



2021 年 11 月

therascreen[®] PIK3CA RGQ PCR Kit 使用說明（使用手冊）



版本 1

供體外診斷使用

可供與 Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM 儀器搭配使用

可供與 QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit 搭配使用

IVD

CE

REF

873111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden, 德國

R2 MAT

1127106TW

目錄

預期用途	5
程序的限制	6
本檢測之摘要及說明	8
程序原理	10
突變反應混合液	10
平台和軟體	15
提供的材料	16
試劑組內容物	16
需要但並未提供的材料	17
警告和注意事項	19
一般注意事項	20
試劑儲存與處理	21
運輸條件	21
儲存條件	21
穩定性	21
試樣儲存與處理	23
試樣儲存	25
程序	26
DNA 萃取	26
<i>PIK3CA</i> 突變檢測	28
執行 <i>PIK3CA</i> 突變分析運行	33
結果	46

分析	46
Rotor-Gene AssayManager <i>therascreen</i> PIK3CA Assay Profile 標幟	48
效能特性：	52
分析效能：	52
空白極限 (Limit of Blank, LoB)：	52
檢測極限 (Limit of detection, LoD):	53
基因體 DNA 輸入範圍	55
DC _T 臨界值	55
DNA 輸入對 ΔC_T 值的影響（線性）：	57
檢測特异性（交叉反應性/特异性）：	58
干擾：	59
批次互換性	61
試樣處理	61
重複性和再現性	61
交叉污染/分析夾帶	65
準確度：與參考分析方法進行比較	65
臨床效能	67
疑難排解指南	72
參考資料	74
聯絡資訊	74
符號	75
訂購資訊	77
文件修訂歷程記錄	79

預期用途

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 是一款即時定性 PCR 檢測套組，可檢測磷脂酸肌醇 3 激酶催化亞基 α (*PIK3CA*) 基因中的 11 項突變 (外顯子 7 : C420R ; 外顯子 9 : E542K 、 E545A 、 E545D [僅限 1635G>T] 、 E545G 、 E545K 、 Q546E 、 Q546R ; 和外顯子 20 : H1047L 、 H1047R 、 H1047Y) ，其使用從乳癌患者採集之福馬林固定石蠟包埋 (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) 乳房腫瘤組織萃取的基因體 DNA (genomic DNA, gDNA) 。

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 可用作為伴隨診斷測試，以輔助臨床人員依據 *PIK3CA* 突變偵測結果，識別可能適合接受 PIQRAY® (alpelisib) 治療的乳癌患者。FFPE 組織試樣中的一項或更多 *PIK3CA* 突變產生陽性 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 測試結果的患者，符合接受 PIQRAY (alpelisib) 治療的資格。

進行人工樣本製備時，使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 處理 FFPE 腫瘤試樣。使用 Rotor-Gene Q (RGQ) MDx 5plex HRM 儀器進行自動擴增與檢測。

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 屬於體外診斷醫療器材。

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 僅可由經過訓練的人員，在專業的實驗室環境中使用。

程序的限制

- 使用 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 之前，必須完整閱讀並理解本使用說明文件。
- 產品的檢測結果必須結合所有相關的臨床和實驗室檢查結果進行判讀，不能單獨用於診斷。
- 結果報告為 No Mutation Detected（未檢測到突變）的樣本，可能攜帶 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 未檢測到的 *PIK3CA* 突變。
- 突變的檢測依據樣本完整性及其中的可擴增 DNA 數量而定。如果樣本中的 DNA 分析顯示數量及/或品質不足，或濃度過高而無法進行突變分析，應重複測試程序。
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 會在 PCR 程序中使用。和所有 PCR 程序一樣，樣本可能會受到測試環境中的外部 DNA 來源污染，以及受到陽性對照組中的 DNA 污染。注意避免樣本和試劑組的試劑受到污染。
- 如果樣本包含的突變等位基因百分比，低於 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 可檢測的範圍，將導致 No Mutation Detected（未檢測到突變）結果。
- 目前不清楚 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 是否會對試劑組所列生物標記以外的其他 *PIK3CA* 突變產生交叉反應（導致「Mutation Detected」（檢測到突變）結果）。
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 是一項定性測試。測試不會提供樣本中包含的突變等位基因頻率 (Mutant Allele Frequency, MAF) 之定量測量值。
- 在檢測程序期間發生微生物污染，對 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 效能的影響不明；操作員必須表現出應有的謹慎，以避免在測試程序執行期間發生微生物污染物，並且不應在觀察到微生物滋生證據時使用試劑盒組分。
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 僅適用於從乳癌患者採集之 FFPE 乳癌組織萃取的 DNA。
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 僅限搭配 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit（用於組織試樣）。
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 僅限在使用所有反應混合液時使用。

- 本產品只能由在體外診斷程序和 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器操作方面經過專業指導和訓練的人員使用。
- 本產品僅用於 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR 循環儀。本產品不得用於其他即時光學檢測之熱循環儀。
- 嚴格遵守 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 使用說明 (使用手冊)* 才能得到最佳結果。不建議對試劑進行稀釋，否則會導致效能受損。
- 本使用手冊適用於具有自動突變狀態調用功能的 Rotor-Gene AssayManager 軟體 2.1 版 (或更新版本)。
- 應注意試劑組上和所有組分標籤上的過期日和儲存條件。不要使用過期或儲存不當的組分。

本檢測之摘要及說明

磷脂酸肌醇 3 激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 訊息傳遞路徑調節多樣化的細胞功能，包括細胞增生、存活、蛋白質合成的轉譯調節、葡萄糖代謝、細胞遷移和血管新生 (1)。在腫瘤組織中，已發現活化增加 PI3K α 蛋白激酶活性的 *PIK3CA* (磷脂酸肌醇 3 激酶催化亞基 α) 基因之體細胞誤義突變，與多種不同人類癌症的細胞轉型相關 (2)，包括激素受體陽性 (HR+) 乳癌 (3)。

乳癌是女性最常診斷出來的癌症，也是排名第二的癌症相關死因 (4)。在 2018 年，美國估計有 266,120 位女性診斷出乳癌 (約佔女性所有癌症的 30%)，且估計會有 40,920 例死亡 (5)。在歐洲，預測 2018 年會有 92,700 位女性死於乳癌 (6)。男性的乳癌很罕見，男性患者診斷出乳癌的比例 <1% (4)；不過兩個性別的治療建議相同。

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 是在 RotorGene Q MDx 5plex HRM 儀器上執行的一項即時定性 PCR 體外診斷測試。其使用等位基因受阻突變系統 (Allele Refractory Mutation System, ARMS) 引子、水解探針和 PCR 夾鉗技術，相對於野生型 (WildType, WT) DNA 背景，檢測 *PIK3CA* 致癌基因外顯子 7、9 和 20 內的 11 項突變 (表 1)。

表 1 : *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 檢測目標

外顯子	突變	COSMIC* ID	鹼基改變
7	C420R	757	1258 T>C
9	E542K	760	1624 G>A
	E545A	12458	1634 A>C
	E545D	765	1635 G>T
	E545G	764	1634 A>G
	E545K	763	1633 G>A
	Q546E	6147	1636 C>G
	Q546R	12459	1637 A>G
20	H1047L	776	3140 A>T
	H1047R	775	3140 A>G
	H1047Y	774	3139 C>T

* COSMIC : 癌症體細胞突變目錄 : <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>。

程序原理

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 包含六組不同的 PCR 擴增反應混合液：

- 五組以 *PIK3CA* 基因的外顯子 7、9 和 20 為目標的突變專一性反應
- 一組以外顯子 15 為目標的對照反應

試劑組的主要組件說明如下。

突變反應混合液

突變的 DNA 會由突變專一性反應混合液，使用突變專一性 ARMS 引子、探針（水解探針和高度專一性短探針）及 PCR 夾鉗進行選擇性擴增和檢測。突變反應會在 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器的 Green、Yellow 和 Crimson 通道內檢測。

ARMS

ARMS 利用 *Taq* DNA 聚合酶可以區分 PCR 引子 3' 端的配對和錯配鹼基的能力，達成等位基因專一性擴增。當引子完全匹配時，擴增將以全效率向前推進。若 3' 鹼基錯配，則可能僅發生少量的背景擴增。因此，即使在大多數 DNA 未攜帶突變的樣本中，也可選擇性地對特定突變序列進行擴增（圖 1）。

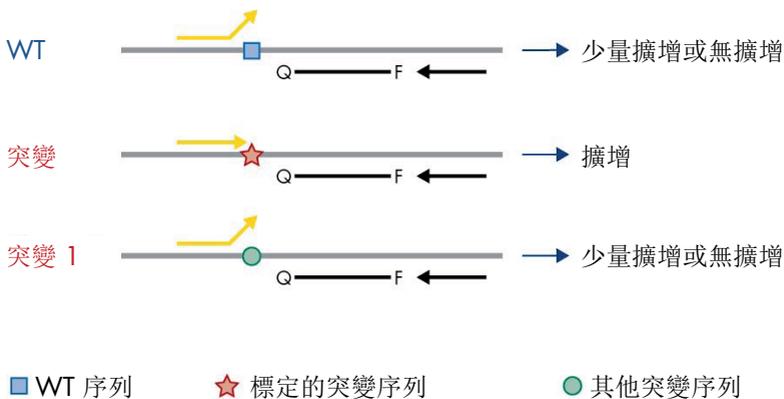


圖 1：由 ARMS PCR 識別專一性突變。WT：野生型。Q—F：雙染料探針。↔：正向和反向引子。

水解探針

水解探針會在特定引子組擴增的 DNA 區域內黏合。隨著 *Taq* 聚合酶延長引子並合成初生股，*Taq* 聚合酶的 5' 至 3' 外切酶活性會分解探針，導致螢光團釋出並發出螢光。

僅在目標序列是作為引子和探針的補充，並因此在 PCR 期間擴增時，才會檢測到螢光訊號的增加（圖 2）。

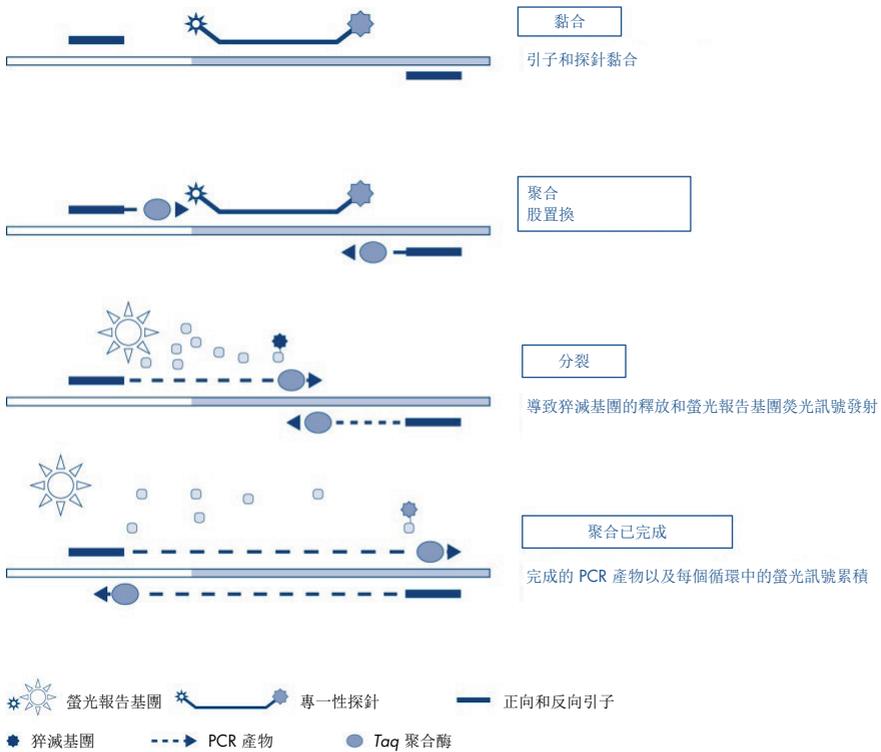
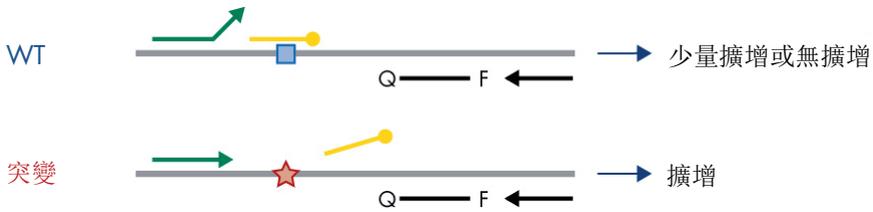


圖 2：水解探針的反應原理。

PCR 夾鉗

PCR 夾鉗可選擇性擴增突變等位基因。與野生型序列完全匹配的 PCR 夾鉗會結合至野生型模板，並透過干擾引子延長而防止擴增。添加磷酸基可阻斷 PCR 夾鉗的 3' 端，以防止野生型序列延長（圖 3）。



■ WT 序列 ★ 標定的突變序列

—●— 3' 磷酸寡核苷酸（夾鉗）

圖 3：PCR 夾鉗技術。WT：野生型。Q—F：雙染料探針。↔：正向和反向引子。

對照反應

對照反應混合液（試管 1）包含一個正向和反向引子及標記探針（在 Green 通道內檢測），以擴增 *PIK3CA* 基因之外顯子 15 的一個短序列。對照反應用於確定樣本中是否含有適量的可擴增 DNA，並且是確定突變狀態之分析計算中的一項因子。

內部對照劑

每組反應混合液皆包含內部對照劑，設計用於檢測反應失敗（例如由於抑制劑存在）。內部對照劑運用非 *PIK3CA* 相關寡核苷酸目標序列、未標記的正向和反向引子，以及以橘色螢光團標記的水解探針。

陽性對照組

陽性對照組（試管 PC）包含五個分別代表 11 項突變和對照組的質體混合物。檢測到可接受範圍內的突變，可確認試劑組內的每個混合液適當發揮作用。

陰性對照組

無模板對照組（試管 NTC）包含用於無模板對照組 (NTC) 反應，且不含核酸酶的水。NTC 可做為陰性對照組，並在檢測設定期間識別可能的污染。

樣本稀釋液

樣本稀釋液（試管 Dil.）包含不含核酸酶的水。

平台和軟體

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 專門設計用於搭配以安裝下列軟體的個人電腦操作之 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器：

