



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX

基于数字 PCR 的表皮生长因子受体（EGFR）基因突变丰度参考测量程序
第 2 部分：外显子 21 点突变 L858R

**Reference measurement procedure for EGFR mutation fraction abundance by
digital PCR - Part 2: Exon 21 single nucleotide variant L858R**

（草案）

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 通用要求	1
5 试剂和材料	2
5.1 预混液及缓冲液	2
20x 的数字 PCR 预混液, 缓冲液包括 TE 及 TE _{0.1}	2
5.2 引物及探针。	2
5.3 耗材	2
所需耗材包括: 数字 PCR 生成油、读取油、数字 PCR 卡槽、数字 PCR 芯片、96 孔板及其封膜、离心管及吸头。	2
5.4 阳性对照	2
为 EGFR 19del 标准物质 (NIM-RM4044-2) 或合成质粒。	2
5.5 阴性对照	2
为提取自正常人细胞的基因组 DNA。	2
6 仪器设备	2
6.1 数字 PCR 仪	2
6.2 离心机	2
6.3 封膜仪	2
6.4 移液器	2
量程范围包括: 1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 20 μ L, 10 μ L。	2
6.5 天平	2
7 操作步骤	2
7.1 仪器校准	2
7.2 开机准备	2
7.3 实验部分	3
8 数据处理	4
8.1 实验成立条件	4
8.2 结果计算	4
参 考 文 献	5

前 言

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

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC 136）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

基于数字 PCR 的表皮生长因子受体（EGFR）基因突变丰度参考测量程序 第 2 部分：外显子 21 点突变 L858R

1 范围

本文件描述了基于数字PCR方法的表皮生长因子受体（EGFR）外显子21点突变L858R丰度参考测量程序的试剂和材料、仪器设备、测量过程及数据处理。

本文件适用于实验室建立和运行经测序确认包含EGFR L858R点突变的基因组及质粒DNA样本的基因突变丰度参考测量程序。

本文件不适用于EGFR未知基因突变的定量检测。

2 规范性引用文件

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

ISO 15189 医学实验室 质量和能力的要求（Medical laboratories — Requirements for quality and competence）

注：GB/T 22576.1-2018 医学实验室 质量和能力的要求 第1部分：通用要求（ISO 15189:2012，IDT）

ISO 15190 医学实验室 安全要求（Medical laboratories — Requirements for safety）

注：GB 19781-2005 医学实验室 安全要求（ISO 15190:2003，IDT）

JJF 2055-2023 数字聚合酶链式反应分析仪校准规范

3 术语和定义

ISO 15189 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1 外显子 21 点突变（L858R）

在本文件中指表皮生长因子受体（EGFR）基因组序列中第21号外显子发生的点突变，对应基因组坐标为：GRCh38, Chr7:55191822，对应的氨基酸编码序列点突变位点为NM_005228.5: c.2573T>G（氨基酸突变为L858R）。

4 通用要求

4.1 实验室要求

实验室设置及管理应符合ISO 15189及ISO 15190。

4.2 样本要求

提取自生物样本的基因组DNA应经过纯度检测确保不含抑制剂。

质粒DNA及高分子量基因组DNA在反应前需经过线性化和酶切处理。

5 试剂和材料

5.1 预混液及缓冲液

20x 的数字 PCR 预混液，缓冲液包括 TE 及 TE_{0.1}

5.2 引物及探针。

将引物及探针溶解于TE_{0.1}缓冲液中，储存浓度100 uM，储存温度-20℃。

引物及探针序列为：

EGFR-21-L858R-1F: 5'-GCAGCATGTCAAGATCACAGATT-3'

EGFR-21-L858R-1R: 5'-CCTCCTTCTGCATGGTATTCTTTCT-3'

EGFR-21-L858R-1WT: 5'-VIC-AGTTTGGCCAGCCCAA-MGB-3'

EGFR-21-L858R-1MU: 5'-FAM-AGTTTGGCCCGCCCAA-MGB-3'

5.3 耗材

所需耗材包括：数字 PCR 生成油、读取油、数字 PCR 卡槽、数字 PCR 芯片、96 孔板及其封膜、离心管及吸头。

5.4 阳性对照

为 EGFR 19del 标准物质（NIM-RM4044-2）或合成质粒。

5.5 阴性对照

为提取自正常人细胞的基因组 DNA。

6 仪器设备

6.1 数字 PCR 仪

6.2 离心机

6.3 封膜仪

6.4 移液器

量程范围包括：1000 μL, 200 μL, 100 μL, 20 μL, 10 μL。

6.5 天平

精度0.01mg。

7 操作步骤

7.1 仪器校准

参照JJF 2055-2023，每年对数字PCR仪进行一次校准。

7.2 开机准备

提前30分钟将数字PCR仪开机。按照仪器说明书检查仪器设备是否处于正常状态。

7.3 实验部分

7.3.1 DNA 模板质量检查

通过电泳等方法检测DNA模板的条带完整性及弥散程度。通过紫外分光光度法检测模板的浓度及纯度。DNA模板的紫外吸收应满足OD260/OD280为1.7-2.0，OD260/OD230大于 2.0。

7.3.2 PCR 反应

7.3.2.1 未知样品稀释

若未知样品浓度高于15 ng/μL，应将样品稀释至大约5000 cp/μL。稀释液为TE_{0.1}。

7.3.2.2 PCR 反应体系配制

按照表1 配制PCR反应体系。

表1. 数字PCR反应体系配制

试剂	母液浓度	工作浓度	体积
数字PCR反应液	2×	1×	10
引物及探针混合液（包括野生及突变探针）	20×	1×	1
样本/阳性对照/阴性对照	-	小于30 ng/μL	5
TE _{0.1}	-	-	4

7.3.2.3 微滴生成

按照仪器说明书进行微滴生成。

7.3.2.4 PCR 扩增

按照表2进行PCR扩增反应。

表2. PCR扩增反应程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	95	10 min	1
2	95	15 s	40
3	58	60 s	

4	98	10 min	1
5	4	15 min	-
注：根据数字PCR液要求调整第4步的温度。			

7.3.2.5 微滴读取

取出96孔板放入微滴读取仪中，设置读取程序进行微滴读取。

8 数据处理

8.1 实验成立条件

阴性对照无扩增；阳性对照有扩增。

8.2 结果计算

导出结果文件，根据公式（1）计算突变丰度。

$$VAF = \frac{C_{MU}}{C_{MU} + C_{WT}} \times 100\% \quad (1)$$

——VAF为突变丰度，%；

—— C_{MU} 为突变基因浓度，copy/ μ L；

—— C_{WT} 为野生基因浓度，copy/ μ L。

参 考 文 献

- [1] GB/T 19000-2016 质量管理体系 基础和术语
- [2] GB/T 19781-2005 医学实验室 安全要求
- [3] GB/T 21415-2008 体外诊断医疗器械—生物样品中量的测量—校准品和控制物质赋值的计算学溯源性
- [4] GB/T 22576.1-2018 医学实验室质量和能力的要求 第1部分 通用要求