

2020 년 6 월

therascreen[®] EGFR RGQ PCR Kit 사용 설명서(안내서)



버전 1

IVD

체외 진단용

처방용 용도에 한함

Rotor-Gene[®] Q MDx 기기와 함께 사용

QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit 와 함께 사용

REF

870121



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724, Hilden, 독일

R10 **MAT**

1121933KR

내용물

용도.....	5
요약 및 설명.....	6
절차의 원리.....	11
제공되는 재료.....	14
키트 내용물.....	14
시약.....	15
필요하지만 제공되지 않는 재료.....	17
경고 및 사전 주의사항.....	19
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안전성 정보와 함께 사용함.....	19
일반 사전 주의사항.....	19
시약 보관 및 취급.....	21
시료의 보관 및 취급.....	23
절차.....	24
DNA 정제.....	24
프로토콜: DNA 검체 평가.....	25
프로토콜: EGFR 돌연변이 검출.....	36
결과.....	47
정도 관리.....	50
이 절차의 한계.....	50
성능 특징.....	52
분석 성능.....	52
분석 민감도 – 공백 한계(Limit of Blank, LoB).....	52

분석 민감도 – 검출 한계(Limit of Detection, LoD).....	53
분석 민감도 – 대조 C _T 범위.....	55
분석 민감도 – 상단 ΔC _T 컷오프	55
분석 민감도 – DNA 투입이 ΔC _T 에 미치는 영향.....	56
선형성 - DNA 투입의 함수로서의 증폭 효율	57
선형성 – % 돌연변이 함수로서의 증폭 효율.....	57
분석 특이도 – 프라이머 및 프로브 특이성	58
분석 특이도 – 기타 EGFR 돌연변이에 대한 교차 반응.....	58
분석 특이도 – 교차 반응/배타성	60
임상적 성능.....	64
참고 문헌	73
문제 해결 가이드	75
Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package 플래그	76
기호.....	80
연락처 정보.....	81
부록: Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package 의 설치	82
주문 정보	86
문서 개정 이력.....	88

용도

therascreen[®] EGFR RGQ PCR Kit 는 비소세포 폐암(Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) 환자의 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) 종양 조직에서 얻은 DNA 내 표피성장인자 수용체(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) 유전자의 정의된 돌연변이를 정량적으로 검출하기 위한 real-time PCR 검사법입니다.

이 검사는 증양에 정의된 EGFR 돌연변이가 있는 NSCLC 환자를 파악하는 데 도움을 주기 위한 것입니다. 이에 대한 약물의 안전성과 유효성은 다음과 같이 검증되었습니다.

GILOTRIF [®] (아파티닙)	엑손 19 결실, L858R, L861Q, G719X, 및 S768I
IRESSA [®] (게피티닙) 및 VIZIMPRO [®] (다코미티닙)	엑손 19 결실 및 L858R

therascreen[®] EGFR RGQ PCR Kit 로 역시 검출되는 다음의 EGFR 돌연변이에 대해서는 약물의 안전성과 유효성은 검증되지 않았습니다.

GILOTRIF [®] (아파티닙)	T790M 및 엑손 20 삽입
IRESSA [®] (게피티닙) 및 VIZIMPRO [®] (다코미티닙)	T790M, L861Q, G719X, S768I 및 엑손 20 삽입

시료는 수동 검체 준비를 위한 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 및 자동 증폭 검출을 위한 Rotor-Gene Q MDx 기기를 사용하여 처리됩니다.

요약 및 설명

EGFR 증양 유전자 내 돌연변이는 사람 암에서 발견됩니다(1, 2). NSCLC 환자에서 이러한 돌연변이의 존재는 특정 티로신 키나아제 억제제(Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) 암 요법에 대한 반응과 상관관계가 있습니다(3-8). EGFR 증양 유전자 내의 그러한 돌연변이는 NSCLC 환자 일반 모집단에서 미국, 유럽 또는 호주의 경우 환자의 약 10%, 일본 및 대만의 경우 환자의 최대 30% 빈도로 존재합니다(1, 2, 9).

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 는 Rotor-Gene Q MDx 기기에서 사용되는 실시간 정성적 PCR 분석법입니다. Scorpions®(10) 및 대립 유전자 불응 돌연변이 시스템(Allele Refractory Mutation System, ARMS) 기술(11)을 사용하는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로 야생형 유전체 DNA 배경과 비교하여 EGFR 증양 유전자의 엑손 18, 19, 20 및 21 에서 20 개(표 1 아래 주석[**] 참조) 돌연변이를 검출할 수 있습니다.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 로 검출된 20 개(표 1 아래 주석[**] 참조) EGFR 돌연변이 중에서, GILOTRIF 의 안전성 및 유효성은 표 1 에 나열된 17 개(표 1 아래 주석[**] 참조) 돌연변이에 대해 검증되었으나, 표 2 에 나열된 3 개 돌연변이에 대해서는 검증되지 않았습니다. 보다 자세한 사항은 GILOTRIF 약물 허가사항을 참고하십시오.

표 1. 돌연변이 및 COSMIC ID 목록 – GILTRIF의 안전성 및 유효성이 검증됨

돌연변이	엑손	염기 변화	COSMIC ID*
G719A	18	2156G>C	6239
결실	19	2238_2255del18	6220
		2235_2249del15	6223
		2236_2250del15	6225
		2239_2253del15	6254**
		2239_2256del18	6255
		2240_2254del15	12369**
		2240_2257del18	12370
		2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
		2239_2251>C	12383
		2237_2255>T	12384
		2239_2258>CA	12387
		2238_2252>GCA	12419
		2238_2248>GC	12422
2235_2252>AAT	13551		
S768I	20	2303G>T	6241
L858R	21	2573T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213

* Catalogue of Somatic Mutations in Cancer(www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)에서 가져온 COSMIC ID

**The COSM6254(2239_2253del15) 및 COSM12369(2240_2254del15) 돌연변이는 EGFR 시퀀스로부터 15 염기쌍 결실을 초래합니다. 동일한 최종 시퀀스가 두 돌연변이에 의해 생성되며 이러한 돌연변이는 서로 구분되지 않습니다. 따라서, 돌연변이 COSM6254(2239_2253del15)는 가장 최신 버전의 COSMIC(v83)에서 삭제되었으며 현재 두 돌연변이는 COSM12369(2240_2254del15)로 표현되고 있습니다. 이는 가장 많은 3' 결실을 나타내도록 하는 HGVS 지침을 따른 것입니다. *therascreen* EGFR 검사는 모든 19 결실 돌연변이와 "결실"이라고 하는 모든 양성 결실을 구별하지 않습니다. 이 변경사항은 문서화에만 영향을 미치며 키트 또는 개별 돌연변이를 검출하는 능력에는 영향을 미치지 않습니다.

표 2. 돌연변이 및 COSMIC ID 목록 – GILOTRIF의 안전성 및 유효성이 검증되지 않음

돌연변이	엑손	염기 변화	COSMIC ID*
T790M	20	2369C>T	6240
삽입	20	2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378

* Catalogue of Somatic Mutations in Cancer(www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)에서 가져온 COSMIC ID

therascreen EGFR RGQ PCR Kit로 검출된 20개(표 1 아래 주석[**] 참조) EGFR 돌연변이 중에서, IRESSA(게피티닙)와 VIZIMPRO(다코미티닙)의 안전성 및 유효성은 표 3에 나열된 14개(표 1 아래 주석[**] 참조) 돌연변이에 대해 검증되었으나, 표 4에 나열된 6개 돌연변이에 대해서는 검증되지 않았습니다. 보다 자세한 사항은 IRESSA(게피티닙) 및 VIZIMPRO(다코미티닙) 약물 허가사항을 참고하십시오.

표 3. 돌연변이 및 COSMIC ID 목록 – IRESSA 와 VIZIMPRO 의 안전성 및 유효성이 검증됨

돌연변이	엑손	염기 변화	COSMIC ID*
결실	19	2238_2255del18	6220
		2235_2249del15	6223
		2236_2250del15	6225
		2239_2253del15	6254**
		2239_2256del18	6255
		2240_2254del15	12369**
		2240_2257del18	12370
		2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
		2239_2251>C	12383
		2237_2255>T	12384
		2239_2258>CA	12387
		2238_2252>GCA	12419
		2238_2248>GC	12422
		2235_2252>AAT	13551
L858R	21	2573T>G	6224

* COSMIC ID 는 공공 데이터베이스인 Catalogue of Somatic Mutations in Cancer 에서 가져온 것입니다:
www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic

**The COSM6254(2239_2253del15) 및 COSM12369(2240_2254del15) 돌연변이는 EGFR 시퀀스로부터 15 염기쌍 결실을 초래합니다. 동일한 최종 시퀀스가 두 돌연변이에 의해 생성되며 이러한 돌연변이는 서로 구분되지 않습니다. 따라서, 돌연변이 COSM6254(2239_2253del15)는 가장 최신 버전의 COSMIC(v83)에서 삭제되었으며 현재 두 돌연변이는 COSM12369(2240_2254del15)로 표현되고 있습니다. 이는 가장 많은 3' 결실을 나타내도록 하는 HGVS 지침을 따른 것입니다. *therascreen* EGFR 검사는 모든 19 결실 돌연변이와 “결실”이라고 하는 모든 양성 결실을 구별하지 않습니다. 이 변경사항은 문서화에만 영향을 미치며 키트 또는 개별 돌연변이를 검출하는 능력에는 영향을 미치지 않습니다.

표 4. 돌연변이 및 COSMIC ID 목록 - IRESSA 와 VIZIMPRO 의 안전성 및 유효성이 검증되지 않음

돌연변이	엑손	염기 변화	COSMIC ID*
T790M	20	2369C>T	6240
L861Q	21	2582T>A	6213
G719A	18	2156G>C	6239
S768I	20	2303G>T	6241
삼입	20	2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378

* Catalogue of Somatic Mutations in Cancer(www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)에서 가져온 COSMIC ID

절차의 원리

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 는 8 개의 개별적 PCR 증폭 반응 혼합물로 구성되었습니다. EGFR 종양 유전자의 엑손 18, 19, 20 및 21 내 7개 돌연변이 특이 반응물과 엑손 2 내 야생형 대조물질로 구성되어 있습니다. 아래는 키트의 주요 구성품에 대한 설명입니다.

돌연변이 반응 혼합물

각 돌연변이 특이적 반응 혼합물은 돌연변이 특이적 ARMS 프라이머를 사용하여 돌연변이된 DNA 를 선택적으로 증폭시킨 후 *Scorpions* 프라이머를 사용하여 증폭 생성물을 검출합니다.

ARMS

대립 유전자 특이적 증폭은 *Taq* DNA 중합효소가 PCR 프라이머의 3' 말단에서 일치 염기와 불일치 염기를 구별하는 능력을 이용하는 ARMS 에 의해 달성됩니다. 프라이머가 완전히 일치할 경우 높은 효율성으로 증폭 곡선이 계속됩니다. 3' 염기가 일치하지 않으면 낮은 수준의 배경 증폭만 발생할 수 있습니다. 그러므로 돌연변이된 염기 서열은 대다수의 DNA 가 돌연변이를 갖고 있지 않은 검체에서도 선택적으로 증폭됩니다.

Scorpions

증폭의 검출은 *Scorpions* 를 사용하여 수행됩니다. *Scorpions* 는 공유 결합으로 프로브에 연결되는 PCR 프라이머를 포함하는 이작용기 분자들입니다. 이 프로브는 형광단 카르복시플루오레세인(FAM™)과 소광제를 포함하고 있습니다. 후자는 형광단의 형광도를 감소시킵니다. PCR 중에 프로브가 ARMS 앰플리콘과 결합하면 형광단과 소광제가 분리되어 형광도가 검출 가능한 수준으로 증가합니다.

대조 반응

대조 반응 혼합물(튜브 CTRL)은 *Scorpions* 프라이머와 비표지 프라이머를 사용하여 EGFR 유전자의 엑손 2 의 짧은 서열을 증폭시킵니다. 대조 반응은 적절한 수준의 증폭 가능한 DNA 가 검체에 존재하는지를 결정하는 데 사용되며, 돌연변이 상태를 결정하는 분석적 계산의 한 요소입니다.

내부 대조물질

8 개의 반응 혼합물 각각은 반응의 실패(예: 억제제의 존재로 인해)를 검출할 수 있도록 설계된 내부 대조물질을 포함합니다. 내부 대조물질을 대조물질 및 돌연변이 반응 혼합물에서 FAM 표지 Scorpions 와 구별하기 위해, 내부 대조물질은 EGFR 과 관련되지 않은 올리고뉴클레오타이드 표적 서열, 비표지 프라이머 및 핵사클로로플루오레세인(HEX™)으로 표지된 Scorpions 프라이머를 사용합니다.

양성 대조물질

양성 대조물질(튜브 PC)은 각 돌연변이 분석항목과 대조물질 분석항목의 한 개의 돌연변이를 대표하는 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물로 구성되었습니다. 허용 범위 이내의 돌연변이가 검출되면 키트의 각 반응 혼합물의 적절한 기능이 확인되는 것입니다.

음성 대조물질

주형 없는 대조물질(튜브 NTC)에는 “주형 없는 대조물질”(No Template Control, NTC) 반응에 사용되는 탈핵산분해효소수가 들어 있습니다. NTC 는 음성 대조물질로 사용되며, 분석항목 설정 중의 잠재적 오염을 평가합니다.

검체 희석제

검체 희석제(튜브 Dil.)에는 탈핵산분해효소수가 들어 있습니다.

Taq DNA 중합효소

Taq DNA 중합효소는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에서 사용하는 중합효소 연쇄 반응을 위한 효소입니다.

플랫폼 및 소프트웨어

- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 제품 웹페이지(www.qiagen.com)에서 다운로드할 수 있는, Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 버전 3.1.2 가 설치된 Rotor-Gene Q MDx 기기와 함께 사용하도록 특별히 고안되었습니다. 분석 패키지를 다운로드하려면 Product Resources(제품 리소스) > Supplementary Protocols(보조 프로토콜)를 방문하십시오. 기기에 관한 사항은 기기 사용 설명서를 참고하십시오.
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 의 설치에 관한 지침은 “부록: Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 의 설치”를 참고하십시오.

Rotor-Gene Q MDx 기기를 기기 사용 설명서에 나와 있는 요건에 따라 유지보수해야 합니다.

Rotor-Gene Q MDx 기기는 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 를 사용하여 다양한 사이클 매개변수 또는 “실행”을 위해 프로그래밍됩니다.

Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 는 2 개 주형, 즉 “*therascreen* EGFR Control Run Locked Template”(DNA 검체 평가용)과 “*therascreen* EGFR Locked Template”(EGFR 돌연변이 검출용)으로 구성되어 있습니다. 이 템플릿은 PCR 실행 매개변수를 포함하고 있으며 결과를 계산합니다.

HEX 신호는 Rotor-Gene Q MDx 기기의 노란색 채널에서 읽으며, FAM 신호는 녹색 채널에서 읽습니다.

제공되는 재료

키트 내용물

therascreen EGFR RGQ PCR Kit			
카탈로그 번호		870121	
반응액 수		24	
색깔	ID	튜브 식별	부피
빨간색	Control Reaction Mix(대조 반응 혼합물)	1 CTRL	2 x 600 µl
보라색	T790M Reaction Mix(T790M 반응 혼합물)	2 T790M	600 µl
주황색	Deletions Reaction Mix(결실 반응 혼합물)	3 Del	600 µl
분홍색	L858R Reaction Mix(L858R 반응 혼합물)	4 L858R	600 µl
녹색	L861Q Reaction Mix(L861Q 반응 혼합물)	5 L861Q	600 µl
노란색	G719X Reaction Mix(G719X 반응 혼합물)	6 G719X	600 µl
회색	S768I Reaction Mix(S768I 반응 혼합물)	7 S768I	600 µl
파란색	Insertions Reaction Mix(삽입 반응 혼합물)	8 Ins	600 µl
베이지색	EGFR Positive Control(EGFR 양성 대조물질)	9 PC	300 µl
박하색	Taq DNA Polymerase(Taq DNA 중합효소)	Taq	2 x 80 µl
흰색	Nuclease-free water for No Template Control(주형 없는 대조물질용 탈핵산분해효소수)	NTC	1.9 ml
흰색	Nuclease-free water for Dilution(희석용 탈핵산분해효소수)	Dil.	1.9 ml
-	therascreen EGFR RGQ PCR Kit 사용 설명서(안내서)		1

시약

반응 혼합물은 이종으로 구성되었으며, 표적을 검출하는 FAM 표지 시약과 HEX 표지 내부 대조물질을 포함하고 있습니다. 표 5 를 참조하십시오.

표 5. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에서 공급되는 시약

시약	구성품	부피
대조 반응 혼합물	대조물질 비표지 프라이머, 대조물질 Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액, 탈핵산분해효소수	튜브 2 개 x 600 µl
T790M 반응 혼합물	T790M ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액, 탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 600 µl
결실 반응 혼합물	결실 ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액, 탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 600 µl
L858R 반응 혼합물	L858R ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액, 탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 600 µl
L861Q 반응 혼합물	L861Q ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액, 탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 600 µl
G719X 반응 혼합물	G719X ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액, 탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 600 µl

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

시약	구성품	부피
S768I 반응 혼합물	S768I ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 주형, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액, 탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 600 µl
삽입 반응 혼합물	삽입 ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 주형, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액, 탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 600 µl
EGFR 양성 대조물질	대조물질 주형, T790M 주형, 결실 6223 주형, L858R 주형, L861Q 주형, G719A 주형, S768I 주형, 삽입 12378 주형, Poly A RNA, Tris EDTA 완충액	튜브 1 개 x 300 µl
Taq DNA 중합효소	Taq 중합효소: 50% 글리세롤/탈핵산분해효소수	튜브 2 개 x 80 µl
주형 없는 대조물질	탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 1.9 ml
검체 희석용	탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 1.9 ml

필요하지만 제공되지 않는 재료

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오.

시약

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, 카탈로그 번호 60404; 24 페이지의 "DNA " 참고)

소모품

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, 72-well rotor 와 함께 사용(QIAGEN, 카탈로그 번호 981103 또는 981106)
- 마스터 혼합액 준비용 탈핵산분해효소, 낮은 DNA 결합 마이크로 원심분리기 튜브
- 에어로졸 막이 있는 탈핵산분해효소 피펫 팁

장비

- 영구 마커
- 72-well rotor 를 사용하는 Rotor-Gene Q MDx 기기 *(QIAGEN, 카탈로그 번호 9002035)
- Rotor-Gene Q 소프트웨어 버전 2.3.5 이상
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 버전 3.1.2
중요: Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 버전 3.1.2 는 Rotor-Gene Q 소프트웨어 버전 2.3.5 이상과만 사용해야 합니다.
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, 수동 반응 설정을 위한 알루미늄 블록(QIAGEN, 카탈로그 번호 9018901)

* 사용하기 전에 제조업체의 권장사항에 따라 기기를 점검 및 보정하십시오.

- 검체 준비 전용 피펫*(조절식)
- PCR 마스터 혼합물 준비 전용 피펫*(조절식)
- 템플릿 DNA 분주 전용 피펫*(조절식)
- 1.5 ml 튜브용 로터 포함 실험대용 원심분리기*
- 56°C, 70°C, 90°C 에서 배양 가능한, 열교반기, 가열 회전 배양기, 가열 블록 또는 수조 *

* 사용하기 전에 제조업체의 권장사항에 따라 기기를 점검 및 보정하십시오.

경고 및 사전 주의사항

체외 진단용

처방용 용도에 한함

Rotor-Gene Q MDx 기기와 함께 사용함.

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안전성 정보와 함께 사용함

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 관련 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오. 해당 정보는 www.qiagen.com/safety 에서 편리하고 용량이 작은 PDF 형식으로 온라인에서 찾아볼 수 있으며, 해당 페이지에서 각 QIAGEN 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS 를 찾고 조회하고 인쇄할 수 있습니다.

일반 사전 주의사항

- 이 검사법은 포르말린 고정 파라핀 포매 NSCLC 조직 시료와 함께 사용합니다.
- 모든 화학물질 및 생물학적 물질은 잠재적으로 유해합니다. 시료 및 검체는 감염 가능성이 있으며 생물학적 유해물질로 취급해야 합니다.
- 검체 및 분석항목 폐기물은 현지 안전 절차에 따라 폐기하십시오.
- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 용 시약은 최적의 상태로 희석되었습니다. 시약을 추가로 희석하면 성능 저하를 야기할 수 있으므로 추가 희석하지 마십시오. 25 µl 미만 부피의 반응액(반응 혼합물 + 검체)을 사용하지 마십시오.
- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에 제공된 모든 시약은 동일한 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에 제공된 다른 시약과 함께 사용하는 목적으로만 사용됩니다. 성능에 영향을 줄 수 있으므로, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 내 또는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 간에 시약을 바꾸지 마십시오.

- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에 제공된 *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)만 사용하십시오. 동일한 유형 또는 다른 유형의 다른 키트에 제공된 *Taq* DNA 중합효소 또는 다른 공급업체의 *Taq* DNA 중합효소로 바꾸지 마십시오.
- 추가적인 경고, 사전 주의사항 및 절차는 Rotor-Gene Q MDx 기기 사용자 설명서를 참고하십시오.
- 유효 기간이 만료되거나 부적절하게 보관된 구성품은 사용하지 마십시오.

참고: 대조 물질 및 반응액 혼합 시약이 양성 대조물질 시약에 들어 있는 합성 물질로 오염되지 않도록 각별히 주의하십시오.

참고: 반응 혼합물을 설정하고 양성 대조물질 시약을 첨가할 때 개별적인 전용 피펫을 사용하십시오.

참고: 양성 대조물질 첨가에 사용한 구역이 아닌 다른 구역에서 반응 혼합물을 준비하고 분주하십시오.

참고: 실행이 끝날 때까지 Rotor-Gene Q MDx 기기를 열지 마십시오.

참고: 실행이 끝날 때까지 Rotor-Gene Q 튜브를 열지 마십시오.

참고: 잘못된 검체 혼입, 로딩 오류 및 피펫팅 오류에 특히 주의하여 정확한 검체 검사가 이루어지도록 신중해야 합니다.

시약 보관 및 취급

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 는 드라이아이스로 보존되어 배송됩니다. 도착 시, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 의 구성품이 동결된 상태가 아니거나 운송 중에 외부 포장이 개봉되었거나 배송물에 포장 명세서, 사용 지침 또는 시약이 들어 있지 않으면 QIAGEN 기술 서비스 부서 또는 현지 유통업체로 문의하십시오(www.qiagen.com 방문).

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 는 수령하는 즉시 -30°C ~ -15°C 의 항온 냉동고에 차광 보관해야 합니다. 지정된 보관 조건에서 보관하는 경우 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 는 명시된 유통 기한까지 안정적입니다.

일단 개봉한 시약은 원래 포장재에 넣은 상태로 -30°C ~ -15°C 에서 90 일간 또는 명시된 유통 기한 중 적용되는 시점까지 보관할 수 있습니다. 해동과 동결을 반복해서는 안 됩니다. 최대 8 회의 동결-해동 사이클을 초과하지 마십시오.

시약은 실온에서 최소 1 시간, 최대 4.5 시간 동안 해동해야 합니다. 시약을 사용할 준비가 되면, PCR 반응을 설정할 수 있습니다. 마스터 혼합물과 DNA 검체가 들어 있는 Rotor-Gene Q 튜브는 Rotor-Gene Q MDx 기기에 즉시 로딩할 수 있습니다. PCR 반응액을 설정하고 나면, 실행 전 총 시간이 다음 시간을 초과해서는 안 됩니다.

- 상온 보관 시 7 시간

참고: 이 시간에는 PCR 설정과 보관이 모두 포함됩니다.

- 냉장고($2 \sim 8^{\circ}\text{C}$)에서 보관 시 18 시간

참고: 이 시간에는 PCR 설정과 보관이 모두 포함됩니다.

참고: 반응 혼합물 시약의 Scorpions 는 (모든 형광 표지 분자와 마찬가지로) 빛에 민감합니다. 광 표백을 방지하기 위해 대조물질 및 반응 혼합물 시약을 빛으로부터 보호하십시오.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 의 시약은 최적으로 희석되었으므로 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 사용 설명서(안내서)에 지시된 바와 같이 분석에 사용하기 전에 더 이상의 정제나 처리가 필요하지 않습니다.

모든 구성품의 포장 상자와 라벨에 인쇄된 유효 기간 및 보관 조건에 유의해야 합니다. 유효 기간이 만료되거나 부적절하게 보관된 구성품은 사용하지 마십시오.

시료의 보관 및 취급

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 는 NSCLC 환자의 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) 종양 조직에서 추출한 DNA 검체와 함께 사용하기 위한 것입니다. 종양은 유전자형과 표현형 모두에서 이질성입니다. 돌연변이 양성 종양은 야생형 DNA 를 포함할 수 있으며, 마찬가지로 조직학적으로 비종양 조직의 영역을 나타낼 수 있습니다. 모든 조직 검체는 잠재적으로 유해한 것으로 취급해야 합니다.

DNA 정제를 위한 조직 검체 준비 방법:

표준 물질과 방법을 사용하여 조직 시료를 10% 중성 완충 포르말린(Neutral Buffered Formalin, NBF)에 고정하고 조직 시료를 파라핀에 포매합니다. 박절기를 사용하여 파라핀 블록에서 5 µm 의 연속 절편을 잘라내어 유리 슬라이드에 고정합니다.

- 수련된 개인(예: 병리학자)이 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin & Eosin, H&E) 염색 절편을 평가하여 종양이 존재하는지 확인합니다.
- 염색된 절편을 DNA 정제에 사용하면 절대 안 됩니다.
- 각 검체에 새 메스를 사용하여 2 개 절편에서 전체 조직 영역을 긁어서 표지된 마이크로 원심분리기 튜브에 넣습니다.

참고: 건조한 메스를 사용하십시오. 기류식 후드 또는 흠 후드에서 이 단계를 수행하지 마십시오.

현지 절차에 따라 통제된 방식으로 정제할 준비가 된 종양 시료, 블록, 슬라이드, 검체 및 마이크로 원심분리기 튜브에 라벨을 붙이고, 취급하며, 보관하십시오.

FFPE 블록과 슬라이드는 실온에서 보관하십시오. 슬라이드는 DNA 정제 전 최대 1 개월까지 상온에서 보관할 수 있습니다.

유전체 DNA 는 정제 후 일주일 동안 2 ~ 8°C 에서 보관하거나 사용 전 최대 8 주 동안 -25 ~ -15°C 에서 보관할 수 있습니다.

절차

DNA 정제

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN, 카탈로그 번호 60404)를 사용하여 아래에 기술된 절차에 따라 FFPE NSCLC 시료로 준비한 검체에서 유전체 DNA 를 정제합니다.

참고: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 는 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 를 사용하여 정제된 DNA 를 사용하여 검증되었습니다. 다른 DNA 정제 제품을 사용하지 마십시오.

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서(버전 1, 2017 년 2 월)의 지침에 따라 다음에 유의하여 DNA 정제를 실시하십시오.

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 는 수동으로만 사용해야 합니다.
- 모든 필수 단계에는 분자생물학 등급 에탄올 *을 사용하십시오.
- 정제당 2 개의 슬라이드를 사용하십시오.
- 단백질분해효소 K 분해법(*QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서* 11 단계를 $56^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 \pm 5 분 동안 수행해야 합니다.
- 단백질분해효소 K 분해법(*QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서* 12 단계)을 $90^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 \pm 5 분 동안 수행해야 합니다.
- 검체는 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 의 용출 완충액(ATE) 120 μl 를 사용하여 용출해야 합니다.

유전체 DNA 는 정제 후 일주일 동안 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하거나 사용 전 최대 8 주 동안 $-25 \sim -15^{\circ}\text{C}$ 에서 보관할 수 있습니다.

* 메탄올 또는 메틸에틸케톤과 같은 기타 물질을 함유한 변성 알코올을 사용하지 마십시오.

프로토콜: DNA 검체 평가

이 프로토콜은 검체의 총 증폭 가능 DNA 를 평가하는 데 사용됩니다.

참고: 검체 내 총 증폭 가능 DNA 만 대조 반응을 사용하여 평가하므로 DNA 검체 평가는 PCR 억제제의 존재를 검출하도록 설계되지 않았습니다.

시작 전 중요 사항

- 올바른 결과를 얻기 위해서는, 분석 설정 절차의 각 혼합 단계에서 기술된 혼합 절차를 반드시 수행해야 합니다.
- 사용 가능한 대조 반응 혼합물로 최대 24 개의 검체를 평가할 수 있습니다.
- 절차를 시작하기에 앞서 일반 사전 주의사항 섹션을 읽으십시오.
- *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*) 또는 *Taq* DNA 중합효소가 들어 있는 혼합물을 흔들지 마십시오. 그렇게 하면 효소가 불활성화될 수 있습니다.
- 피펫 팁이 효소에 과도하게 덮이지 않도록 팁을 조심스럽게 액체 표면 바로 밑에 담가서 *Taq* DNA 중합효소를 피펫팅하십시오.
- 검사 전에 대조 반응 혼합물(튜브 CTRL)을 사용하여 DNA 를 평가하십시오.

참고: 이 평가를 위해 분광 광도계 또는 기타 대체 방법이 아니라 아래에 기술된 바와 같이 대조 반응 혼합물을 사용하는 것이 중요합니다. 심하게 분해된 DNA 는 프라이머가 짧은 DNA 단편을 생성하더라도 증폭되지 않을 수 있습니다.

- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 의 시약을 효율적으로 사용하려면 가능한 한 DNA 검체를 배치로 구성하여 실행을 완전히 채워진 상태로 만드십시오. 검체를 개별적으로 또는 적은 수량으로 검사하면 시약이 더 많이 사용되고 한 개의 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로 검사할 수 있는 전체 검체의 수량이 줄어듭니다.

시작하기 전 해야 할 일

- Rotor-Gene Q MDx 기기를 처음 사용하기 전에 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 소프트웨어가 설치되었는지 확인하십시오(82 페이지의 "부록: Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 의 설치" 참고).

- 사용할 때마다 항상 모든 시약을 최소 1 시간, 최대 4.5 시간 동안 상온(15 ~ 25°C)에서 완전히 해동하고, 10 회 거꾸로 하여 혼합한 후 짧게 원심분리하여 튜브 바닥의 내용물을 수집해야 합니다.
- 각 사용 전에 *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)가 상온(15 ~ 25°C)인지 확인합니다. 튜브를 잠깐 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.
- 모든 검체를 10 회 거꾸로 하여 혼합하고 잠깐 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 내용물을 수집합니다.

절차

1. 대조 반응 혼합물(튜브 CTRL), 주형 없는 대조물질 탈핵산분해효소수(튜브 NTC) 및 EGFR 양성 대조물질(튜브 PC)을 상온(15 ~ 25°C)에서 최소 1 시간, 최대 4.5 시간 동안 완전히 해동합니다. 실행 시작 전 시약 해동, PCR 설정 및 보관 시간은 표 6 에 기재되어 있습니다. 시약이 해동되면 염의 농도가 한 곳만 높지 않도록 각 튜브를 10 회 거꾸로 하여 혼합하고 잠깐 원심 분리하여 튜브 바닥에 있는 내용물을 수집합니다.

표 6. 해동 시간, PCR 설정 시간 및 보관 온도

최소 해동 시간	최대 해동 시간	PCR 설정 후 보관 온도	최대 PCR 설정 및 보관 시간
1 시간	4.5 시간	상온 (15 ~ 25°C)	7 시간
1 시간	4.5 시간	2 ~ 8°C	18 시간

참고: PCR 설정은 상온에서 수행해야 합니다. “보관”이라는 용어는 PCR 설정 완료 시점부터 Rotor-Gene Q MDx 기기에서 PCR 실행을 시작하기까지의 시간을 말합니다.

참고: *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)를 다른 시약과 동시에 상온(15 ~ 25°C)으로 해동합니다(21 페이지의 “시약 보관 및 취급” 참고). 튜브를 잠깐 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.

2. DNA 검체를 위한 충분한 마스터 혼합물(대조 반응 혼합물[튜브 CTRL] + DNA 검체용 *Taq* DNA 중합효소[튜브 *Taq*]), 한 개의 EGFR 양성 대조물질(튜브 PC) 반응 및 한 개의 주형 없는 대조물질(튜브 NTC)용 탈핵산분해효소수 반응물을 표 7의 부피에 따라 준비합니다. PCR 설정에 충분한 여분이 있도록 한 개의 추가 검체에 대한 시약을 포함시킵니다.

마스터 혼합물에는 검체를 제외하고 PCR에 필요한 모든 구성품이 포함됩니다.

표 7. 대조물질 분석 마스터 혼합물 준비

구성품	부피
대조 반응 혼합물(튜브 CTRL)	19.5 $\mu\text{l} \times (n+1)^*$
<i>Taq</i> DNA 중합효소(튜브 <i>Taq</i>)	0.5 $\mu\text{l} \times (n+1)^*$
총 부피	20.0 μl /반응

* n = 반응물 수(검체 + 대조물질). PCR 설정을 위한 여분으로 한 개의 추가 검체($n + 1$)를 위한 충분한 마스터 혼합물을 준비합니다. n 값은 24(+ 대조물질)를 초과하면 안 됩니다. 24는 한 번에 실행할 수 있는 최대 검체 수입니다.

참고: 마스터 혼합물을 준비할 때, 필요한 부피의 대조 반응 혼합물을 해당 튜브에 먼저 추가하고 마지막으로 *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)를 추가합니다.

3. 표 8의 배치에 따라 적절한 수의 PCR 4-스트립 튜브(각 스트립에 4개의 튜브)를 로딩 블록에 배치합니다. 튜브의 캡을 닫지 마십시오.

참고: 캡은 필요할 때까지 플라스틱 용기에 남겨 두십시오.

표 8. DNA 검체 평가를 위한 로딩 블록의 실행 배치도*

분석항목									
대조물질	1[PC]	9	17	25	-	-	-	-	-
대조물질	2[NTC]	10	18	26	-	-	-	-	-
대조물질	3	11	19	-	-	-	-	-	-
대조물질	4	12	20	-	-	-	-	-	-
대조물질	5	13	21	-	-	-	-	-	-
대조물질	6	14	22	-	-	-	-	-	-
대조물질	7	15	23	-	-	-	-	-	-
대조물질	8	16	24	-	-	-	-	-	-

* 각 튜브에는 총 25 µl 의 반응물 부피가 들어 있어야 합니다(표 7 에 따라 준비한 마스터 혼합물 20 µl 와 NTC/검체/PC 5 µl). 번호는 로딩 블록 내 위치를 표시하며 최종 로터 위치를 나타냅니다.

4. 마스터 혼합물의 튜브를 캡으로 닫고 10 회 거꾸로 하여 혼합한 후, 잠깐 원심분리하여 혼합물이 튜브 바닥에 모이게 합니다. 각 PCR 스트립 튜브에 마스터 혼합물 20 µl 를 즉시 추가합니다.

참고: 마스터 혼합물 설정 중 튜브 배치는 표 8 을 참조하십시오. DNA 검체 평가를 위해서는 대조물질 분석 마스터 혼합물을 한 개의 PC 튜브, 한 개의 NTC 튜브 및 각 DNA 검체당 한 개의 튜브에 추가해야 합니다.

5. 주형 없는 대조물질(튜브 NTC)을 위한 5 µl 의 탈핵산분해효소수를 NTC 튜브(튜브 위치 2)에 즉시 첨가하고 튜브에 캡을 닫습니다.

6. 검체 튜브(튜브 위치 3 ~ 26)에 각 DNA 검체 5 µl 를 추가하고 튜브에 캡을 닫습니다.

7. 5 µl 의 EGFR 양성 대조물질(튜브 PC)을 PC 튜브(튜브 위치 1)에 추가하고 튜브에 캡을 닫습니다.

8. 영구 마커를 사용하여 각 PCR 4-스트립 튜브(예: 위치 1, 5 및 9 등)의 가장 낮은 숫자 위치의 첫 번째 튜브 뚜껑에 튜브를 Rotor-Gene Q MDx 기기의 72-well rotor 에 로드하는 방향을 표시합니다.

9. 캡을 덮은 튜브를 4 회 거꾸로 하여 검체와 반응 혼합물을 섞습니다.

10. 모든 PCR 4-스트립 튜브를 방향 표시를 사용하여 실행 배치도(표 8)에 따라 72-well rotor 의 적절한 위치에 배치합니다.

참고: 로터가 완전히 차지 않은 경우, 로터에 사용되지 않는 모든 위치를 캡이 씌워진 빈 튜브로 채워야 합니다. 이렇게 하면 Rotor-Gene Q MDx 기기의 열 효율이 유지됩니다.

11. 72-well rotor 를 Rotor-Gene Q MDx 기기에 배치합니다. 잠금 링(Rotor-Gene Q MDx 와 함께 공급됨)을 로터 상단에 설치하여 실행 중에 튜브를 고정시킵니다.

12. Rotor-Gene Q MDx 기기에 연결된 노트북의 바탕화면에서 *therascreen* EGFR Control Run Locked Template (*therascreen* EGFR 대조물질 실행 잠금 템플릿) 아이콘을 두 번 클릭합니다(그림 1).

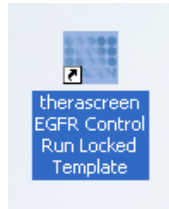


그림 1. “*therascreen* EGFR Control Run Locked Template”(therascreen EGFR 대조물질 실행 잠금 템플릿) 아이콘.

13. 기본값에 따라 “Setup”(설정) 탭이 표시됩니다(그림 2). 잠금 링이 적절히 부착되어 있는지 확인한 다음 Locking Ring Attached(잠금 링 부착됨) 상자에 체크합니다. Rotor-Gene Q MDx 기기 뚜껑을 닫습니다.

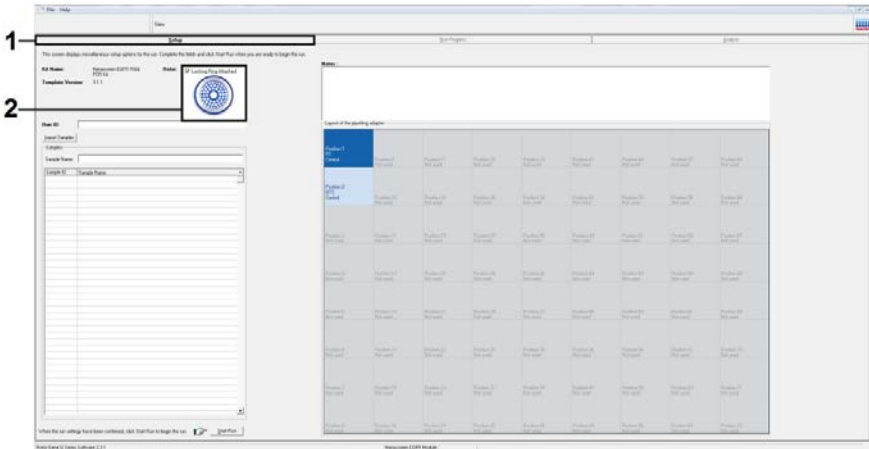


그림 2. “Setup”(설정) 탭 및 “Locking Ring Attached”(잠금 링 부착됨) 상자. 1 = “Setup”(설정) 탭, 2 = “Locking Ring Attached”(잠금 링 부착됨) 상자.

14. 현지 명명 규칙에 따라 Run ID(실행 ID) 필드에 실행 ID 를 입력합니다. 현지 명명 규칙에 따라 Sample Name(검체 이름) 필드에 검체 이름을 입력하고 리턴 키를 누릅니다.

이렇게 하면 검체 이름이 아래의 검체 목록에 추가되고, 검체에 “Sample ID”(검체 ID)(1, 2, 3 등)가 배정됩니다. 또한, 우측에 있는 “Layout of the pipetting adapter”(피펫팅 어댑터 배치) 패널이 해당 검체 이름이 포함되도록 업데이트됩니다(그림 3). 또는 “Import Samples”(검체 가져오기)를 사용하여 *.smp(Rotor-Gene Q 검체 파일) 또는 *.csv(쉼표로 구분된 값) 형식으로 저장된 검체 이름을 가져올 수도 있습니다. 이 방법을 사용하면 검체 이름이 자동으로 채워집니다.

참고: “Layout of the pipetting adapter”(피펫팅 어댑터 배치) 패널에 추가한 검체 이름 색깔이 바뀌며 강조 표시되고, 검체 이름이 검체 위치에 있는지 확인하십시오(그림 3).

참고: 8 글자가 넘는 검체 이름은 “Layout of the pipetting adapter”(피펫팅 어댑터 배치) 패널에 모두 표시되지 않을 수 있으나, 보고서에는 모두 표시됩니다.

