

受理号：CSZ2200142

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：非小细胞肺癌组织 TMB 检测试剂盒（可逆末端终止测序法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：南京世和医疗器械有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息.....	3
一、 申请人名称.....	3
二、 申请人住所.....	3
三、 生产地址.....	3
技术审评概述.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究概述.....	6
三、 临床评价概述.....	10
四、 产品受益风险判定.....	14
综合评价意见.....	16

基本信息

一、申请人名称

南京世和医疗器械有限公司

二、申请人住所

南京市江北新区华康路 128 号 A 座 6 层

三、生产地址

南京高新技术产业开发区新锦湖路 3 号-1 中丹生态生命科学产业园一期 A 栋 7 楼 701、707-1、708-712, B 栋 22 楼 2208-2209

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

产品试剂盒由以下组分组成，主要组成成分见下表。

表 1 试剂盒主要组成成分

组分编号	组分名称	24 人份/盒	主要组成成分
B1	TMB 修复缓冲液	84 μ L*1 管	Mg ²⁺ 、Tris、dNTPs
E1	TMB 修复反应液	36 μ L*1 管	DNA 聚合酶、多核苷酸激酶
E2	TMB 连接酶	120 μ L*1 管	DNA 连接酶
B2	TMB 连接缓冲液	360 μ L*1 管	PEG6000、Mg ²⁺ 、Tris
DA01-DA48	TMB 双标签接头 1-48	5 μ L*48 管	寡核苷酸
E3	TMB PCR 扩增反应液	800 μ L*1 管	DNA 聚合酶
P1	TMB PCR 扩增引物	160 μ L*1 管	寡核苷酸
P2	TMB 富集探针	10 μ L*1 管	寡核苷酸
B3	TMB DNA 封闭液	80 μ L*1 管	寡核苷酸
S1	TMB 封闭序列	8 μ L*1 管	寡核苷酸
B4	TMB 杂交缓冲液 1	30 μ L*1 管	四甲基氯化铵
B5	TMB 杂交缓冲液 2	12 μ L*1 管	甲酰胺
W1	TMB 清洗缓冲液 1	120 μ L*1 管	十二烷基硫酸钠
W2	TMB 清洗缓冲液 2	80 μ L*1 管	柠檬酸钠
W3	TMB 清洗缓冲液 3	80 μ L*1 管	柠檬酸钠
W4	TMB 清洗缓冲液 4	160 μ L*1 管	乙二醇四乙酸
BW	TMB 磁珠清洗液	1000 μ L*1 管	柠檬酸钠
MB	TMB 磁珠	200 μ L*1 管	M270 链霉亲和素磁珠
NC	TMB 阴性对照品	40 μ L*1 管	健康人细胞系 DNA、TE 缓冲液
PC	TMB 阳性对照品	40 μ L*1 管	细胞系 DNA 混合液、TE 缓冲液

注：同一组分不同批号不能混用。

(二) 产品预期用途

本产品用于体外定性检测 EGFR 基因突变阴性和 ALK 阴性的非鳞状非小细胞肺癌患者经福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）组织样本中的肿瘤突变负荷（TMB）。

针对抗肿瘤药物卡瑞利珠单抗，本产品的检测结果与免疫组相对于化疗组的无进展生存期的延长相关，免疫组为卡瑞利珠单抗与化疗药联合使用，化疗组为仅使用化疗药物。

本产品的检测结果仅供临床参考，不应作为医生决策的唯一依据，临床医生应结合患者临床情况进行综合判定。

肿瘤突变负荷(tumor mutation burden)是一个独立的免疫检查点抑制剂治疗疗效预测标志物，多项临床研究证实了 TMB 对 NSCLC 中使用多种免疫检查点抑制剂疗效均有一定预测作用。CheckMate 026、CheckMate 227 的研究结果显示，与化疗组相比，高 TMB 亚组患者使用 Nivolumab 治疗后有更长的无进展生存期和更高的客观缓解率。KEYNOTE-010、KEYNOTE-042 研究的高 TMB 患者中，Pembrolizumab 对比化疗，可显著延长患者总生存期，提示高 TMB 能够富集免疫治疗获益人群。

（三）产品包装规格

24 人份/盒

（四）产品检验原理

本产品对从肿瘤福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）组织样本中提取的核酸（DNA）进行片段化、接头连接及 PCR 扩增、制备文库。其后采用具有特定序列的 DNA 探针与文库进行杂交，从而特异性捕获

探针目标区域 DNA 片段，包含人类基因组 425 个基因；再通过磁珠法对这些片段进行富集。在对捕获富集后的文库进行定量与质控后，再采用测序仪进行高通量测序。对于测序数据，采用生物信息学软件分析判读样本中肿瘤突变负荷（TMB）。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括：双标签接头、PCR 扩增引物、富集探针、链霉亲和素磁珠、细胞系 DNA 等，这些原材料均为外购方式获得。

其中富集探针为申请人自行设计后由专业的合成公司合成并纯化获得。细胞系 DNA 由供应商提取纯化获得。

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

2. 企业参考品和对照品的设置情况

企业参考品针对 TMB 状态和基因变异进行了设置，包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品、重复性参考品、差异化参考品，共 15 支。其中：阳性参考品包括不同基因变异类型和 TMB-H 状态样本。阴性参考品包括 TMB-L 状态样本和基因变异阴性样本。差异化参考品包括不同丰度水平的变异位点样本。检测限参考品包括 TMB-H 状态样本和基因变异阳性样本。精密度参考品包括不同 TMB 状态样

本和基因变异阳性样本。

本产品设置了阴性对照品和阳性对照品各 1 支，阳性对照为细胞系和质粒的混合 DNA，阴性对照为健康人细胞系 DNA，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。

3.生物信息分析及数据库要求

申请人通过分析数据库特征、基因突变基本特征，再通过样本验证，构建单样本检测体细胞突变预测模型。参照指南性文件确定了本产品生物信息分析质控要求。

申请人设计了配套使用的基因突变分析软件，实现对基因测序仪产生的下机数据进行分析并计算报告 TMB。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过企业内部参考品试验，确定最佳的生产工艺。

申请人通过对FFPE样本DNA文库和白细胞样本DNA文库等的检测和功能性试验确定了最终反应体系，研究包括：文库构建条件、接头浓度、封闭序列浓度、探针浓度、文库富集条件等进行筛选和优化等。

申请人通过对FFPE DNA样本进行试验，确定了DNA破碎体系和条件；通过对企业参考品进行试验，确定了检测最低平均测序深度。

(三) 分析性能评估

本产品分析性能评估内容主要包括：准确性、最低检测限、精密度、分析特异性、肿瘤组织细胞含量、核酸提取纯化性能等。申请人提交了有效运行的质量管理体系下生产的三批产品，在适用机型上的

性能评估资料。

准确性研究使用 3 批试剂盒对含有不同变异位点及丰度水平、不同 TMB 状态的 FFPE 临床样本进行检测，试剂盒检测结果与对比结果阳性符合率和阴性符合率均为 100%。

最低检测限研究对具有代表型突变的临床样本按照不同比例进行稀释，使用 3 批试剂盒 20 次重复检测，将检出率 $\geq 95\%$ 的最低浓度水平确定为最低检测限。以健康人细胞系稀释 TMB-H 肿瘤细胞系，使用 3 批成品试剂盒 20 次重复检测，将检出率 $\geq 95\%$ 的细胞系占比确定为最低检测限。研究结果显示本试剂盒检测 50ng 基因组 DNA 下，基因突变的最低检出限为 2%；检测 50ng 基因组 DNA 下，肿瘤细胞系占比最低检测限为 5%。

精密度研究使用 3 批试剂盒对含有代表型突变及丰度水平、不同 TMB 状态的 FFPE 临床样本进行连续 20 天的检测。结果显示三批试剂盒的批次内/间、日内/日间、不同操作者间、不同仪器及不同实验室间的精密度良好，符合预期要求。

分析特异性包含交叉反应研究及干扰物质研究。交叉反应研究包括肺部相关感染微生物、不同变异类型、高浓度基因组，结果显示与本产品均不产生交叉反应。干扰因素研究结果显示，临床 FFPE 样本可能存在的干扰物酒精（1%V/V）、福尔马林（0.005%V/V）、石蜡（1%V/V）、血红蛋白（2g/L）、甘油三酯（1.5mg/500 μ L）、蛋白酶 K（0.08mg/mL），对检测结果均无影响。

肿瘤组织细胞含量研究，将不同肿瘤细胞含量对检测结果的影响

进行了研究。结果表明，肿瘤细胞含量 10% 以上的组织样本均可检出。结合临床样本的多样性和复杂性，建议组织样本肿瘤细胞含量 $\geq 20\%$ 。

针对核酸提取、纯化步骤，申请人采用临床样本，根据与产品的组合性能研究结果，确定推荐的核酸提取试剂和核酸纯化试剂符合检测要求。

(四) 阳性判断值研究

申请人首先采用 408 例非小细胞肺癌样本数据，以全外显子测序方法作为参考方法，通过多种组合初步确立了产品 TMB 算法规则以及 TMB 计算的结果判定标准。

采用 135 例经全外显子测序确认的非小细胞肺癌临床样本通过绘制 ROC 曲线，选择 Youden 指数最大时的 TMB 值，初步确定了 TMB 状态的划分阈值。采用 85 例卡瑞利珠单抗治疗患者的疗效为金标准进行了验证。最终确定阳性判断值为“当 TMB 值 ≥ 10 个/Mb 时，TMB 状态为高 TMB (TMB-H)；当 TMB 值 < 10 个/Mb 时，TMB 状态为低 TMB (TMB-L)”。

