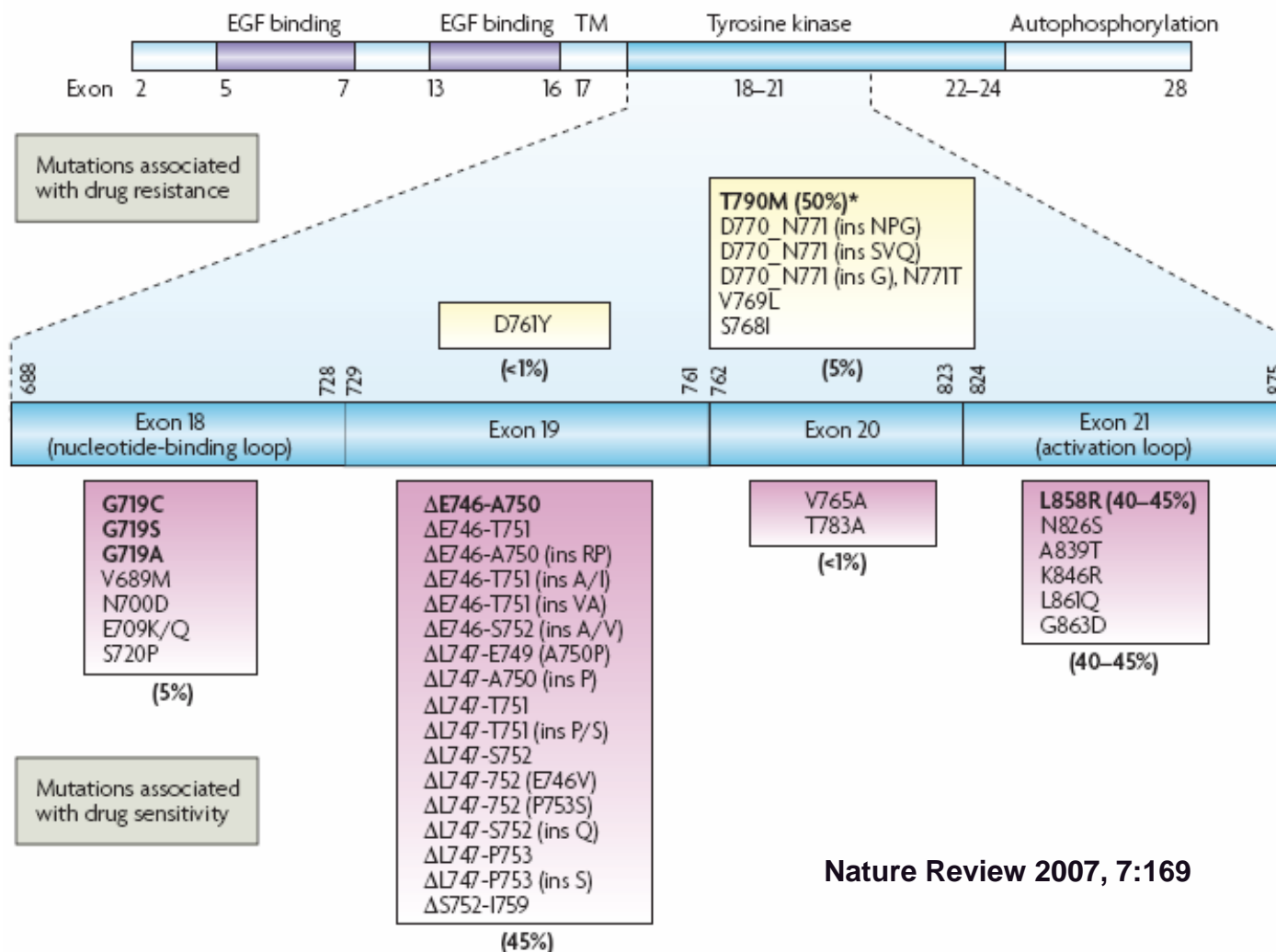


EGFR突变检测方法简介

朱冠山 (Mike)
阿斯利康中国创新研究中心
20010年4月9日

- 非小细胞肺癌中EGFR活性增强突变
- 标本因素对肿瘤组织中基因突变检测的影响
- EGFR突变检测方法概述
- ARMS试剂盒检测EGFR突变
- 工作流程与质量控制