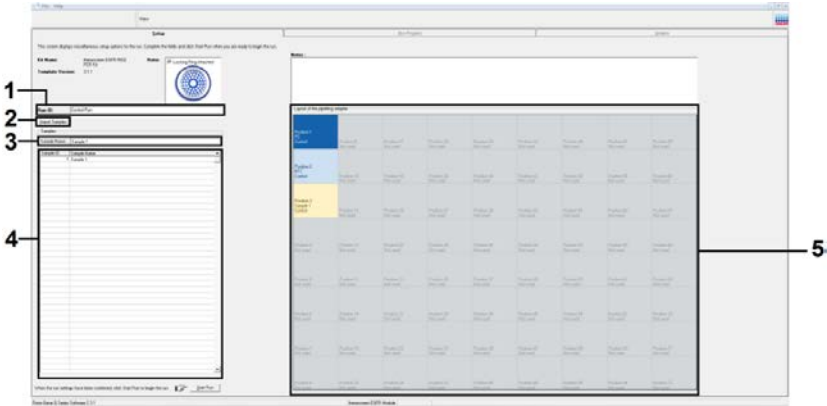


그림 3. "Run ID"(실행 ID) 및 "Sample Name"(검체 이름) 입력. 1 = "Run ID"(실행 ID) 대화상자 필드, 2 = "Import Sample"(검체 가져오기), 3 = "Sample Name"(검체 이름) 대화상자 필드, 4 = 검체 목록, 5 = "Layout of the pipetting adapter"(피펫팅 어댑터 배치) 패널.

15. 14 단계를 반복하여 모든 추가 검체의 이름을 입력합니다(그림 4).

참고: 검체 이름을 편집하려면 검체 목록에서 Sample Name(검체 이름)을 클릭합니다. 선택한 검체가 상단 Sample Name(검체 이름) 필드에 나타납니다. 현지 명명 규칙에 따라 검체 이름을 편집하고 리턴 키를 눌러 이름을 업데이트합니다.

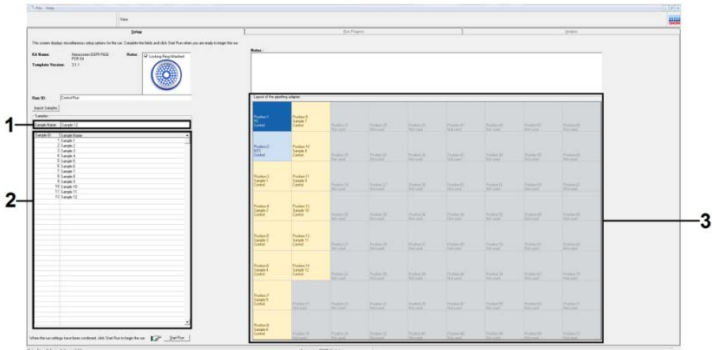


그림 4. "Sample Name"(검체 이름) 대화상자 필드에 추가 검체 이름 입력. 1 = "Sample Name"(검체 이름) 대화상자 필드, 2 = 검체 목록, 3 = 추가 검체 이름이 있는 "Layout of the pipetting adapter"(피펫팅 어댑터 배치) 패널.

16. 모든 검체 이름을 입력한 후 이름이 정확한지 확인합니다. 필요할 경우 Notes(참고) 필드에 모든 추가 정보를 추가하고 Start Run(실행 시작)을 클릭합니다(그림 5).

참고: 사용되지 않는 로터 위치가 있으면 로터의 모든 미사용 위치를 캡을 씌운 빈 튜브로 채워야 한다는 것을 사용자에게 상기시키는 Warning(경고)가 표시됩니다(그림 5 및 그림 6). 모든 미사용 로터 위치가 캡을 씌운 빈 튜브로 채워졌는지 확인하고 OK(확인)를 눌러서 진행합니다.

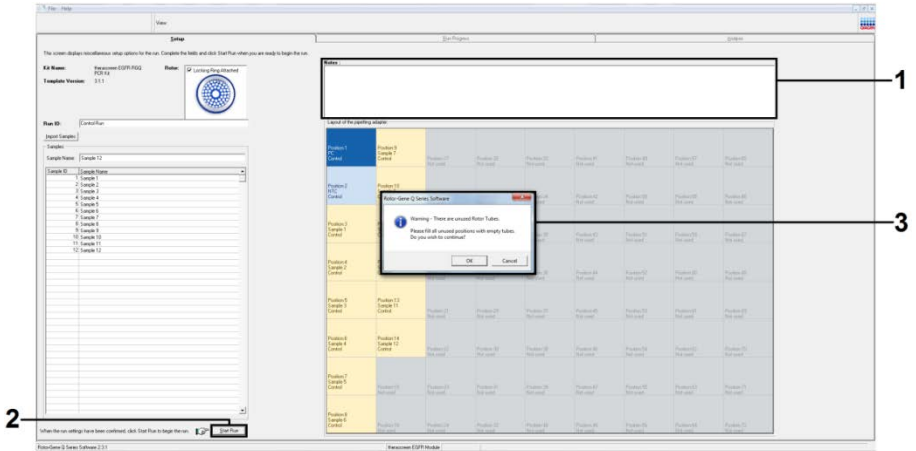


그림 5. “Notes”(참고) 대화상자 필드, “Start Run”(실행 시작) 및 미사용 로터 위치 “Warning”(경고).
1 = “Notes”(참고) 대화상자 필드, 2 = “Start Run”(실행 시작), 3 = 미사용 로터 위치 경고.

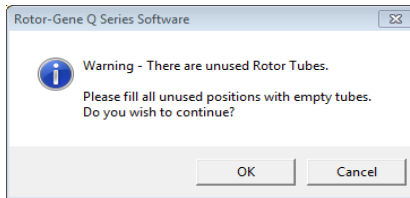


그림 6. 미사용 로터 위치 경고.

17. "Save As"(다른 이름으로 저장) 창이 표시됩니다. 적절한 파일명을 선택하고 Save(저장)를 클릭하여 PCR 실행을 선택된 위치에 *.rex 실행 파일로 저장합니다(그림 7).

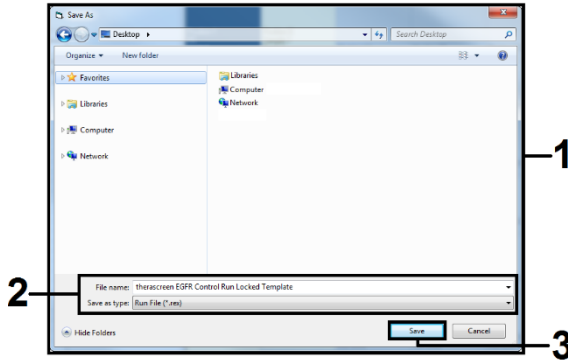


그림 7. 실행 파일 저장. 1 = "Save As"(다른 이름으로 저장) 창, 2 = 파일명 및*. rex 파일과 같은 파일 형식으로 저장, 3 = "Save"(저장).

18. PCR 실행이 시작됩니다.

참고: 실행이 시작되면 "Run Progress"(실행 진행) 탭이 자동으로 열려서 온도 추적 및 남은 실행 시간을 표시합니다(그림 8).

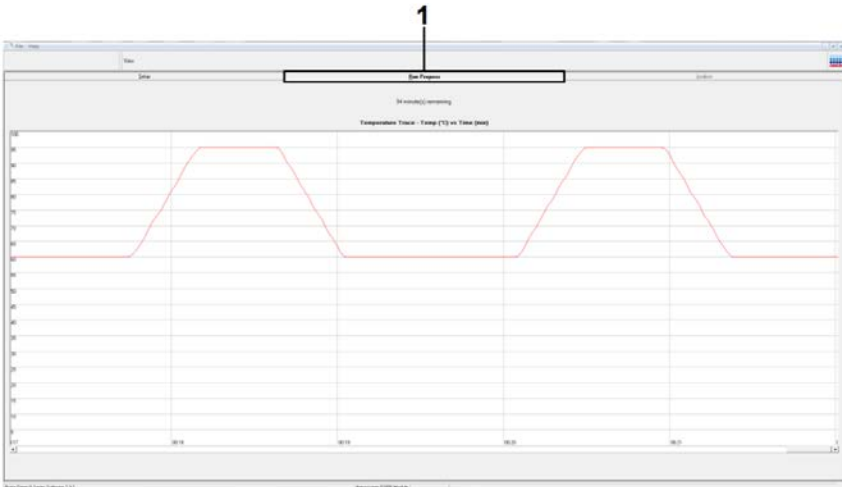


그림 8. 온도 추적 및 남은 실행 시간. 1 = "Run Progress"(실행 진행) 탭.

19. 실행이 끝나면 “Analysis”(분석) 탭이 자동으로 열립니다.

참고: “Analysis”(분석) 탭이 열리지 않을 경우 “Analysis”(분석) 탭을 클릭합니다(그림 9).

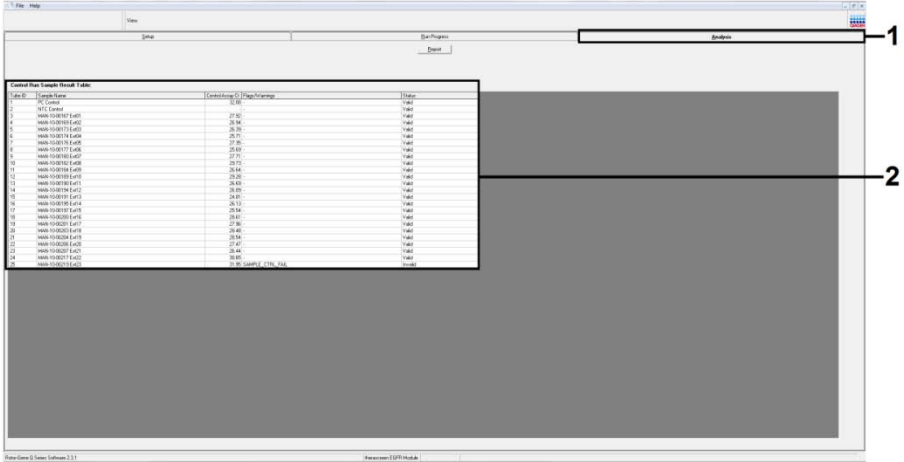


그림 9. “Analysis”(분석) 탭 및 결과 보고. 1 = “Analysis”(분석) 탭, 2 = “Control Run Sample Result Table”(대조물질 실행 검체 결과 표).

대조물질 결과가 “Control Run Sample Result Table”(대조물질 실행 검체 결과 표)의 결과와 같이 보고됩니다(그림 9).

참고: 재정제 또는 희석이 필요한 경우, 대조 반응을 반복하여 DNA 농도가 사용에 적합한지 확인합니다.

- 대조물질을 실행합니다(PC와 NTC, 각각 튜브 위치 1 과 2). 결과가 허용 범위 이내이면 각각이 Valid(유효)로 표시되며, 그렇지 않을 경우 Invalid(무효) 결과가 표시됩니다.
- 검체 대조 반응 $C_t > 31.10$ 은 “Invalid”(무효)로 표시됩니다. DNA 의 양이 돌연변이 분석에 충분하지 않습니다. 검체를 재검사합니다. DNA 의 양이 여전히 불충분할 경우, 이용 가능하면 2 개의 FFPE 조직 절편을 추가로 추출합니다(75 페이지의 “문제 해결 가이드” 참고).

- 검체 대조 반응 $C_T < 23.70$ 은 "Invalid"(무효)로 표시됩니다. DNA 농도가 돌연변이 분석을 하기에 너무 높습니다. 희석용 탈핵산분해효소수(튜브 Dil.)로 희석한 후 다시 검사합니다. $23.70 \sim 31.10$ 의 C_T 까지 희석합니다. 1:1 희석은 C_T 값을 약 1.0 증가시킵니다.
- 검체 대조 반응 $C_T 23.70 \sim 31.10(23.70 \leq \text{대조 } C_T \leq 31.10)$ 은 "Valid"(유효)로 표시됩니다. DNA 농도가 돌연변이 분석을 하기에 적합합니다.

참고: 재정제 또는 희석이 필요한 경우, 대조 반응을 반복하여 DNA 농도가 사용에 적합한지 확인합니다.

Report(보고서) 버튼을 클릭하여 보고서 파일을 만들 수 있습니다. "Report Browser"(보고서 브라우저) 창이 표시됩니다. "Templates"(템플릿) 아래에 있는 "EGFR Analysis Report"(EGFR 분석 보고서)를 선택한 다음 "Show"(표시)를 클릭합니다(그림 10).

참고: 각 보고서 좌측 상단 구석에 있는 Save As(다른 이름으로 저장)를 클릭하면 보고서를 다른 위치에 웹 아카이브 형식으로 저장할 수 있습니다.

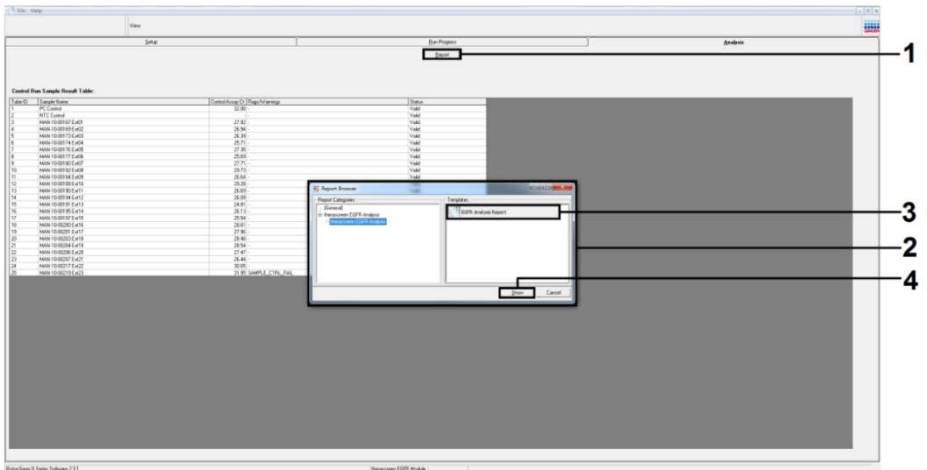


그림 10. "EGFR Analysis Report"(EGFR 분석 보고서) 선택. 1 = "Report"(보고서), 2 = "Report Browser"(보고서 브라우저) 창, 3 = "EGFR Analysis Report"[EGFR 분석 보고서) 선택, 4 = "Show"(표시).

프로토콜: EGFR 돌연변이 검출

이 프로토콜은 EGFR 돌연변이를 검출하기 위한 것입니다.

시작 전 중요 사항

- 올바른 결과를 얻기 위해서는, 분석 설정 절차의 각 혼합 단계에서 기술된 혼합 절차를 반드시 수행해야 합니다.
- 검체 평가를 통과한 검체는 EGFR 돌연변이 분석항목을 사용하여 검사할 수 있습니다.
- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 를 효율적으로 사용하려면 검체를 7 개씩 배치로 묶어야 합니다(72-well rotor 를 채우기 위해). 배치 크기가 이보다 작으면 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로 검사할 수 있는 검체의 수가 적어집니다.
- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에 제공된 모든 반응 혼합물을 사용하여 검체를 검사해야 합니다.
- *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*) 또는 *Taq* DNA 중합효소가 들어 있는 혼합물을 흔들지 마십시오. 그렇게 하면 효소가 불활성화될 수 있습니다.
- 피펫 팁이 효소에 과도하게 덮이지 않도록 팁을 조심스럽게 액체 표면 바로 밑에 담가서 *Taq* DNA 중합효소를 피펫팅하십시오.

시작하기 전 해야 할 일

- Rotor-Gene Q MDx 기기를 처음 사용하기 전에 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 소프트웨어가 설치되었는지 확인하십시오(82 페이지의 “부록: Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 의 설치” 참고).
- 사용할 때마다 항상 모든 시약을 최소 1 시간, 최대 4.5 시간 동안 상온(15 ~ 25°C)에서 완전히 해동하고, 10 회 거꾸로 하여 혼합한 후 짧게 원심분리하여 튜브 바닥의 내용물을 수집해야 합니다.
- 모든 검체를 10 회 거꾸로 하여 혼합하고 잠깐 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 내용물을 수집합니다.

- 각 사용 전에 *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)가 상온(15 ~ 25°C)인지 확인합니다. 튜브를 잠깐 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.

절차

1. 모든 반응 혼합물 튜브, 주형 없는 대조물질용 탈핵산분해효소수(튜브 NTC), EGFR 양성 대조물질(튜브 PC)을 상온(15 ~ 25°C)에서 최소 1 시간 동안 완전히 해동합니다. 실행 시작 전 시약 해동, PCR 설정 및 보관 시간은 표 9 에 기재되어 있습니다. 시약이 해동되면 염의 농도가 한 곳만 높지 않도록 각 튜브를 10 회 거꾸로 하여 혼합하고 잠깐 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 내용물을 수집합니다.

표 9. 해동 시간, PCR 설정 시간 및 보관 온도

최소 해동 시간	최대 해동 시간	PCR 설정 후 보관 온도	최대 PCR 설정 및 보관 시간
1 시간	4.5 시간	상온 (15 ~ 25°C)	7 시간
1 시간	4.5 시간	2 ~ 8°C	18 시간

참고: PCR 설정은 상온에서 수행해야 합니다. 보관은 PCR 설정 완료 시점부터 Rotor-Gene Q MDx 기기에서 PCR 실행을 시작하기까지의 시간을 말합니다.

참고: *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)를 다른 시약과 동시에 상온(15 ~ 25°C)으로 해동합니다(21 페이지의 “시약 보관 및 취급” 참고). 튜브를 잠깐 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.

2. 표 10 에 나오는 각 반응 혼합물에 따라 8 개의 마이크로 원심분리기 튜브(제공되지 않음)에 라벨을 붙입니다. DNA 검체를 위한 충분한 마스터 혼합물(대조물질 또는 돌연변이 반응 혼합물[튜브 CTRL, T790M, 결실, L858R, L861Q, G719X, S768I 또는 삽입] + DNA 검체용 *Taq* DNA 중합효소[*Taq*]), 한 개의 EGFR 양성 대조물질(튜브 PC) 반응 및 한 개의 주형 없는 대조물질(튜브 NTC)을 위한 탈핵산분해효소수 반응물을 표 10 의 부피에 따라 준비합니다. PCR 설정에 충분한 여분이 있도록 한 개의 추가 검체에 대한 시약을 포함시킵니다.

마스터 혼합물에는 검체를 제외하고 PCR 에 필요한 모든 구성품이 포함되어 있습니다.

표 10. 분석 마스터 혼합물 준비*

분석항목	반응 혼합물 튜브	반응 혼합물의 부피	Taq DNA 중합효소(튜브 Taq) 부피
대조물질	CTRL	19.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
T790M	T790M	19.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
결실	Del	19.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
L858R	L858R	19.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
L861Q	L861Q	19.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
G719X	G719X	19.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
S768I	S768I	19.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
삽입	Ins	19.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0.50 $\mu\text{l} \times (n+1)$

* n = 반응물 수(DNA 검체 + 대조물질). PCR 설정에 충분하도록 한 개의 추가 검체(n + 1)에 대해 충분히 준비합니다. n 값은 7(+ 대조물질)을 초과하면 안 됩니다. 7 이 실행할 수 있는 최대 검체 수입니다.

참고: 마스터 혼합물을 준비할 때는 필요한 양의 대조물질 또는 돌연변이 반응 혼합물을 해당 튜브에 먼저 추가하고, 마지막으로 Taq DNA 중합효소를 추가합니다.

- 표 11의 배치에 따라 적절한 수의 PCR 4-스트립 튜브(각 스트립에 4 개의 튜브)를 로딩 블록에 배치합니다. 튜브의 캡을 닫지 마십시오.

참고: 캡은 필요할 때까지 플라스틱 용기에 남겨 두십시오.

- 마스터 혼합물의 튜브를 캡으로 닫고 10 회 거꾸로 하여 혼합한 후, 잠깐 원심분리하여 혼합물이 튜브 바닥에 모이게 합니다. 각 적절한 PCR 스트립 튜브에 마스터 혼합물 20 μl 를 즉시 추가합니다.

참고: 반응 혼합물 설정 중 튜브 배치는 표 11 을 참조하십시오. EGFR 돌연변이 검출을 위해서는 마스터 혼합물을 8 개의 PC 튜브, 8 개의 NTC 튜브, 각 DNA 검체를 위한 8 개의 튜브에 추가해야 합니다.

