:D2)	不适用
		FGFR2-DST (F17:D70)	不适用
		FGFR2-EEA1 (F17:E23)	不适用
		FGFR2-ERC1 (F17:E2)	不适用
		FGFR2-EVI5 (F17:E12)	不适用
		FGFR2-FLNA (F17:F29)	不适用
		FGFR2-GNAT2 (F17:G3)	不适用
		FGFR2-GRSF1 (F17:G2)	不适用

		FGFR2-HIP1 (F17:H23)	不适用
		FGFR2-INADL (F18:I40)	不适用
		FGFR2-KIAA1217 (F17:K3)	不适用
		FGFR2-KIAA1598 (F17:K5)	不适用
		FGFR2-KIF2C (F17:K3)	不适用
		FGFR2-LOC401320 (F17:L6)	不适用
		FGFR2-MAP3K5 (F17:M15)	不适用
		FGFR2-MCU (F17:M2)	不适用
		FGFR2-NRAP (F17:N28)	不适用
		FGFR2-PAWR (F18:P3)	不适用
		FGFR2-PKD2L1 (F17:P10)	不适用
		FGFR2-PTK2 (F18:P24)	不适用
		FGFR2-RBFOX2 (F17:R2)	不适用
		FGFR2-RPAP3 (F17:R9)	不适用
		FGFR2-SCLT1 (F17:S3)	不适用
		FGFR2-SORBS1 (F17:S19)	不适用
		FGFR2-SORBS1 (F17:S8)	不适用
		FGFR2-SPECC1 (F17:S2)	不适用
		FGFR2-TACC1 (F17:T7)	不适用
		FGFR2-TACC2 (F17:T17)	不适用
		FGFR2-TBL1X (F17:T4)	不适用
		FGFR2-TDO2 (F17:T3)	不适用
		FGFR2-TDRD1 (F17:T2)	不适用
		FGFR2-TFEC (F17:T3)	不适用
		FGFR2-WAC (F17:W13)	不适用
		FGFR2 17 号外显子重排	不适用
		FGFR2 17 号内含子重排	不适用
		FGFR2 18 号外显子重排	不适用

*可检测多种相关基因融合（重排）。

附表6: 接头序列信息

名称	序列（5’-3’）	分子量
QUID1-1	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTTAGACGT	12290.03
QUID1-2	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTTCGCAGT	12266.01

QUID1-3	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTTGCGACT	12266.01
QUID1-4	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTGTCTACT	12240.99
QUID1-5	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTGACATGGT	12619.24
QUID1-6	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTGCACTAGT	12579.22
QUID1-7	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTCGAGTTCT	12570.2
QUID1-8	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTCTATGCCT	12530.18
QUID1-9	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTCATAGAGGT	12932.45
QUID1-10	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTACTCGAGGT	12908.42
QUID1-11	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTAGTGCTCCT	12859.39
QUID1-12	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTATGTCTCCT	12834.37
QUID1-13	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTGATCACAGGT	13221.63
QUID1-14	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTTCAGCAACGT	13181.61
QUID1-15	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTAGCTGTACCT	13172.6
QUID1-16	GGCTCACAGAACGACATGGCTACGATCCGACTTCTGATGAGCT	13212.62
QUID2-1	CGTCTAAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10307.59
QUID2-2	CTGCGAAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10332.61
QUID2-3	GTCGCAAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10332.61
QUID2-4	GTAGACAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10356.63
QUID2-5	CCATGTCAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10596.78
QUID2-6	CTAGTGCAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10636.8

QUID2-7	GAACTCGAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10645.81
QUID2-8	GGCATAGAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10685.84
QUID2-9	CCTCTATGAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10900.97
QUID2-10	CCTCGAGTAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10925.98
QUID2-11	GGAGCACTAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10975.02
QUID2-12	GGAGACATAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	10999.05
QUID2-13	CCTGTGATCAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	11230.18
QUID2-14	CGTTGCTGAAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	11270.21
QUID2-15	GGTACAGCTAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	11279.22
QUID2-16	GCTCATCAGAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAA	11239.19

附表7：标签引物序列

编号	**GF 引物序列（5'-3'）**	**GR 引物序列（5'-3'）**
7001	CTCTGGCGTT	AACGCCAGAG
7002	GGAATTGTAA	TTACAATTCC
7003	TCTCAATACC	GGTATTGAGA
7004	AAGGCCACGG	CCGTGGCCTT
7005	GTGACGGAGC	GCTCCGTCAC
7006	ACAGTAAGAT	ATCTTACTGT
7007	TATCACTCTG	CAGAGTGATA
7008	CGCTGTCTCA	TGAGACAGCG
7009	TGCCAACTGG	CCAGTTGGCA
7010	CATTGGTCAA	TTGACCAATG

7011	GCAACCAGTC	GACTGGTTGC
7012	ATGGTTGACT	AGTCAACCAT
7013	GTCCGTAAGC	GCTTACGGAC
7014	TAAGCATCCA	TGGATGCTTA
7015	CGGATGCTTG	CAAGCATCCG
7016	ACTTACGGAT	ATCCGTAAGT
7017	GGTATGTAGA	TCTACATACC
7018	AACGCACGAG	CTCGTGCGTT
7019	TTACGCACCT	AGGTGCGTAA
7020	CCGTATGTTC	GAACATACGG
7021	AGATAGTAGC	GCTACTATCT
7022	TCCATTGCCG	CGGCAATGGA
7023	GAGCGACGAT	ATCGTCGCTC
7024	CTTGCCATTA	TAATGGCAAG
7025	AGCTACTATA	TATAGTAGCT
7026	GATCGTCGCG	CGCGACGATC
7027	CCGGTAACAC	GTGTTACCGG
7028	TTAACGGTGT	ACACCGTTAA
7029	CTATAGTCTT	AAGACTATAG
7030	TCGCGACTCC	GGAGTCGCGA
7031	AATGTCGGAA	TTCCGACATT
7032	GGCACTAAGG	CCTTAGTGCC
7033	ATAGTTAGCA	TGCTAACTAT
7034	ACGCCAGTAC	GTACTGGCGT
7035	CGCAGCAATT	AATTGCTGCG
7036	CGTGTACCAG	CTGGTACACG

7037	TAGCTCACAG	CTGTGAGCTA
7038	AATGACTGGT	ACCAGTCATT
7039	CACTCAATTC	GAATTGAGTG
7040	GTCTCGCCAC	GTGGCGAGAC
7041	CACGGCTAGT	ACTAGCCGTG
7042	TATCTTGTAG	CTACAAGATA
7043	TCCACGTGTT	AACACGTGGA
7044	CCATCTCGCC	GGCGAGATGG
7045	ATTGAGGTCC	GGACCTCAAT
7046	CTGAGGAATA	TATTCCTCAG
7047	CTAATAACCG	CGGTTATTAG
7048	GGTCTATTAA	TTAATAGACC