- Rotor-Gene AssayManager® 2.1 版（或更新版本）
- Gamma Plug-in 1.0.0 版
- *therascreen*_PIK3CA_FFPE Assay Profile 1.0.1 版，用於分析組織試樣

請參閱 *Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 使用者手冊* 中有關 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器的資訊。必須按照使用者手冊中的要求維護 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器。

請參閱 *Rotor-Gene AssayManager Core Application 使用者手冊* 和 *Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in 使用者手冊* 中，有關軟體的進一步資訊。

運行參數

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器以不同的 *therascreen* PIK3CA Assay Profile，針對不同的循環參數（或運行）進行設定。Assay Profile 包含 PCR 運行參數並計算結果。檢測的 PCR 熱循環參數如下：

- 在 95° C 維持 15 分鐘以活化 *Taq DNA* 聚合酶。
- 進行 45 個循環的 PCR，在 95° C 下維持 30 秒以解離，並在 60° C 下維持 1 分鐘以黏合並延長。

提供的材料

試劑組內容物

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit (24)

產品編號 **873111**

反應次數 **24**

內容物 帽顏色 體積

PIK3CA Reaction Mix 1 (PIK3CA 反應混合液 1) 紅色 750 µl

PIK3CA Reaction Mix 2 (PIK3CA 反應混合液 2) 紫色 750 µl

PIK3CA Reaction Mix 3 (PIK3CA 反應混合液 3) 橙色 750 µl

PIK3CA Reaction Mix 4 (PIK3CA 反應混合液 4) 黃色 750 µl

PIK3CA Reaction Mix 5 (PIK3CA 反應混合液 5) 綠色 750 µl

PIK3CA Reaction Mix 6 (PIK3CA 反應混合液 6) 藍色 750 µl

Taq DNA Polymerase (Taq) (Taq DNA 聚合酶 (Taq)) 薄荷色 85 µl

PIK3CA Positive Control (PC) (PIK3CA 陽性對照組 (PC)) 米色 250 µl

Water for No Template Control (NTC) (無模板對照 (NTC) 用水) 白色 1.9 ml

Nuclease-free water for Dilution (Dil.) (稀釋用無核 酸酶水 (Dil.)) 白色 1.9 ml

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 使用說明 (使用手冊) 1

需要但並未提供的材料

使用前，確保按照製造商的建議檢查並校準儀器。

試劑

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN，產品編號 60404；參見第 26 頁的「DNA 萃取」)
- DNAZap™ PCR 降解溶液
- Distel High Level Laboratory Disinfectant 及異丙醇 (Isopropyl Alcohol, IPA) 清洗液

耗材

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps，用於搭配 72-well rotor 使用 (QIAGEN，產品編號 981103 或產品編號 981106)
- 無核酸酶、低度 DNA 結合微量離心管，用於製備主混合液
- 無核酸酶微量滴管吸頭附氣霧屏障

設備

- 永久性標記工具
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (產品編號 9002032) 或 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (產品編號 9002033) *†
- Rotor-Gene AssayManager 2.1 版 (或更新版本)、Gamma Plug-in 和 theascreen_PIK3CA_FFPE Assay Profile
- 樣本製備專用微量滴管* (可調式)

* 確保按照生產商的建議檢查並校正儀器和設備。

† 在某些國家或地區，如果適用，可以使用生產日期為 2011 年 5 月或以後的 Rotor-Gene Q 5plex HRM 儀器。生產日期可以從儀器背面的序號中獲知。序號的格式為 mmyyynn，其中 mm 表示生產月份的數字，yy 表示生產年份的最後兩位數字，nnn 表示唯一的儀器識別碼。

- PCR 主混合液製備專用微量滴管*（可調式）
- 模板 DNA 分注專用微量滴管*（可調式）
- 帶轉子的桌上型離心機*，適合 1.5 ml 反應管使用
- 熱混合器*、加熱迴轉式培養箱*、加熱塊* 或可在 56° C、70° C 和 90° C 下靜置的水浴箱*
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes，適用於手動反應設定的鋁塊（QIAGEN，產品編號 9018901）
- Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes，適用於以帶有單通道微量滴管之 96 x 0.2 ml PCR 試管進行手動反應設定的鋁塊（QIAGEN，產品編號 9018905）
- 72-Well Rotor，用於容納反應體積為 10-50 μ l 的 Strip Tubes and Caps, 0.1 ml；需要 Locking Ring 72-Well Rotor（QIAGEN，產品編號 9018903）
- Locking Ring 72-Well Rotor，用於在 72-Well Rotor 內固定 Strip Tubes and Caps, 0.1 ml（QIAGEN，產品編號 9018904）

警告和注意事項

供體外診斷使用。

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 僅可由經過訓練的人員，在專業的實驗室環境中使用。

在操作化學物質時，務必穿戴合適的實驗室工作服、拋棄式手套和護目鏡。如需瞭解更多資訊，請參閱相應的安全資料表 (Safety Data Sheets, SDS)。這些安全資料表以簡潔方便的 PDF 格式在線上提供：www.qiagen.com/safety，對於每種 QIAGEN 試劑組和每種試劑組組分，您可以從中找到、瀏覽並列印 SDS。

僅可供與 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器搭配使用。

如需了解 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器的安全資訊，請參閱儀器隨附的使用者手冊。

僅限組織試樣：僅可供與 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 搭配使用。

如需了解有關 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit（產品編號 60404）的安全資訊，請參閱 *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 使用手冊*。

一般注意事項

- 測試適用於乳癌患者的 FFPE 乳癌組織試樣。
- 所有化學物質和生物材料都具有潛在的危險性。FFPE 試樣材料和從其製備的核酸，不太可能有感染危險。務必遵循本地機構健康及安全性程序。
- 依據當地安全程序丟棄試樣、樣本和檢測廢棄物。
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 的試劑已進行過最佳化稀釋。切勿進一步稀釋試劑，否則可能導致效能喪失。請勿使用小於 25 μ l 的反應體積（反應混合液加樣本）。
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 中提供的所有試劑，僅適用於與同一 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 中提供的其他試劑搭配使用。切勿替換 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 中的試劑或 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 間的試劑，否則可能會影響效能。
- 僅使用 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 中提供的 *Taq* DNA 聚合酶（試管 *Taq*）。不要以其他 QIAGEN 試劑組中的 *Taq* DNA 聚合酶替換，或以另一家供應商的 *Taq* DNA 聚合酶替換。
- 請參閱 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器使用者手冊，了解其他警告、注意事項和程序。
- 不要使用過期或儲存不當的組分。
- 請特別小心，避免對照組和反應混合液試劑，受到陽性對照試劑中包含的合成材料污染。
- 請特別小心，避免樣本之間交叉污染。添加每份樣本後，立即將試管蓋上。
- 使用載入塊製備檢測主混合液之前，先將其徹底去污。建議使用 DNAZap PCR 降解溶液，接著使用 Distel High Level Laboratory Disinfectant 和 IPA 清洗。使用前載入塊必須乾燥。
- 使用單獨的專用微量滴管製備反應混合液，及添加陽性對照試劑。
- 在一個用於添加陽性對照組區域以外的不同區域，執行反應混合液的製備和分注。
- 反應混合液試劑內含的螢光標記分子，對光線敏感。防止對照和反應混合液試劑照光，以避免光漂白作用。
- 運行完成前，請勿開啟 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器。
- 運行完成後，請勿開啟 Rotor-Gene Q 試管。
- 必須小心以確保正確樣本測試，以避免不正確的樣本進入、裝載錯誤和移液錯誤。

試劑儲存與處理

運輸條件

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 用乾冰運輸，必須保證到達時仍為冷凍狀態。如果 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 的任何組分到達時未處於冷凍狀態、在運輸過程中外包裝已開啟，或貨物中缺少裝箱單、使用說明或試劑，請聯絡 QIAGEN 技術服務部或當地經銷商（瀏覽 www.qiagen.com）。

儲存條件

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 應在收到後立即置於恆溫冰箱中以 -30 至 -15°C 的溫度避光儲存。

在規定儲存條件下存放時，*therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 可保持穩定至標示的過期日。

穩定性

已開啟後，試劑可使用其原始包裝，在 -30 至 -15°C 下保存 12 個月，或直至包裝上標示的過期日。應避免反覆凍融。請勿超過最多 5 次冷凍解凍循環。

使用前，試劑必須在室溫下解凍至少 1 小時（且最多 4.5 小時）。一旦試劑可以使用，便可以建立 PCR 反應。裝有主混合液和樣本 DNA 的 Rotor-Gene Q 試管，應立即裝載到 Rotor-Gene Q MDx 上。若在室溫下進行，從開始 PCR 預備到開始運行之間的總時間，不應超過 7.5 小時。

備註：此時間包括 PCR 預備時間和儲存時間。

備註：反應混合液試劑內含的螢光標記分子，對光線敏感。防止對照和反應混合液試劑照光，以避免光漂白作用。

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 內的試劑已經最佳化稀釋，且使用前不需要進一步純化或處置。

應注意試劑組上和所有組分標籤上的過期日和儲存條件。不要使用過期或儲存不當的組分。

試樣儲存與處理

試樣處理

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 適用於從乳癌患者採集之 FFPE 腫瘤組織切片試樣，和粗針組織切片 (Core Needle Biopsy, CNB) 試樣中萃取的 gDNA。腫瘤的基因型和表現型皆具有異質性。突變陽性腫瘤可能包含野生型 DNA，並可能呈現與非腫瘤組織區域相近的組織學。

要製備用於 DNA 萃取的組織試樣：

- 使用標準材料和方法將組織試樣固定在 10% 中性福馬林緩衝液 (Neutral Buffered Formalin, NBF) 中，並將其組織試樣包埋於石蠟中。使用切片機從石蠟塊切取 5 µm 的連續切片，並將其貼附於載玻片上。
- 由受過訓練的人員（例如病理學家），評估蘇木素及伊紅 (Hematoxylin & Eosin, H&E) 染色切片，以確認腫瘤含量及有效腫瘤面積 (Effective Tumor Area, ETA)。標記染色的玻片，以決定關注區域 (Region Of Interest, ROI)。使用連續切片進行 DNA 萃取。
 - **備註：**染色的切片不得用於 DNA 萃取。
- 使用新的無菌解剖刀，從組織上刮掉多餘的石蠟並棄置。

警示



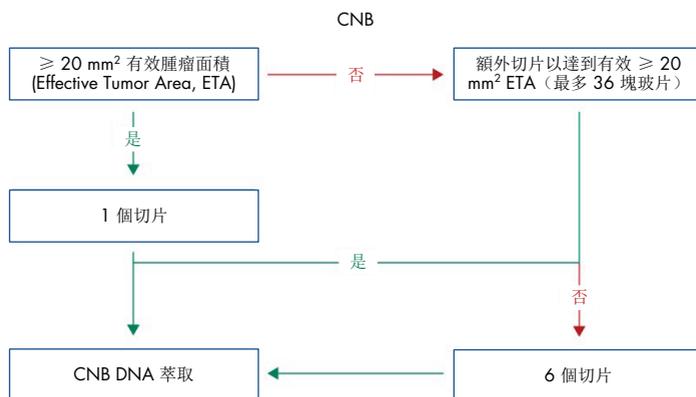
使用乾燥解剖刀。請勿在層流或通風櫥中執行此步驟。

- 對於每個試樣，使用新的解剖刀從玻片上將腫瘤組織刮到帶標籤的微量離心管中。

依據當地程序，以受管控方式標記、處理和儲存腫瘤試樣、腫瘤塊、玻片、樣本及準備萃取的微量離心管。

使用 FFPE 腫瘤組織切片試樣和 FFPE CNB 試樣時，有兩個不同的工作流程（圖 4）。

A



B

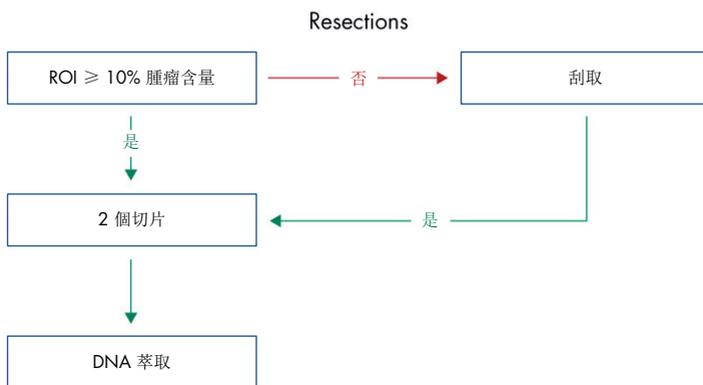


圖 4：搭配 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 使用之臨床試樣純化工作流程。A：FFPE CNB。B：FFPE 腫瘤組織切片試樣。

試樣儲存

DNA 萃取之前，FFPE 塊與玻片應儲存在室溫下 (15-25° C)。萃取後 DNA 可儲存至檢測前。表 2 提供試樣與萃取後 DNA 的最大建議儲存時間和條件指引。

表 2：從 FFPE 組織萃取的 gDNA 之建議儲存時間

儲存	最大建議儲存時間
冷凍庫 (-30 至 -15° C)	5 週
冰箱 (2 至 8° C)	1 週
冷凍庫 (-80° C)	33 個月

程序

DNA 萃取

DNA 應使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (產品編號 60404) 萃取。

備註： *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 使用以 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 萃取的 DNA 開發。請勿使用其他任何 DNA 萃取產品。

依據 *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 使用手冊* 中的說明進行 DNA 萃取，並注意下列事項：

- 使用下列部分中建議的玻片和洗脫體積 (第 26 頁的 FFPE 組織切片 (RES) 試樣 和第 27 頁的 FFPE CNB 試樣)。
- 如果第一次離心後組織沒有聚集成團塊，需進行額外離心。
- 確保使用分子生物學級乙醇 *執行所有必需的步驟。
- 去除乙醇後，在 15-40° C 下將試管開蓋靜置 10 分鐘，讓所有殘留的乙醇蒸發。