표 11. EGFR 분석항목 실행 배치도*

분석항목	대조물질		검체 번호						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
대조물질	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
결실	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
삽입	8	16	24	32	40	48	56	64	72

* 각 튜브에는 총 25 μ l의 반응물 부피가 들어 있어야 합니다(표 10에 따라 준비한 마스터 혼합물 20 μ l와 NTC/검체/PC 5 μ l). 번호는 로딩 블록 내 위치를 표시하며 최종 로터 위치를 나타냅니다.

- 주형 없는 대조물질용 5 μ l의 탈핵산분해효소수(튜브 NTC)를 즉시 NTC 튜브(튜브 위치 9 ~ 16)에 첨가하고 튜브에 캡을 닫습니다.
- 검체 튜브(튜브 위치 17 ~ 72)에 각 DNA 검체 5 μ l를 추가하고 튜브에 캡을 닫습니다.
- 5 μ l의 EGFR 양성 대조물질(튜브 PC)을 PC 튜브(튜브 위치 1 ~ 8)에 추가하고 튜브에 캡을 닫습니다.
- 영구 마커를 사용하여 각 PCR 4-스트립 튜브(예: 위치 1, 5 및 9 등)의 가장 낮은 숫자 위치의 첫 번째 튜브 뚜껑에 튜브를 Rotor-Gene Q MDx 기기의 72-well rotor에 로드하는 방향을 표시합니다.
- 캡을 덮은 튜브를 4회 거꾸로 하여 검체와 반응 혼합물을 섞습니다.
- 모든 PCR 4-스트립 튜브를 방향 표시를 사용하여 실행 배치도(표 11)에 따라 72-well rotor의 적절한 위치에 배치합니다.

참고: 각 PCR 실행에 최대 7개의 검체가 포함될 수 있습니다. 로터가 완전히 차지 않은 경우, 로터에 사용되지 않는 모든 위치를 캡이 씌워진 빈 튜브로 채워야 합니다. 이렇게 하면 Rotor-Gene Q MDx 기기의 열 효율이 유지됩니다.

11. 72-well rotor 를 Rotor-Gene Q MDx 기기에 배치합니다. 잠금 링(Rotor-Gene Q MDx 와 함께 공급됨)을 로터 상단에 설치하여 실행 중에 튜브를 고정시킵니다.
12. 단계 12 에 따라 Rotor-Gene Q 소프트웨어를 엽니다.
13. Rotor-Gene Q MDx 기기에 연결된 노트북의 바탕화면에서 theascreen EGFR Locked Template(therascreen EGFR 잠금 템플릿) 아이콘을 두 번 클릭합니다(그림 11).

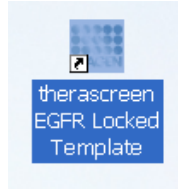


그림 11. “therascreen EGFR Locked Template”(therascreen EGFR 잠금 템플릿) 아이콘.

14. 기본값에 따라 “Setup”(설정) 탭이 표시됩니다(그림 12). 잠금 링이 적절히 부착되어 있는지 확인한 다음 Locking Ring Attached(잠금 링 부착됨) 상자에 체크합니다. Rotor-Gene Q MDx 기기 뚜껑을 닫습니다.

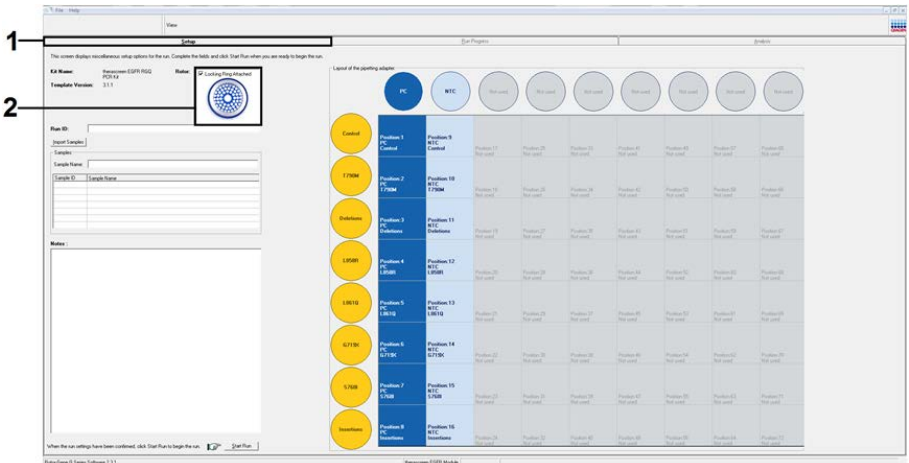


그림 12. “Setup”(설정) 탭 및 “Locking Ring Attached”(잠금 링 부착됨) 상자. 1 = “Setup”(설정) 탭, 2 = “Locking Ring Attached”(잠금 링 부착됨) 상자 체크.

15. 현지 명명 규칙에 따라 Run ID(실행 ID) 필드에 실행 ID를 입력합니다. 현지 명명 규칙에 따라 Sample Name(검체 이름) 필드에 검체 이름을 입력하고 리턴 키를 누릅니다. 이렇게 하면 검체 이름이 아래의 검체 목록에 추가되고, 검체에 “Sample ID”(검체 ID)(1, 2, 3 등)가 배정됩니다. 또한, 우측에 있는 “Layout of the pipetting adapter”(피펫팅 어댑터 배치) 패널이 해당 검체 이름이 포함되도록 업데이트됩니다(그림 13).

참고: “Layout of the pipetting adapter”(피펫팅 어댑터 배치) 패널에 추가한 검체 이름 색깔이 바뀌며 강조 표시되고, 검체 원 아래의 컬럼에 8 개의 분석항목이 모두 강조 표시되었는지 확인하십시오(그림 13).

참고: 최대 7 개의 검체를 추가할 수 있습니다. 검체 ID(검체 원 안)에 자동으로 1 ~ 7 이 배정됩니다.

참고: 8 글자가 넘는 검체 이름은 “Layout of the pipetting adapter”(피펫팅 어댑터 배치) 패널에 모두 표시되지 않을 수 있으나, 보고서에는 모두 표시됩니다.

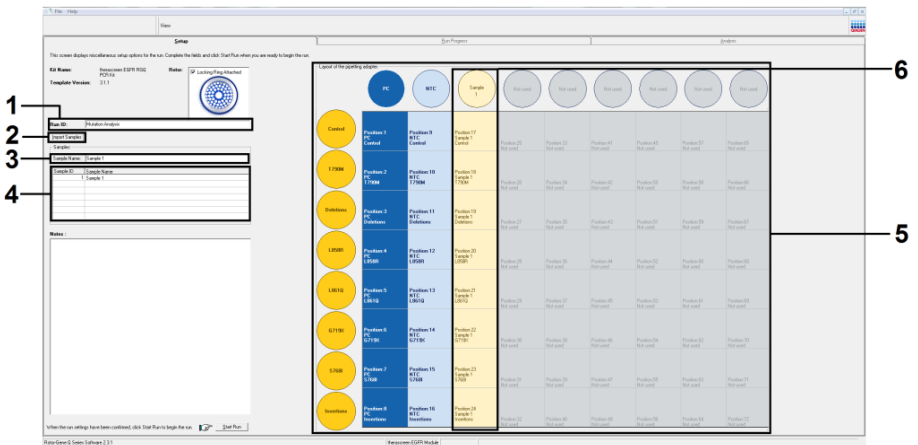


그림 13. “Run ID”(실행 ID) 및 “Sample Name”(검체 이름) 입력. 1 = “Run ID”(실행 ID) 대화상자 필드, 2 = “Sample Import”(검체 가져오기), 3 = “Sample Name”(검체 이름) 대화상자 필드, 4 = 검체 목록, 5 = “Layout of the pipetting adapter”(피펫팅 어댑터 배치) 패널, 6 = 강조 표시된 검체 원과 그 아래 8 개의 분석항목 열.

16. 14 단계를 반복하여 모든 추가 검체의 이름을 입력합니다(그림 14).

참고: 검체 이름을 편집하려면 검체 목록에서 **Sample Name**(검체 이름)을 클릭합니다. 선택한 검체가 **Sample Name**(검체 이름) 필드에 나타납니다. 현지 명명 규칙에 따라 검체 이름을 편집하고 리턴 키를 눌러 이름을 업데이트합니다.

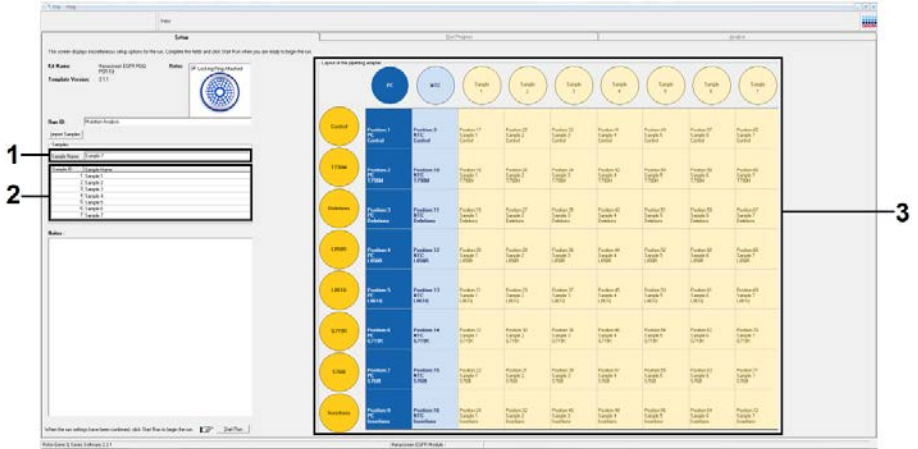


그림 14. “Sample Name”(검체 이름) 대화상자 필드에 추가 검체 이름 입력. 1 = “Sample Name”(검체 이름) 대화상자 필드, 2 = 검체 목록, 3 = 추가 검체 이름이 있는 “Layout of the pipetting adapter”(피펫팅 어댑터 배치) 패널.

17. 모든 검체 이름을 입력한 후 이름이 정확한지 확인합니다. 필요할 경우 **Notes**(참고) 필드에 일체의 추가 정보를 추가하고 **Start Run**(실행 시작)을 클릭합니다(그림 15).

참고: 사용되지 않는 로터 위치가 있으면 로터의 모든 미사용 위치를 캡을 씌운 빈 튜브로 채워야 한다는 것을 사용자에게 상기시키는 **Warning**(경고)가 표시됩니다(그림 15 및 그림 16). 모든 미사용 로터 위치가 캡을 씌운 빈 튜브로 채워졌는지 확인하고 **OK**(확인)를 눌러서 진행합니다.

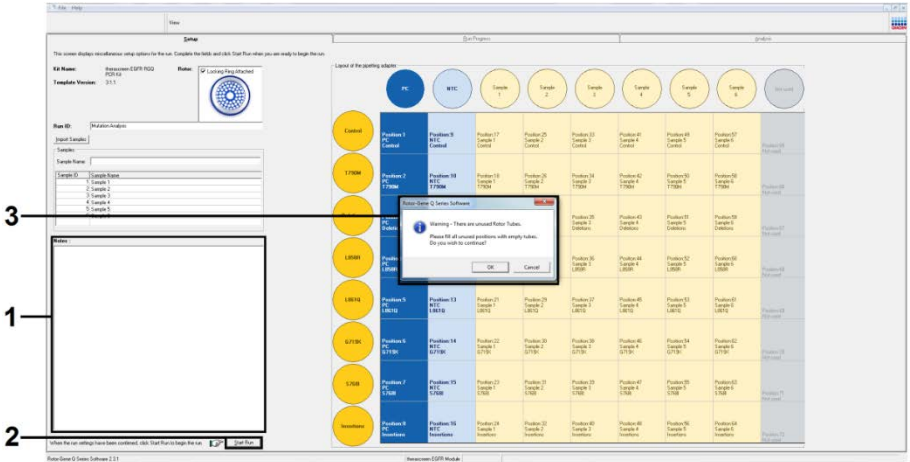


그림 15. “Notes”(참고) 대화상자 필드, “Start Run”(실행 시작) 및 미사용 로터 위치 “Warning”(경고).
1 = “Notes”(참고) 대화상자 필드, 2 = “Start Run”(실행 시작), 3 = 미사용 로터 위치 경고.

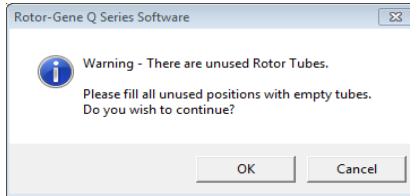


그림 16. 미사용 로터 위치 경고.

18. “Save As”(다른 이름으로 저장) 창이 표시됩니다. 적절한 파일명을 선택하고 PCR 실행을 선택된 위치에 *.rex 실행 파일로 저장합니다(그림 17).

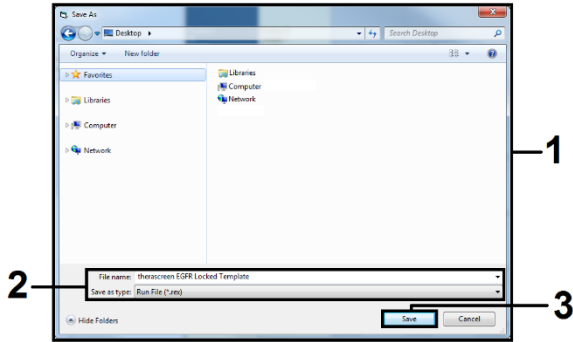


그림 17. 실행 파일 저장. 1 = "Save As"(다른 이름으로 저장) 창, 2 = 파일명 및*. rex 파일과 같은 파일 형식으로 저장, 3 = "Save"(저장).

19. PCR 실행이 시작됩니다.

참고: 실행이 시작되면 "Run Progress"(실행 진행) 탭이 자동으로 열려서 온도 추적 및 남은 실행 시간을 표시합니다(그림 18).

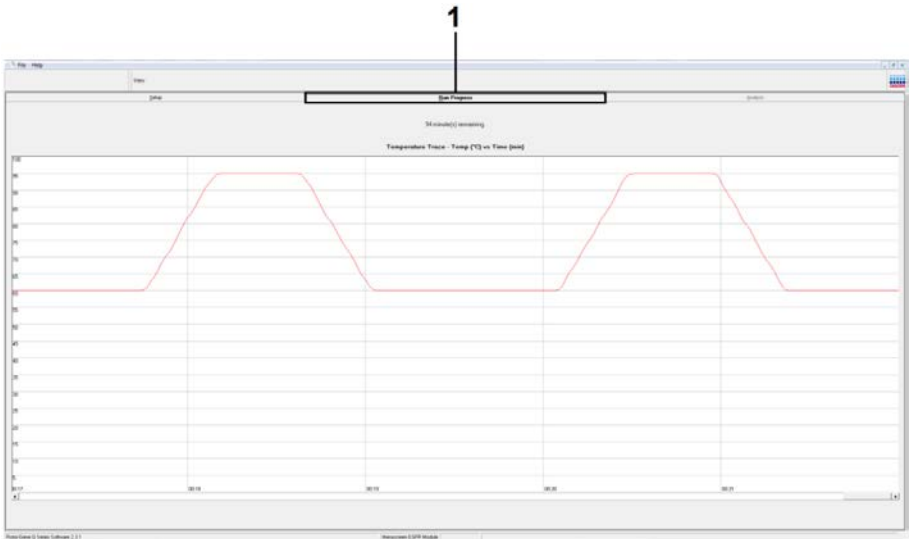


그림 18. 실행. 1 = "Run Progress"(실행 진행) 탭.

20. 실행이 끝나면 “Analysis”(분석) 탭이 자동으로 열립니다.

참고: “Analysis”(분석) 탭이 열리지 않을 경우 “Analysis”(분석) 탭을 클릭합니다(그림 19).

참고: 계산법에 대한 설명은 47 페이지의 “결과” 섹션에 나와 있습니다.

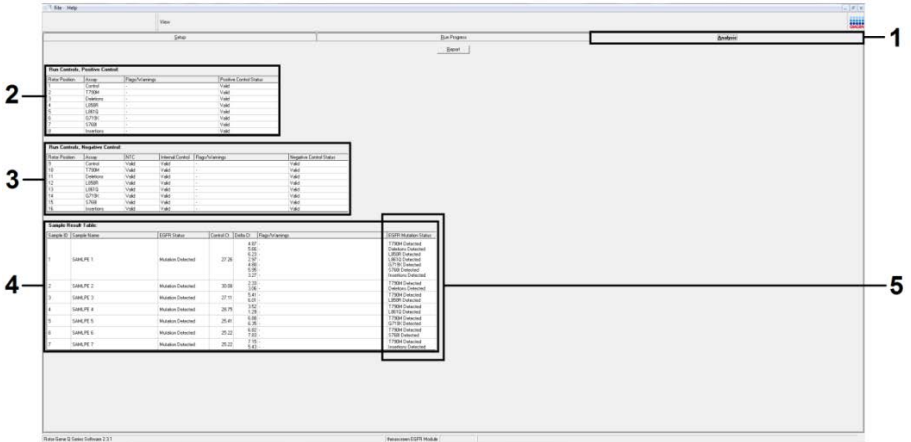


그림 19. “Analysis”(분석) 탭 및 결과 보고. 1 = “Analysis”(분석) 탭, 2 = “Run Controls, Positive Control”(대조군 실행, 양성 대조물질) 패널, 3 = “Run Controls, Negative Control”(대조물질 실행, 음성 대조물질) 패널, 4 = “Sample Result Table”(검체 결과 표), 5 = “EGFR Mutation Status”(EGFR 돌연변이 상태) 열.

분석 결과가 다음과 같이 보고됩니다(그림 19).

“Run Controls, Positive Control”(대조물질 실행, 양성 대조물질) 패널. 결과가 허용 범위 이내이면 “Positive Control Status”(양성 대조물질 상태)가 Valid(유효)로 표시되며, 그렇지 않을 경우 Invalid(무효) 결과가 표시됩니다.

“Run Controls, Negative Control”(대조물질 실행, 음성 대조물질) 패널. “NTC”와 “Internal Control”(내부 대조물질) 결과가 모두 허용 범위 이내이면 “Negative Control Status”(음성 대조물질 상태)가 Valid(유효)로 표시되고 그렇지 않으면 Invalid(무효) 결과가 표시됩니다.

“Sample Result Table”(검체 결과 표) 패널. “EGFR Mutation Status”(EGFR 돌연변이 상태) 열 아래에 돌연변이 양성 검체에 대한 특정 돌연변이가 보고됩니다.

Report(보고서) 버튼을 클릭하여 보고서 파일을 만들 수 있습니다. "Report Browser"(보고서 브라우저) 창이 표시됩니다. "Templates"(템플릿) 아래에 있는 "EGFR Analysis Report"(EGFR 분석 보고서)를 선택한 다음 "Show"(표시)를 클릭합니다(그림 20).
참고: 각 보고서 좌측 상단 구석에 있는 Save As(다른 이름으로 저장)를 클릭하면 보고서를 다른 위치에 웹 아카이브 형식으로 저장할 수 있습니다.

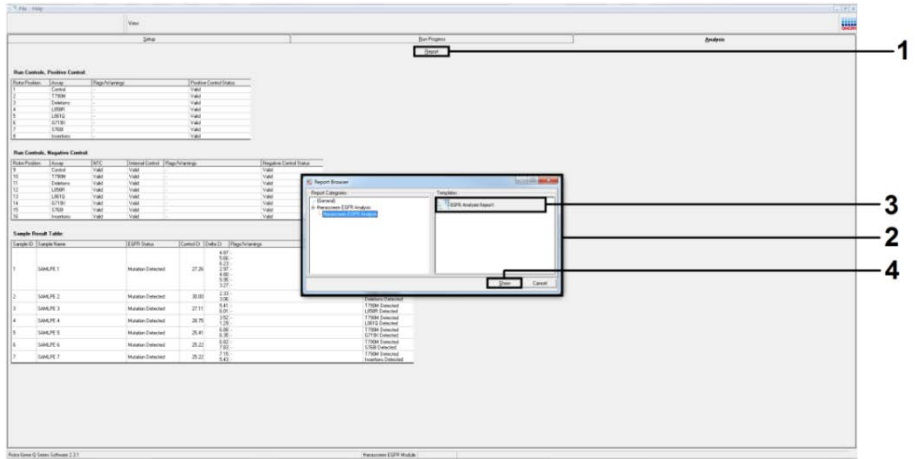


그림 20. "EGFR Analysis Report"(EGFR 분석 보고서) 선택. 1 = "Report"(보고서), 2 = "Report Browser"(보고서 브라우저) 창, 3 = "EGFR Analysis Report"(EGFR 분석 보고서) 선택, 4 = "Show"(표시).