(五) 稳定性研究

申请人对产品的稳定性研究包括实时稳定性、使用稳定性（包括开瓶稳定性、冻融稳定性）、运输稳定性及样本稳定性（包括 FFPE 样本稳定性、DNA 溶液稳定性、文库稳定性等）。

实时稳定性：采用 3 批试剂盒置于 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 条件下放置 0 月、3 月、9 月、10 月、11 月，每到一一个时间节点使用企业参考品对试剂盒的性能进行检测，结果显示试剂盒在生产后保存至 11 个月各项性能指标均

符合产品技术要求，产品有效期可达 10 个月。

此外，申请人对产品的使用稳定性和样本稳定性分别进行了研究。结果显示，产品的性能均能满足产品说明书的声称。

三、临床评价概述

本产品临床试验分为两大部分，第一部分为申报产品临床检测性能的研究，第二部分为申报产品临床意义的研究。

第一部分：临床检测性能的研究。

申请人在上海市胸科医院、中国医科大学附属第一医院、中国医学科学院肿瘤医院和苏州大学附属第一医院共 4 家临床试验机构完成了该部分临床试验。该部分临床试验包括四部分内容：

(一) 采用申报产品与临床参考方法 (WES-TMB) 进行一致性比较研究。该研究纳入 1089 例非小细胞肺癌和良性疾病患者，其中非小细胞肺癌患者 989 例，覆盖了非小细胞肺癌的各种病理亚型。采用申报产品与 WES-TMB 方法检测 FFPE 组织样本，其中阳性样本 306 例，阴性样本 783 例。临床试验结果显示，申报产品与 WES-TMB 的阳性符合率为 84.97% (95%CI: 80.5%, 88.5%)，阴性符合率为 95.02% (95%CI: 93.3%, 96.3%)，总符合率为 92.19% (95%CI: 90.5%, 93.6%)。

针对 514 例 EGFR 突变和 ALK 融合双阴性的人群进行分层统计分析，临床试验结果显示，申报产品与 WES-TMB 的阳性符合率为 88.89% (95%CI: 84.00%, 92.42%)，阴性符合率为 92.28% (95%CI: 88.69%, 94.80%)，总符合率为 90.86% (95%CI: 88.05%, 93.05%)。

(二) 采用申报产品与临床参考方法 (WES-TMB) 针对特定基因

的突变位点进行的一致性比较研究。共纳入 641 例样本，选择具有代表性的 14 个基因进行该部分研究。临床试验结果显示，针对 SNV 突变，申报产品与 WES-TMB 的阳性符合率为 98.37% (95%CI: 96.7%，99.2%)，阴性符合率为 99.47% (95%CI: 99.3%，99.61%)，总符合率为 99.42% (95%CI: 99.24%，99.56%)；针对 INDEL 突变，申报产品与 WES-TMB 的阳性符合率为 96.47% (95%CI: 90.13%，98.79%)，阴性符合率为 99.93% (95%CI: 99.85%，99.97%)，总符合率为 99.9% (95%CI: 99.81%，99.95%)。

针对每个基因，申报产品与 WES-TMB 的阳性符合率均大于 90%，阴性符合率均大于 90%，总符合率均大于 95%。

(三) 针对其他 5 个特定基因的突变位点，采用申报产品与已上市产品进行一致性比较研究。共纳入 1089 例样本，选择具有代表性的其他 5 个基因进行该部分研究。针对每个基因，申报产品与已上市产品的阳性符合率均大于 90%，阴性符合率均大于 95%，总符合率均大于 95%。

(四) 采用申报产品与 WES-TMB 进行相关性研究。该部分研究共纳入 1089 例受试者样本。临床试验结果显示，申报产品与 WES-TMB 的相关系数为 0.86。

第二部分：申报产品临床意义的研究。

申报产品参与卡瑞利珠单抗的药物临床试验。该部分临床试验资料由卡瑞利珠单抗的上市许可持有人以主文档方式提交。

申报产品参与了抗肿瘤药物临床试验 SHR-1210-III-303-NSCLC

研究（NCT03134872），该项临床试验为一项 III 期、随机、开放性对照研究，评估了卡瑞利珠单抗联合培美曲塞和卡铂一线治疗晚期或转移性非鳞状非小细胞肺癌患者的有效性和安全性。研究中纳入了病理诊断为晚期或转移性非鳞状非小细胞肺癌的患者，排除 EGFR 突变的患者或 ALK 易位的患者。入组的患者至少有一个可测量病灶（淋巴结病变短径 ≥ 15 mm 或者结外病灶最长径 ≥ 10 mm），肝肾功能正常或轻度异常，ECOG 评分 ≤ 1 分。无论研究前患者肿瘤的 PD-L1 表达状态如何，均可入选。研究排除患有活动性自身免疫性疾病、已知或高度怀疑间质性肺炎的患者，既往接受过针对晚期/转移性非小细胞肺癌的系统性治疗的患者，HIV 感染以及未经治疗的活动性 HBV 和 HCV 感染的患者。

上述临床试验共入组病例 412 例，其中进行申报产品 TMB 检测的病例共 218 例，因未完成申报产品检测，或因检测质控不合格共剔除 26 例病例，具有有效 TMB 结果 192 例。192 例有效数据中，卡瑞利珠单抗联合培美曲塞和卡铂组（以下简称免疫组）治疗 103 例，培美曲塞和卡铂组（以下简称化疗组）治疗 89 例。103 例免疫组中，29 例 TMB-H，74 例 TMB-L；89 例化疗组中，26 例 TMB-H，63 例 TMB-L。针对 TMB 临床意义研究的主要评价指标为中位无进展生存期（mPFS）。

临床试验结果显示，TMB-H 的病例中，免疫组病例 mPFS 未达到 mPFS(NR)，化疗组 mPFS 为 6.5 个月，HR 可达 0.35（95%CI: 0.14, 0.85），生存分析见图 1；TMB-L 的病例中，免疫组 mPFS 为 10.1 个

月，化疗组 mPFS 为 9.9 个月，HR 为 0.72 (95%CI: 0.45,1.16)，生存分析见图 2。以 TMB 高低对总人群进行分层分析，提示 TMB 高低与免疫组相对于化疗组 mPFS 的延长相关。此外，临床试验还对 TMB-H 组、TMB-L 组病例的客观缓解率进行分析，分析结果见表 1。

综上，临床试验结果显示，产品临床应用能够使患者在临床诊疗过程中获益，满足临床需求。

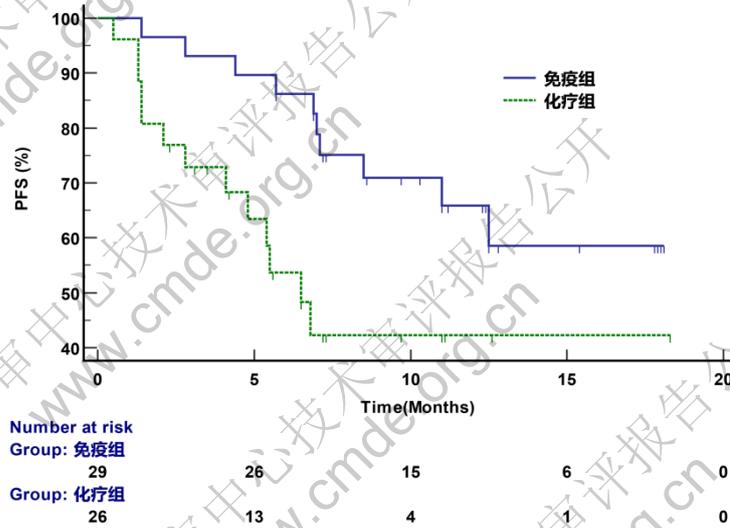


图 1.TMB-H 人群中免疫组与化疗组生存曲线图

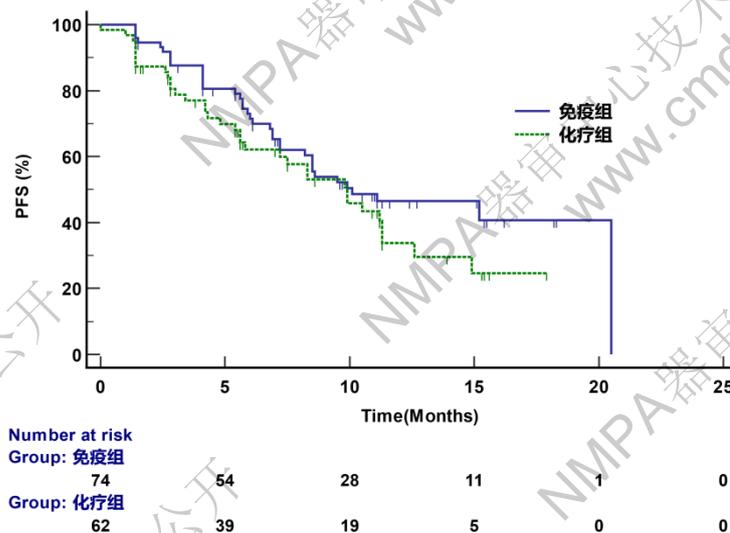


图 2.TMB-L 人群中免疫组与化疗组生存曲线图

表 1.入组病例客观缓解率分析

标志物分层	客观缓解率（ORR）	
	免疫组	化疗组
TMB-H	69.00% (95%CI: 49.2%,84.7%)	30.80% (95%CI: 14.3%,51.8%)
TMB-L	59.50% (95%CI: 47.4%,70.7%)	46.00% (95%CI: 33.4%,59.1%)