FFPE 組織切片 (RES) 試樣

- 如果 RES 試樣關注區域 (Region Of Interest, ROI) 內具有 $\geq 10\%$ 的腫瘤含量，對於每份試樣，使用新解剖刀從兩個切片 (5 μm) 將整個組織區域刮到標記的微量離心管內。如果試樣在 ROI 內具有 $< 10\%$ 的腫瘤含量，對於每份試樣，使用新解剖刀進行刮取，僅從兩個切片將腫瘤 ROI 刮入標記的微量離心管內。
- 刮取的組織試樣必須以蛋白酶 K 消化 1 小時。
- 對於 RES 試樣，純化的 gDNA 必須在管柱內靜置 10 分鐘後，溶析至 120 μl Buffer ATE 內 (附在 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 內)。

* 不要使用含有甲醇或甲基乙基酮等其他物質的變性乙醇。

FFPE CNB 試樣

- 對於 CNB 試樣，使用適當數量的 5 μm 切片，從最多六個切片取得至少 20 mm^2 的所需有效腫瘤面積 (Effective Tumor Area, ETA)。盡可能使用最少量的切片 (1-6) 達成 20 mm^2 ETA。
- 對於最多六個切片無法達到 20 mm^2 ETA 的試樣，使用六個切片進行檢測。
- CNB 試樣必須以蛋白酶 K 消化 1 小時。
- 對於 CNB 試樣，純化的基因體 DNA 必須在管柱內靜置 10 分鐘後，溶析至 70 μl Buffer ATE 內（附在 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 內）。

PIK3CA 突變檢測

本操作程序用於 *PIK3CA* 突變檢測。

開始前要點

- 使用每個試劑組內提供的 *PIK3CA* 反應混合液進行的四次運行，可處理最多 24 份樣本。最佳用法為四次運行，每次運行包含最多六份樣本。較小的樣本批次大小表示每份 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 可檢測的樣本較少。
- 樣本必須使用 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 中提供的所有反應混合液進行檢測。
- 切勿振盪 *Taq DNA* 聚合酶（試管 *Taq*）或包含 *Taq DNA* 聚合酶的任何混合液，因為這可能會導致酵素失去活性。
- 移取 *Taq DNA* 聚合酶時，小心將微量滴管吸頭插入至略低於液面，以避免吸頭外部被過量酵素包覆。

開始前需完成的事項

- 確保使用 Rotor-Gene AssayManager 2.1 版（或更新版本）、Gamma Plug-in 和 *therascreen_PIK3CA_FFPE Assay Profile* 執行運行。首次使用 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器之前，確保安裝相關軟體，並遵循運行開始與資料分析之適當說明（請參閱執行 *PIK3CA* 突變分析運行）。
- 每次使用前，包括 *Taq DNA* 聚合酶（試管 *Taq*）的所有試劑和 DNA 樣本，必須在室溫（15-25° C）下完全解凍至少 1 小時（且最多 4.5 小時），透過顛倒 10 次進行混合，並進行短暫離心以收集試管底部的成分。
- 確保 PCR 載入塊適當清潔消毒（請參閱一般注意事項）並乾燥。

程序

1. 在室溫 (15-25°C) 下解凍所有反應混合液、無模板對照用水、*Taq* DNA 聚合酶、PIK3CA 陽性對照組和 DNA 樣本至少 1 小時，且最多 4.5 小時。
2. 1 小時後，透過將每個試管顛倒 10 次徹底混合所有試劑，以避免鹽局部濃集。將所有試劑短暫離心，以收集試管底部的成分。

備註：切勿振盪 *Taq* DNA 聚合酶（試管 *Taq*）或包含 *Taq* DNA 聚合酶的任何混合液，因為這可能會導致酵素失去活性。

3. 依據表 3 標示六根微量離心管（未提供）。依據表 3 中的體積，準備足量的主混合液（對照組與突變反應混合液）加上 *Taq* DNA 聚合酶，用於 DNA 樣本、一次 PIK3CA 陽性對照組反應與一次無模板對照組反應。

主混合液包含除了樣本以外，PCR 所需的所有組分。

備註：製備主混合液時，首先將所需體積的對照或突變反應混合液添加到相關試管中，最後添加 *Taq* DNA 聚合酶。

表 3：檢測主混合液的製備

反應混合液試管	反應混合液體積 ($n^* + 3$)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶體積 ($n^* + 3$)
試管 RM 1	19.83 μ l \times ($n + 3$)	0.17 μ l \times ($n + 3$)
試管 RM 2	19.83 μ l \times ($n + 3$)	0.17 μ l \times ($n + 3$)
試管 RM 3	19.83 μ l \times ($n + 3$)	0.17 μ l \times ($n + 3$)
試管 RM 4	19.83 μ l \times ($n + 3$)	0.17 μ l \times ($n + 3$)
試管 RM 5	19.83 μ l \times ($n + 3$)	0.17 μ l \times ($n + 3$)
試管 RM 6	19.83 μ l \times ($n + 3$)	0.17 μ l \times ($n + 3$)

* n = DNA 樣本數量。 n 值不應超過六，因為六是一次運行中可容納的最大樣本數。包含額外三次反應，以確保充分涵蓋 PCR 預備與對照組。

- 蓋住主混合液試管蓋子，並顛倒 10 次以徹底混合主混合液。短暫離心以確保混合液位於試管底部。
- 主混合液就緒後，立即依據表 4 的排列方式，將適當數量的 PCR 4 連排試管（每排有四根試管；未附上 PCR 4 連排試管）放入載入塊內。請勿蓋上連排試管蓋子。立即添加 20 μ l 的適當主混合液到每個 PCR 連排試管內。

備註：將蓋子留在塑膠容器中，等到需要時才取出。

備註：請參見表 4 以瞭解製備反應混合液時的試管排列方式。

表 4：PIK3CA 突變檢測時載入塊內的運行排列方式

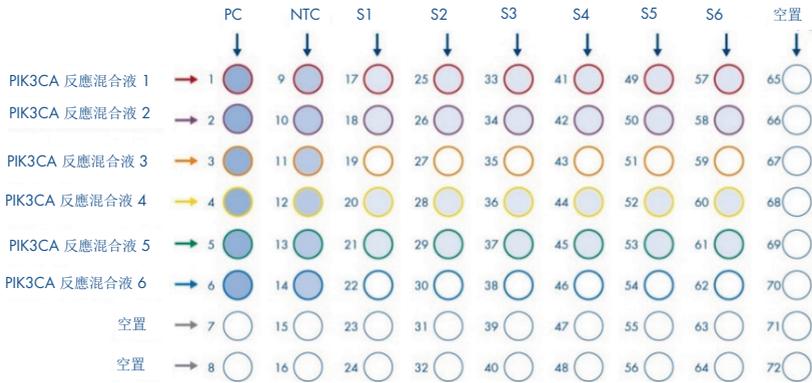
檢測	對照		樣本編號						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
試管 RM 1	1	9	17	25	33	41	49	57	E
試管 RM 2	2	10	18	26	34	42	50	58	E
試管 RM 3	3	11	19	27	35	43	51	59	E
試管 RM 4	4	12	20	28	36	44	52	60	E
試管 RM 5	5	13	21	29	37	45	53	61	E
試管 RM 6	6	14	22	30	38	46	54	62	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

備註：每個試管應含有 25 μ l 的總反應體積（依據表 4 製備的 20 μ l 主混合液，加上 5 μ l NTC/樣本/PC）。數字表示載入塊中的位置，以及最終轉子位置。E：空置。

- 立即將 5 μ l 無模板對照用水添加到 NTC 試管（試管位置 9-14）中並加蓋。
- 將 5 μ l 的每份 DNA 樣本添加到樣本試管，並在添加每份樣本後立即為試管加蓋，以避免樣本之間的交叉污染。
- 將 5 μ l PIK3CA 陽性對照組添加到 PC 試管（試管位置 1-6）並加蓋。

9. 使用永久性標記工具標記每排 PCR 4 連排試管中位置編號最小的首根試管（例如位置 1、5 和 9）的蓋子，以指示將試管裝載到 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器 72 孔轉子時的裝載方向。
10. 依據運行排列方式（表 4 和圖 5），將所有 PCR 4 連排試管插入 72 孔轉子的適當位置中。請格外小心，確保將試管轉移到 72 孔轉子中的正確位置（72 孔轉子中的試管位置應與載入塊中的試管位置相同）。

備註：轉子上所有未用位置都必須用加蓋的空試管填充。這可以確保維持 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器的熱效率。



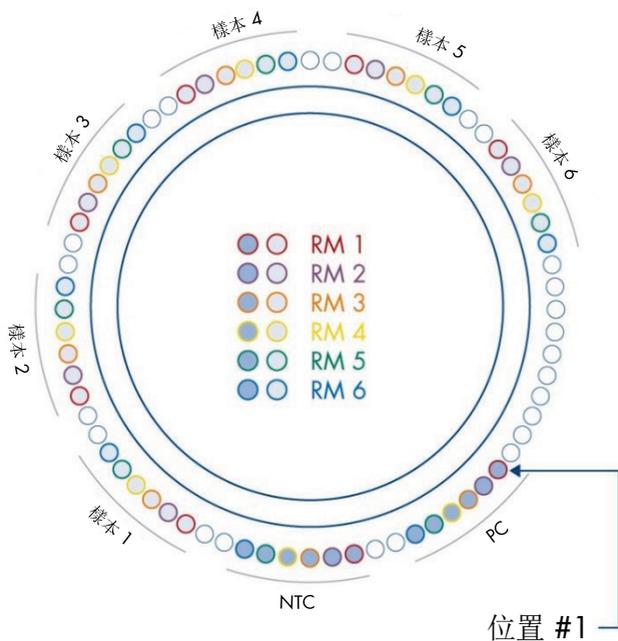


圖 5：使用 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 的試驗的微量盤和轉子設定。PC：陽性對照組。S：DNA 樣本。NTC：無模板對照組（水）。

警示



必須依據圖 5 所示將試管插入轉子，因為 Assay Profile 是依據這種排列設定自動分析。如果使用不同的排列方式，將取得異常結果。

11. 立即將 72 孔轉子放入 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器中。確保密封圈（隨 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器提供）放置在轉子頂部，以便在運行期間固定試管並關閉儀器蓋。
12. 若要開始運行，遵循下一節 執行 PIK3CA 突變分析運行 中提供的說明。

執行 PIK3CA 突變分析運行

13. 在連接至 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器的膝上型電腦之桌面上的 Rotor-Gene AssayManager 圖示上按兩下。



14. 按預設顯示「Setup」（設定）環境。按下 New manual worklist（新建手動工作清單），以建立新的工作清單（圖 6）。

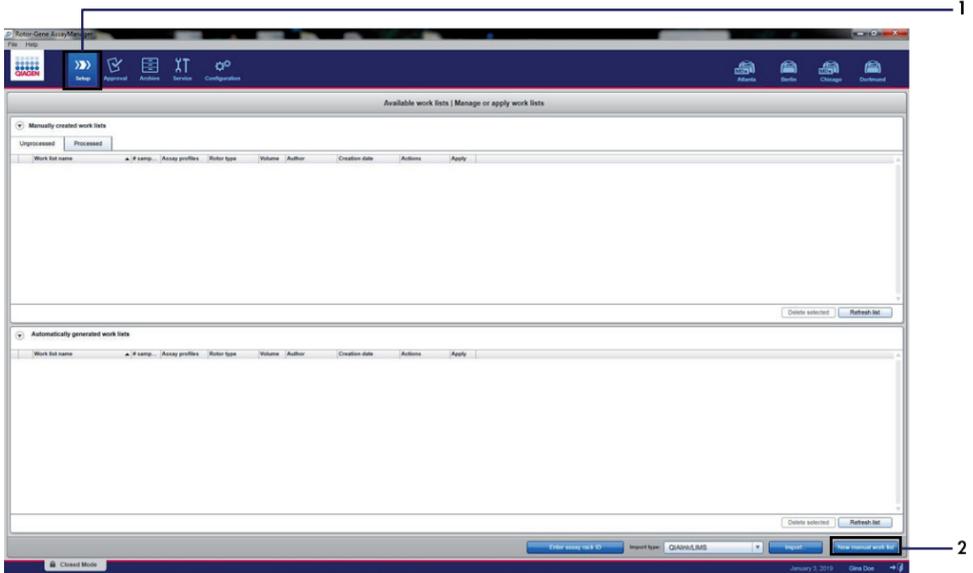


圖 6：建立新的手動工作清單。1 = Setup（設定）標籤，2 = New manual work list（新建手動工作清單）。

15. 選取主視窗左側的 Assays（檢測）標籤。依據樣本類型，從可用檢測設定檔清單，按一下 `therascreen_PIK3CA_FFPE Assay Profile`。按一下藍色箭頭以選取該檢測設定檔。如果檢測設定檔名稱被截斷，將滑鼠指標移至檢測設定檔上以查看完整名稱（圖 7）。

警告



檢查確認已為選取試樣類型選取正確的檢測設定檔。

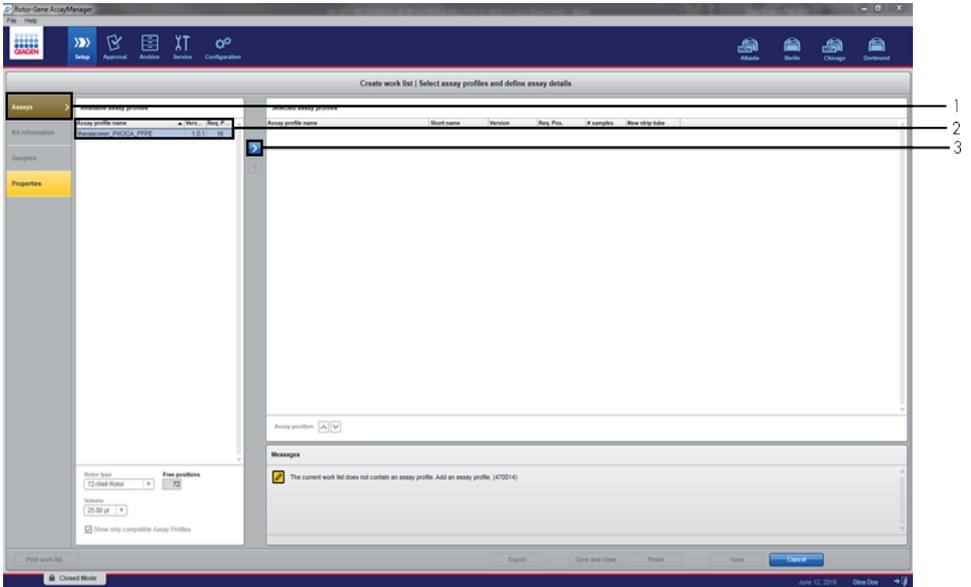


圖 7：建立新的手動工作清單：選擇檢測設定檔名稱。1 = Assays（檢測）標籤，2 = 選取可用的檢測設定檔 *therascreen_PIK3CA_FFPE*，3 = 選取檢測設定檔。