결과

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 는 Rotor-Gene Q MDx 기기와 사용하기 위해 특별히 설계되었습니다. Rotor-Gene Q MDx 기기는 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 를 사용하여 다양한 사이클 매개변수 또는 "실행"을 위해 프로그래밍됩니다.

Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 는 2 개 주형, 즉 "*therascreen* EGFR Control Run Locked Template"(DNA 검체 평가용)과 "*therascreen* EGFR Locked Template"(EGFR 돌연변이 검출용)으로 구성되어 있습니다. 이 템플릿은 PCR 실행 매개변수를 포함하고 있으며 결과를 계산합니다.

대조 반응 혼합물을 이용한 DNA 검체 평가 및 돌연변이 반응 혼합물을 이용한 EGFR 돌연변이 검출에 동일한 실행 매개변수가 사용됩니다.

1. 95°C 에서 15 분간 유지하여 *Taq* DNA 중합효소를 활성화시킵니다.
2. 95°C 에서 30 초간 40 사이클의 PCR 을 실시하여 변성시키고 60°C 에서 1 분간 어닐링 및 신장시킵니다.

DNA 검체를 평가하기 위한 대조 반응을 사용하면 검체가 분석에 적합한 수준의 DNA 를 포함하고 있으며, 얻어진 C_T 값에 기초하여 돌연변이 분석 전에 어떤 검체가 희석이 필요한지를 결정하는 것이 가능합니다.

미리 결정된 분석 C_T 및 ΔC_T 값에 기초하여 Rotor-Gene Q 소프트웨어는 DNA 검체의 돌연변이 상태를 정성적으로 결정하고, 어떤 검체가 어떤 돌연변이를 포함하고 있는지 보고합니다.

실행이 완료되면 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 에 의해 분석 및 돌연변이 판정이 자동으로 수행됩니다. 다음의 정보는 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 가 분석 및 돌연변이 판정을 수행하는 방법을 설명합니다.

특정 반응물의 형광도가 임계값과 교차하는 PCR 사이클을 C_T 값으로 정의합니다. C_T 값은 특정 투입 DNA 의 양을 나타냅니다. 낮은 C_T 값은 높은 투입 DNA 수준을 나타내고, 높은 C_T 값은 낮은 투입 DNA 수준을 나타냅니다. C_T 값이 있는 반응은 양성 증폭으로 분류됩니다.

Rotor-Gene Q 소프트웨어는 기록된 2 개의 값 사이로 형광 신호를 보간합니다. 따라서 C_T 값은 0 ~ 40 범위 내의 어떤 수(정수로 한정되지 않음)도 될 수 있습니다.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 의 경우 녹색 채널에 대한 임계값은 0.075 상대 형광 단위로, 노란색 채널에 대한 임계값은 0.02 로 설정됩니다. 이러한 값은 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 에서 녹색 및 노란색 채널에 대하여 모두 구성됩니다. 임계값은 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 의 개발 중에 정의되었습니다.

허용 가능한 C_T 값이 충족되며, 반응이 정확하게 수행되었는지 확인하기 위해 실행 대조(양성 대조물질 및 NTC, 각 반응 혼합물의 내부 대조물질)가 평가됩니다.

검체 ΔC_T 값은 동일한 검체로부터의 돌연변이 분석항목 C_T 와 대조 분석항목 C_T 간의 차이로 계산됩니다. 계산된 ΔC_T 가 해당 분석항목의 컷오프 $\square C_T$ 범위 이내일 경우 검체가 돌연변이 양성으로 분류됩니다(표 12). $\square C_T$ 범위를 초과하면 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 가 검출할 수 있는 돌연변이 비율보다 적게 포함하고 있거나(분석 한계 초과) 검체가 돌연변이 음성이기 때문에 검체가 "No Mutation Detected"(돌연변이 무검출)로 보고됩니다. ΔC_T 범위 미만에서는 검체가 "Invalid"(무효)로 보고됩니다.

표 12. 돌연변이 분석항목 ΔC_T 컷오프 범위

돌연변이 분석항목	ΔC_T 컷오프 범위
T790M	-10.00 \geq ~ \leq 7.40
Del*	-10.00 \geq ~ \leq 8.00
L858R	-10.00 \geq ~ \leq 8.90
L861Q	-10.00 \geq ~ \leq 8.90
G719X	-10.00 \geq ~ \leq 8.90
S768I	-10.00 \geq ~ \leq 8.90
Ins†	-10.00 \geq ~ \leq 8.00

* 엑손 19 결실.

† 엑손 20 삽입.

돌연변이 반응에서 증폭이 없으면 "No Mutation Detected"(돌연변이 무검출)로 기록됩니다. Δ 배경 증폭에서 계산된 C_T 값은 ΔC_T 컷오프 범위의 상한보다 클 것으로 예상되며, 해당 검체는 "No Mutation Detected"(돌연변이 무검출)로 분류됩니다.

분석 결과는 "Mutation Detected"(돌연변이 검출), "No Mutation Detected"(돌연변이 무검출), "Invalid"(무효) 또는 실행 대조물질이 실패일 경우, "Run Control Failed"(실행 대조물질 실패)로 표시됩니다. 돌연변이 양성 검체의 경우, 구체적인 돌연변이가 보고됩니다. 표시될 수 있는 다른 가능한 결과는 이 사용 지침의 "프로토콜: DNA 검체 평가"(25 페이지) 및 "문제 해결 가이드"(75 페이지) 섹션에서 논의됩니다.

종양에 둘 이상의 돌연변이가 포함되어 있을 수 있습니다. 그러한 경우 둘 이상의 돌연변이가 보고됩니다.

정도 관리

QIAGEN의 ISO 인증 품질 관리 시스템에 따라 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit의 각 로트는 일관된 제품 품질을 보장하기 위해 사전 결정된 규격에 대해 검사됩니다.

이 절차의 한계

결과가 "No Mutation Detected"(돌연변이 무검출)로 보고되는 검체는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit로 검출되지 않는 EGFR 돌연변이를 포함하고 있을 수 있습니다.

돌연변이의 검출은 검체의 무결성과 시료에 존재하는 증폭 가능한 DNA의 양에 따라 달라집니다. 검체 내 DNA의 최초 평가에서 양이 돌연변이 분석에 충분하지 않거나 너무 높은 경우에는 절차를 반복해야 합니다.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit는 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR) 절차에 사용됩니다. 모든 PCR 절차에서와 마찬가지로 검체가 검사 환경의 외부 DNA 소스나 양성 대조물질의 DNA로 오염될 수 있습니다. 검체 및 반응 혼합물 시약이 오염되지 않도록 주의하십시오.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit는 포르말린 고정 파라핀 포매 NSCLC 조직과의 사용에 대해서만 검증되었습니다.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit는 오직 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit와의 사용에 대해서만 검증되었습니다.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit는 모든 반응 혼합물이 사용되는 경우의 사용에 대해서만 검증되었습니다.

오직 Rotor-Gene Q MDx 기기만 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 와 함께 사용하도록 검증되었습니다. 실시간 광학 검출 기능이 있는 다른 열 사이클러를 이 제품과 함께 사용해서는 안 됩니다.

빈번하지는 않지만 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에서 사용되는 프라이머나 프로브가 처리하는 EGFR 유전자의 유전체 DNA 부위 내 돌연변이가 EGFR 종양 유전자의 엑손 18, 19, 20 및 21 에 존재하는 돌연변이의 검출 실패를 초래할 수 있습니다("No Mutation Detected"(돌연변이 무검출) 결과).

EGFR 결실 반응 혼합물 내 프라이머는 다중 엑손 19 결실, 광범위한 뉴클레오티드 55174772 ~ 55174795(GRCh38 chr7)(23 bp 범위)를 표적으로 하도록 제작되었습니다.

엑손 19 결실 분석항목이 엑손 19 내 특정 결실 14 건을 검출하는 것으로 분석적으로 검증되었고 입증되기는 했지만(본 안내서의 표 1 및 표 3 참조), 추가적인 돌연변이(추가적인 엑손 19 결실, 엑손 19 삽입 및 L747P 돌연변이 *를 포함하되 이에 국한되지는 않음)가 결실 프라이머 세트에 의해 증폭될 가능성이 있습니다.

그러한 추가적인 돌연변이가 존재하는 경우, 주어진 환자 검체에 대해 "Deletions Detected"(결실 검출됨) 결과가 나오게 됩니다.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 는 정성적 검사법입니다. 이 검사법은 돌연변이 비율의 정량적 측정을 위한 것이 아닙니다.

분석 절차 중에 미생물 오염이 발생할 경우의 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 의 성능은 알려지지 않았습니다.

* *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 와 교차 반응하는 것으로 확인된 돌연변이가 "성능 특징" 섹션의 표 15(56 페이지)에 상세히 나와 있습니다.

성능 특징

분석 성능

QIAGEN *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit의 구체적인 성능 특징은 NSCLC 환자에서 수집한 FFPE 조직 시료 및 FFPE 사람 세포주(FFPE 세포주)를 사용한 연구로써 결정되었습니다. FFPE 세포주는 원하는 특정 EGFR 돌연변이를 보유하는 세포주를 생산하기 위해 폐 암종 세포주(A549)를 사용하여 생성했습니다. 양방향 생어 염기서열 분석(Sanger sequencing) 및 대량 병렬 염기서열 분석을 사용하여 다음의 연구들을 위한 시료를 선택하고 NSCLC FFPE 검체의 돌연변이 비율을 측정하였습니다. FFPE 임상 시료와 FFPE 세포주 간의 유사성은 2 개의 검체 유형 간 분석항목 증폭 효율(Amplification Efficiency, AE)을 비교하고 구체적인 돌연변이 분석항목의 검출 한계(Limit of Detection, LoD)를 평가함으로써 입증되었습니다. FFPE 세포주는 FFPE 임상 시료와 유사하게 절편화 및 처리되었습니다. DNA 는 사용 지침에 따라 추출 및 검사했습니다.

분석 민감도 – 공백 한계(Limit of Blank, LoB)

주형이 없는 상태에서 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit의 성능을 평가하고, 공시료 검체 또는 야생형 DNA 를 가진 검체가 낮은 농도의 돌연변이를 나타낼 수 있는 분석 신호를 생성하지 않음을 확인하기 위해 주형 없는 검체 및 NSCLC FFPE EGFR 야생형 세포주 DNA 를 평가했습니다. 이 결과를 통해 주형 없는 대조물질(No-Template Control, NTC) 검체 및 FFPE 야생형 검체로 양성 돌연변이 호출이 초래되지 않음이 입증되었습니다.

분석 민감도 – 검출 한계(Limit of Detection, LoD)

검출 한계란 각 돌연변이 양성 검체에서 총 증폭 가능한 DNA(투입 범위 이내)가 95%로 정확한 돌연변이 판정을 제공했을 때(C95) 야생형 DNA 를 배경으로 하여 검출될 수 있는 돌연변이 DNA 의 최소 비율입니다.

분석항목의 DNA 투입 작업 범위는 대조 C_T 의 사전 지정 범위 23.70 ~ 31.10 으로 정의되었습니다(또한 55 페이지의 “분석 민감도 – 대조 CT 범위” 참조).

검출 한계는 낮은 DNA 투입(대조 C_T 약 30.10) 수준으로 결정되었습니다.

NSCLC FFPE 임상 시료 또는 FFPE 세포주를 검출 한계 연구에 사용했습니다. 전체 DNA 를 높은 또는 낮은 DNA 투입 수준으로 일정하게 유지하는 가운데 다양한 비율의 돌연변이 DNA 를 포함하는 일련의 검체를 만들기 위해 FFPE 임상 시료 또는 FFPE 세포주에서 추출한 돌연변이 DNA 를 야생형 DNA 를 배경으로 하여 희석했습니다. 각 희석 수준(돌연변이 비율)에서 24 개의 복제물을 여러 개의 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로트를 사용하여 평가했습니다.

각각의 낮은 투입 및 높은 투입 DNA 데이터세트를 사용하여 각 돌연변이에 로지스틱 회귀 분석을 개별적으로 적용했습니다. 낮은 DNA 투입 수준 또는 높은 DNA 투입 수준에서 각 EGFR 돌연변이에 대한 검출 한계를 결정했습니다. 아래 표에 나와 있는 최종 LoD 표시값은 20 개(표 1 아래 주석[*] 참조)의 돌연변이 각각에서 95%의 정확한 판정 예측 확률을 제공한 돌연변이 비율을 나타냅니다.

EGFR 돌연변이에 대한 최종 검출 한계 표시값은 낮은 DNA 투입 수준에서 수행된 재현성 연구의 결과로 충분히 지지되었습니다(62 페이지의 “반복성 및 재현성” 참고). *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로 검출된 20 개(표 1 아래 주석[*] 참조) EGFR 돌연변이 중에서, GILOTRIF 의 안전성 및 유효성은 표 13 에 나열된 17 개(표 1 아래 주석[*] 참조) 돌연변이에 대해 검증되었으나, 표 14 에 나열된 3 개 돌연변이에 대해서는 검증되지 않았습니다. 보다 자세한 사항은 GILOTRIF 약물 허가사항을 참고하십시오.

표 13. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit의 민감도 – GILOTRIF의 안전성 및 유효성이 입증됨

엑손	돌연변이	Cosmic ID	염기 변화	검체 유형*	최종 LOD 표시값 (% 돌연변이) 낮은 DNA 투입
18	G719A	6239	2156G>C	CL	32.5 [†]
19	결실	6220	2238_2255del18	CL	2.70
		6223 [†]	2235_2249del15	CL+CS	6.40
		6225 [†]	2236_2250del15	CL+CS	6.50 [†]
		6254**	2239_2253del15	CS	10.20 [†]
		6255	2239_2256del18	CS	0.81 [†]
		12369**	2240_2254del15	CS	4.94
		12370	2240_2257del18	CS	8.10
		12382	2239_2248TTAAGA GAAG>C	CS	1.45 [†]
		12383	2239_2251>C	CS	4.58
		12384	2237_2255>T	CS	7.54 [†]
		12387	2239_2258>CA	CL	4.91
		12419	2238_2252>GCA	CL	16.87
		12422	2238_2248>GC	CL	3.24
		13551	2235_2252>AAT	CL	4.24
20	S768I	6241	2303G>T	CL	7.66
21	L858R	6224 [†]	2573T>G	CL+CS	5.94
21	L861Q	6213	2582T>A	CL	9.24 [†]

* CS는 FFPE 임상 시료를 나타내며, CL은 FFPE 세포주를 나타냅니다.

[†] LoD는 표 13 및 표 14의 이들 4개 EGFR 돌연변이에 대해 낮은 DNA 투입 수준에서의 FFPE 임상 시료 및 FFPE 세포주를 둘 다 사용하여 결정되었으며, 이는 보고된 EGFR 돌연변이의 68.71%를 차지했습니다.

[‡] 최종 LoD % 돌연변이 표시값은 재현성 연구 결과를 토대로 합니다.

** 표 1 아래 주석(**)을 참조하십시오.

분석 민감도 – 대조 C_T 범위

417 개의 절편화 FFPE 임상 시료 블록을 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로 분석하여 특성을 파악했습니다. 이들 중에서 400 개의 검체가 야생형이었으며, 17 개는 양방향 생어 염기서열 분석에서 돌연변이 양성으로 결정되었습니다. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 의 7 개 돌연변이 분석항목 중에서 5 개를 대표하는 EGFR 돌연변이가 이 연구에서 다루어졌습니다. 남은 2 개 돌연변이 분석항목의 검체(G719X 및 S768I)는 이용할 수 없었습니다. 대조물질 분석항목 C_T 값 데이터는 정규 분포되지 않았습니다. 따라서, 비모수 방법이 사용되었습니다. 각 경계에서 사용된 비모수 단측 허용 구간은 90% 포함 확률로 선택되었습니다(99% 신뢰 구간). 선택된 경계를 사용자 요구 사항 및 위험 관리에 따른 고려 이후 추가적으로 반올림했습니다. EGFR 키트에서 선택된 최종 대조 반응 C_T 작업 범위는 23.70 ~ 31.10 C_T 로 결정되었습니다.

분석 민감도 – 상단 ΔC_T 컷오프

위험 기반 접근법은 분석 컷오프 값을 설정할 때 위양성률과 관련하여 선택되었으며, 추정 LoB 값은 컷오프 값 개발 중에 하나의 요소로 사용되었습니다. 선택된 상단 컷오프 값에 관해서는 47 페이지의 “결과” 섹션을 참고하십시오.

표 14. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit의 민감도 – GILOTRIF의 안전성 및 유효성이 입증되지 않음

엑손	돌연변이	Cosmic ID	염기 변화	검체 유형*	최종 LoD 표시값(% 돌연변이)	
					낮은 DNA 투입	높은 DNA 투입
20	T790M	6240 [†]	2369C>T	CS	8.16	6.32
20	삽입	12377	2319_2320insCAC	CL	3.72 [‡]	해당 없음
20	삽입	12378	2310_2311insGGT	CL	19.96 [‡]	해당 없음

* CS는 FFPE 임상 시료를 나타내며, CL은 FFPE 세포주를 나타냅니다.

[†] LoD는 표 13 및 표 14의 이들 4개 EGFR 돌연변이에 대해 낮은 DNA 투입 수준에서의 FFPE 임상 시료 및 FFPE 세포주를 둘 다 사용하여 결정되었으며, 이는 보고된 EGFR 돌연변이의 68.71%를 차지했습니다.

[‡] 최종 LoD % 돌연변이 표시값은 재현성 연구 결과를 토대로 합니다.

N/A: 해당 없음.

분석 민감도 – DNA 투입이 ΔC_T 에 미치는 영향

DNA 투입 수준은 한 개 검체 내 증폭 가능한 EGFR DNA의 총량으로 정의되며, 대조 반응에서 얻어진 C_T 값으로 결정됩니다. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit의 성능이 총 DNA 투입(분석항목의 대조 C_T) 범위에서 일관성이 있음을 입증하기 위해, 7개 전체 EGFR 돌연변이 분석항목을 포함해 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit로 검출된 돌연변이를 검사했습니다. FFPE 세포주에서 추출된 DNA를 사용하여 대조 반응 작동 범위의 하단으로 DNA 풀을 준비했습니다. 목표 C_T 값은 약 24.70의 각 돌연변이 C_T 에 대해 희석 1(100% 또는 희석하지 않음)로 설정되었습니다. 이러한 DNA 풀은 작동 범위 전반 및 그 외 영역에서 6개 동일한 간격의 희석 레벨을 생성하기 위해 사용되었으며, 약 1/3로 희석되었습니다(즉, 각 후속 희석 레벨은 약 3배 적은 DNA를 포함했음). 최종 희석값이 작업 범위의 최저 DNA 투입 수준을 벗어났습니다(C_T 가 대략 32 ~ 33 C_T). 전반적으로, 각기 다른 총 DNA 투입량에서 측정된 ΔC_T 값은 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 작동 범위 전반에 걸쳐 일관적이었으며 사전 지정 수용 기준을 통과했습니다.

선형성 - DNA 투입의 함수로서의 증폭 효율

therascreen EGFR RGQ PCR Kit의 작동 범위에 걸쳐 각 돌연변이 분석항목에서 PCR의 선형성 및 증폭 효율을 대조 반응과 비교하여 조사했습니다. 증폭 효율은 7개 전체 EGFR 돌연변이 분석항목 및 대조 반응을 포함한 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit로 검출된 EGFR 돌연변이에 대해 분석항목 C_T 를 반응 변수로 하고 \log_2 상대적 DNA 투입 수준을 설명 변수로 하는 선형 회귀를 사용하여 계산되었습니다. EGFR 돌연변이는 대조 반응 작업 범위의 하단(약 25 C_T , 높은 DNA 투입)을 목표로 하여 검사했으며, ATE 완충액으로 연속적으로 희석했고, 투입 DNA 및 돌연변이 DNA를 똑같이 효과적으로 희석했습니다. 최종 희석값이 작업 범위의 최저 DNA 투입 수준을 벗어났습니다(C_T 가 대략 32 ~ 33 C_T). 돌연변이 분석항목에 비해 대조 분석항목의 증폭 효율은 ΔC_T (그리고 따라서 돌연변이 판정)가 분석항목의 작동 범위에서 일관성을 보인다는 것을 나타냅니다.