综上，临床试验结果显示，产品临床性能满足技术审评要求，产品临床应用能够使患者在临床诊疗过程中获益，满足临床需求。

四、产品受益风险判定

本产品根据 YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械产品的安全风险分析方式，对本产品进行风险分析。

（一）受益评估

在我国，肺癌是发病率最高，也是死亡率最高的恶性肿瘤，其中 NSCLC 最为常见。本产品用于体外定性检测 EGFR 基因突变阴性和 ALK 阴性的非鳞状非小细胞肺癌患者经福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）组织样本中的肿瘤突变负荷（TMB）。药物临床试验结果显示，本产品的检测结果与卡瑞利珠单抗联合化疗相对于仅化疗的无进展生存期的延长相关，TMB-H 人群提示使用卡瑞利珠单抗联合化疗相对于仅化疗的人群比 TMB-L 的人群无进展生存期的延长更显著。

（二）风险评估

申报产品的检测结果不用于决定是否使用卡瑞利珠单抗，本产品检测假阳性与假阴性结果不会导致患者的错误用药，综合分析该产品临床应用不会产生严重不良事件。本产品检测结果的假阴性、假阳性会给临床医生及患者针对卡瑞利珠单抗联合化疗的治疗方案，使临床医生及患者对疾病治疗过程中的无进展生存期产生错误的预期。产品说明书明确局限性。

1.预期用途：本产品用于体外定性检测 EGFR 基因突变阴性和 ALK 阴性的非鳞状非小细胞肺癌患者经福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）组织样本中的肿瘤突变负荷（TMB）。

针对抗肿瘤药物卡瑞利珠单抗，本产品的检测结果与免疫组相对于化疗组的无进展生存期的延长相关，免疫组为卡瑞利珠单抗与化疗药联合使用，化疗组为仅使用化疗药物。

本产品的检测结果仅供临床参考，不应作为医生决策的唯一依据，临床医生应结合患者临床情况进行综合判定。

2.警示及注意事项：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检查方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类体外诊断试剂产品注册，属于创新医疗器械（创新审查受理号：CQTS1900186）。申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令 第 739 号）、《体外诊断试剂注册与备案管理办法》（国家市场监督管理总局令 第 48 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价，申报产品符合安全性、有效性的要求，符合现有认知水平，建议准予注册。

2023 年 9 月 27 日

附件：产品说明书

非小细胞肺癌组织 TMB 检测试剂盒

(可逆末端终止测序法)

说明书

【产品名称】

非小细胞肺癌组织 TMB 检测试剂盒 (可逆末端终止测序法)

【包装规格】

24 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测 EGFR 基因突变阴性和 ALK 阴性的非鳞状非小细胞肺癌患者经福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 组织样本中的肿瘤突变负荷 (TMB)。

针对抗肿瘤药物卡瑞利珠单抗, 本产品的检测结果与免疫组相对于化疗组的无进展生存期的延长相关, 免疫组为卡瑞利珠单抗与化疗药联合使用, 化疗组为仅使用化疗药物。

本产品的检测结果仅供临床参考, 不应作为医生决策的唯一依据, 临床医生应结合患者临床情况进行综合判定。

肿瘤突变负荷 (tumor mutation burden) 是一个独立的免疫检查点抑制剂治疗疗效预测标志物, 多项临床研究证实了 TMB 对 NSCLC 中使用多种免疫检查点抑制剂疗效均有一定预测作用 [1]。CheckMate 026、CheckMate 227 的研究结果显示, 与化疗组相比, 高 TMB 亚组患者使用 Nivolumab 治疗后有更长的无进展生存期和更高的客观缓解率。KEYNOTE-010、KEYNOTE-042 研究的高 TMB 患者中, Pembrolizumab 对比化疗, 可显著延长患者总生存期, 提示高 TMB 能够富集免疫治疗获益人群 [4]。

【检验原理】

本产品对肿瘤福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 组织样本中提取的核酸 (DNA) 进行片段化、接头连接及 PCR 扩增、制备文库。其后采用具有特定序列的 DNA 探针与文库进行杂交, 从而特异性捕获探针目标区域 DNA 片段, 包含人类基因组 425 个基因; 再通过磁珠法对这些片段进行富集。在对捕获富集后的文库进行定量与质控后, 再采用测序仪进行高通量测序。对于测序数据, 采用生物信息学软件分析判读样本中肿瘤突变负荷 (TMB)。

下图为本试剂盒检测步骤简表。本试剂盒包含阴、阳性对照品, 用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。

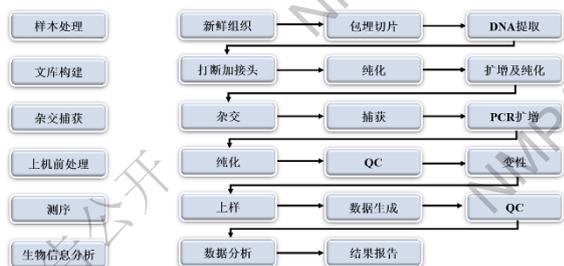


图 1 试剂盒检测步骤示意图

【主要组成成分】

组分编号	组分名称	管盖颜色	24 人份/盒
B1	TMB 修复缓冲液	黄色	84μL*1 管
E1	TMB 修复反应液	黄色	36μL*1 管
E2	TMB 连接酶	绿色	120μL*1 管
B2	TMB 连接缓冲液	绿色	360μL*1 管
DA01-DA48	TMB 双标签接头 1-48	绿色	5μL*48 管
E3	TMB PCR 扩增反应液	粉色	800μL*1 管
P1	TMB PCR 扩增引物	粉色	160μL*1 管

P2	TMB 富集探针	红色	10μL*1 管
B3	TMB DNA 封闭液	红色	80μL*1 管
S1	TMB 封闭序列	红色	8μL*1 管
B4	TMB 杂交缓冲液 1	红色	30μL*1 管
B5	TMB 杂交缓冲液 2	红色	12μL*1 管
W1	TMB 清洗缓冲液 1	白色	120μL*1 管
W2	TMB 清洗缓冲液 2	白色	80μL*1 管
W3	TMB 清洗缓冲液 3	白色	80μL*1 管
W4	TMB 清洗缓冲液 4	白色	160μL*1 管
BW	TMB 磁珠清洗液	白色	1000μL*1 管
MB	TMB 磁珠	白色	200μL*1 管
NC	TMB 阴性对照品	蓝色	40μL*1 管
PC	TMB 阳性对照品	蓝色	40μL*1 管

注: 同一组分不同批号不能混用。

组分编号	组分名称	主要组成成分	
		主要组成	主要成分
B1	TMB 修复缓冲液	End Repair & A-Tailing Buffer	Mg ²⁺ 、Tris、dNTPs
E1	TMB 修复反应液	End Repair & A-Tailing Enzyme Mix	DNA 聚合酶、多核苷酸激酶
E2	TMB 连接酶	DNA Ligase	DNA 连接酶
B2	TMB 连接缓冲液	Ligation Buffer	PEG6000、Mg ²⁺ 、Tris
DA01-DA48	TMB 双标签接头 1-48	Dual Index Adapter Duplexes 1~48	寡核苷酸
E3	TMB PCR 扩增反应液	KAPA HiFi HotStart Ready Mix	DNA 聚合酶
P1	TMB PCR 扩增引物	P5-425gene/P7-425gene	寡核苷酸
P2	TMB 富集探针	425 panel 探针	寡核苷酸
B3	TMB DNA 封闭液	Human Cot-1 DNA	寡核苷酸
S1	TMB 封闭序列	xGen Universal Blockers TS	寡核苷酸
B4	TMB 杂交缓冲液 1	2X Hybridization buffer	四甲基氯化铵
B5	TMB 杂交缓冲液 2	Hybridization Buffer Enhancer	甲酰胺
W1	TMB 清洗缓冲液 1	10X Wash Buffer I	十二烷基硫酸钠
W2	TMB 清洗缓冲液 2	10X Wash Buffer II	柠檬酸钠
W3	TMB 清洗缓冲液 3	10X Wash Buffer III	柠檬酸钠
W4	TMB 清洗缓冲液 4	10X Stringent Wash Buffer	乙二醇四乙酸
BW	TMB 磁珠清洗液	Bead Wash Buffer	柠檬酸钠
MB	TMB 磁珠	Dynabeads M-270 Streptavidin	M270 链霉亲和素磁珠
NC	TMB 阴性对照	健康人细胞系 DNA、TE 缓冲液	