16. 在 Selected assay profiles (選定檢測設定檔) 視窗中，輸入不包括運行對照劑數量的待測測試樣本數量 (圖 8)。

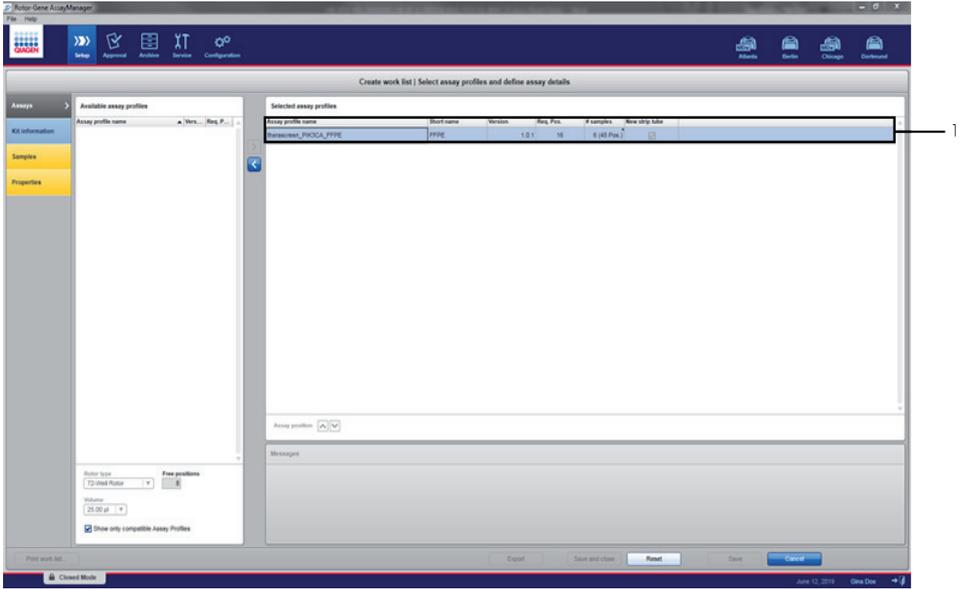


圖 8：建立工作清單主視窗。1 = 新增樣本數量。

17. 按一下 Kit information (試劑盒資訊) 標籤。選擇 Enter kit information manually (手動輸入試劑盒資訊) 並輸入試劑盒資訊 (圖 9) :

- Kit bar code (試劑盒條碼)
- Material number (材料編號)
- Lot number (批號)
- Kit expiry date (試劑盒到期日期)

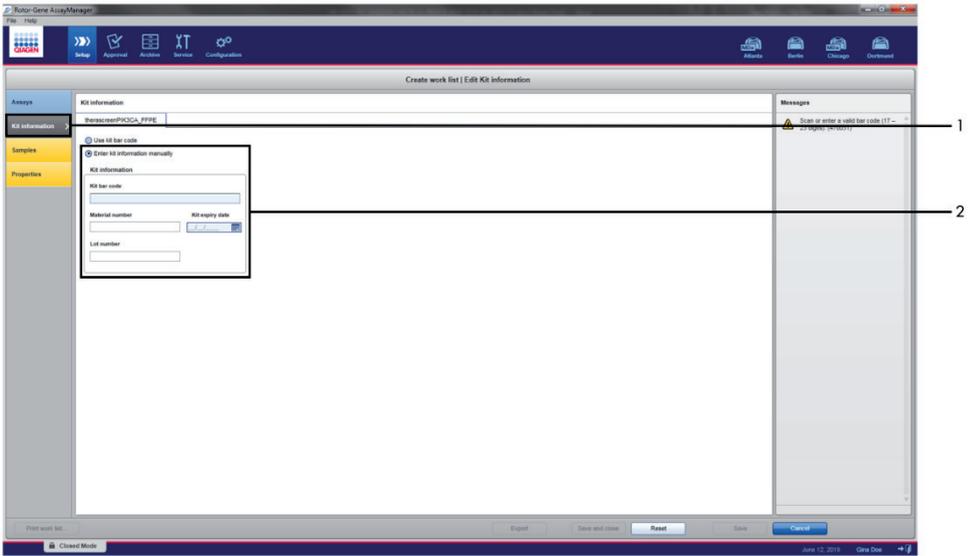


圖 9：建立工作清單主視窗。1 = Kit information (試劑盒資訊) 標籤，2 = 輸入試劑盒資訊。

18. 按一下 Samples (樣本) 標籤輸入樣本資訊。手動輸入樣本名稱 (圖 10)。

備註：開始 Rotor-Gene AssayManager 運行之前，確保輸入正確的樣本名稱。

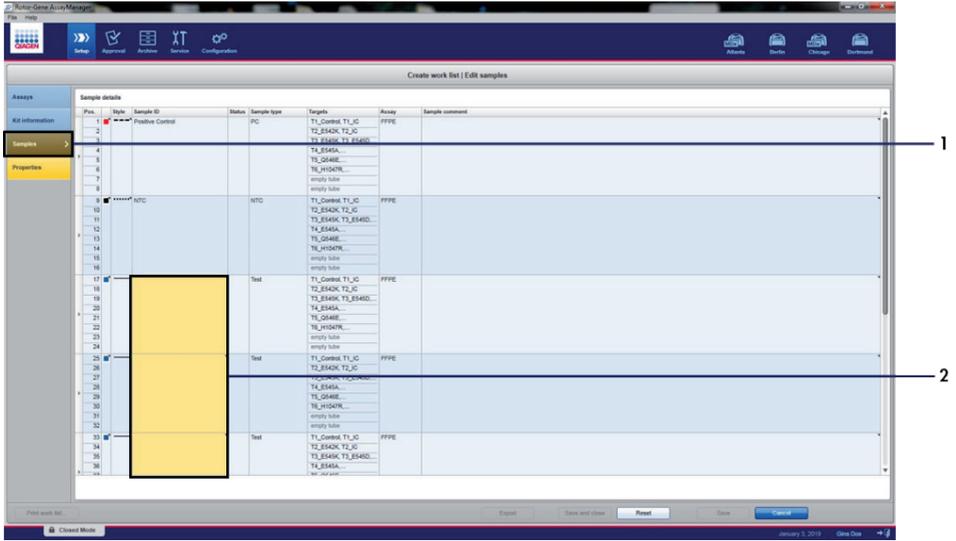


圖 10：建立工作清單主視窗。1 = Samples (樣本) 標籤，2 = 輸入樣本名稱。

19. 按一下 Properties (屬性) 標籤並輸入工作清單的名稱。工作清單名稱輸入後，確保已勾選「is editable」(可編輯)和「work list is complete」(工作清單完整)方塊。按一下右下角的 Apply (套用) 以套用工作清單。將出現一個新的視窗(圖 11)。

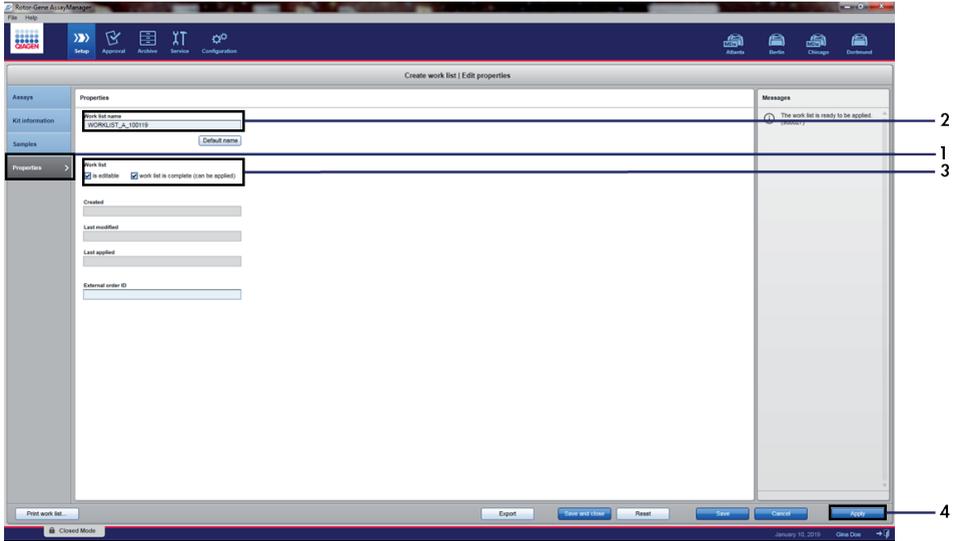


圖 11：建立工作清單主視窗。1 = Properties (屬性) 標籤，2 = 輸入工作清單名稱，3 = 選取 is editable (可編輯) 和 work list is complete (工作清單完整)，4 = Apply (套用)。

20. 在 Experiment name (試驗名稱) 欄位內輸入試驗名稱。從可用循環儀清單中選取一個循環儀，並確保已勾選 Ring attached (環已連接) 方塊 (圖 12)。

所有步驟執行完畢後，按一下 Start run (開始運行)。螢幕左上方的 RGQ 圖示會變成綠色，指示運行已開始。

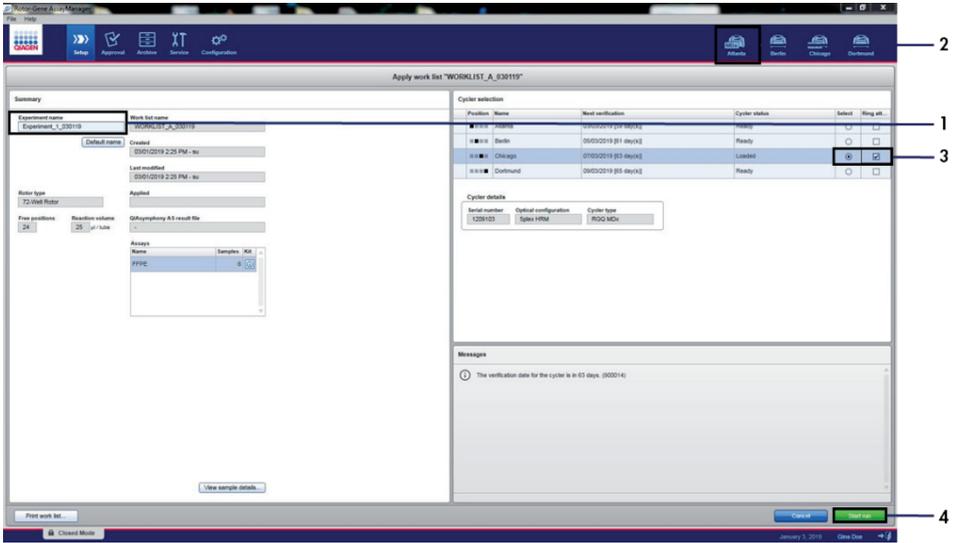


圖 12：套用工作清單和運行開始。1 = 輸入試驗名稱，2 = 儀器選擇，3 = 確保已選取 Ring attached (環已連接)，4 = Start run (開始運行)。

備註： Cycler（循環儀）圖示隨運行進度和結果改變其外觀。對這些循環儀圖示的完整說明請參閱 *Rotor-Gene AssayManager Core Application 使用者手冊*。

循環儀圖示範例如圖 13 所示。



圖 13：可能顯示的循環儀圖示。

21. 運行完成後，按一下 **Finish run**（完成運行）。將開啟 **Release and go to approval**（放行並轉至核准）對話方塊（圖 14）。

備註：在運行過程中，將即時顯示和更新擴增曲線。左下角進度列指示器將顯示剩餘時間。

重要提示：運行正在進行時切勿關閉視窗。



圖 14：完成運行。1 - Finish run（完成運行）。

22. 按一下 **Release and go to approval**（放行並轉至核准）以進入 **Approval**（核准）標籤，並放行 Rotor-Gene Q 儀器（圖 15）。螢幕右上方的 RGQ 圖示將從綠色變為藍色，表示儀器已準備好執行另一個運行。無論運行是否成功，都必須將運行放行並核准。有關 Rotor-Gene AssayManager 內的可能失敗與錯誤代碼清單，請參閱 *Rotor-Gene AssayManager Core Application 使用者手冊* 和 *Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in 使用者手冊*。

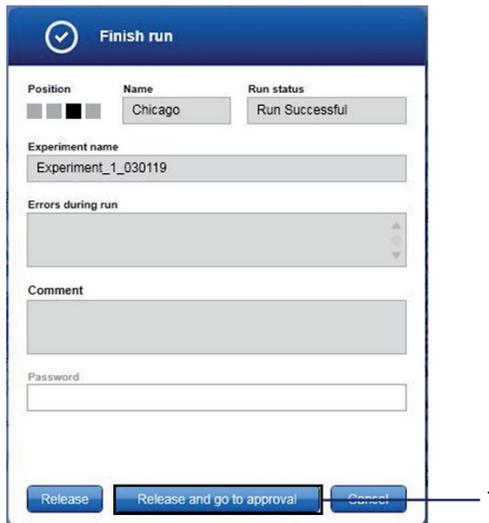


圖 15：Finish Run（完成運行）快顯視窗。1 = Release and go to approval（放行並轉至核准）。

23. 在核准環境的 Assay selection（檢測選擇）視窗選取試驗，然後按一下 Start approval（開始核准）（圖 16）。

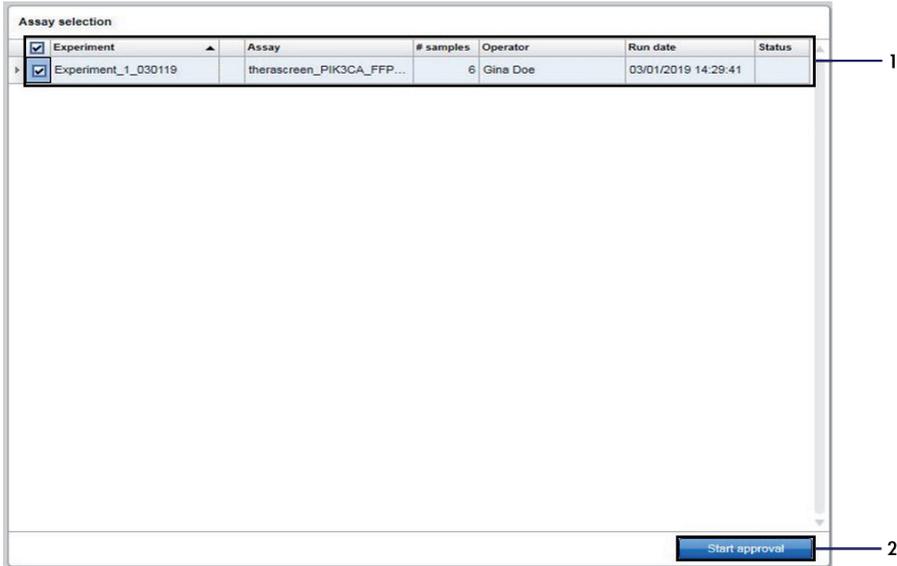


圖 16：在 Approval（核准）環境中開始放行程序。1 = 選取要核准的檢測，2 = Start approval（開始核准）。

Raw data（原始資料）、Processed data（已處理資料）、Experiment（試驗）、Assay（檢測）和 Audit trail（稽核記錄）資訊請參閱 Plots and information（圖和資訊）部分 (1)。檢測結果請參閱 Results（結果）部分 (2)。