선형성 - % 돌연변이 함수로서의 증폭 효율

이 연구의 목적은 DNA의 총량이 일정하게 유지되지만 돌연변이 DNA의 비율이 다를 때 분석항목의 작동 범위에 걸쳐 각 돌연변이 분석항목의 선형성을 평가하는 것이었습니다. 희석 시리즈 전반에 걸쳐 동등한 대조 C_T 를 유지하기 위해, EGFR 돌연변이 양성 FFPE 세포주 DNA를 야생형 FFPE 세포주 DNA로 희석했습니다. 높은 DNA 투입(대조 C_T 약 26) 및 낮은 DNA 투입(대조 C_T 약 29 ~ 30) 모두에서 희석 시리즈를 검사했습니다. 각 EGFR 돌연변이에 대해, 각 희석 수준에서 6개 복제물에 충분한 DNA 풀을 준비했습니다. 각 희석 수준에서 각 돌연변이에 대해 C_T 및 ΔC_T 데이터를 계산했습니다. 대략 26 C_T 또는 29 ~ 30 C_T 에 해당하는 대조 C_T 값은 각 돌연변이의 희석 시리즈에 걸쳐서 일관성을 보였습니다. 두 DNA 투입 수준 간의 평균 ΔC_T 차이를 평가하기 위해 선형 회귀 모델을 적용하였습니다. ΔC_T 값의 플롯은 동일한 플롯에서 높은 DNA 투입 수준 및 낮은 DNA 투입 수준 모두에 대한 데이터를 보여주도록 생성되었습니다. 기울기 및 95% 신뢰 구간(95% CI)을 보고했습니다. 이 연구 결과는 일정한 DNA 총량의 배경에서 돌연변이의 희석이 위의 선형성 연구(선형성 - DNA 투입의 함수로서의 증폭 효율)에서 측정된 돌연변이 증폭 효율과 대체로 유사한($\pm 10\%$) 증폭 효율을 초래함을 보여주었습니다. 10%에 가깝거나 그보다 큰 차이가 있는 증폭 효율이 Del6220, Del6223, G719A, Ins12377 및 L861Q 돌연변이에 대해 확인되었습니다.

분석 특이도 – 프라이머 및 프로브 특이성

프라이머와 프로브는 알려진 모든 EGFR 다형성을 피하기 위해 고안되었습니다. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에 사용된 프라이머가 인간 EGFR 시퀀스만을 증폭하고 다른 종 또는 비-EGFR 인간 시퀀스(예: 위유전자)는 증폭하지 않음을 확인하기 위해 기본 국소 정렬 검색 도구(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)를 사용한 특이도 분석이 수행되었습니다. 비-EGFR 유전자로부터 비특이적 증폭은 예상되지 않습니다. 또한, 비특이적 증폭을 야기할 수도 있는 예기치 못한 결합이 없음을 보장하기 위해 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에 사용된 올리고뉴클레오티드(프라이머, 프로브, 및 주형) 쌍의 정렬이 수행되었습니다. 다양한 시약들 간에 유의미한 상동성은 없었습니다.

분석 특이도 – 기타 EGFR 돌연변이에 대한 교차 반응

기타 EGFR 돌연변이에 대한 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 의 교차 반응이 제 3 상 임상시험 시료, FFPE 세포주, EGFR 플라스미드 및 긴 올리고뉴클레오티드에서의 조사에서 관찰되었습니다. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 는 표 15 에 나와 있는 특정 검체 유형 내 다음의 EGFR 돌연변이에 대해 "Mutation Detected"(돌연변이 검출) 결과를 제공했습니다. 이런 돌연변이 검출에서의 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 의 분석 성능은 그 용도에 대하여 평가되지 않았습니다.

표 15. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 와 교차 반응하는 것으로 확인된 돌연변이

돌연변이	COSMIC ID*	검체 유형
엑손 19 – 돌연변이 분석항목 Del		
2237_2251del15	12678	FFPE 임상시험 시료 [†]
2239_2247del9	6218	FFPE 세포주
2236_2253del18	12728	FFPE 세포주
2237_2254del18	12367	FFPE 세포주
2240_2251del12	6210	FFPE 세포주
L747P [‡]	24267	인실리코
엑손 18 – 돌연변이 분석항목 G719X		
G719S	6252	FFPE 임상시험 시료 [§]
G719C	6253	플라스미드
엑손 20 – 돌연변이 분석항목 Ins		
삽입	12376	FFPE 세포주
엑손 21 - 돌연변이 분석항목 L858R		
L858Q [¶]	29578	긴 올리고뉴클레오티드

* Catalogue of Somatic Mutations in Cancer(www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)에서 가져온 COSMIC ID

[†] 엑손 19 결실 12678 이 1200.32 임상시험의 비무작위배정 연구 모집단에서 관찰되었습니다.

[‡] 엑손 19 L747P 돌연변이는 엑손 19 결실 반응 혼합물과 교차 반응하는 것으로 관찰되었습니다(12). L747P 는 TKI 치료에 대한 저항성을 가져올 수 있는 희귀한 획득 돌연변이입니다(13).

[§] 엑손 18 G719S 돌연변이가 1200.32 임상시험의 무작위 배정 연구 모집단에서 관찰되었습니다.

[¶] 희귀한 돌연변이 L858Q 가 인실리코 분석 및 긴 뉴클레오티드의 분석에서 L858R 반응 혼합물과 교차 반응하는 것으로 관찰되었습니다.

분석 특이도 – 교차 반응/배타성

비특이적 증폭/교차 반응: 야생형 EGFR DNA

특이적 돌연변이의 증폭을 위해 만들어진 반응 혼합물에 의한 야생형 EGFR DNA의 비특이적 증폭의 양을 확인하기 위해 증폭 가능한 DNA 투입 수준이 대략 최고 농도(대조 C_T 약 25)인 60 개의 야생형 FFPE 세포주 DNA 복제물을 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit를 사용하여 평가했습니다. 결과를 통해 최저 ΔC_T 값이 확립된 컷오프를 초과한 것으로 입증되었으며, 비특이적 증폭은 관찰되지 않은 것으로 나타났습니다.

비특이적 증폭/배타성: 돌연변이 양성 EGFR DNA

therascreen EGFR RGQ PCR Kit의 배타성은 돌연변이 음성과 돌연변이 양성 상태를 구별하기 위한 것입니다. 높은 농도의 투입 DNA(대조 C_T 약 25)를 포함하고 있는 돌연변이 검체를 FFPE 세포주로부터 DNA 검체를 준비하여 모든 반응 혼합물에서 검사했습니다. 각 돌연변이 검체의 60 개 복제물을 평가했습니다. 최소 ΔC_T 값이 비일치 반응 혼합물과 DNA 검체 모두에 대한 각각의 분석 컷오프 값보다 모두 더 높았으므로, 결과를 통해 돌연변이 반응물 간 교차 반응성으로 인한 영향은 없음이 입증되었습니다.

간섭 – 회사 조직의 영향

EGFR 돌연변이 및 야생형 검체 모두에서 회사 조직 함량이 최대 50%인 NSCLC FFPE 임상 시료는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit를 사용한 판정 결과에 간섭을 일으키지 않는 것으로 나타났습니다.

간섭 – 외인성 물질

DNA 정제 과정에 존재하는 잠재적 간섭 물질을 돌연변이 및 야생형 검체에 있는 파라핀 왁스, 크실렌, 에탄올 및 단백질분해효소 K의 10 배 농도에서 검사했습니다. 검사 결과는 이 물질들이 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit의 판정 결과에 영향을 미치지 않음을 나타냈습니다.

로트 간 재현성

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 검사 시스템은 다음 2 개의 개별적인 키트를 활용합니다: QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit - DNA 를 NSCLC FFPE 조직 시료로부터 분리하는 용도, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit - 분리된 DNA 를 EGFR 돌연변이 상태를 위해 증폭 및 검출하는 용도. 로트 간 재현성 및 상호교환성은 3 개 로트의 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 와 3 개 로트의 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 를 사용하여 입증했습니다. EGFR 돌연변이 분석항목의 전체 로트에 대한 정확한 판정의 전체 비율은 97.8%(317/324)였으며 야생형 검체에 대한 해당 비율은 100%(379/379)였습니다.

시료 취급 - 재현성

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 검사 시스템 과정의 일부로 검체 처리 변동성을 평가하기 위해, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 의 재현성을 3 개의 FFPE 시료 블록에서 얻은 절편인 엑손 19 결실돌연변이(2235-2249 del15), 엑손 21 L858R 돌연변이(2573T>G) 및 한 개의 야생형으로 검사했습니다. 각 시료에서 정제는 각 검사 기관에서 2 회 반복하여 수행되었으며, 3 개 검사 기관에서 6 일에 걸쳐 비연속적으로 3 일간 검사하여 시료당 총 18 개의 데이터 값을 산출했습니다. 각 검사 기관에서 2 명의 작업자가 한 개 로트의 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit(검사 기관당 한 개 로트, 총 3 개 로트)를 동일한 로트의 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 시약과 조합 사용하여 검사를 수행했습니다. 검사 기관 1 에서는 한 개의 Rotor-Gene Q MDx 기기를 사용하여 검사를 수행했으며, 검사 기관 2 와 3 에서는 2 개의 Rotor-Gene Q MDx 기기가 사용되었습니다. 모든 돌연변이 및 야생형 시료 결과는 유효했고, 예상된 판정 결과(정확한 판정 = 100%, 각 시료에서 18/18)가 산출됨으로써 DNA 분리의 분석 전 단계에서 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 의 재현성 및 반복성이 뒷받침되었습니다.

반복성 및 재현성

therascreen EGFR RGQ PCR Kit의 반복성 및 재현성은 NSCLC FFPE 임상 시료 또는 FFPE 세포주에서 추출한 DNA(*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit의 7개 돌연변이 분석항목 모두를 대표함)를 검사하여 조사했습니다. 이 연구에는 NSCLC 야생형 FFPE 임상 시료 또한 포함되었습니다. 3개 검사 기관(영국, 독일, 미국)에서 재현성 검사를 수행하였습니다. 각 검사 기관에서 검체를 2회 반복으로 검사했으며(실행 내 반복성 평가), 2개의 다른 Rotor-Gene Q MDx 기기에서 2명의 작업자가 2개 로트의 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit(3개 검사 기관에서 3개 로트)를 사용하여 총 16일간 수행했습니다. 각 개별 돌연변이의 재현성은 각 기관에서 비연속적 검사일에 걸쳐 수행되었습니다.

2세트의 검체를 다양한 돌연변이 수준으로 준비했으며, 2세트 모두 낮은 DNA 투입 수준을 포함했습니다. 이 때 대조 C_T 값은 대략 30.10이 목표였습니다. 야생형 검체에 대한 84개의 유효 검사에서 "Mutation Detected"(돌연변이 검출) 결과는 없었으며, 100%의 정확한 판정을 얻었습니다. 모든 기관에서 1 ~ 3x LoD로 검사한 돌연변이 검체에 대한 정확한 판정의 비율 범위는 96 ~ 100%였습니다.

실행 내, 실행 간, 일간, 로트 간, 기관 간 변동성에 대한 표준 편차 및 95% 신뢰구간을 추정하기 위해 분산 성분 분석을 사용했습니다. 모든 분산 성분에 걸쳐서 검사한 모든 EGFR 돌연변이에서 총 변동 계수(Coefficient of Variation, CV)는 $\leq 14.11\%$ 였습니다. 모든 돌연변이 패널 구성요소에 걸쳐 로트 간, 일 간, 실행 간 %CV는 $\leq 8.33\%$ 였습니다. 실행 내 %CV(반복성)는 5.99% ~ 13.49%였습니다.

표 16. 분석항목 재현성 – 검사한 EGFR 돌연변이에 대한 정확한 판정 비율

역손	돌연변이	COSMIC ID	검사한 돌연변이 비율(%)	최종 LoD 표시값		유효 결과의 수, N	정확한 판정, N	정확한 판정 비율(%)	% 정확한 판정 편측 95% CI 하한
				대비 검사한 돌연변이 비율(%)					
19	결실	6220*	5.69%	2 ~ 3x LoD		96	96	100	96.93
19	결실	6223	15.99%	2 ~ 3x LoD		95	95	100	96.90
19	결실	6225	7.06%	1 ~ 2x LoD		95	91	95.79	90.62
19	결실	6254**	10.02%	LoD		92	92	100	96.80
19	결실	6255	0.81%	LoD		96	94	97.92	93.59
19	결실	12369**	9.29%	1 ~ 2x LoD		95	95	100	96.90
19	결실	12370	8.06%	LoD		63†	62	98.41	92.69
19	결실	12382	1.45%	LoD		95	92	96.84	92.04
19	결실	12383	8.43%	1 ~ 2x LoD		93	93	100	96.83
19	결실	12384	7.54%	LoD		92	92	100	96.80
19	결실	12387*	9.53%	1 ~ 2x LoD		95	95	100	96.90
19	결실	12419*	28.75%	1 ~ 2x LoD		83	83	100	96.46
19	결실	12422	7.85%	2 ~ 3x LoD		94	94	100	96.86
19	결실	13551*	11.12%	2 ~ 3x LoD		95	95	100	96.90
21	L858R	6224	5.77%	LoD		92	92	100	96.80
20	T790M†	6240	34.02%	1 ~ 2x LoD		94	94	100	96.86
21	L861Q ^Δ	6213	9.24%	LoD		84	83	98.81	94.48
18	G719A ^Δ	6239	32.50%	LoD		78	77	98.72	94.06
20	S768I ^Δ	6241*	11.57%	1 ~ 2x LoD		82	82	100	96.41
20	삽입†	12377*	10.45%	2 ~ 3x LoD		93	93	100	96.83
20	삽입†	12378*	19.96%	LoD		92	92	100	96.8
-	야생형	-	해당 없음 [§]	-		84	84	100	96.5

* FFPE 세포주를 사용해 이러한 돌연변이에 대한 재현성을 수행했습니다.

† 한 기관에서 LoD 에서 결실 12370 에 대한 대조 C_T 가 작동 범위에서 벗어났으며 어떠한 데이터도 생성할 수 없었습니다(n = 32). 이 검사 기관에서 이 돌연변이에 관해 누락된 데이터는 검체의 가용성 부족으로 인해 다시 검사하지 않았습니다.

* GILOTRIF(아파티닙)와 IRESSA(게피티닙)의 안전성 및 유효성은 이러한 EGFR 돌연변이가 있는 환자를 대상으로 확립되지 않았습니다. 보다 자세한 사항은 GILOTRIF 또는 IRESSA 약물 허가사항을 참고하십시오.

△ IRESSA(게피티닙)와 VIZIMPRO(다코미티닙)의 안전성 및 유효성은 이러한 EGFR 돌연변이가 있는 환자를 대상으로 확립되지 않았습니다. 보다 자세한 사항은 IRESSA 약물 라벨 허가사항을 참고하십시오.

§ NA: 해당되지 않음.

** 표 1 아래 주석(**)을 참조하십시오.

임상적 성능

제 3 상 검체를 사용한 표준 방법과의 상관관계

therascreen EGFR RGQ PCR Kit의 정확성을 양방향 생어 염기서열 분석과 비교 검증하기 위해 3 상 연구인 1200.32 임상시험의 임상시험 시료를 사용한 정확성 연구가 수행되었습니다. 이 연구는 3 상 연구인 1200.32 임상시험의 환자들로부터 획득한 FFPE 임상 시료를 사용한 눈가림 연구였습니다. 이 후향적 검사에서 이용할 수 있는 시료가 있는 환자들의 베이스라인 임상적 및 인구 통계적 특성은 재검사에 시료를 이용할 수 없었던 다른 적합 환자들과 유사했습니다. 사용자에게 눈가림되었던 엑손 18, 19, 20, 21에 대한 양방향 생어 염기서열 분석 결과가 있는 360개 시료에서 추출한 DNA 검체에 대해 EGFR 검사를 수행했습니다.

전체 돌연변이 상태에 대한 두 가지 방법 간 일치율을 토대로 OPA, PPA, NPA를 평가하기 위해 생어 및 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 유효 결과가 모두 있는 검체를 분석했습니다. 이 백분율 그리고 상응하는 양측 95% 신뢰 구간(Confidence Interval, CI)이 표 17에 요약되어 있습니다.

표 17. 제 3 상 시료에서의 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 대 생어 일치율

일치도 척도	일치율(%) (N)	95% CI
양성 일치율(Positive Percent Agreement, PPA)	99.4%(157/158)	96.5, 100.0
음성 일치율(Negative Percent Agreement, NPA)	86.6%(175/202)	81.2, 91.0
전체 일치율(Overall Percent Agreement, OPA)	92.2%(332/360)	89.0, 94.8

28 개의 전체 돌연변이 상태 불일치 결과 중에서 1 개(3.6%)의 검체는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에서 야생형(돌연변이 무검출) 결과를 보였고 생어 염기서열 분석에서는 돌연변이 검출 결과를 보였으며, 27 개(96.4%)의 검체는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 에서 돌연변이 검출을 나타냈고 생어 염기서열 분석에서는 야생형 결과를 나타냈습니다.

EGFR Del19 및 L858R 돌연변이에 대해 NSCLC 양성에서의 임상적 혜택을 뒷받침하는 임상 결과 데이터(GILOTRIF)

1200.32 임상시험은 EGFR 돌연변이가 있는 비소세포 폐암(Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) 중 IIIb 기 또는 IV 기의 선암종 환자를 위한 일차 치료로서의 아파티닙과 화학요법에 대한 국제적, 다기관, 공개, 무작위 배정, 3 상 시험이었습니다(ClinicalTrials.gov 번호 NCT00949650, 'LUX-Lung 3'이라고도 함). 임상시험 분석(Clinical Trial Assay, CTA)을 사용하여 NSCLC 환자의 EGFR 상태에 대한 돌연변이 상태를 검사하여 환자의 1200.32 임상시험 등록 적합성을 결정했습니다. 1200.32 임상시험을 위해 스크리닝 검사를 받은 환자들에서 수집한 조직 시료에 대한 후향적 검사를 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 를 사용하여 수행하였습니다. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 와 1200.32 임상시험을 위한 환자를 선택하기 위해 사용된 CTA 의 일치도를 평가하기 위한 가교 연구가 수행되었습니다. 이 시험의 목적은 중앙에 EGFR 돌연변이(엑손 19 결실, 엑손 21 L858R 치환, "기타" EGFR 돌연변이)가 있는 NSCLC 환자를 위한 일차 치료로서의 아파티닙 단일 요법의 유효성 및 안전성을 화학요법과 비교하는 것이었습니다. CTA 검사 결과에 기초하여 345 명의 환자가 무작위 배정군(아파티닙 230 명, 화학요법 115 명)에 포함되었습니다. 일차 유효성 결과는 독립검토위원회(Independent Review Committee, IRC)가 평가한 무진행 생존 기간(Progression-Free Survival, PFS)이었습니다. 345 명의 무작위 배정 환자 가운데, 264 명의 환자(아파티닙에 무작위 배정된 환자 178 명 및 화학요법에 무작위 배정된 환자 86 명)에게서 얻은 중앙 검체를 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 를 사용하여 후향적으로 검사했습니다. 화학요법에 무작위 배정된 환자들에 비해 아파티닙에 무작위 배정된 환자들은 전체 CTA+ 모집단과 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ 모집단 모두에서 IRC 가 결정된 바와 같이 통계적으로 유의미한 PFS 개선이 입증되었습니다. 전반적 유효성 결과가 표 18 과 그림 21 에 요약되어 있습니다.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ 하위군(n = 264)에 대한 분석에서는 아파티닙으로 치료받은 환자들이 PFS 기간의 유의미한 증가를 보였으며(PFS 중앙값 11.2 개월 vs. 6.9 개월), 질병 진행 또는 사망을 경험할 가능성 또한 화학요법으로 치료 받은 환자들에 비해 더 적은 것(HR = 0.49, 95% CI[0.35; 0.69], p<0.0001)으로 확인되었습니다. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit로 검사한 하위군 환자에서 관찰된 임상적 혜택은 전체 연구 모집단(n = 345)에서 관찰된 것과 유사했습니다.