	品	
PC	TMB 阳性对照品	细胞系 DNA 混合液、TE 缓冲液

注：同一组分不同批号不能混用。

本试剂盒不包含，但推荐配套使用的试剂和软件如下：

用途	名称	注册/备案证号
核酸提取	核酸提取或纯化试剂/QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (凯杰生物工程(深圳)有限公司生产)	粤深械备 20160266 号
	核酸提取试剂(南京世和医疗器械有限公司生产)	苏宁械备 20200007 号
核酸纯化	核酸纯化试剂(南京世和医疗器械有限公司生产)	苏宁械备 20160006 号
	核酸纯化试剂(南京世和医疗器械有限公司生产)	苏宁械备 20200132 号
质量浓度定量	Qubit® dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher 公司生产)	/
	DNA 浓度测定试剂盒(南京世和医疗器械有限公司生产)	
文库摩尔浓度定量	KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems 公司生产)	
	qPCR 扩增通用试剂盒(南京世和医疗器械有限公司生产)	
测序试剂	NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (Illumina 公司生产)	国械备 20190416 号
数据分析	实体瘤多基因突变分析软件 版本号: 1.0 型号: GSMDD-ST-425 南京世和医疗器械有限公司生产	

【储存条件及有效期】

1. 本试剂盒除磁珠外于-20±5℃条件下保存，磁珠于 2-8℃条件下保存，有效期为 10 个月。
2. 试剂盒反复冻融次数不超过 4 次，开封使用后应尽快用完；其中磁珠不可冻融。
3. 生产日期及失效日期：见标签。

【适用仪器】

NextSeq 550Dx 基因测序仪，Illumina 公司生产。

【样本要求】

保存年限不超过 6 年的 FFPE 样本，均可使用本试剂盒检测。样本必须按照标准的病理学方法进行处理和保存，以确保样本的质量。组织样本中肿瘤细胞含量应达 20% 及以上。

【检验方法】

1. 样本制备

1.1 样本要求：石蜡包埋组织（白片/蜡块）：

- 1.1.1 用刀片修整组织周围多余的石蜡。修片，直至切出完整的组织。
- 1.1.2 切片厚度调至 5-10μm，手术组织需切取 2-8 张，穿刺组织切取 10-15 张。
- 1.1.3 可做成白片或直接切至 1.5ml 离心管中备用。

1.2 样本前处理

- 1.2.1 小心刮取白片上的组织标本置于 1.5ml 离心管中，或直接取保存于 1.5ml 的组织样本。

1.2.2 向装有样本的 1.5ml 离心管中加入 1ml 二甲苯。涡旋振荡器充分振荡 10s。

1.2.3 室温 16000×g 离心 5min。

1.2.4 离心结束后，使用移液器吸取并移弃上清，操作中注意不要移弃下面的组织。

1.2.5 重复 b-d。

1.2.6 加入 1ml 96-100%乙醇，涡旋振荡器充分振荡，充分溶解组织中残留的二甲苯。

1.2.7 在室温下放置 5min，16000×g 离心 5min。

1.2.8 使用移液器吸取并移弃上清，操作中注意不要移弃下面的组织。

1.2.9 重复 f-h。

1.2.10 打开离心管盖，室温下静置孵育 10min。尽量保证所有的乙醇挥发干净。

1.3 核酸提取 (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit)

1.3.1 加入 180μL buffer ATL 及 20μL 蛋白酶 K 重悬沉淀，涡旋振荡器充分振荡。

1.3.2 置于恒温金属浴 56℃，800 rpm 孵育 1 小时（或直至组织完全裂解）。

1.3.3 待金属浴温度升至 90℃时，放入待提取样本孵育 1 小时。注意严格控制温度及时间。

1.3.4 将标本取出并快速离心，将离心管盖以及侧壁的液体甩入管中。待标本冷却至室温时，加入 2μL RNase A(100 mg/ml)，室温静置 2min，以去除溶液中残存的 RNA。

1.3.5 在每个样本中加入 200μL buffer AL，涡旋振荡充分混匀。然后加入 200μL 无水乙醇，并立即涡旋振荡充分混匀。如同时处理多个样本，为节省时间可将缓冲液 AL 和乙醇提前预混一起加入样本。

1.3.6 再次快速离心，将离心管盖以及侧壁的液体甩入管中。

1.3.7 将全部样本小心转移至 QIAamp MinElute 柱中，盖上离心管盖，6000×g 离心 1min，之后将下方收集管中的滤过液以及收集管一并丢弃。

1.3.8 将离心完毕的吸附柱置于新的收集管中，小心打开盛放样品的吸附柱盖子，加入 500μL AW1（请确认已加乙醇！）。盖好盖子后室温放置 1min，6000×g 离心 1min，离心后将下方收集管中的滤过液以及收集管一并丢弃。

1.3.9 将离心完毕的吸附柱置于新的收集管中，小心打开盛放样品的吸附柱盖子，分别加入 500μL AW2（请确认已加乙醇！）。盖好盖子后室温放置 1min，6000×g 离心 1min，离心后将下方收集管中的滤过液以及收集管一并丢弃。

1.3.10 将离心完毕的吸附柱置于新的收集管中，将离心机调至最高转速，至少达到 16,000×g 或 13,000 rpm，离心 3min，甩尽吸附柱内残存的乙醇。

1.3.11 准备对应标记新的 1.5ml 离心管，将离心完毕的吸附柱放置于新的离心管中，并丢弃下方的废液收集管。小心打开吸附柱盖子，加入 100μL 无酶水至吸附膜中央。

1.3.12 盖好盖子室温孵育 5min，之后将离心机调至最大转速，至少达到 16,000×g 或 13,000 rpm，离心 1min。

1.4 DNA 样本质量要求

提取后的 DNA 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 定量，DNA 总量应不少于 50ng；使用 Nanodrop 检测纯度，OD_{260/280} 应不低于 1.6。
注：提取后的样本 DNA，如不立即进行后续实验，可在-20±5℃以下保存 12 个月。

2 文库构建

2.1 DNA 打断

取试剂盒中阳性对照品 (PC) 和阴性对照品 (NC) 各 10μL 与待测样本同步检测，待测样本按照如下步骤进行操作：

- 2.1.1 DNA 进入量为 50ng-1.0μg，选择破碎片段大小为 300-370bp。

2.1.2 推荐使用 Diagenode Bioruptor 超声破碎仪或 Covaris M220 Focused-Ultrasonicator 聚焦超声破碎仪进行超声打断。

2.1.3 破碎体系:

打断体系			
Diagenode Bioruptor		Covaris M220	
样本+水	90μL	样本+水	49.5μL
TE	10μL	TE	5.5μL
100μL		55μL	

2.1.4 推荐打断条件如下:

Diagenode Bioruptor 超声打断			
Time on(sec)	Time off(sec)	Cycles	Temperature (°C)
30	30	6	4
100μL			

Covaris M220 超声打断-30sec			
Peak Power	Duty Factor	Cycles/Burst	Temperature
50W	20%	200	6°C
55μL			

2.2 磁珠纯化(核酸纯化试剂(南京世和医疗器械有限公司生产))

2.2.1 核酸纯化试剂在使用前充分漩涡震荡混匀。

2.2.2 加入样品体积 1.5 倍的核酸纯化试剂,用移液器上下混匀 10 次。

2.2.3 室温下静置 5min 后,置于磁力分离架上 5min,直至上清澄清。小心移去上清。

2.2.4 置于磁力分离架上,加入 200μL 新鲜配制的 80%乙醇,室温静置 30sec,吸弃上清。

2.2.5 重复步骤 d,并尽量去除所有残留乙醇溶液。

2.2.6 离心管留于磁力架上室温开盖 5min 干燥,使乙醇全部挥发。

2.2.7 加入 28μL 无酶水,从磁力架取下,使用移液器上下混匀 10 次。室温孵育 5min。

2.2.8 置于 1.5mL 磁力架上 5min,取 25μL DNA 溶液进入下一步文库构建实验。

2.3 末端修复加 A

2.3.1 在 0.2mL PCR 管中,按下表配制文库混合液 1。

组分	混合液 1 所需加样量	终体积
DNA 片段	25μL	30μL
E1	1.5μL	
B1	3.5μL	

2.3.2 使用移液器上下吹吸将液体混匀,快速离心收集液体。

2.3.3 将文库混合液 1 置于 PCR 热循环仪中按照以下条件进行孵育。

步骤	温度	持续时间
1	20°C	30min
2	65°C	30min
3	降温至 4°C	

2.4 加接头

2.4.1 孵育完成后按下表向装有混合液 1 的反应管中加入试剂盒内相应组分试剂,完成混合液 2 配制(配置过程于冰上完成)。

组分	混合液 2 所需加样量	终体积
混合液 1	30μL	55μL
E2	5μL	
B2	15μL	

接头	5μL	

注:同批次检测时,不同样本分别加入不同编号的接头试剂。

2.4.2 使用移液器上下吹吸将液体混匀,快速离心收集液体。将反应管置于 PCR 仪上,20°C 孵育 15min。

2.5 磁珠纯化(核酸纯化试剂(南京世和医疗器械有限公司生产))