如果陽性對照組和無模板對照組在可接受範圍內，Sample Status（樣本狀態）欄會報告 Valid（有效）；否則會報告 Invalid（無效）樣本狀態。

如果任一運行對照組失敗，則運行將為無效。所有樣本將標記為 ASSAY_INVALID。

有關如何繼續進行的說明，請參閱 Rotor-Gene AssayManager *therascreen* PIK3CA Assay Profile 標幟。

備註：檢測設定檔包含自動檢測、樣本分析、結果判讀的所有規則。因此軟體將自動評估樣本和對照組的有效性或無效性。

24. 按一下 Release/report data (放行/報告資料)。將開啟 Release/report data (放行/報告資料) 視窗 (圖 17)。

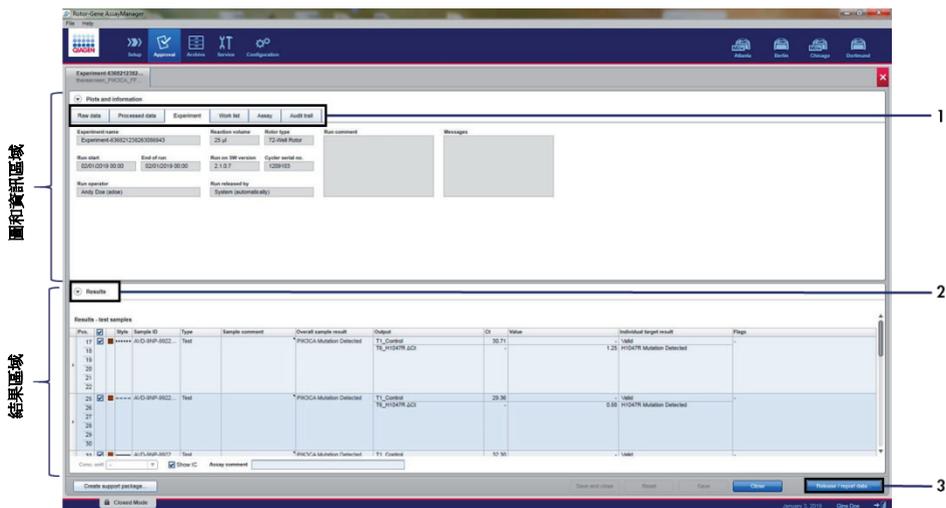


圖 17：檢測結果主視窗範例。1 = Plots and information (圖和資訊) 區域中的 Experiment (試驗) 標籤。2 = 結果區域，3 = Release/report data (放行/報告資料)。

25. 按一下 OK (確定) 將試驗儲存到封存並建立 LIMS 輸出和運行報告 (圖 18)。運行報告和 LIMS 匯出將儲存在預設報告目錄內。可在 Configuration (配置) 標籤的 Default data export directories (預設資料匯出目錄) 部分中找到預設目錄。

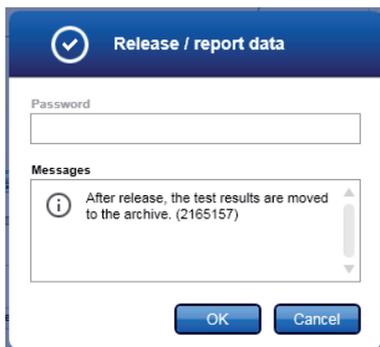


圖 18：Release/report data (放行/報告資料) 視窗範例。

26. 要檢視儲存在環境封存中的試驗，按一下 **Archive**（封存），並使用 **Filter Options**（篩選選項）部分的搜尋條件搜尋試驗。按一下 **Apply filter**（套用篩選）進行搜尋。透過勾選您想檢視的試驗旁的核取方塊選取試驗，並按一下 **Show assays**（顯示檢測）（圖 19）。

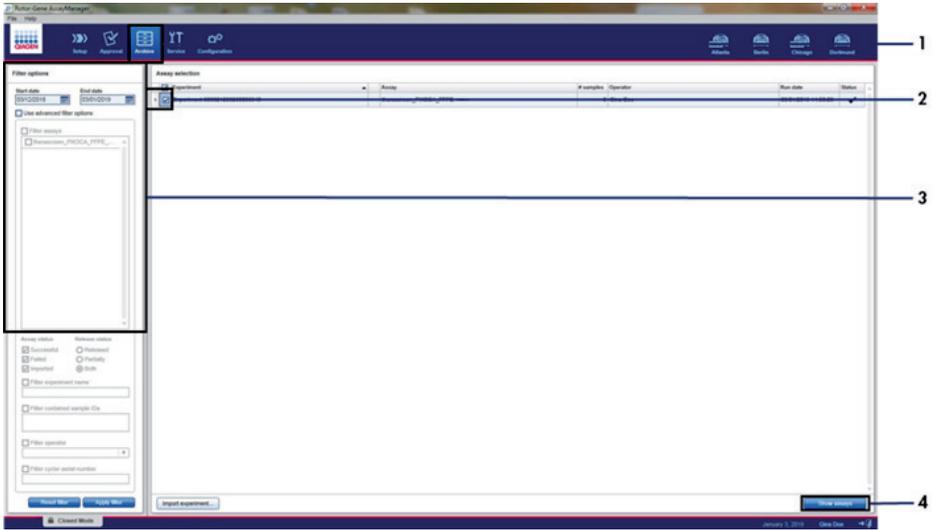


圖 19：Experiment Archive（試驗封存）主視窗範例。1 = Archive（封存）標籤，2 = 搜尋選項，3 = 選取試驗名稱，4 = Show assays（顯示檢測）標籤。

結果

當運行完成後，*therascreen* PIK3CA Assay Profile 將自動執行分析和突變檢出。以下資訊說明了 *therascreen* PIK3CA Assay Profile 如何進行分析和突變檢出。

分析

特定反應的螢光跨越 *therascreen* PIK3CA Assay Profile 指定的預先定義閾值之 PCR 循環，定義為 C_T 值。 C_T 值表示特定輸入 DNA 的數量。低 C_T 值表示較高的輸入 DNA 含量，高 C_T 值表示較低的輸入 DNA 含量。螢光在此 C_T 值或之前跨越閾值的反應，歸類為陽性。

透過使用對照反應評估 DNA 樣本，可依據取得的 C_T 值，判定樣本是否包含適合分析的 DNA 含量，以及哪些樣本在分析前需要稀釋。

使用不同突變反應混合液評估樣本以決定其個別 C_T 值，可讓 *therascreen* PIK3CA Assay Profile 使用下列等式執行計算以決定樣本的 ΔC_T 值：

$$\Delta C_T = [\text{突變檢測 } C_T \text{ 值}] - [\text{對照檢測 } C_T \text{ 值}]$$

依據預先決定的分析 C_T 和 ΔC_T 值，*therascreen* PIK3CA Assay Profile 可定性決定 DNA 樣本的突變狀態，並報告樣本是否包含突變。

評估運行對照（PC、NTC 以及 IC），以確保滿足可接受的 C_T 值，且反應已成功執行。

如果樣本對照 C_T 低於可接受的範圍，這表示 DNA 輸入過高，且需要依照 Rotor-Gene AssayManager *therascreen* PIK3CA Assay Profile 標幟 所述稀釋樣本。

上述所有評估皆自動執行，且不需要手動判讀。系統自動檢查運行有效性和樣本有效性標準，並且在樣本無效或運行無效時，不會報告突變狀態。

Rotor-Gene AssayManager 軟體依據核心分析演算法，例如對應檢測設定檔中定義的標準化、樣本及檢測規則，透過合併所有相關分析結果，決定每個生物標記目標的結果。

可給單個樣本分配下列結果：

- PIK3CA Mutation Detected (檢測到 PIK3CA 突變)
- No Mutation Detected (未檢測到突變)
- INVALID (無效)：如果分析期間 Rotor-Gene AssayManager 軟體給樣本指派了一個或多個標幟，這些標幟定義為將目標結果設定為 INVALID (無效)。

備註：如果運行期間發生錯誤，必須棄置 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 內的樣本，且不得重新檢測。

Rotor-Gene AssayManager *therascreen* PIK3CA Assay Profile 標幟

所有可能與 Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in 對應的標幟，請參閱 *Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in 使用者手冊*。

表 5 列出了 *therascreen* PIK3CA Assay Profiles 可能產生的標幟、其含意，以及要採取的措施。

建立標幟名稱，以提供受影響試劑組成分、受影響樣本或對照組及故障模式的相關資訊。

例如：

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = 陽性對照組 (PC) 對照檢測 (CTRL_ASSAY) 已失敗 (FAIL)。
- NTC_INT_CTRL_FAIL = 無模板對照 (NTC) 內部對照劑 (INT_CTRL) 已失敗 (FAIL)。
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = 樣本 (SAMPLE) 對照檢測 (CTRL) 具有高含量 (HIGH_CONC)。

表 5：PIK3CA Assay Profiles 使用的軟體標幟

標幟	含意	措施
IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	無效運行。 PC 或 NTC 試管中的 IC 值高於規格範圍。 無效樣本。 樣本中的 IC 高於規格範圍。	重複運行。 重新檢測樣本一次；重新檢測後，如果樣本 IC C_T 仍高於可接受範圍，需重新萃取樣本。如果重新萃取和兩輪檢測後，樣本 IC 仍高於可接受範圍，則應報告樣本為不確定。
(PC)_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	無效運行。 PC 高於規格範圍。	重複運行。
(PC)_BELOW_ACCEPTED_RANGE	無效運行。 PC 低於規格範圍。	重複運行。
IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	無效運行。 PC 或 NTC 試管中的 IC 低於規格範圍。 無效樣本。 樣本中的 IC 低於規格範圍	重複運行。 重新檢測樣本一次；重新檢測後，如果樣本 IC C_T 仍低於可接受範圍，需重新萃取樣本。如果重新萃取和兩輪檢測後，樣本 IC 仍低於可接受範圍，則應報告樣本為不確定。
UNEXPECTED_CT_VALUE	無效運行。 在 NTC 中檢測到 C_T 值。	重複運行。
NO_CT_VALUE	無效 PC 或 IC。 PC 試管中的 PC，或 PC 和 NTC 試管中的 IC 沒有 C_T 值。 無效樣本。 樣本中無 C_T 值。	重複運行。 重新檢測樣本一次；重新檢測後，如果仍然沒有樣本 IC C_T ，需重新萃取樣本。如果重新萃取和兩輪檢測後仍然沒有樣本 IC，則應報告樣本為不確定。

表格轉下頁

表 5：PIK3CA Assay Profiles 使用的軟體標幟，續

標幟	含意	措施
DNA_INPUT_TOO_HIGH	無效樣本。 樣本對照 C _T 值低於對照組工作範圍。	樣本過於濃縮且必須稀釋。遵循對照 C _T 值的說明。
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	無效樣本。 樣本對照 C _T 值高於對照組工作範圍。	重新檢測樣本一次；重新檢測後，如果對照 C _T 值仍高於對照組工作範圍，需重新萃取樣本。如果重新萃取和兩輪檢測後，對照 C _T 值仍高於對照組工作範圍，則應報告樣本為不確定。
T1_CONTROL_NO_CT_VALUE	無效樣本。 樣本對照試管內的樣本無 C _T 值。	重新檢測樣本一次；重新檢測後，如果樣本沒有 C _T ，需重新萃取樣本。如果重新萃取和兩輪檢測後，樣本仍無 C _T ，則應報告樣本為不確定。

備註：如果重新檢測時，重新檢測樣本因為不同原因而無效，這仍會歸類為第二次重複，且應執行樣本的重新萃取。

對照 C_T 值

由於對照 C_T 值導致樣本無效，有兩個可能的標幟：

- **DNA_INPUT_TOO_HIGH**：樣本過於濃縮，且會讓突變檢測過載。為了取得有效樣本結果，必須稀釋樣本。稀釋樣本的原則應為，稀釋一半會讓 C_T 增加 1。應使用試劑組中提供的水（稀釋用水 [Dil.]）稀釋樣本。

要計算所需的對照 C_T 偏移 (X_R)，並估計所需的稀釋係數（表 6）：

$$X_R = 25 - X \text{ (FFPE 試樣)}$$

其中 25 可讓稀釋樣本達到目標對照 C_T，而 X 是要稀釋的樣本之實際對照 C_T。

如果 X 不是整數，則進位到下一個整數，例如 2.1 進位到 3.0。此數值為 X_R。從表 6 取得所需的稀釋係數。

表 6：稀釋係數的計算

X_R	稀釋係數	樣本比	稀釋比
1	2 倍	1	1
2	4 倍	1	3
3	8 倍	1	7
4	16 倍	1	15
5	32 倍	1	31
6	64 倍	1	63

- ABOVE_ACCEPTED_RANGE 和 T1_CONTROL_NO_CT_VALUE：DNA 的數量不足以進行突變分析。在足夠 DNA 溶析物可用時 (>30 μ l) 重新檢測樣本。如果重新檢測時 DNA 數量仍然不足，從新鮮 FFPE 切片重新萃取。如果不可行，則應報告樣本為不確定。