표 18. 1200.32 임상시험 모집단에서 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit로 검사받은 환자들의 임상적 혜택

매개변수	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ 모집단, n = 264		CTA+ 모집단, n = 345	
	화학요법 n = 86	아파티닙 n = 178	화학요법 n = 115	아파티닙 n = 230
무진행 생존 기간(Progression-Free Survival, PFS)				
사망 또는 진행 수, N(%)	53 (61.6%)	120 (67.4%)	69 (60.0%)	152 (66.1%)
PFS 중앙값(개월)	6.9	11.2	6.9	11.1
PFS 중앙값 95% CI	[5.3, 8.2]	[9.7, 13.7]	[5.4, 8.2]	[9.6, 13.6]
위험비	0.49		0.58	
위험비 95% CI	[0.35, 0.69]		[0.43, 0.78]	
P값(층화 로그 순위 검정)*	<0.0001		<0.001	

CI: 신뢰 구간, CTA: 임상시험 분석.

* EGFR 돌연변이 상태 및 인종으로 층화됨.

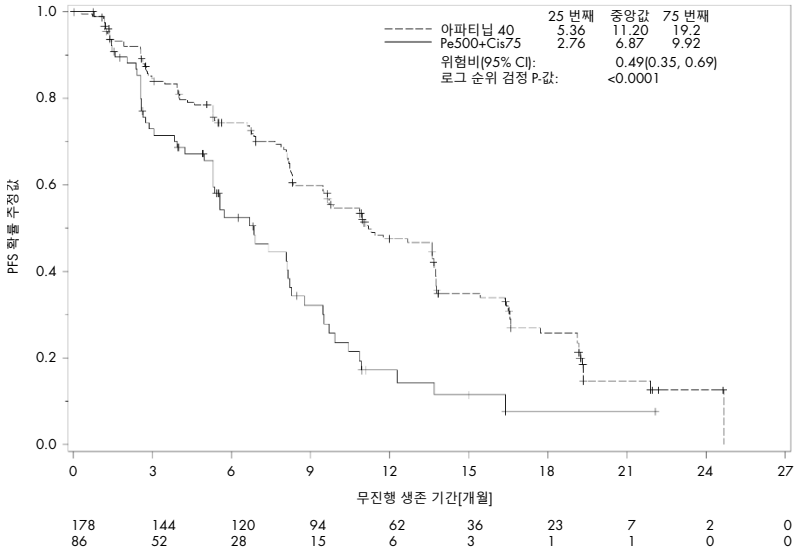


그림 21. 치료군별 독립 검토에 의한 PFS의 카플란 마이어 곡선(*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ 모집단).

1200.32 임상시험에서 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 가 환자 선택에 사용되지 않았다는 점을 감안하여, CTA 에서 음성으로 검사됨으로써 1200.32 임상시험에 참여하지 않았으나 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로는 양성으로 검사될 수도 있었던 환자들(즉, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-)을 고려하기 위한 추가적인 유효성 분석이 실시되었습니다. 가설적 시나리오에서, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-인 치료군(아파티닙)의 환자는 베이스라인(제 1 일)에서 PFS 사례에 배정되고, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA- 인 대조군(화학요법)의 환자는 제 11 개월에 PFS 에 대해 중도절단되었습니다(제 335 일, 아파티닙에 대한 PFS 중앙값). 이 가설적 시나리오의 결과, PFS 기간 중앙값(95% CI)은 아파티닙 군이 11.0(8.3, 13.6)이었고 화학요법 군은 6.9(5.3, 8.8)였으며, 위험비(95% CI)는 0.56(0.39, 0.79), p-값은 0.0009 였습니다. 모든 가설적 분석의 결과들은 대체로 일차 유효성 분석의 결과와 유사했습니다.

EGFR L861Q, G719X 및 S768I 돌연변이에 대해 NSCLC 양성에서의 임상적 혜택을 뒷받침하는 임상 결과 데이터(GILOTTRIF)

EGFR 돌연변이 L861Q, G719X 또는 S768I 이 있는 NSCLC 환자에서 GILOTTRIF의 유효성이 3개 임상시험 중 하나에 참여한 환자 풀에 대한 분석에서 평가되었습니다. 이 평가의 목적은 종양에 아파티닙 치료에서 혜택을 누릴 수 있는 EGFR 돌연변이가 있는 환자를 파악하는 것이었습니다.

다음 표는 L861, G719X 또는 S768I, EGFR 돌연변이를 단독으로, 또는 다른 이차 돌연변이와 함께 보유하고 있는 환자에서의 GILOTTRIF에 대한 반응 지속 기간을 보여줍니다. 치료를 받은 32명의 환자 가운데, 21명이 아파티닙에 반응하는 것으로 입증되었습니다. 반응 지속 기간은 특정 돌연변이 또는 돌연변이 조합에 따라 2.8 ~ 37.3개월이었습니다.

표 19. 1200.22, 1200.32 및 1200.34 임상시험에 참여한 EGFR 돌연변이 L861Q, G719X 및/또는 S768I가 있는 NSCLC 환자들에 대해 IRC가 평가한 반응

EGFR 돌연변이	GILOTTRIF로 치료받은 환자 수(N = 32)	확인된 반응 수(N = 21)	반응 지속 기간(개월)(N = 21)
S768I	1	1	37.3
S768I 및 G719X	5	4	4.1, 13.2, 15.2, 29.5+
S768I 및 L858R	2	1	34.5+
G719X	8	6	5.7+, 8.1, 9.6, 23.5+, 25.2, 31.8+
G719X 및 L861Q	3	2	2.8+, 6.8
L861Q	12	7	2.8, 4.0, 4.1, 8.3+, 12.9, 15.2, 20.6
L861Q 및 Del19	1	0	해당 없음

+: 평가 시점에 진행 중인 반응.

NA: 해당 없음.

결론적으로, EGFR 돌연변이 L861Q, G719X 또는 S768I를 보유한 NSCLC 환자는 아파티닙으로부터 임상적 혜택을 얻는 것으로 입증되었습니다. 미충족된 높은 의료적 요구 사항이 있는 환자들에서 아파티닙은 적절한 치료 옵션입니다.

임상 결과 데이터 – IRESSA

IRESSA 추적관찰 측정(IRESSA Follow-up Measure, IFUM) 임상시험은 IIIA/B/IV, EGFR 돌연변이 양성 국소 진행성 또는 전이성 NSCLC 이 있는 백인 환자들에서 일차 치료 게피티닙의 유효성 및 안전성/내약성을 평가하는 제 4 상, 공개, 단일 환자군 연구(NCT01203917)였습니다. IFUM 연구는 전향적으로 선택된 EGFR 돌연변이 백인 NSCLC 환자들에서 RECIST 기준에 따라 객관적 반응을 평가하기 위하여 설계되었습니다.

임상시험 분석(Clinical Trial Assay, CTA)을 통해 전향적으로 결정된 바와 같이 적합한 환자는 EGFR 엑손 19, L858R, L861Q 또는 G719X 치환 돌연변이에 결실이 있고 중앙 시료에 T790M 또는 S768I 돌연변이 또는 엑손 20 삽입이 없어야 했습니다. IFUM 임상시험을 위해 스크리닝 검사를 받은 환자들에서 수집한 조직 시료에 대한 후향적 검사가 동반 진단적 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 를 사용하여 수행되었습니다. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 와 IFUM 임상시험을 위한 환자를 선택하기 위해 사용된 CTA 의 일치도를 평가하기 위한 가교 연구가 수행되었습니다. EGFR 엑손 19 결실과 L858R 돌연변이 검출에 대한 두 분석 간 전체 일치율은 98.2%(n = 700/713, 95% CI: 96.9%, 99.0%)였으며 PPA 는 88.2%(n = 90/102, 95%CI: 80.4%, 93.8%)였고, NPA 는 99.8%(n = 610/611; 95% CI: 99.1%, 100.0%)였습니다.

CTA 검사 결과는 859 명의 스크리닝 검사 환자들에서 얻었으며, 이 중 106 명이 게피티닙을 사용한 치료에 적합했습니다. CTA 결과가 있는 859 개의 검체 가운데, CTA 와 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 모두에서 EGFR 돌연변이 양성이었던 87 개의 검체를 포함해 765 개의 검체를 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로 후향적 검사를 하는 데 이용할 수 있었습니다.

주요 유효성 결과는 눈가림 상태의 독립 중앙 심의위원회(Blinded Independent Central Review, BICR) 및 연구자들이 평가한 객관적 반응률(Objective Response Rate, ORR)이었습니다. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로 검사한 하위군 환자들에서 관찰된 임상적 혜택은 전체 연구 모집단에서 관찰된 것과 유사했습니다.

전반적 유효성 결과가 표 20 에 요약되어 있습니다.

표 20. IFUM 임상시험 모집단에서 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로 검사받은 환자들의 임상적 혜택

매개변수	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+ 모집단, n = 87	CTA+ 모집단, n = 106
BICR 에서 평가한 객관적 반응률(Objective Response Rate, ORR)		
반응 수(N)	42	53
ORR(%) [95% CI]	48.3 [38.1 ~ 58.6]	50.0 [40.6 ~ 59.4]
반응 지속 기간 중앙값(개월)	6.9 [5.6 ~ 11.4]	6.0 [5.6 ~ 11.1]
연구자들이 평가한 객관적 반응률(Objective Response Rate, ORR)		
반응 수(N)	62	74
ORR(%) [95% CI]	71.3 [61.0 ~ 79.7]	69.8 [60.5 ~ 77.7]
반응 지속 기간 중앙값(개월)	8.3 [7.2 ~ 11.3]	8.3 [7.6 ~ 11.3]

BICR: 눈가림 상태의 독립 중앙 심의위원회, CI: 신뢰 구간, CTA: 임상시험 분석.

참고: 키트+는 엑손 19 결실/L8585R/L861Q/G719X 에서 양성인 결과입니다.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 를 IFUM 임상시험을 위한 환자 선정에 사용하지 않은 점을 감안하여, 검사 결과 CTA 로는 음성이었지만 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로는 양성일 수 있었으므로 임상시험에 포함되지 않았던 환자(즉, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-) 및 임상시험에 등록되었지만 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로 얻은 재검사 결과가 유효하지 않았던 환자(즉, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 알려지지 않음/CTA+)를 고려하기 위한 추가 유효성 분석을 수행했습니다. 모든 가설적 분석의 결과들은 대체로 일차 유효성 분석의 결과와 유사했습니다.

임상 결과 데이터 – VIZIMPRO

VIZIMPRO 연구 A7471050 은 IIIB/IV 기 또는 재발성 NSCLC 로 새로 진단받은 환자에서 다코미티닙 일차 치료의 유효성 및 안전성을 결정하는 다국가, 다기관, 무작위 배정, 공개, 제 3 상 임상시험이었습니다. 모든 환자는 최소 하나 이상의 EGFR 활성화 돌연변이, 엑손 19 또는 엑손 21 의 L858R 치환 돌연변이 결실에 대해 검사 결과가 양성인 종양을 가져야 했습니다.

엑손 20 T790M 돌연변이와 함께 EGFR 활성화 돌연변이가 존재하거나 둘 중 하나만 존재하는 환자는 이 연구에서 허용되었습니다. 모든 증양은 조직병리학 및/또는 세포병리학적으로 선암종 또는 병리학적으로 인정되는 그 변이체와 일관성이 있었습니다.

이 제 3 상 연구에서, 452 명의 환자가 공개 다코미티닙 또는 공개 게피티닙의 두 치료군 중 하나에 무작위 배정(1:1)되었으며 두 치료군 모두 질병 진행, 새로운 항암 요법 시작, 견딜 수 없는 수준의 독성 확인, 동의 철회, 사망 또는 임상시험계획서 준수에 따른 시험자의 결정이 있기 전까지 계속하여 매일 경구 투여를 받았습니다. 무작위 배정은 인종(환자가 명시한 바에 따라 일본인 대 중국인 대 동아시아인 대 비동아시아인)과 EGFR 돌연변이 상태(엑손 19 결실돌연변이 대 엑손 21 의 L858R 치환 돌연변이)라는 두 가지 요인으로 층화되었습니다.

가고 연구에서는 스크리닝 검사를 받고 연구 A7471050 에 무작위 배정된 환자들에게서 수집한 검체를 재검사했습니다. 재검사는 연구 A7471050 의 일부로 수집한 환자 시료에 대해 CDx 를 사용하여 돌연변이 상태를 결정했으며, 이는 새로운 데이터를 일치율에 대한 CTA 를 사용하여 생성된 돌연변이 상태와 비교하고 CDx 의 임상적 유효성을 결정하기 위한 것이었습니다.

452 명의 무작위 배정 환자 가운데, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 로 후향적으로 재검사하여 288 건의 사례(치료 의향[Intent-to-Treat, ITT] 모집단의 64%, 다코미티닙군 환자 142 명 및 게피티닙군 환자 146 명 포함)가 CDx +ve 인 것으로 결정되었습니다. 288 명의 환자 하위 집단 분석에서 게피티닙군 환자보다 다코미티닙군 환자가 질병 진행 또는 사망에 대해 47.9% 더 낮은 위험을 갖는 것으로 입증되었습니다(HR=0.52, 95 % CI [0.39, 0.70], $p<0.0001$).

일차 분석에서, CDx 를 사용하고 불일치 및 결측 결과를 고려하여 다코미티닙 치료 혜택을 평가하였을 때 HR 은 0.54, 95% CI(0.42, 0.68), $p<0.0001$ 였습니다. 이는 연구 A7471050 의 ITT 모집단에 대한 결과와 유사했습니다[HR 0.59, 95% CI(0.47, 0.74)]. PFS 에 대한 불일치 및 결측 EGFR Kit 데이터의 영향을 평가한 추가 민감도 분석은 일관성 있는 결과를 나타냈습니다. 민감도 분석을 통해 해당 결과는 모집단 유형별 및 최악 사례 결측 시나리오에 대한 조정에 강건하였던 것으로 입증되었습니다.

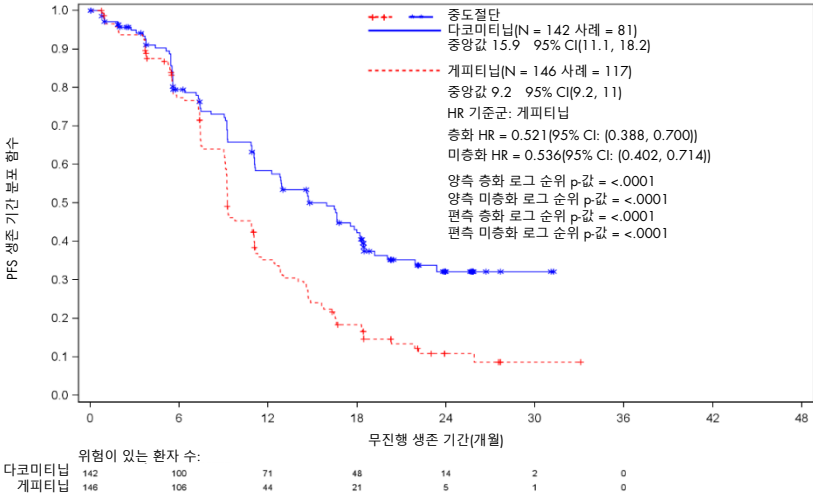


그림 22: IRC 심의에 따른 PFS의 카플란 마이어 플롯: ITT 모집단 내 CDx +ve 환자.

CTA와 CDx 가운데 EGFR 활성화 돌연변이 양성 환자 선정과 관련한 일치율을 평가하기 위해, 각 양측 클로퍼 피어슨 정확 95% 신뢰 구간과 함께 CDx를 참조로 사용한 PPA, NPA 및 OPA는 PPA는 99.7%, 95% CI(98.3%, 100.0%)였고 NPA는 84.2%, 95% CI(74.4%, 91.3%)였습니다. OPA는 96.5%, 95% CI(94.2%, 98.1%)였습니다. 이는 CDx를 기준으로 사용한 CTA의 PPA에 대한 높은 수준의 일치율(>99%)을 나타냅니다.

CTA를 기준으로 사용하여 CDx 평가 가능한 하위 집단을 분석한 경우, PPA는 96.1%, 95% CI(93.4%, 97.9%), NPA는 98.6%, 95% CI(92.3%, 100.0%)였으며 OPA는 96.5%, 95% CI(94.2%, 98.1%)였습니다. 따라서, CTA를 기준으로 사용한 경우, PPA 및 NPA 모두에 대해 CDx와의 일치율은 >95%였습니다.

실험실 CTA 결과 및 CDx 결과 간에는 14개의 불일치 결과가 있었습니다. 13명의 환자가 CTA 양성이었으며 연구에 무작위 배정되었고, 13명의 환자 모두 CDx 음성이었습니다. 1명의 환자가 CTA 음성이었고 이 환자는 CDx 양성이었습니다.

참고 문헌

1. Pao, W., Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* 23, 2556.
2. Johnson, B.E., Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65, 7525.
3. Inoue, A., Suzuki, T., Fukuhara, T., Maemondo, M., Kimura, Y. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J. Clin. Oncol.* 24, 3340.
4. Asahina, H., et al. (2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2-6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* 24(18S)(Suppl), Abstr 13014.
5. Paz-Ares, L. et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2-6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* 24(18S)(Suppl), Abstr 7020.
6. Kobayashi, K., et al. (2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. 44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago 31 May-3 June 2008. *J. Clin. Oncol.* 26(15S)(Suppl), Abstr 8070.
7. Sequist, L.V., et al. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* 15, 2442.

8. Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). *J. Clin. Oncol.* 26 (May 20 suppl), abstr 8038.
9. Jaene, P.A., Johnson, B.E. (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutation on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. 3rd Cambridge Conference on Novel Agents in the Treatment of Lung Cancer: Advances in EGFR-Targeted Agents, Cambridge, 23–24 Sep 2005. *Clin. Cancer Res.* 12 (Suppl.14), 4416.
10. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17, 804.
11. Thelwell, N. et al. (2000) Mode of Action and Application of Scorpion Primers to Mutation Detection. *Nucleic Acids Res.* 28, 3752.
12. Walsh, K., et al. (2014) A cautionary lesson on the use of targeted methods for EGFR mutation analysis: a case report. *J. Clin. Pathol.* 67, 734.
13. Huang, J., Wang, Y., Zhai, Y., and Wang, J. (2018) Non-small cell lung cancer harboring a rare EGFR L747P mutation showing intrinsic resistance to both gefitinib and osimertinib (AZD9291): A case report. *Thorac. Cancer.* 9, 745.

문제 해결 가이드

이 문제 해결 가이드는 발생 가능한 문제를 해결하는 데 도움을 줄 수 있습니다. 더 자세한 정보는 또한 당사 기술 지원 센터의 자주 묻는 질문(Frequently Asked Questions, FAQ) 페이지를 참조하십시오: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN 기술 서비스 소속 과학자들은 본 안내서의 정보 및/또는 프로토콜 또는 검체 및 분석 기술에 대해 가질 수 있는 어떠한 질문이든 기꺼이 답변해 드립니다(연락처 정보는 www.qiagen.com 을 방문해 주십시오).

의견 및 제안

무효 결과

- | | |
|---|---|
| a) 한 개 이상의 키트 구성품의 보관 조건이 "시약 보관 및 취급"에 제공된 지침에 부합하지 않았습니다. | 시약의 보관 조건과 유통 기한(라벨 참조)을 확인하고, 필요하면 새 키트를 사용합니다. |
| b) <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit 유효 기간이 만료되었습니다. | 시약의 보관 조건과 유통 기한(키트 라벨 참조)을 확인하고, 필요하면 새로운 <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit 를 사용합니다. |

NTC 검체가 FAM 채널에서 양성 결과를 나타냅니다

- | | |
|-------------------|--|
| PCR 준비 중 오염이 발생했음 | 새 시약으로 PCR 을 반복합니다.
가능하다면, 검사할 검체를 추가한 직후에 PCR 튜브를 닫습니다.
반드시 작업 공간과 기기의 오염을 정기적으로 제거합니다. |
|-------------------|--|

Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 플래그

표 21 에는 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 에 의해 생성될 수 있는 플래그, 플래그의 의미 및 취해야 할 조치 목록이 나와 있습니다.

플래그 이름은 키트의 해당 구성품, 해당 검체 또는 대조 및 실패 모드에 대한 정보를 제공하도록 지어졌습니다.

예:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = 양성 대조물질(PC), 대조물질 분석항목(CTRL_ASSAY)이 실패했습니다(FAIL)
- NTC_INT_CTRL_FAIL = 주형 없는 대조물질(NTC), 내부 대조물질(INT_CTRL)이 실패했습니다(FAIL)
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = 검체(SAMPLE), 대조물질 분석항목(CTRL)의 농도가 높습니다(HIGH_CONC)

표 21. Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 플래그

플래그	의미	취해야 할 조치
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR 실행 무효 — FAM C _T 가 대조 반응에서 양성 대조물질의 범위를 벗어났습니다.	전체 PCR 실행을 반복합니다.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PCR 실행 무효 — FAM C _T 가 하나 이상의 돌연변이 대조 반응의 범위를 벗어났습니다.	전체 PCR 실행을 반복합니다.
PC_CTRL_INVALID_DATA	PCR 실행 무효 — 양성 대조물질(대조 반응 혼합물)의 형광도 데이터를 해석할 수 없습니다	전체 PCR 실행을 반복합니다.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR 실행 무효 — 양성 대조물질(돌연변이 반응 혼합물)의 형광도 데이터를 해석할 수 없습니다.	혼합 단계에 각별히 주의를 기울이면서 전체 PCR 실행을 반복합니다.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR 실행 무효 — 내부 대조물질이 음성 대조물질의 범위를 초과합니다.	전체 PCR 실행을 반복합니다.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR 실행 무효 — 내부 대조물질이 음성 대조물질의 범위 미만입니다.	전체 PCR 실행을 반복합니다.
NTC_INVALID_CT	PCR 실행 무효 — 음성 대조물질에 대해 FAM 이 무효입니다(한도보다 작음).	혼합 단계에 각별히 주의를 기울이면서 전체 PCR 실행을 반복합니다.
NTC_INVALID_DATA	PCR 실행 무효 — 음성 대조물질의 형광도 데이터를 해석할 수 없습니다.	혼합 단계에 각별히 주의를 기울이면서 전체 PCR 실행을 반복합니다.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	검체 무효 — 검체 대조물질의 형광도 데이터를 해석할 수 없습니다.	혼합 단계에 각별히 주의를 기울이면서 새 PCR 실행을 설정하여 해당 검체를 반복합니다.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	검체 무효 — 검체 대조물질에서 FAM C _T 가 너무 낮습니다.	검체를 희석하여 대조 C _T 값을 높입니다. 이 희석은 키트에 공급된 물을 사용하여 1:1로 희석했을 때 C _T 값이 1.0 증가할 것이라는 가정을 바탕으로 계산해야 합니다. 검체가 희석되면 새로운 EGFR 돌연변이 검출 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 또는 검체가 DNA 검체 평가 실행 이후 희석되었다면 희석된 검체를 사용하여 곧바로 EGFR 돌연변이 검출 실행을 진행합니다.

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

플래그	의미	취해야 할 조치
SAMPLE_CTRL_FAIL	검체 무효 — 검체 대조 반응의 FAM C _T 가 너무 높습니다.	새 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다.
<p>DNA의 양이 여전히 불충분하면 가능할 경우, 2개의 FFPE 조직 절편을 추가로 추출합니다. 새 PCR 실행을 설정하여 이 정제를 검사합니다. 검체가 무효이면 두 번째 정제에서 PCR 실행을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 그 검체는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.</p>		
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	내부 대조물질(HEX)의 C _T 가 너무 높음(또는 C _T 가 없음), FAM 채널 돌연변이 음성.	임상적으로 관련 있는 돌연변이 반응 혼합물에서 돌연변이가 검출되고(또는 검출되지 않고) SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 플래그 또한 생성된 검체의 경우, 결과를 보고하며 더 이상의 검사가 필요하지 않습니다.
<p>검체에 무효 상태가 부여되면 1:1 희석이 대조 반응의 C_T를 1.0 증가시킬 것으로 가정하여, 남은 검체를 키트와 함께 제공된 물로 희석하여 최종 용량이 >40 µl(예: 40 µl DNA 및 DIL로 표시되어 있는 튜브에 든 40 µl 물)이 되도록 합니다.</p> <p>새 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 2회 더 FFPE 절편으로부터 검체를 추출합니다.</p> <p>새 PCR 실행을 설정하여 이 새로운 정제를 검사합니다. 두 번째 정제가 무효이면 위에 설명한 대로 희석합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 그 검체는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.</p>		

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

플래그	의미	취해야 할 조치
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	한 개 검체에서 한 개 이상의 돌연변이가 양성이고 그와 동시에 그 동일한 검체에서 한 개 이상의 돌연변이가 무효입니다.	임상적으로 관련 있는 돌연변이 반응 혼합물에서 INVALID(무효) 결과가 나오고 SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 플래그가 생성된 검체의 경우, 특정 무효 플래그 조치에 따라 모든 반응 혼합물로 검체를 재검사합니다.
<p>해당 검체에서 SAMPLE_INT_CTRL_FAIL 플래그가 또 다른 플래그와 함께 생성된 경우에는 SAMPLE_INT_CTRL_FAIL 플래그의 검체 희석 조치를 따라야 합니다. 새 PCR 실행을 설정하여 검체를 다시 검사합니다.</p> <p>반복 PCR 실행에서의 임상적으로 관련 있는 돌연변이 반응 혼합물에서 INVALID(무효) 결과가 나오고 SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 플래그가 생성된 검체의 경우, 2 회 더 FFPE 절편으로부터 검체를 추출합니다. 모든 반응 혼합물로 새 PCR 실행을 설정하여 이 정제를 검사합니다.</p> <p>임상적으로 관련 있는 돌연변이 반응 혼합물에서 검체가 또 다시 무효 결과를 생성하면, 특정 무효 플래그 조치에 따라 모든 반응 혼합물로 검체를 재검사합니다.</p> <p>영향을 받은 검체에 대해 다른 플래그와 함께 SAMPLE_INT_CTRL_FAIL 이 생성되면, SAMPLE_INT_CTRL_FAIL 플래그의 검체를 희석하는 조치가 뒤따라야 합니다. 새 PCR 실행을 설정하여 이 검체를 다시 검사합니다.</p> <p>SAMPLE_POS_AND_INVALID 플래그가 이 반복에서도 관찰되면 그 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여됩니다.</p>		
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	돌연변이 튜브 무효 — 검체(내부 대조물질)에서 C _t HEX 가 너무 낮습니다	임상적으로 관련 있는 돌연변이 반응 혼합물에서 돌연변이가 검출되고(또는 검출되지 않고) SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 플래그 또한 생성된 검체의 경우, 결과를 보고하며 더 이상의 검사가 필요하지 않습니다.
<p>검체에 무효 상태가 부여될 경우: 새 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면, 가능할 경우 2 개의 FFPE 조직 절편으로부터 검체를 추가로 추출합니다. 새 PCR 실행을 설정하여 이 정제를 검사합니다. 무효이면 두 번째 정제에서 PCR 실행을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 그 검체는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.</p>		
SAMPLE_INVALID_DATA	돌연변이 튜브 무효 — 내부 대조물질의 형광도 데이터를 해석할 수 없습니다.	임상적으로 관련 있는 돌연변이 반응 혼합물에서 돌연변이가 검출되고(또는 검출되지 않고) SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID 플래그 또한 생성된 검체의 경우, 결과를 보고하며 더 이상의 검사가 필요하지 않습니다.
<p>검체에 무효 상태가 부여될 경우: 새 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면, 가능할 경우 2 개의 FFPE 조직 절편으로부터 검체를 추가로 추출합니다. 새 PCR 실행을 설정하여 이 정제를 검사합니다. 무효이면 두 번째 정제에서 PCR 실행을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 그 검체는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.</p>		
MUTATION_EARLY_CT	검체 무효 — 델타 C _t 가 너무 낮거나 C _t 가 컷오프 범위 미만입니다	검체 혼합에 각별히 주의를 기울이면서 새 PCR 실행을 설정하여 해당 검체를 반복합니다.

기호

포장물 및 라벨에 다음과 같은 기호가 있을 수 있습니다.

기호

기호 정의



<N>회 반응에 충분한 시약 포함



사용 기한



체외 진단용 의료 기기



카탈로그 번호



로트 번호



재료 번호



구성품



내용물



수



국제 거래 단위 번호

Rn

R 은 사용 설명서(안내서)의 개정 버전을 나타내며, n 은 개정 번호입니다.



온도 제한



제조업체

기호

기호 정의



사용 설명서 참조



직사광선을 피할 것

Rx ONLY

처방용 용도에 한함

연락처 정보

기술 지원 및 자세한 정보는 www.qiagen.com/support 에서 기술 지원 센터를 참조하여 00800-22-44-6000 으로 전화하거나 QIAGEN 기술 서비스 부서 또는 현지 유통업체에 연락하십시오(뒷표지를 참조하거나 www.qiagen.com 를 방문하시기 바랍니다).

부록: Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 의 설치

therascreen EGFR RGQ PCR Kit 는 72-well rotor 를 사용하는 Rotor-Gene Q MDx 기기와 함께 사용하도록 만들어졌습니다. Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 제품 웹사이트(www.qiagen.com)에서 다운로드할 수 있습니다. 분석 패키지를 다운로드하려면 Product Resources(제품 리소스) > Supplementary Protocols(보조 프로토콜)를 방문하십시오.

이 패키지에는 "*therascreen* EGFR Control Run Locked Template" 및 "*therascreen* EGFR Locked Template"이 포함되어 있습니다.

인쇄 가능한 문서 템플릿과 PCR 배치도는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 제품 웹사이트(www.qiagen.com)에서 다운로드할 수 있습니다. 문서를 다운로드하고 인쇄하려면 Product Resources(제품 리소스) > Instrument Technical Documents(기기 기술 문서)를 방문하십시오. 문서 템플릿과 PCR 배치도는 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 를 사용한 FFPE 검체 준비, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 를 사용한 DNA 검체 평가, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 를 사용한 EGFR 돌연변이 검출을 기록하는 데 사용할 수 있습니다.

참고: Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 는 Rotor-Gene Q 소프트웨어 버전 2.3.5 과만 사용해야 합니다. Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 를 설치하기 전에 Rotor-Gene Q 소프트웨어의 정확한 버전이 설치되어 있는지 확인하십시오.

절차

1. www.qiagen.com 에서에서 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 를 다운로드한 후 무바이러스 USB 저장 장치로 전송합니다.

참고: 분석 패키지는 *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit 제품 웹페이지에서 찾아볼 수 있습니다. 분석 패키지를 다운로드하려면 Product Resources(제품 리소스) > Supplementary Protocols(보조 프로토콜)를 방문하십시오.

2. USB 저장 장치를 Rotor-Gene Q MDx 기기에 연결된 노트북에 삽입합니다.
3. Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 파일을 찾습니다.
4. Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package 를 오른쪽 클릭한 후 Extract all(압축 풀기)를 선택하여 파일의 압축을 풉니다.
5. *therascreen_EGFR_Assay_Package_3.1.2.exe* 를 두 번 클릭하여 설치를 시작합니다.
설정 마법사가 나타납니다.
6. Next(다음)를 클릭하여 계속합니다(그림 23).

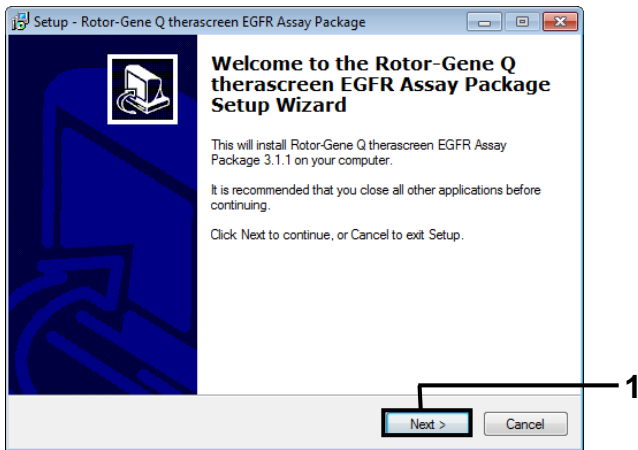


그림 23. "Setup"(설정) 대화상자. 1 = "Next"(다음).

7. "License Agreement"(라이선스 계약) 대화상자의 라이선스 계약을 읽고 I accept the agreement(계약에 동의함) 문장에 체크 표시합니다. Next(다음)를 클릭하여 계속합니다(그림 24).

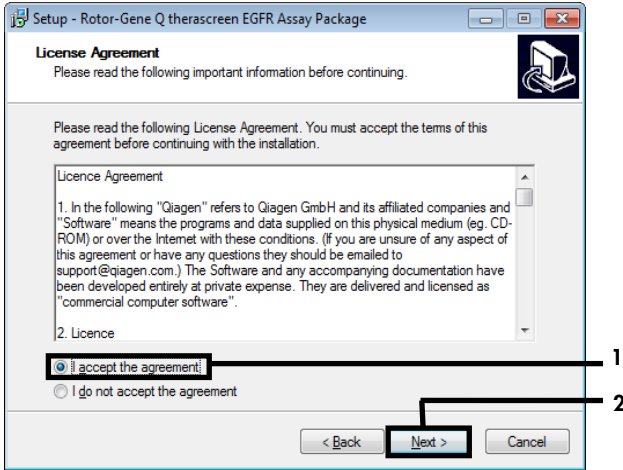


그림 24. "License Agreement"(라이선스 계약) 대화상자. 1 = "I accept the agreement"(계약에 동의함) 문구, 2 = "Next"(다음).

템플릿 설정이 자동으로 시작되며, 최종 "Setup"(설정) 대화상자가 표시됩니다.

8. Finish(마침)를 클릭하여 설정 마법사를 끝냅니다(그림 25).

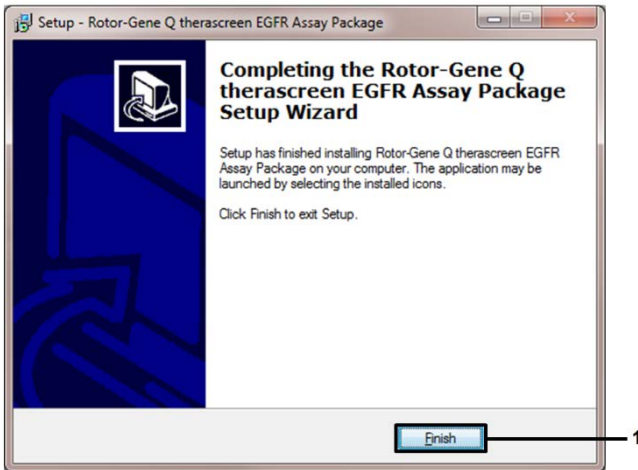


그림 25. 설정 마법사 완료. 1 = "Finish"(마침).

-
9. 컴퓨터를 다시 시작합니다. "*therascreen* EGFR Control Run Locked Template" 및 "*therascreen* EGFR Locked Template"의 바로 가기가 자동으로 생성되어 바탕 화면에 표시됩니다.

주문 정보

제품	내용물	카탈로그 번호
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	24 개 반응물의 경우: 대조물질 분석항목 1 개, 돌연변이 분석항목 7 개, 양성 대조물질, 물, <i>Taq</i> DNA 중합효소	870121
Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit 및 QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 기기와 함께 사용하는 소프트웨어 프로토콜 패키지	다운로드
Rotor-Gene Q MDx and accessories		
Rotor-Gene Q MDx Platform (US)	Real-time PCR 사이클러, 노트북 컴퓨터, 소프트웨어, 액세서리, 1 년 보증(부품 및 인건비)	9002035
Rotor-Gene Q MDx System (US)	Real-time PCR 사이클러, 노트북 컴퓨터, 소프트웨어, 액세서리, 1 년 보증(부품 및 인건비), 설치 및 교육	9002036
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	72 x 0.1 ml 튜브에서 단일 채널 피펫을 사용한 수동 반응 설정을 위한 알루미늄 블록	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	1000 개 반응액을 위한 250 개 스트립(4 개 튜브) 및 캡	981103

관련 제품

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue
Kit (50)

50 회 DNA 준비용: QIAamp
MinElute® 컬럼, 단백분해효소 K,
완충액, Collection Tubes (2 ml)

60404

최신 라이선스 정보 및 제품별 면책 사항은 각 QIAGEN 키트 안내서 또는 사용 설명서를 참조하십시오. QIAGEN 키트 안내서와 사용 설명서는 www.qiagen.com 에서 확인하거나 QIAGEN 기술 서비스 또는 현지 유통업체에 요청할 수 있습니다.

문서 개정 이력

날짜	변경 사항
R8, 2019 년 10 월	절차 한계 문구 및 분석 특이도 섹션에 엑손 19 결실 분석항목 및 <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit 와 교차 반응하는 것으로 밝혀진 추가적인 돌연변이에 대한 정보를 업데이트함.
R9, 2019 년 11 월	제조외리자 변경(표지)
R10, 2020 년 6 월	EGFR 분석 패키지 버전 번호를 3.1.1 에서 3.1.2 로 업데이트함 RGQ 소프트웨어 버전에 관한 문구를 2.3 에서 2.3.5 이상으로 업데이트함 델타 C _T (ΔC_T)에 대한 새로운 컷오프 범위를 이행하기 위해 표 12 를 업데이트함 표 13 을 분석 민감도 - 상단 컷오프 값 섹션을 분석 민감도 - 검출 한계 섹션으로 옮김 섹션 시작 전 중용 사항에 혼합의 중요성에 관한 정보를 포함하도록 모든 프로토콜 절이 업데이트됨. 프로토콜의 모든 혼합 단계에서 혼합 세부사항이 강조 표시됨. 필요한 경우 혼합 단계가 추가됨 MUTATION_CT_EARLY 플래그를 표 20 에 추가함 <i>therascreen</i> EGFR Assay Package CD 에 관한 모든 언급을 삭제하고 다운로드 정보로 교체함

이 페이지는 의도적으로 공백입니다.

이 페이지는 의도적으로 공백입니다.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit의 제한적 라이선스 계약

본 제품을 사용하는 것은 제품의 구매자 또는 사용자가 다음의 조건에 동의함을 나타냅니다.

1. 이 제품은 오직 제품과 함께 제공된 프로토콜과 이 안내서에 따라 사용해야 하며, 패널에 포함된 구성품만 함께 사용할 수 있습니다. QIAGEN은 제품과 함께 제공된 프로토콜, 이 안내서 및 www.qiagen.com에서 제공하는 추가 프로토콜에 기술된 바와 같은 경우를 제외하고, 그의 지적 재산권 하에서 이 패널에 포함된 구성품을 이 패널에 포함되지 않은 구성품과 함께 사용하거나 통합할 수 있는 라이선스를 허용하지 않습니다. QIAGEN 사용자를 위해 QIAGEN 사용자가 이 추가 프로토콜의 일부를 제공하였습니다. QIAGEN에서 이 프로토콜을 철저히 검사하거나 최적화하지 않았습니다. QIAGEN은 이를 보장하지 않으며 제 3자의 권한을 침해하지 않는다는 것도 보증하지 않습니다.
2. 명시적으로 설명한 라이선스 이외에 QIAGEN은 이 패널 및/또는 이 패널의 사용이 제 3자의 권리를 침해하지 않음을 보증하지 않습니다.
3. 이 패널 및 구성품은 일회 사용에 대해 라이선스가 부여되며 재사용, 재정비 또는 재판매할 수 없습니다.
4. QIAGEN은 명시적으로 설명한 경우 이외에 명시 또는 암시한 다른 라이선스는 명확히 부인합니다.
5. 패널의 구매자 및 사용자는 위에서 금지한 행위로 이어지거나 그러한 행위를 조장할 수 있는 조치를 취하거나 다른 사람이 그렇게 하도록 허용하지 않는다는 데 동의합니다. QIAGEN은 어떤 법정에서든 이 제한적 라이선스 계약의 금지를 주장할 수 있으며, 패널 및/또는 그것의 구성품과 관련된 이 제한적 라이선스 계약 또는 그것의 지적재산권을 주장하기 위한 어떤 소송에서 변호사 비용을 포함하여 그의 모든 조사 및 법정 비용을 회수할 수 있습니다.

라이선스 조항의 업데이트에 대해서는 www.qiagen.com을 참조하십시오.

상표: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*®(QIAGEN 그룹), FAM™, HEX™(Thermo Fisher Scientific Inc.), GILOTRIF®(Boehringer Ingelheim), IRESSA®(AstraZeneca Group), VIZIMPRO®(Pfizer). 이 문서에 사용된 등록된 이름, 상표 등은 별도로 표시되지 않은 경우에도 법적 보호를 받는 것으로 간주됩니다.

1121933 HB-1605-010 06-2020 © 2020 QIAGEN, 모든 권리 보유.