2.5.1 核酸纯化磁珠在使用前室温平衡 30min,并充分漩涡震荡混匀。

2.5.2 连接反应完成后,立即加入连接反应体积 0.85X 的核酸纯化试剂。使用移液器上下混匀 10 次。

2.5.3 室温下静置 5min 后,置于磁力分离架上 5min,直至上清澄清。小心移去上清。

2.5.4 置于磁力分离架上,加入 200μL 新鲜配制的 80%乙醇,室温静置 30sec,吸弃上清。

2.5.5 重复步骤 d,并尽量去除所有残留乙醇溶液。

2.5.6 离心管留于磁力架上室温开盖 5min 干燥,保证所有乙醇全部挥发。

2.5.7 加入 21μL 无酶水,从磁力架取下,使用适宜量程的移液器上下混匀 10 次。室温孵育 5min。

2.5.8 置于磁力架上 5min,取 1μL DNA 进行 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 进行定量。剩余样本混匀后进入 PCR 扩增。

2.6 PCR 扩增

2.6.1 按下表加入试剂,配制混合液 3(配置过程于冰上完成):

组分	混合液 3 所需加样量	终体积
E3	25μL	50μL
P1	5μL	
纯化产物	20μL	

2.6.2 使用移液器上下吹吸将液体混匀,短暂离心收集液体。

2.6.3 将配制好的混合液 3 置于 PCR 仪,按以下反应程序扩增:

步骤	温度	持续时间	循环数
1	98°C	45sec	1
2	98°C	15sec	5-9*
	60°C	30sec	
	72°C	30sec	
3	72°C	1min	1
4	降温至 4°C		

*根据样本质量及进入量选择适当循环数,以获得足够文库进行富集。

2.7 磁珠纯化(核酸纯化试剂(南京世和医疗器械有限公司生产))

2.7.1 核酸纯化磁珠在使用前应充分室温平衡 30min,并充分漩涡震荡混匀。

2.7.2 加入 PCR 反应终体积等量的核酸纯化试剂。使用适宜量程的移液器上下混匀 10 次。

2.7.3 室温下静置 5min 后,置于磁力分离架上 5min,直至上清澄清。小心移去上清。

2.7.4 置于磁力分离架上,加入 200μL 新鲜配制的 80%乙醇,室温静置 30sec,吸弃上清。

2.7.5 重复步骤 d,并尽量去除所有残留乙醇溶液。

2.7.6 离心管留于磁力架上室温开盖 5min 干燥,保证所有乙醇全部挥发。

2.7.7 加入 23μL 无酶水,使用移液器上下混匀 10 次。室温孵育 5min。

2.7.8 置于磁力架上 5min,取 20μL DNA 溶液进入下一步文库富集。取 1μL 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 进行 DNA 定量。

3 杂交捕获

3.1 文库杂交

3.1.1 文库池常包含多个不同样本文库，根据文库 DNA 浓度计算文库池进入量，混合获得文库池。文库池 DNA 总量为 0.5-2.0μg，建议同质量样本建立文库池。

3.1.2 文库池 DNA 混合方案：文库扩增比例 (Xi) = 扩增并纯化后文库 DNA 总量/扩增前 DNA 样本总量。
临床样本文库平均扩增比例 (\bar{X}) = (X₁+X₂+...+X_n)/n，即该文库池中，各样本文库扩增比例的平均数。

样本类型	文库扩增比例	文库进入量系数
临床样本	\bar{X}	1
	\bar{X}	\bar{X}

根据上表计算每个样本的文库进入量系数，依照该系数和文库池总量计算每个样本的文库富集进入量，从而混合各样本得到文库池。

推荐 NC、PC 的进入量为 \bar{X}/X_i ；NC 可在计算值的基础上稍许调整增加进入量。

3.1.3 文库池按下表加入试剂，于 1.5mL 离心管中配制混合液 4。

组分	混合液 4 所需加样量
文库池 DNA	总量 0.5-2.0μg
B3	20μL
S1	2μL

3.1.4 使用移液器上下吹吸将液体混匀，短暂离心收集液体。

3.1.5 使用可控温真空干燥仪，建议设置干燥温度 45℃，打开管盖，直至混合液 4 干燥完全。

3.1.6 另取 0.2mL PCR 管，按下表加入试剂盒内相应组分，配制混合液 5：

组分	混合液 5 所需加样量	终体积
B4	7.5μL	12.5μL
B5	3μL	
无酶水	2μL	

3.1.7 将 12.5μL 混合液 5 加入到干燥后混合液 4 的反应管中，室温静置 10min。使用移液器上下吹吸 10 次，完全溶解 DNA 后，转移至新的 0.2mL PCR 管中。

3.1.8 加入 2.5μL 探针组分 (P2)，用移液枪上下快速吹吸混匀 10 次，配制成文库杂交混合液 (总体积 15μL)，

3.1.9 将 PCR 管置于 PCR 仪并运行程序：95℃ 加热 10min。每个循环降 3℃，共 10 个循环，降至 65℃ 保温，杂交过夜，14-18 小时。

3.2 文库捕获和清洗

3.2.1 按下表稀释富集试剂 (单个富集反应试剂用量)：

组分	所需体积	加入无酶水体积	1X 终体积
W1	30μL	270μL	300μL
W2	20μL	180μL	200μL
W3	20μL	180μL	200μL
W4	40μL	360μL	400μL
BW	250μL	250μL	500μL

3.2.2 在恒温金属浴上 65℃ 预热 100μL 清洗缓冲液 1 (W1) 及 400μL 清洗缓冲液 4 (W4)。

3.2.3 取出试剂盒中的磁珠组分 (MB) 漩涡震荡 3-5s，重悬沉淀的磁珠，恢复分散状态，每个富集反应取 50μL 液体至 1.5mL 低吸附离心管中，室温静置 30min。

3.2.4 将磁珠放于磁力分离架上约 1min，吸弃上清。

3.2.5 每 50μL 磁珠用 200μL 磁珠清洗液 (BW) 重悬，移液枪上下吹吸混匀 10 次。将磁珠放于配套的磁力分离架上静置约 1min，吸弃上清。

3.2.6 重复步骤 e，取 100μL 磁珠清洗液 (BW) 重悬，用移液枪上下吹吸混匀 10 次，并将混匀液转移至新 PCR 管中。

3.2.7 PCR 管放于磁力分离架上约 1min，吸弃上清，立即加入 15μL 杂交后的文库混合液。将 PCR 管从磁力架上取下，移液枪上下吹吸混匀 10 次，使磁珠在文库杂交混合液中充分重悬。

3.2.8 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置 65℃ 孵育 45min。每隔 15min 使用移液枪上下吹吸混匀 5 次，以尽量保证磁珠在孵育过程中处于悬浮状态。

3.2.9 孵育结束后，加入 100μL 65℃ 预热的清洗缓冲液 1 (W1)，使用移液枪上下吹吸混匀 10 次，并转移到 1.5mL 低吸附离心管中。将离心管放于磁力分离架上约 1min，吸弃上清。

3.2.10 离心管中加入 200μL 65℃ 预热的清洗缓冲液 4 (W4)，移液枪上下吹吸混匀 10 次后置于恒温金属浴 65℃ 孵育 5min (转速 400rpm)。孵育后离心管放于磁力分离架上约 1min，吸弃上清。

3.2.11 重复步骤 j 一次。

3.2.12 依次加入室温清洗缓冲液 W1-W3 进行富集清洗：先加入 200μL 室温清洗缓冲液 1 (W1)，涡旋点震 2min。离心管放于磁力分离架上约 1min，吸弃上清。

3.2.13 加入 200μL 室温清洗缓冲液 2 (W2)，涡旋点震 1min。离心管放于磁力分离架上约 1min，吸弃上清。

3.2.14 加入 200μL 清洗缓冲液 3 (W3)，涡旋点震 30sec。离心管放于磁力分离架上约 1min，尽量吸弃全部残留液体。

3.2.15 将离心管继续置于磁力架上，室温开盖干燥 3min，以去除残留水分，尽量干燥磁珠。

3.2.16 将离心管从磁力架上取下，加入 40μL 无酶水重悬磁珠，移液枪上下吹吸混匀 10 次。按 20μL/管将磁珠悬液等量分装至 2 个 PCR 管中，分别标记两管，并分别进行后续实验。

3.3 PCR 扩增

3.3.1 每管分别按下表加入试剂，配制得到 2 管混合液 6。

组分	每个反应配制混合液 6 所需加样	终体积
E3	25μL	50μL
P1	5μL	
磁珠悬液	20μL	

3.3.2 将 2 管混合液 6 分别置于 PCR 仪上，按以下反应程序扩增，

步骤	温度	持续时间	循环数
1	98℃	10min	1
	98℃	15sec	
	60℃	30sec	
2	72℃	1min	5-9*
	72℃	5min	
3	降温至 4℃		

* 循环数根据富集起始样本量调整。

4 上机前处理

4.1 磁珠纯化 (核酸纯化试剂 (南京世和医疗器械有限公司生产))