效能特性：

分析效能：

在使用自乳癌患者收集之 FFPE 組織試樣，以及檢測帶有已知的 *PIK3CA* 突變的 12 份 FFPE 人類細胞株試樣（FFPE 細胞株試樣），加上一份 *PIK3CA* 野生型試樣（亦即，*therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 在外顯子 7、9 和 20 未檢測到突變）的研究中，已決定 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 的特定效能特性。

空白極限 (Limit of Blank, LoB)：

CLSI 準則 EP17-A2 將 LoB 定義為空白樣本可能觀察到的最高測量結果（且列出機率）。對 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 而言，這是在突變陰性樣本中，對應至 95% 百分位上限的資料點。依據 56 份個別臨床野生型 FFPE 試樣（30 份 RES 試樣和 26 份 CNB 試樣）的分析決定 LoB，以三個 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 批次，針對每份樣本二重複檢測，總計產生 336 個資料點。已驗證 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 檢測的每項突變檢測之 LoB 值（就 ΔC_T 而言），高於每項檢測決定的 ΔC_T 臨界值，並與取得的偽陽性檢出率彙整如下（表 7）。

表 7 : LoB 結果摘要

外顯子	突變	鹼基改變	LoB (ΔC_T 值)	偽陽性檢出率 (%)
7	C420R	1258T>C	7.57	0.94
9	E542K	1624G>A	5.09	1.88
	E545A	1634A>C	13.03	0.00
	E545D	1635G>T	9.19	0.31
	E545G	1634A>G	13.03	0.00
	E545K	1633G>A	6.74	1.57
	Q546E	1636C>G	13.03	0.00
	Q546R	1637A>G	8.72	0.00
20	H1047L	3140A>T	12.63	0.94
	H1047R	3140A>G	9.80	1.25
	H1047Y	3139C>T	7.61	0.63

檢測極限 (Limit of detection, LoD):

已執行一項研究，決定 11 項 *PIK3CA* 突變的個別 LoD。LoD 定義為野生型 DNA 背景下突變型 DNA 的最低量，其中突變型樣本將在 95% 的檢測結果中提供突變陽性結果 (C_{95})。 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit 的 11 項 *PIK3CA* 突變檢測之 LoD 報告為 MAF。為了決定每項突變的 LoD，透過在 FFPE 臨床野生型背景中連續稀釋，在低 DNA 輸入下製備具有不同突變百分比的乳癌 FFPE 臨床試樣或 FFPE 細胞株 DNA。對於每項 *PIK3CA* 突變，使用三個不同的 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit 批次，每五到六個 MAF 水準以每個試劑組檢測 24 份重複樣品，在稀釋濃度範圍內評估正確檢出百分比。使用「probit」方法計算每項檢測的 LoD（圖 8）。已決定每項突變的最終 LoD 值為，所有 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit 批次中的最高數值（就 MAF 而言）。為了驗證 LoD，對確定 LoD 下的突變樣本進行檢測，並在重複性和再現性研究中驗證陽性檢測率。

表 8：使用取自 FFPE 臨床試樣和 FFPE 細胞株試樣的低 DNA 輸入樣本，確立組織試樣的 LoD

外顯子	突變	COSMIC* ID	鹼基改變	LoD (% MAF)
7	C420R	757	1258T>C	2.41 [†]
9	E542K	760	1624G>A	5.47 [‡]
	E545A	12458	1634A>C	3.54 [‡]
	E545D	765	1635G>T	2.69 [‡]
	E545G	764	1634A>G	4.98 [‡]
	E545K	763	1633G>A	4.13 [‡]
	Q546E	6147	1636C>G	4.50 [‡]
	Q546R	12459	1637A>G	6.08 [‡]
20	H1047L	776	3140A>T	2.56 [‡]
	H1047R	775	3140A>G	3.13 [‡]
	H1047Y	774	3139C>T	14.04 [‡]

MAF：突變等位基因頻率。

* COSMIC：癌症體細胞突變目錄：<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>。

[†] LoD 數值使用細胞株試樣的 DNA 確立。

[‡] LoD 數值使用臨床試樣的 DNA 確立。

基因體 DNA 輸入範圍

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 並未使用以分光光度法決定的特定 DNA 濃度。DNA 輸入是依據對照反應 C_T 結果，其用於顯示樣本內具有充足的可擴增 DNA。對照 C_T 工作範圍使用總計 20 份野生型 FFPE 臨床試樣產生的 107 個資料點決定。對照 C_T 工作範圍使用計算所得的容許區間設定。對照反應 C_T 範圍確定為 23.23 至 33.38 C_T 。

DC_T 臨界值

檢測臨界值是一個特定 ΔC_T 值，用於決定是否將樣本歸類為 *PIK3CA* 突變陽性或陰性。產生的 ΔC_T 值等於或低於臨界值之樣本，會歸類為 *PIK3CA* 突變陽性（亦即，*PIK3CA Mutation Detected*（檢測到 *PIK3CA* 突變）），而產生的 ΔC_T 值高於臨界值的樣本，會歸類為 *PIK3CA* 突變陰性（亦即，*No Mutation Detected*（未檢測到突變））。使用細胞株、臨床試樣和預先萃取細胞株 DNA 的混合物，確定每項突變的臨界值。分別針對下列參數選擇臨界值：偽陽性部分、偽陰性部分和檢測靈敏度。

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 內每項檢測的臨界值如圖 9 所示。

表 9：檢測組織試樣的 DNA 時，每項突變檢測之臨界值

檢測	臨界值 (ΔC_t)
C420R	≤ 6.0
E542K	≤ 4.8
E545A	≤ 10.0
E545D	≤ 7.5
E545G	≤ 9.5
E545K	≤ 6.5
Q546E	≤ 10.0
Q546R	≤ 7.0
H1047L	≤ 10.0
H1047R	≤ 7.0
H1047Y	≤ 6.2

DNA 輸入對 ΔC_T 值的影響（線性）：

DNA 輸入含量定義為樣本中的可擴增 DNA 總量，其透過 *PIK3CA* 對照反應的 C_T 值確定。為了確定 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 的效能，在對照反應 C_T 範圍（23.23 至 33.38）一致，以突變陽性樣本評估不同 DNA 輸入含量上下限在對照反應 C_T 工作範圍 (23.23-33.38 C_T) 外的 9 級連續稀釋。此研究使用三種不同試樣類型：臨床 FFPE 切片試樣、細胞株 FFPE 試樣和從細胞株預先萃取的 gDNA。改變 DNA 輸入時，MAF 維持不變。對於每項突變，稀釋等級 1 和 9 的目標 C_T 值分別為約 23.00 和 33.50。兩個數值的目標皆在對照反應 C_T 範圍外。

評估使用一個 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 批次執行，每個 DNA 含量檢測三份重複樣品。資料進行迴歸分析以確定線性範圍。為了判定檢測在 DNA 輸入範圍內的線性， ΔC_T 內範圍不應改變，亦即沒有統計顯著的線性、二次或三次效應。整體而言，對於 E542K、E545D、E545G、E545A、H1047Y、Q546E、C420R 和 H1047R 突變，在不同的總 DNA 輸入含量下測得的 ΔC_T 值，在 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 的工作範圍內一致，亦即這些檢測對於所有測試模型，線性、二次和三次適配並未得到統計顯著 p 值 ($p > 0.05$)。E545K、Q546R 和 H1047L 檢測在測試的 DNA 輸入範圍內， ΔC_T 並非線性。觀察到 E545K 檢測在 C_T 24.08 和 31.02 範圍內具線性。觀察到 Q546R 檢測在 C_T 24.28 和 32.69 範圍內具線性。觀察到 H1047L 檢測在 C_T 25.74 和 31.61 範圍內具線性。一項評估判定非線性效應不會影響 E545K 和 H1047L 檢測的效能。不過判定會對 Q546R 檢測效能產生影響；DNA 輸入高時（約為對照 C_T 23），在 LoD 的樣本可能會檢出偽陰性；不過發生此情況的機率極低，約為 0.0052%。

檢測特異性（交叉反應性/特異性）：

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 包含六種不同的反應混合液：一項單一對照反應，檢測 *PIK3CA* 基因外顯子 15 內的一個區域，以及檢測 *PIK3CA* 突變的 11 項突變檢測。沒有反應專門用於測量外顯子 7、9 或 20 的野生型 *PIK3CA* 序列。*therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 的 No Mutation Detected（未檢測到突變）結果，是依據沒有出現任何陽性突變結果而推斷所得。

為了評估在分析臨界值情境中，檢測是否正確納入檢測突變之間的交叉反應性，已使用三個批次的 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit，在低 DNA 輸入及低 MAF%，和高 DNA 輸入及高 MAF%，二重複檢測突變陽性臨床試樣和細胞株試樣（總計產生 240 個資料點）。在本研究中，E545D 和 H1047R 之間有一例交叉反應性，且 C420R 和 H1047R 之間有一例。在高 MAF 樣本 E545A 和 H1047L 之間，也有四例突變非專一性擴增。整體而言，6/240 個資料點出現突變非專一性擴增。出現突變非專一性擴增的六個資料點為偶發性，且和相同樣本的其他重複樣品不一致。因此並未認定這些結果為交叉反應結果。不過在 H1047L 和 H1047R 之間觀察到 PCR 交叉反應。這項交叉反應為單向，亦即如果看到雙重 H1047R 和 H1047L 樣本，只會報告為 H1047R Mutation Detected（檢測到 H1047R 突變）。此規則已納入自動化的 *therascreen*_PIK3CA_FFPE Assay Profile 演算法內。

干擾：

壞死組織的影響

為了評估乳癌 FFPE 試樣中的壞死組織含量，對於 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 效能的可能影響，同時以 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 和次世代定序 (Next Generation Sequencing,NGS) 結果分析 SOLAR-1 的 FFPE 臨床試樣。總計評估評估 180 份 NGS 判定為 *PIK3CA* 突變陰性的試樣，和 199 份 NGS 判定為 *PIK3CA* 突變陽性的試樣，包括 CNB 和 RES 試樣。突變陰性樣本由病理學家判定的壞死百分比從 0 到 10%，而突變陽性樣本為 0 至 20%。

對於突變陽性和突變陰性 FFPE 試樣，都有 20 份樣本的 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 結果，與預期的 NGS 結果不一致。這些結果來自壞死含量不到 5% 的 17 份突變陰性和 2 份突變陽性樣本，以及壞死含量不到 10% 的 1 份突變陰性樣本；因此壞死不太可能是不一致結果的原因。結果支持將 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 用於壞死組織含量 20% 以下的乳癌 FFPE 試樣。

血紅素和外生性物質的影響

已透過比較每項突變外加干擾物和添加對照組萃取物之間的 ΔC_{tr} ，以及比較野生型 DNA 樣本的正確檢出，測量 FFPE 萃取試劑組（外生性物質）或樣本本身（血紅素）的潛在干擾物質，對於檢測效能的影響。

測試的 DNA 萃取過程中出現之外生性物質為：

- 石蠟
- 二甲苯
- 乙醇
- Buffer ATL
- 蛋白酶 K
- Buffer AL
- Buffer AW1

- Buffer AW2

外加外生性干擾物的樣本先標準化至 C_T 30.00，然後以野生型（也標準化至 to C_T 30.00）稀釋，以得到代表 $3x$ LoD 之 MAF 下預期之 ΔC_T 。萃取期間外加血紅素（內生性干擾物）的樣本，在突變評估前並未標準化至 C_T 30.00 或稀釋至 $3x$ LoD，不過在萃取後立即使用。這是為了避免去除干擾物可能已經引入的任何差異。

研究要求製備一個檢測樣本組和一個空白樣本組（外生性物質使用 Buffer ATE，血紅素使用水）。檢測樣本組包括外加干擾物的所有突變和野生型樣本。空白樣本組包括外加適當對照組物質的突變和野生型樣本。以血紅素檢測的樣本，在萃取過程中外加，以反映經由 FFPE 樣本可能引入的物質。血紅素的檢測濃度，以及萃取過程中使用的估計組織體積，是依據 CLSI 準則而定（CLSI EP7-A2，附錄 D，2005，臨床化學中的干擾檢測；核准的準則）。EP07-A，附錄 D，2005 中所列的血紅素建議檢測濃度為 2 mg/ml。以潛在外生性干擾物檢測的樣本，在標準化至 C_T 30.00 且稀釋至 $3x$ LoD 後外加，濃度代表帶入樣本中的最高（最嚴重情況）可行干擾物質濃度（ $10x$ 濃度）。總計每個樣本/干擾物組合，以一個 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 批次重複檢測六次。突變和野生型樣本中的所有突變檢出符合預期。外加和對照樣本之間觀察到顯著差異時，在檢測的可接受中間精確度內，且因此在檢測既有的變異性內。結果證實這些物質不會干擾 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 的檢出結果。

批次互換性

therascreen PIK3CA RGQ PCR 系統利用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit，用於分離 DNA，以及 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 用於擴增 DNA 和檢測 *PIK3CA* 突變狀態。使用三個批次的 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 和三個批次的 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit，證實了批次間的再現性。各批次間對於所有突變陽性和野生型樣本的整體正確檢出百分比為 96.8% (363/375)。

試樣處理

使用取自 11 個 FFPE 試樣塊的切片，檢視了 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 的再現性：四個 *PIK3CA* 突變臨床乳癌試樣、六個 *PIK3CA* 突變細胞株試樣和一個野生型臨床乳癌試樣。對於每份試樣，在三個實驗室，由兩位操作員重複三次萃取，每份試樣產出總計 18 個資料點。在每個實驗室，使用一個批次的 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 和一個批次的 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 試劑進行檢測。所有有效的突變和野生型試樣結果，皆產生預期的整體突變狀態結果（每份試樣的正確檢出皆為 100%，18/18）。在專一性 *PIK3CA* 突變檢出中，正確檢出的比例為 97.92%，支持 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 在 DNA 分離的分析前步驟之再現性及重複性。

重複性和再現性

透過檢測從 *PIK3CA* 突變 E542K、E545G、E545K、H1047L、H1047R 和 Q546R 之 FFPE 臨床乳癌試樣，以及從 *PIK3CA* 突變 C420R、E545A、E545D、H1047Y、Q546E 和 Q546R 之細胞株 FFPE 樣本萃取的 DNA，評估了 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 的精確度和再現性。研究中也納入野生型 FFPE 臨床乳癌試樣（表 11）。