4.1.1 合并 2 管混合液 6 扩增产物，核酸纯化试剂在使用前充分漩涡震荡混匀。

4.1.2 加入 PCR 反应终体积 1.5X 的核酸纯化试剂重悬。使用移液器上下混匀 10 次。

4.1.3 室温下静置 5min 后，置于 1.5mL 磁力架上 5min，直至上清澄清。小心吸弃上清。

4.1.4 置于磁力分离架上，加入 500μL 新鲜配制的 80% 乙醇，室温静置 30sec，吸弃上清。

4.1.5 重复步骤 d，并尽量去除所有残留乙醇溶液。

4.1.6 离心管留于磁力架上室温开盖 5min 干燥, 保证乙醇全部挥发。

4.1.7 加入 23μL 无酶水, 使用适宜量程的移液器上下混匀 10 次。室温孵育 5min。

4.1.8 置于 1.5mL 磁力架上 5min, 取 20μL 作为待上样富集文库, 取 1μL 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 进行 DNA 定量, 以计算富集文库浓度及总量。

注: 纯化后富集文库若不能立即上机测序, 可在 -20±5℃ 以下保存 30 天。

4.2 文库质检

文库 qPCR 定量: 使用 KAPA Library Quantification Kit 试剂盒对待上机富集文库进行定量, 以调整至合适上机浓度。

4.2.1 试剂准备

4.2.1.1 准备适量的 DNA 稀释缓冲液: 使用无酶水将 1X IDTE 缓冲液稀释至 0.1X, 每个文库约需 1.2mL 稀释缓冲液。使用前将缓冲液放至室温。

4.2.1.2 冰上解冻试剂盒中各组分, 使用前充分混匀, 短暂离心, 置于冰上备用。

4.2.2 样本准备

4.2.2.1 准备适当的文库稀释液 (使用 DNA 稀释缓冲液)。取 1μL 富集文库进行 1: 1,000、1: 10,000、1: 100,000 稀释。

4.2.2.2 如需使用, 准备内部对照品 ROX 稀释液。

4.2.3 点样及程序设置

4.2.3.1 向 PCR 反应板需要进行反应的孔中各加入混有引物的 6μL Master Mix 以及 2ul 无酶水。

4.2.3.2 向每个样本孔中加入对应的 2μL 已稀释的 DNA 文库 (1:10000 和 1:100000)。

4.2.3.3 向标准品孔中各加入 2μL DNA 标准品, 按照从低浓度到高密度顺序加入。

4.2.3.4 向阴性对照孔中加入 2μL 稀释缓冲液。

4.2.3.5 密封 PCR 反应板, 放入微孔板离心机中离心 1min。

4.2.3.6 将反应板装载到 qPCR 仪上并按照下表参数运行 qPCR 仪:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	5min	1
变性	95℃	30sec	35
退火/延伸/数据采集	60℃	45sec	
溶解曲线分析	65-95℃		

4.2.4 数据分析

4.2.4.1 按照 KAPA Library Quantification Kit 试剂盒说明书进行待检文库的浓度计算。

4.2.4.2 若最终文库总摩尔质量 < 0.008pmoles, 需要重新进行文库杂交富集或重新进行建库, 若再次不合格, 终止检测。

5 测序

5.1 文库预处理

5.1.1 准备变性试剂: 取 200μL 1N NaOH 浓储, 加 800μL 无酶水配置成 0.2N NaOH, 涡旋混匀, 短暂离心, 室温放置备用。

5.1.2 文库变性: 取 2μL 文库 (不低于 4nM) 至低吸咐管管底, 再加入 2μL 0.2N NaOH, 吹打混匀, 关闭管盖室温孵育 5min。变性后的 4μL 文库中加入 2ul 200mM 的 Tris-HCl PH8.0, 吹打混匀。之后立即置于冰上。

5.1.3 文库稀释: 向变性好的 6ul 文库加入 394ul 预冷 HT1, 混匀后快速离心。再从 400ul 稀释液中取 117ul 文库与 1183ul 预冷的 HT1 混合。吹打混匀, 之后立即置于冰上备用。

5.2 上样

5.2.1 使用洁净的 1mL 枪头刺穿 Load Samples (装入样品) 孔的封箱, 将 1.3mL 已制备文库注入 Load Samples (装入样品) 孔中。避免接

触封箱。

5.2.2 加载样品后检查孔中是否有气泡, 如果有气泡在工作台轻轻敲打试剂盒以释放气泡。

5.2.3 将加载好样品的测序试剂盒使用 Nextseq 550Dx /HiSeq4000/ NovaSeq 测序仪 (Illumina 公司) 进行测序。

5.2.4 接头上样标签对应表

中文名称	标签	P7Seq	P5Seq
双标签接头 1 (DA01)	DU-2	TTGCGCAT	CAGAGGTT
双标签接头 2 (DA02)	DU-6	TCACTCGT	ATGTTCCGG
双标签接头 3 (DA03)	DU-8	TACGCTTG	AGACGTAG
双标签接头 4 (DA04)	DU-11	CTCACAAG	AAGAACGG
双标签接头 5 (DA05)	DU-12	CTGAAC TG	GGATAGGT
双标签接头 6 (DA06)	DU-13	CTATCGTG	TGTGGCTT
双标签接头 7 (DA07)	DU-14	CAGTGT TG	TGCAAGGA
双标签接头 8 (DA08)	DU-15	CAACGAGT	TGGTTGAG
双标签接头 9 (DA09)	DU-16	TTCGTGGA	TGGTAAGG
双标签接头 10 (DA10)	DU-17	TTCGGATG	TGGAGGAT
双标签接头 11 (DA11)	DU-20	TTGGTCTG	GGCTTGTT
双标签接头 12 (DA12)	DU-21	TTGAGGTG	GGCTGATA
双标签接头 13 (DA13)	DU-22	TTACGAGG	GGCAATGT
双标签接头 14 (DA14)	DU-23	TCCGAGAA	GGATCAAG
双标签接头 15 (DA15)	DU-25	TGTGCGTA	GGAGTTAG
双标签接头 16 (DA16)	DU-27	TGATGCAG	AGGTTGGA
双标签接头 17 (DA17)	DU-28	TAGGCAGA	AGATGAGG
双标签接头 18 (DA18)	DU-29	TAAGCGGT	CCTCTTGA
双标签接头 19 (DA19)	DU-30	CTAGGTGT	CCTGTCAA
双标签接头 20 (DA20)	DU-32	CGTGAGTT	CCGTTGAA
双标签接头 21 (DA21)	DU-33	CGCAACTT	CCGTATAG
双标签接头 22 (DA22)	DU-34	TTCTCGAG	CCATGAAG
双标签接头 23 (DA23)	DU-38	CGAGCATA	CCAACCTA
双标签接头 24 (DA24)	DU-40	TTCTGTGT	CGTGTAAC
双标签接头 25 (DA25)	DU-42	TTACAC TG	CGATGTCA
双标签接头 26 (DA26)	DU-43	TTGCCTGA	CGATAACG
双标签接头 27 (DA27)	DU-45	TCCACAGA	CGAACTAC
双标签接头 28 (DA28)	DU-46	TACCTCAG	GTACAAGC
双标签接头 29 (DA29)	DU-47	TTCCAGGT	GCACAACA
双标签接头 30 (DA30)	DU-48	TTATCCGG	GAGATCAC
双标签接头 31 (DA31)	DU-55	GCCTAAGT	TGGTGACT
双标签接头 32 (DA32)	DU-56	GCATCCAA	GGTAACAC
双标签接头 33 (DA33)	DU-57	GAATCCGT	GGACTTCA
双标签接头 34 (DA34)	DU-61	CAGAAGAC	TTCCGTAC
双标签接头 35 (DA35)	DU-63	TTCACGCA	TTCCAACG
双标签接头 36 (DA36)	DU-64	TTGTCACG	TTCGATCC
双标签接头 37 (DA37)	DU-66	TTGAACGC	TTGTCTCT

双标签接头 38 (DA38)	DU-67	TTAGTCGC	TTGAGCCA
双标签接头 39 (DA39)	DU-70	TCAATGCG	TCTAGACC
双标签接头 40 (DA40)	DU-71	TAGTGTCA	TCCTTGCT
双标签接头 41 (DA41)	DU-73	CTGTATGC	TCACTTCC
双标签接头 42 (DA42)	DU-76	CAAGCAAC	TAGTGTCC
双标签接头 43 (DA43)	DU-77	ATGTGAGC	TAGCCTTC
双标签接头 44 (DA44)	DU-79	AATCGCTC	CTCCTAAC
双标签接头 45 (DA45)	DU-81	AAGAGTGC	CCTATTTC
双标签接头 46 (DA46)	DU-84	TTGGCAAC	CCAATAGC
双标签接头 47 (DA47)	DU-85	TTGGAGTC	CCAAGTTC
双标签接头 48 (DA48)	DU-88	TCGGTTCT	AACATGCC