為了證實重複性，在一個實驗室（位於英國），由三位操作員在非連續的 20 天內，每天兩次運行二重複檢測兩個突變水平（LoD 和 3x LoD）的樣本，導致 120 個資料點，LoD 下的 E545A 和 Q546R *PIK3CA* 突變樣本除外。LoD 下 E545A 和 Q546R 突變的樣本，連續六天在一個實驗室由三位操作員進行評估，進行兩次運行並重複四次，總計進行 144 次測量，以證實重複性。對於再現性，連續 10 天在另外兩個實驗室（皆位於美國），由每位操作員

(每個實驗室三位操作員) 每天執行兩次運行，為每個額外實驗室產生額外 60 個資料點，LoD 下的 E545A 和 Q546R *PIK3CA* 突變樣本除外。LoD 下的 E545A 和 Q546R *PIK3CA* 突變樣本，連續六天在另外兩個實驗室，由三位操作員評估，進行兩次運行且重複四次，每個實驗室總計進行 144 次測量，三個實驗室總計 432 次測量。在每個實驗室，使用兩個 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit 批次 (三個實驗室共三個批次) 檢測樣本。使用一到兩個批次的 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 從 FFPE 試樣萃取 DNA。在低 DNA 輸入含量下製備樣本，目標對照 C_T 值約為 30。

突變陽性樣本僅用對照反應混合液及目標突變的相關反應混合液運行。野生型樣本以所有反應混合液運行。如需建立突變陽性和野生型的樣本，從單一臨床試樣進行了多次萃取，並合併以產生研究設計所需的樣本量。使用 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit 進行測試，採用的臨床試樣先前已確認為 *PIK3CA* 突變陽性或陰性。

對於每份樣本，重複性之正確檢出比例如表 10 所示，而再現性之正確檢出比例如表 11 所示。

表 10：檢測重複性 - 從 FFPE 組織試樣取得之 DNA 樣本中檢測的 *PIK3CA* 突變之正確檢出比例

外顯子	突變	突變水平	有效結果的部分比例	正確檢出率，%	雙側 95% CI 下限
NA	野生型	NA	108/120	90.00	83.18
7	C420R	LoD	120/120	100.00	96.97
		3x LoD	120/120	100.00	96.97
9	E542K	LoD	119/119	100.00	96.95
		3x LoD	120/120	100.00	96.97
	E545A	LoD*	144/144	100.00	97.47
		3x LoD	120/120	100.00	96.97
	E545D	LoD	120/120	100.00	96.97
		3x LoD	120/120	100.00	96.97
	E545G	LoD	120/120	100.00	96.97
		3x LoD	120/120	100.00	96.97
	E545K	LoD	118/120	98.33	94.11
		3x LoD	120/120	100.00	96.97
	Q546E	LoD	120/120	100.00	96.97
		3x LoD	120/120	100.00	96.97
Q546R	LoD*	139/140	99.29	96.08	
	3x LoD	119/119	100.00	96.95	
20	H1047L	LoD	117/120	97.50	92.87
		3x LoD	120/120	100.00	96.97
	H1047R	LoD	120/120	100.00	96.97
		3x LoD	120/120	100.00	96.97
	H1047Y	LoD	117/120	97.50	92.87
		3x LoD	120/120	100.00	96.97

NA：不適用。

* LoD 下的 E545A 和 Q546R *PIK3CA* 突變樣本，連續六天在一個實驗室由三位操作員進行評估，進行兩次運行並重複四次，總計進行 144 次測量。

表 11：檢測再現性 - 從 FPPE 組織試樣取得之 DNA 樣本中檢測的 *PIK3CA* 突變之正確檢出比例

外顯子	突變	突變水平	有效結果的部分比例	正確檢出率，%	雙側 95% CI 下限
NA	野生型	NA	222/240	92.50	88.41
7	C420R	LoD	240/240	100.00	98.47
		3x LoD	240/240	100.00	98.47
9	E542K	LoD	237/239	99.16	97.01
		3x LoD	240/240	100.00	98.47
	E545A	LoD*	431/432	99.77	98.73
		3x LoD	240/240	100.00	98.47
	E545D	LoD	238/240	99.17	97.02
		3x LoD	240/240	100.00	98.47
	E545G	LoD	240/240	100.00	98.47
		3x LoD	240/240	100.00	98.47
	E545K	LoD	238/240	99.17	97.02
		3x LoD	240/240	100.00	98.47
	Q546E	LoD	240/240	100.00	98.47
		3x LoD	240/240	100.00	98.47
Q546R	LoD*	421/424	99.29	97.95	
	3x LoD	239/239	100.00	98.47	
20	H1047L	LoD	230/240	95.83	92.47
		3x LoD	240/240	100.00	98.47
	H1047R	LoD	240/240	100.00	98.47
		3x LoD	240/240	100.00	98.47
	H1047Y	LoD	234/240	97.50	94.64
		3x LoD	240/240	100.00	98.47

NA：不適用。

* LoD 下的 E545A 和 Q546R *PIK3CA* 突變樣本，連續六天在三個實驗室由三位操作員進行評估，進行兩次運行並重複四次，每個實驗室總計進行 144 次測量，總計 432 次測量。

針對重複性和再現性，使用一項變異數分量分析，估計試劑組之間、運行之間、操作員之間、儀器之間、每日之間和運行內變異性的標準差。在所有變異數分量中，對於在再現性檢測中檢測的所有 *PIK3CA* 突變，在 LoD 下的總標準差 (Standard Deviation, SD) 為 $\leq 1.32 \Delta C_T$ ，而在 3x LoD 下為 $\leq 0.63 \Delta C_T$ 。在所有突變檢測組成員中，批次間（批次互換性）在 LoD 下的 SD 為 $\leq 0.17 \Delta C_T$ ，在 3x LoD 下為 $\leq 0.16 \Delta C_T$ 。運行內變異性（重複性）在 LoD 下的 SD 為 $\leq 1.24 \Delta C_T$ ，在 3x LoD 下為 $\leq 0.53 \Delta C_T$ 。

交叉污染/分析夾帶

本研究的目的是，在 *PIK3CA* 突變陰性樣本旁檢測高 *PIK3CA* 突變陽性樣本時，評估 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit*。此研究評估整個檢測過程中（DNA 萃取和後續以 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 檢測）的交叉污染可能性。

此研究以 H1047R（盛行率最高的突變）和野生型 FFPE 細胞株試樣進行。兩個獨立樣本組分別稱為 Set A（A 組）和 Set B（B 組），以設計引入樣本交叉污染風險的預先定義萃取基質培養後，進行萃取。由兩位操作員進行萃取。突變陽性 (H1047R) 樣本總計進行 18 次萃取（每組 9 次）。野生型樣本總計進行 42 次萃取（每組 21 次）。以 10 次 PCR 運行評估萃取物的突變狀態；每個樣本組由同一位操作員使用相同設備和 Rotor-Gene Q 儀器連續設定 5 次，這些運行之間並未使用此儀器進行其他運行設定。萃取物以對照檢測反應混合液（*therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 試管 1）和目標突變（*therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 試管 6）進行檢測。

有效野生型樣本觀察到的正確突變檢出百分比為 100%，證實野生型樣本並未受到採用相同 DNA 萃取和運行設定程序的突變樣本交叉污染。

準確度：與參考分析方法進行比較

為了證實 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 相對於驗證過 NGS 檢測的準確度，使用 SOLAR-1 試驗中隨機分配且具有充足數量試樣，可用 NGS 對照檢測進行檢測的乳癌患者之 FFPE 臨床試樣，進行一項準確度試驗。在這 453 份臨床試樣中，385 達到 NGS 對照試樣的組織體積和腫瘤含量要求，而 379 產出有效 NGS 結果。

分析同時具有 NGS 和 *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* 有效結果的樣本，以 NGS 做為基準，評估陽性一致性百分比 (Positive Percent Agreement, PPA)、陰性一致性百分比 (Negative Percent Agreement, NPA) 和總體一致性百分比 (Overall Percent Agreement, OPA)。這些百分比加上使用 Clopper-Pearson Exact 法計算相應的雙側 95% 信賴區間 (Confidence Interval, CI)，總結於表 12。

表 12：FFPE 組織試樣之一致性分析

測量	一致性百分比 (N)	雙側 95% CI
陽性一致性百分比	99.0 (197/199)	96.4，99.9
陰性一致性百分比	90.0 (162/180)	84.7，94.0
總體一致性百分比	94.7 (359/379)	92.0，96.7

在 20 份總體突變狀態不一致的結果中，兩份 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 陰性結果樣本具有 NGS 陽性結果，而 18 份 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 陽性結果樣本得到 NGS 陰性結果。在具有 NGS 陽性結果的兩份 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 陰性結果樣本中，皆由 NGS 在低於 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit LoD 的 MAF 含量下檢測出來。在 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 判定為陽性，而 NGS 為陰性的 18 份樣本中，11 份為低度陽性（使用 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit，在臨界值的一個 ΔC_T 內，因此為低度陽性樣本）。一例由 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 檢測為 H1047L (3140A>T)，但 NGS 檢測為 H1047I (3139_3140CA>AT)。其他六例不一致結果的潛在原因不明。

表 13 顯示以 NGS 做為正交方法的目標之 PPA。

表 13：依據特定突變區分的 FFPE 組織試樣之一致性分析

突變*	陽性一致性百分比 (N)	雙側 95% CI
C420R	100.0 (4/4)	39.8，100.0
E542K	100.0 (27/27)	87.2，100.0
E545G	100.0 (3/3)	29.2，100.0
E545K	100.0 (49/49)	92.7，100.0
E545A	100.0 (2/2)	15.8，100.0
Q546E	100.0 (1/1)	2.5，100.0
Q546R	50.0 (1/2)	1.3，98.7
H1047L	100.0 (12/12)	73.5，100.0
H1047R	98.1 (101/103)	93.2，99.8

* 全部 11 項 PIK3CA 突變皆在 SOLAR-1 試驗（表 14）的組織試樣中檢測出來。

臨床效能

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 可用作為伴隨診斷測試，以輔助臨床人員依據臨床 FFPE 乳癌組織試樣中，是否出現一項或更多 *PIK3CA* 突變，識別可能接受 PIQRAY (alpelisib) 治療的乳癌患者。

臨床結果資料

SOLAR-1 試驗 (CBYL719C2301) 是一項隨機分配、雙盲、安慰劑對照、國際合作、多中心第三期臨床試驗，針對罹患 HR+、HER2 陰性晚期乳癌，芳香酶抑制劑治療期間或之後惡化的男性和停經後女性，評估 PIQRAY (alpelisib) 加上 fulvestrant，相對於安慰劑加上 fulvestrant 治療之療效與安全性。總計 572 位乳癌患者納入為兩個群體，帶有或未帶有 *PIK3CA* 突變。患者以 1:1 比例隨機分配接受 PIQRAY (alpelisib) 300 mg 加上 fulvestrant，或安慰劑加上 fulvestrant。隨機分配依據是否出現肺及/或肝轉移，以及先前 CDK4/6 抑制劑治療進行分層。

試驗的主要評估指標為，對於納入時帶有 *PIK3CA* 突變的晚期乳癌患者，試驗主持人使用實體腫瘤治療反應評估標準 (RECIST v1.1) 評估之無惡化存活期 (Progression-Free Survival, PFS)。其他次要評估指標包括未帶有 *PIK3CA* 突變患者的 PFS，以及各 *PIK3CA* 群體（亦即帶有或未帶有 *PIK3CA* 突變）的整體存活期 (Overall Survival, OS)、整體治療反應率 (Overall Response Rate, ORR) 和臨床效益率 (Clinical Benefit Rate, CBR)。

患者篩選及納入時的 *PIK3CA* 突變狀態，由中央實驗室以臨床試驗檢測 (CTA) 或 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit，檢測 FFPE 乳癌腫瘤試樣而判定。在 SOLAR-1 試驗隨機分配的 572 位患者中，177 位患者（試驗族群的 30.9%，包括 172 位 *PIK3CA* 突變陽性和 5 位 *PIK3CA* 突變陰性患者）使用 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 隨機分配。其他全部患者 (395) 使用 CTA 隨機分配（試驗族群的 69.1%，包括 169 位 *PIK3CA* 突變陽性和 226 位 *PIK3CA* 突變陰性患者）。

在 *PIK3CA* 突變群體中，依據試驗主持人使用 RECIST 1.1 評估之 PFS 主要評估指標，證實 PIQRAY (alpelisib) 合併 fulvestrant 優於單獨使用 fulvestrant。估計 PIQRAY (alpelisib) 加上 fulvestrant 組，相對於安慰劑加上 fulvestrant 組，疾病惡化或死亡的風險差為 35% (風險比 [HR] = 0.65; 95% CI : 0.50, 0.85; p = 0.0013, 依據雙側分層對數秩檢定)。PFS 中位數延長具臨床意義的 5.3 個月，從安慰劑加上 fulvestrant 組的 5.7 個月，延長至 PIQRAY (alpelisib) 加上 fulvestrant 組的 11.0 個月 (圖 20)。

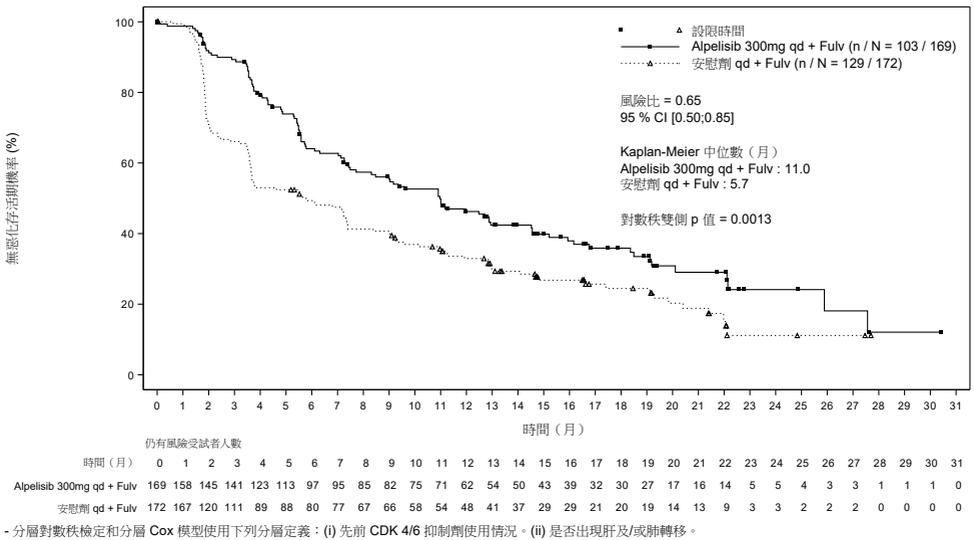


圖 20：SOLAR-1 試驗中隨機分配的 *PIK3CA* 突變患者，不同治療的 PFS 之 Kaplan-Meier 圖。

使用 CTA 隨機分配的 395 位患者之樣本，以 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit 進行回溯性重新檢測，並產出 389 份 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit (98.5%) 可評估的樣本，而 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit 無法評估六份患者樣本 (表 15)。