6 生物信息分析与结果解读

本产品结果分析采用《实体瘤多基因突变分析软件》(型号: GSMDD-ST-425, 以下简称分析软件)对原始数据进行分析。分析软件可实现从 Illumina 测序仪原始数据下机到报告的自动化分析。相关数据分析流程和阳性判断值如下:

6.1 数据转换拆分:该模块对下机测序数据(BCL格式)进行转换,根据 SampleSheet(样本名及标签序列)将 BCL 文件转换成 FASTQ 格式。

6.2 FASTQ 质检:该模块对 FASTQ 数据进行质量控制,去除建库过程中引入的接头序列以及低质量碱基片段。

6.3 比对参考基因组:使用分析软件的序列比对模块将 FASTQ 文件中的碱基序列比对至 hg19(GRCh37)人类参考基因组。

6.4 BAM 文件排序:对 BAM 文件进行排序。

6.5 BAM 文件去重复:对 BAM 文件进行 PCR 序列去重复。

6.6 点突变和插入缺失分析:使用分析软件的变异鉴定模块分析样本的点突变和插入缺失。分析生成的 VCF 变异结果使用 VEP 软件进行功能注释。

6.7 肿瘤突变负荷分析:分析样本的肿瘤突变负荷状态。

6.8 质检信息汇总:该模块对样本信息进行收集汇总,包括样本 Q20 数据比例、Q30 数据比例、片段大小、中靶率、序列比对比率、测序深度等指标进行收集汇总。其中 Q30 碱基占比 $\geq 85\%$,序列比对至参考基因组比例 $\geq 95\%$,平均测序深度 $\geq 700\times$,则样本数据质检通过。如数据质检不通过,则判定实验失败,需要重新实验。

【阳性判断值】

1. 发生在编码区域(CDS)内的点突变、插入缺失突变,其突变 reads 数 ≥ 5 ,且丰度 $\geq 2\%$ 时,纳入 TMB 的计算。
2. TMB 状态的判定标准:当 TMB 值 ≥ 10 个/Mb 时,TMB 状态为高 TMB(TMB-H);当 TMB 值 < 10 个/Mb 时,TMB 状态为低 TMB(TMB-L)。

【检验结果的解释】

1. 阴性对照品(NC)的检测结果应为 TMB-L,若检出 TMB-H,说明试剂盒操作过程可能存在污染,此次检测结果无效。
2. 阳性对照品(PC)的检测结果应为 TMB-H,若检出 TMB-L,说明试剂盒操作过程有误,此次检测结果无效。

【检验方法局限性】

1. 本试剂盒仅用于患者 FFPE 样本的体外定性诊断,其检测结果仅供临床参考,不应作为临床诊疗的唯一依据。
2. 阴性结果不能完全排除目标检测物阳性,样本中肿瘤细胞较少、突变比例低于试剂盒最低检测限、样本降解、样本污染、样本中存

在过量干扰物质、不正确的样本保存、不正确的试剂盒保存、试剂盒过期等亦可能产生阴性检测结果。

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

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

5. 本试剂盒仅用于检测保存年限不超过 6 年的 FFPE 组织样本,超过 6 年的 FFPE 样本的检测可能受到影响。

【产品性能指标】

1.1. TMB 检测一致性:检测肿瘤突变负荷国家参考品,TMB-5%和 TMB-10%参考品的标准 TMB 值落在试剂盒检测计算的 WES-TMB 理论值 90% 预测区间的比例应不少于 90.0%;或检测肿瘤突变负荷企业参考品,结果应为对应的 TMB 状态。

1.2. TMB 位点检测准确性:检测肿瘤突变负荷国家参考品中高置信 SNP/Indel 位点标准集的参考品,TMB-14-2%、TMB-14-5%和 TMB-14-10%参考品的突变检测准确性应分别不低于 40.0%、80.0%、90.0%;或检测肿瘤突变负荷企业参考品,突变检测准确性应不低于产品技术要求的规定。

1.3. TMB 检测限:检测 50ng 基因组 DNA 下肿瘤细胞占比低至 5%的肿瘤突变负荷检测限参考品,结果应为 TMB-H。

1.4. TMB 重复性:检测企业参考品中的肿瘤突变负荷重复性参考品,重复检测 10 次,结果应均为对应的 TMB 状态。

2. 临床试验结果

2.1. 临床试验在 4 家临床机构共同开展,共入组 1089 例有效样本。申报产品与 WES-TMB 的阳性符合率为 84.97%,阴性符合率为 95.02%,总符合率为 92.19%。

2.2. 针对 514 例 EGFR 和 ALK 突变双阳性的人群进行分层统计分析,临床试验结果显示,申报产品与 WES-TMB 的阳性符合率为 88.89%,阴性符合率为 92.28%,总符合率为 90.86%。

2.3. 采用申报产品与 WES-TMB,针对特定基因的突变位点进行一致性比较研究。共纳入 641 例样本,选择具有代表性的 14 个基因进行该部分研究。临床试验结果显示,针对 SNV 突变,申报产品与 WES-TMB 的阳性符合率为 98.37%,阴性符合率为 99.47%,总符合率为 99.42%;针对 INDEL 突变,申报产品与 WES-TMB 的阳性符合率为 96.47%,阴性符合率为 99.93%,总符合率为 99.9%。针对每个基因,申报产品与 WES-TMB 的阳性符合率均大于 90%,阴性符合率均大于 90%,总符合率均大于 95%。

2.4. 针对其他 5 个特定基因的突变位点,采用申报产品与已上市产品进行一致性比较研究。共纳入 1089 例样本,选择具有代表性的其他 5 个基因进行该部分研究。针对每个基因,申报产品与已上市产品的阳性符合率均大于 90%,阴性符合率均大于 95%,总符合率均大于 95%。

2.5. 采用申报产品与 WES-TMB 进行相关性研究。该部分研究共纳入 1089 例受试者样本。临床试验结果显示,申报产品与 WES-TMB 的相关系数为 0.86。

2.6. 本产品参与了抗肿瘤药物临床试验 SHR-1210-III-303-NSCLC 研究(NCT03134872),该项临床试验为一项 III 期、随机、开放性对照研究,评估了卡瑞利珠单抗联合培美曲塞和卡铂一线治疗晚期或转移性非鳞状非小细胞肺癌患者的有效性和安全性。研究中纳入了病理诊断为晚期或转移性非鳞状非小细胞肺癌的患者,排除 EGFR 突变的患者或 ALK 易位的患者。入组的患者至少有一个可测量病灶(淋巴结病变短径 ≥ 15 mm 或者结外病灶最长径 ≥ 10 mm),肝肾功能正常或轻度异常,ECOG 评分 ≤ 1 分。无论研究前患者肿瘤的 PD-L1 表达状态如何,均可入选。研究排除患有活动性自身免疫性疾病、已知或高度怀疑间质性肺炎的患者,既往接受过针对晚期/转移性非小细胞肺癌的系统性治疗的患者,HIV 感染以及未经治疗的活动性 HBV 和 HCV 感染的患者。

3.上述临床试验共入组病例 412 例，其中进行申报产品 TMB 检测的病例共 218 例，因未完成申报产品检测，或因检测质控不合格共剔除 26 例病例，具有有效 TMB 结果 192 例。192 例有效数据中，卡瑞利珠单抗联合培美曲塞和卡铂组（以下简称免疫组）治疗 103 例，培美曲塞和卡铂组（以下简称化疗组）治疗 89 例。103 例免疫组中，29 例 TMB-H，74 例 TMB-L；89 例化疗组中，26 例 TMB-H，63 例 TMB-L。针对 TMB 临床意义研究的主要评价指标为中位无进展生存期（mPFS）。

4.临床试验结果显示，TMB-H 的病例中，免疫组病例 mPFS 未达到 mPFS(NR)，化疗组 mPFS 为 6.5 个月，HR 可达 0.35（95%CI: 0.14, 0.85），生存分析见图 1；TMB-L 的病例中，免疫组 mPFS 为 10.1 个月，化疗组 mPFS 为 9.9 个月，HR 为 0.72（95%CI: 0.45,1.16），生存分析见图 2。以 TMB 高低对总人群进行分层分析，提示 TMB 高低与免疫组相对于化疗组 mPFS 的延长相关。此外，临床试验还对 TMB-H 组、TMB-L 组病例的客观缓解率进行分析，分析结果见表 1。