表 14：SOLAR-1 臨床試驗中，*therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 在組織試樣中檢測出來的 *PIK3CA* 突變盛行率

外顯子	突變*	COSMIC ID [†]	鹼基改變	FFPE 組織試樣中的 頻率 N = 374 (%)
7	C420R	757	1258 T>C	6 (1.6)
9	E542K	760	1624 G>A	66 (17.6)
	E545A	12458	1634 A>C	4 (1.1)
	E545D	765	1635 G>T	6 (1.6)
	E545G	764	1634 A>G	9 (2.4)
	E545K	763	1633 G>A	91 (24.3)
	Q546E	6147	1636 C>G	1 (0.3)
	Q546R	12459	1637 A>G	2 (0.5)
20	H1047L	776	3140 A>T	24 (6.4)
	H1047R	775	3140 A>G	160 (42.8)
	H1047Y	774	3139 C>T	5 (1.3)

* 一位 *PIK3CA* 突變陽性患者，可能具有超過一項突變。

[†] COSMIC：癌症體細胞突變目錄：<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>。

N = SOLAR-1 試驗中由 FFPE 組織試樣識別的 *PIK3CA* 突變陽性患者人數。

表 15：回溯性重新檢測 (CTA 納入) 受試者的分佈 (全分析資料集, CTA 納入)

<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit 結果	CTA 陽性 (N = 169)	CTA 陰性 (N = 226)	總計 (N = 395)
Valid (有效)	169 (100.0%)	220 (97.3%)	389 (98.5%)
Positive (陽性)	164 (97.0%)	11 (4.9%)	175 (44.3%)
Negative (陰性)	5 (3.0%)	209 (92.5%)	214 (54.2%)
Invalid (無效)	0 (0%)	6 (2.7%)	6 (1.5%)

為了評估 CTA 和 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 之間的一致性，計算一致性指標 PPA、NPA 和 OPA，以及個別的雙側 Clopper-Pearson Exact 95% 信賴區間。

表 16 顯示以 CTA 做為基準的 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 可評估子集，顯示 CTA 和 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 結果之間高度一致。

表 17 使用 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 做為基準，並顯示 CTA 和 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 結果之間高度一致。

表 16 : *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 相對於 CTA (使用 CTA 做為基準)

一致性指標	一致性百分比, %	雙側 95% CI
陽性一致性百分比 (Positive Percent Agreement, PPA)	97.0	93.2, 99.0
陰性一致性百分比 (Negative Percent Agreement, NPA)	95.0	91.2, 97.5
總體一致性百分比 (Overall Percent Agreement, OPA)	95.9	93.4, 97.6

表 17 : *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 相對於 CTA (使用 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 做為基準)

一致性指標	一致性百分比, %	雙側 95% CI
陽性一致性百分比 (Positive Percent Agreement, PPA)	93.7	89.0, 96.8
陰性一致性百分比 (Negative Percent Agreement, NPA)	97.7	94.6, 99.2
總體一致性百分比 (Overall Percent Agreement, OPA)	95.9	93.4, 97.6

表 18 顯示由於 CTA 突變陰性患者中缺漏 6 份 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 結果，而重新計算以調整富集的 PPA、NPA 和 OPA 估計值。

表 18 : *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 相對於 CTA (使用 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 做為基準)

一致性指標	一致性百分比, %	雙側 95% CI
陽性一致性百分比 (Positive Percent Agreement, PPA)	93.6	90.1, 97.0
陰性一致性百分比 (Negative Percent Agreement, NPA)	97.7	95.6, 99.5
總體一致性百分比 (Overall Percent Agreement, OPA)	95.9	93.8, 97.8

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 的臨床效用之主要 PFS 分析，證實具有與 SOLAR-1 試驗決定者類似的臨床療效。*therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 突變陽性患者子集 (347 位患者) 的分析證實，隨機分配至 PIQRAY (alpelisib) 加上 fulvestrant 組的患者，相較於隨機分配至安慰劑加上 fulvestrant 組的患者，疾病惡化或死亡的估計風險降低 36% (HR = 0.64; 95% CI: 0.48, 0.85)。

靈敏度分析評估 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 的缺漏資料對 PFS 的影響，並證實對於缺漏資料，結果維持穩健。例如假設缺漏的六例 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 結果與 CTA 結果不一致，隨機分配到 PIQRAY (alpelisib) 加上 fulvestrant 組的 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 突變陽性患者，相較於隨機分配到安慰劑加上 fulvestrant 組的患者，疾病惡化或死亡的估計風險降低 37% (HR = 0.63; 95% CI [0.47, 0.84])。

所有 CTA 納入的突變陽性患者，皆可用 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 評估，且只有六位 CTA 納入的突變陰性患者無法用 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 評估。因此透過試驗樣本可評估性，結果並無偏差。

也在 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit 陰性族群中估計過 PFS，而這些患者並未觀察到 PFS 效益 (HR = 0.85; 95% CI: 0.58, 1.25)。

疑難排解指南

本疑難排解指南對解決發生的任何問題都可能有用。關於技術支援和更多資訊，請瀏覽 www.qiagen.com/support 網頁上的技術支援中心（如需聯絡資訊，請瀏覽 www.qiagen.com）。

意見和建議

陽性對照組 (Positive Control, PC) 中的 No C_T value (無 C_T 值) 標幟

- a) PCR 的配置不正確 檢查移液方案並重複 PCR。

- b) 一個或多個試劑組組分的儲存條件與 試劑儲存與處理，第 21 頁的說明不一致 檢查試劑的儲存條件（參見試劑組標籤），必要時使用新的試劑組。

NTC 中的 Unexpected C_T value (非預期 C_T 值) 標幟

- PCR 準備期間發生污染 確認區域已清潔消毒。以新的試劑重複 PCR。如果可能，在加入待檢測樣本後直接蓋上 PCR 管。工作區和儀器務必定期清潔消毒。

PC 中的 Above acceptable range (高於可接受範圍) 或 Below acceptable range (低於可接受範圍) 標幟

- PCR 準備期間發生錯誤 重複 PCR 確保準確移液。

樣本試管中的 DNA input too high (DNA 輸入過高) 標幟

- 樣本過度濃縮 稀釋樣本以增加 C_T 值。應使用試劑組中提供的水（稀釋用水 [Dil.]）稀釋樣本。

樣本試管中的 Above acceptable range (高於可接受範圍) 標幟

- 樣本中的起始 DNA 模板不足 **組織試樣：**再一次重新檢測。如果系統第二次顯示相同的標幟，從相同的切片組織試樣使用兩塊玻片，CNB 使用適當數量的玻片，再度萃取 DNA 以取得 20 mm²，然後重複 PCR。如果重新萃取後，系統為樣本顯示相同標幟，第二次重新檢測。如果標幟再度發生，則樣本不適合使用。應記錄為不確定，且不再進行後續檢測。

意見和建議

樣本試管中的 IC above acceptable range (內部對照高於可接受範圍) 標幟

PCR 準備期間發生錯誤，
或反應中出現抑制劑

組織試樣：再一次重新檢測。如果系統第二次顯示相同的標幟，從相同的切片組織試樣使用兩塊玻片，或 CNB 使用適當數量的玻片，再度萃取 DNA 以取得 20 mm²，然後重複 PCR。如果重新萃取後，系統為樣本顯示相同標幟，第二次重新檢測。如果標幟再度發生，則樣本不適合使用。應報告為不確定，且不再進行後續檢測。

T1 對照 (樣本) 中的 No C_T value (無 C_T 值) 標幟

樣本中沒有可擴增 DNA
模板

組織試樣：再一次重新檢測。如果系統第二次顯示相同的標幟，從相同的切片組織試樣使用兩塊玻片，或 CNB 使用適當數量的玻片，再度萃取 DNA 以取得 20 mm²，然後重複 PCR。如果重新萃取後，系統為樣本顯示相同標幟，第二次重新檢測。如果標幟再度發生，則樣本不適合使用。應記錄為不確定，且不再進行後續檢測。

參考資料

1. Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., et al. (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17, 615.
2. Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., et al. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 304, 554.
3. Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 490, 61.
4. National Breast Cancer Foundation (2018). Breast cancer facts. Available at: www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-facts. Accessed: 14 January 2019.
5. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* 68, 7.
6. Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., et al. (2018). European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 29, 1016.

聯絡資訊

有關技術協助和更多資訊，請瀏覽我們的技術支援中心（www.qiagen.com/Support）、撥打 00800-22-44-6000 或者聯絡 QIAGEN 技術服務部門或當地的經銷商（參閱封底或瀏覽 www.qiagen.com）。

符號

包裝和標籤上可能出現以下符號：

符號

符號定義



歐盟符合性標記



含有足夠進行 <N> 次反應的試劑



用於



體外診斷醫療器材



產品編號



批號



材料編號



成分



內含物



數量



避光



全球交易品項識別代碼

Rn

R 是表示使用說明（手冊）的修訂版而 n 是修訂版號



溫度限制

符號

符號定義



製造商



參閱使用說明



警示

訂購資訊

產品	內容物	產品編號
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (24)	24 次反應：6 份反應混合液、陽性對照組、 <i>Taq</i> DNA 聚合酶、NTC 用水和樣本稀釋用水	873111
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 次 DNA 製備：QIAamp MinElute® 管柱、蛋白酶 K、緩衝液和 Collection Tubes (2 ml)	60404
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 和配件		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyclers 和 High Resolution Melt analyzer，帶有 5 個通道（綠色、黃色、橙色、紅色、深紅色），外加 HRM 通道、膝上型電腦、軟體、配件：含 1 年期部件保固和人力服務，不含安裝和訓練	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyclers 和 High Resolution Melt analyzer，帶有 5 個通道（綠色、黃色、橙色、紅色、深紅色），外加 HRM 通道，膝上型電腦，軟體，配件：含 1 年期部件保固和人力服務、安裝和訓練	9002033
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 個用於 1000 次反應的 20–50 µl 薄壁試管	981005

Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 × 250 個 4 連排管，以及用於 10,000 次反應的蓋	981106
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	帶有 72 x 0.1 ml 試管的鋁塊，使用單通道微量滴管進行手動反應設定	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes	帶有 96 x 0.2 ml PCR 試管的鋁塊，使用單通道微量滴管進行手動反應設定	9018905
72-Well Rotor	用於盛裝反應體積為 10–50 μ l 的 Strip Tubes and Caps, 0.1 ml；需要鎖環 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	用於將 Strip Tubes and Caps, 0.1 ml 鎖定在 72-Well Rotor 中	9018904

有關於最新的授權資訊和個別產品的免責聲明，請參閱各 QIAGEN 試劑組使用手冊或使用者手冊。QIAGEN 試劑組使用手冊和使用者手冊可從 www.qiagen.com 下載，或向 QIAGEN 技術服務部或您當地經銷商索取。

文件修訂歷程記錄

日期	變更
R1, 2020 年 11 月	首次發佈
R2, 2021 年 11 月	全面刪除與使用 PIK3CA 試劑組檢測血漿試樣 DNA 有關的參考資料及說明

此頁刻意留白

此頁刻意留白

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit 的有限授權合約

使用本產品表示產品的購買者或使用者同意以下條款：

1. 本產品僅可根據產品提供的操作程序和本手冊，與試劑組中包含的組分搭配使用。除了本產品隨附的操作程序、本使用手冊以及 www.qiagen.com 中提供的其他操作程序中所述的情況，QIAGEN 並未在其任何知識產權下許可將本試劑匣的所含組分與本試劑匣中未包含的任何組分協同使用或者相整合。其中一些附加操作程序可能是由 QIAGEN 使用者為 QIAGEN 使用者所提供，這些操作程序未經 QIAGEN 全面測試或優化。QIAGEN 既不擔保也不保證這些操作程序不會侵犯第三方的權利。
2. 除了特別聲明的許可外，QIAGEN 不保證本試劑組和/或其使用不會侵犯第三方的權利。
3. 本試劑組及其組分僅供一次使用，不得重複使用、翻新或再銷售。
4. 除了特別聲明的授權外，QIAGEN 明確否認全部明示或暗示的任何其他授權。
5. 本試劑組的購買者和使用者同意不會採取或允許他人採取可導致或促成以上所禁止行為的任何措施。QIAGEN 得於任何法庭強制執行本合約相關禁止規定，並追討所有調查和訴訟費用 (包括律師費)，以行使本「有限授權合約」或保護試劑組及其中成分的智慧財產權。

購買者須知：購買此產品授予購買者有限、不得轉移的權利，僅可在人類診斷領域，針對伴隨的 QIAGEN

儀器手冊或包裝說明中所列目的，僅使用此數量的產品，操作已取得專利之肽核酸 (Peptide Nucleic Acid, PNA) 程序。購買此產品後，購買者同意不會：(1) 以任何形式轉賣產品；(2) 將產品用於法醫鑑識應用；或 (3) 將產品用於有限使用標示授權所列項目以外之目的。關於取得 Applied Biosystems LLC 持有專利之權利的詳細資訊，可聯絡授權部門 (Licensing Department, Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad CA 92008) 取得；電話 (760) 603-7200；電子郵件 outlicensing@lifetech.com。

有關最新許可條款和產品專屬免責聲明，請參閱 www.qiagen.com。

商標：QIAGEN®、Sample to Insight®、QIAamp®、MinElute®、Rotor-Gene®、Rotor-Gene AssayManager®、*therascreen*® (QIAGEN 集團)；DNAzap™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)；PIQRAY® (Novartis AG)。即使未特別標明，本文件中使用的註冊名稱、商標等也不應視為不受法律保護。

1127106 Nov-21 HB-2635-TW-001 © 2021 QIAGEN · 保留所有權利。