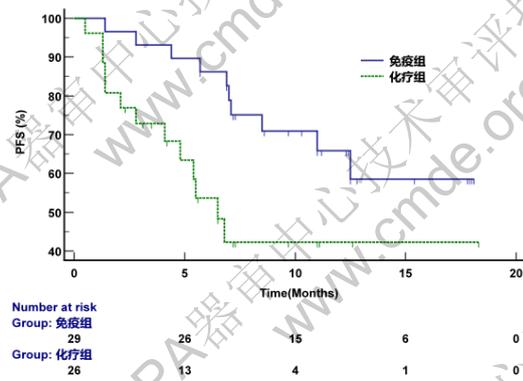


图 1.TMB-H 人群中免疫组与化疗组生存曲线图

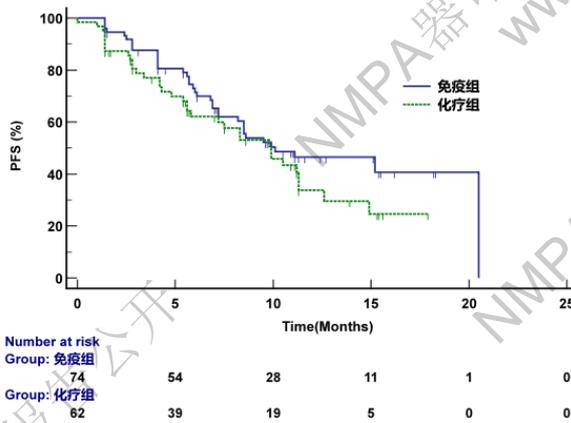


图 2.TMB-L 人群中免疫组与化疗组生存曲线图

表 1.入组病例客观缓解率分析

客观缓解率（ORR）		
标志物分	免疫组	化疗组
层		
TMB-H	69.0%	30.8%

	(95%CI: 49.2%,84.7%)	(95%CI: 14.3%,51.8%)
TMB-L	59.5%	46.0%
	(95%CI: 47.4%,70.7%)	(95%CI: 33.4%,59.1%)

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 临床基因扩增实验室及实验室操作人员资质应当严格遵循《医疗机构临床基因扩增管理办法》（卫办医政发〔2010〕194号）。
3. 标本的容器、标本的处理以及检验过程中使用的材料的处理须符合《医疗废物管理条例》和《医疗卫生机构医疗废物管理办法》以及国家和地区的相关要求。
4. 所有化学药品都具有潜在危险性。只有经过培训且具有相应实验室技术的专业人员才能使用本试剂盒进行检测。操作时，请穿着合适的实验室工作服、并佩戴一次性手套等防护性措施。使用过的试剂盒为医疗废弃物，应妥善处理。

【参考文献】

1. 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会遗传性肿瘤标志物协作组，中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会分子病理协作组. 肿瘤突变负荷检测及临床应用中国专家共识(2020 年版)[J]. 中国癌症防治杂志, 2020, v.12(05):9-18.
2. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, et al. First-line nivolumab in stage IV or recurrent non-small-cell lung cancer. N Engl J Med, 2017, 376(25):2415-2426.
3. Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden. N Engl J Med, 2018,378(22): 2093-2104.
4. Herbst R S , Lopes G , Kowalski D M , et al. Association between tissue TMB (tTMB) and clinical outcomes with pembrolizumab monotherapy (pembro) in PD-L1-positive advanced NSCLC in the KEYNOTE-010 and -042 trials[J]. Annals of Oncology, 2019, 30:v916-v917.
5. 中国临床肿瘤学会血管靶向治疗专家委员会，中国临床肿瘤学会非小细胞肺癌专家委员会. 肿瘤突变负荷应用于肺癌免疫治疗的专家共识(2021 年版)[J]. 中国肺癌杂志, 2021 (11).
6. 中国临床肿瘤学会（CSCO）非小细胞肺癌诊疗指南（2020 版）. 北京：人民卫生出版社.

【基本信息】

注册人/生产企业/售后服务单位名称：南京世和医疗器械有限公司
住所：南京市江北新区华康路 128 号 A 座 6 层
联系方式：
网址：
E-mail：
生产地址：南京高新技术产业开发区新锦湖路3 号-1 中丹生态生命科学产业园一期A栋7楼701、707-1、708-712，B栋22楼2208-2209
生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】

附表：本产品 425 个基因列表

ABCB1	CDC73	ERCC1	HRAS	MSH2	PPARD	SMO
ABCB4	CDH1	ERCC2	HSD3B1	MSH6	PPP2R1A	SOS1
ABCC2	CDK10	ERCC3	IDH1	MTHFR	PRDM1	SOX2
ADH1A	CDK12	ERCC4	IDH2	MTOR	PRF1	SPOP
ADH1B	CDK4	ERCC5	IFNG	MUTYH	PRKACA	SPRY4
ADH1C	CDK6	ESR1	IFNGR1	MYC	PRKARIA	SRC
AIP	CDK8	ETV1	IGF1R	MYCL	PRKCI	SRY
AKT1	CDKN1A	ETV4	IGF2	MYCN	PRKDC	STAG2
AKT2	CDKN1B	ETV5	IKBKE	MYD88	PRSS1	STAT3
AKT3	CDKN1C	ETV6	IKZF1	MYH9	PRSS3	STK11
ALDH2	CDKN2A	EWSR1	IL7R	NAT1	PTCH1	STMN1
ALK	CDKN2B	EXT1	INPP4B	NBN	PTEN	STT3A
AMER1	CDKN2C	EXT2	IRF2	NCOR1	PTK2	SUFU
APC	CEBPA	EZH2	JAK1	NF1	PTPN11	TACC3
AR	CEP57	EZR	JAK2	NF2	PTPN13	TAP1
ARAF	CHD4	FANCA	JAK3	NFE2L2	PTPRD	TAP2
ARID1A	CHEK1	FANCC	JARID2	NFKBIA	QKI	TEK
ARID1B	CHEK2	FANCD2	JUN	NKX2-1	RAC1	TEKT4
ARID2	CREBBP	FANCE	KDM5A	NOTCH1	RAC3	TERC
ARID5B	CRKL	FANCF	KDM6A	NOTCH2	RAD50	TERT
ASCL4	CSF1R	FANCG	KDR	NOTCH3	RAD51	TUBB6
ASXL1	CTCF	FANCI	KEAP1	NPM1	RAD51B	TET2
ATF1	CTLA4	FANCL	KIF1B	NQO1	RAD51C	TGFBR2
ATIC	CTNNB1	FANCM	KIF5B	NRAS	RAD51D	THADA
ATM	CUL3	FAT1	KIT	NRG1	RAD54L	TMEM127
ATR	CUX1	FBXW7	KITLG	NSD1	RAF1	TMPRSS2
ATRX	CXCR4	FGF19	KLLN	NTRK1	RARA	TNFAIP3
AURKA	CYLD	FGFR1	KMT2A	NTRK2	RARG	TNFRSF11A
AURKB	CYP19A1	FGFR2	KMT2B	NTRK3	RASGEF1A	TNFRSF14
AXIN2	CYP2A13	FGFR3	KMT2C	NUTM1	RB1	TNFRSF19
AXL	CYP2A6	FGFR4	KMT2D	PAK3	RECQL4	TNFSF11
B2M	CYP2A7	FH	KRAS	PALB2	RELN	TOP1
BAD	CYP2B6*6	FLCN	LHCGR	PALLD	RET	TOP2A
BAI3	CYP2C19*2	FLT1	LMO1	PARK2	RHOA	TP53
BAK1	CYP2C9*3	FLT3	LRP1B	PARP1	RICTOR	TP63
BAP1	CYP2D6	FLT4	LYN	PARP2	RNF43	TPMT
BARD1	CYP3A4*4	FOXA1	LZTR1	PAX5	ROS1	TSC1
BAX	CYP3A5	FOXP1	MAP2K1	PBRM1	RPTOR	TSC2
BCL2	DAXX	FRG1	MAP2K2	PDCD1	RRM1	TSHR
BCL2L11	DDR2	GATA1	MAP2K4	PDCD1LG2	RUNX1	TFE1
BCR	DENND1A	GATA2	MAP3K1	PDE11A	RUNX1T1	TUBB3
BIRC3	DHFR	GATA3	MAP3K4	PDGFRA	SBDS	TYMS
BLM	DICER1	GATA4	MAP4K3	PDGFRB	SDC4	U2AF1

BMPRI1A	DLL3	GATA6	MAX	PDK1	SDHA	UGT1A1
BRAF	DNMT3A	GNA11	MCL1	PGR	SDHB	VAMP2
BRCA1	DOT1L	GNAQ	MDM2	PHOX2B	SDHC	VEGFA
BRCA2	DPYD	GNAS	MDM4	PIK3C3	SDHD	VHL
BRD4	DUSP2	GRIN2A	MECOM	PIK3CA	SEPTIN9	WAS
BRIP1	EGFR	GRM3	MED12	PIK3CD	SETBP1	WISP3
BTG2	EML4	GRM8	MEF2B	PIK3R1	SETD2	WRN
BTK	EP300	GSTM1	MEN1	PIK3R2	SF3B1	WT1
BUB1B	EPAS1	GSTM4	MET	PKHD1	SGK1	XPA
c11orf30	EPCAM	GSTM5	MGMT	PLAG1	SLC34A2	XPC
CASP8	EPHA2	GSTP1	MITF	PLK1	SLC3A2	XRCC1
CBL	EPHA3	GSTT1	MLH1	PMS1	SLC7A8	XRCC2
CBLB	EPHA5	HDAC2	MLH3	PMS2	SMAD2	YAP1
CCND1	EPHB2	HDAC9	MLLT1	POLD1	SMAD3	ZNF2
CCNE1	ERBB2	HGF	MLLT3	POLD3	SMAD4	ZNF217
CD274	ERBB2IP	HLA-A	MLLT4	POLE	SMAD7	ZNF703
CD74	ERBB3	HNF1A	MPL	POLH	SMARCA4	
CDA	ERBB4	HNF1B	MRE11A	POT1	SMARCB1	