非小细胞肺癌中EGFR酪氨酸激酶区突变



Nature Review 2007, 7:169

EGFR突变类型与吉非替尼敏感性

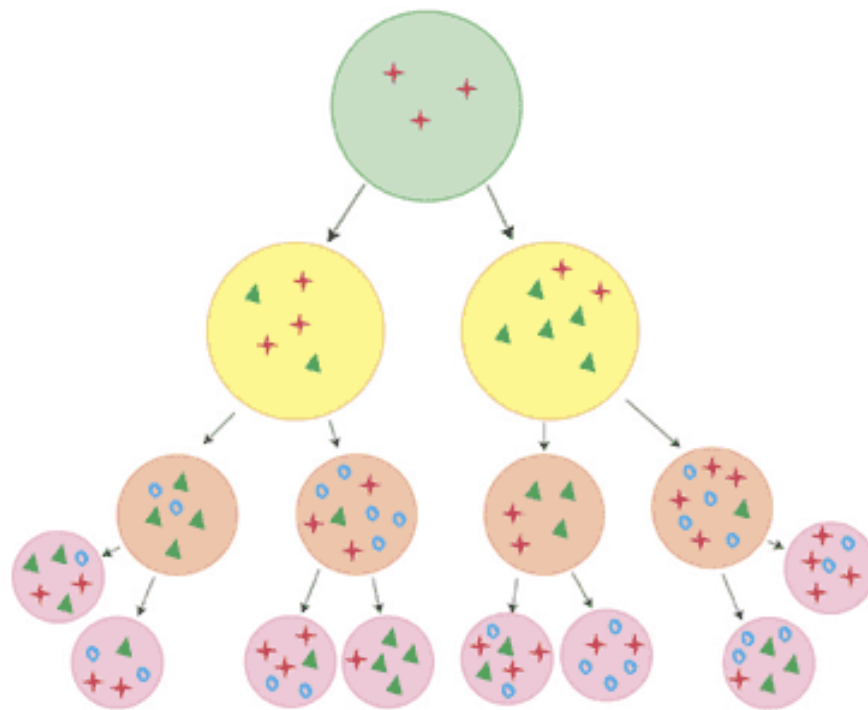
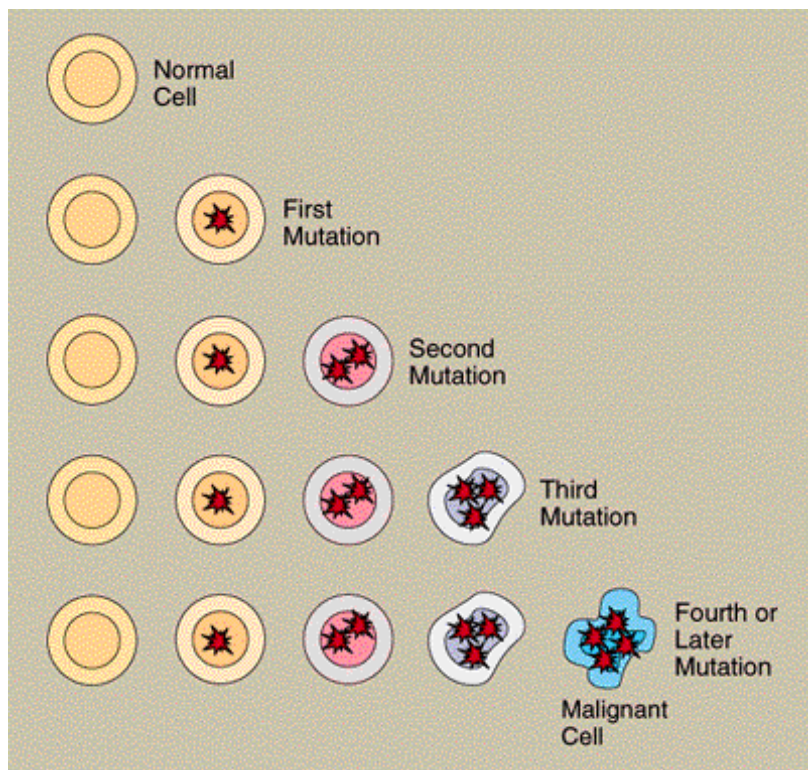


组别	突变类型	所占比例	对吉非替尼敏感性
1	Exon 19 deletions; L858R	~90%	敏感
2	T790M/deletion; T790M/L858R; G719X; L861Q; S768I	~7%	有限敏感
3	T790M alone; Exon 20 insertions; other mutations	~3%	不敏感

Mok *et al.*, 2008
Kim *et al.*, 2008
Hirsch *et al.*, 2006
AZ In-House Data - Unpublished

标本因素对肿瘤组织中基因突变检测的影响

--肿瘤组织特点--



遗传异质性
(Heterogeneity)

● 对检测方法敏感度有较高要求

标本因素对肿瘤组织中基因突变检测的影响

--组织标本种类--

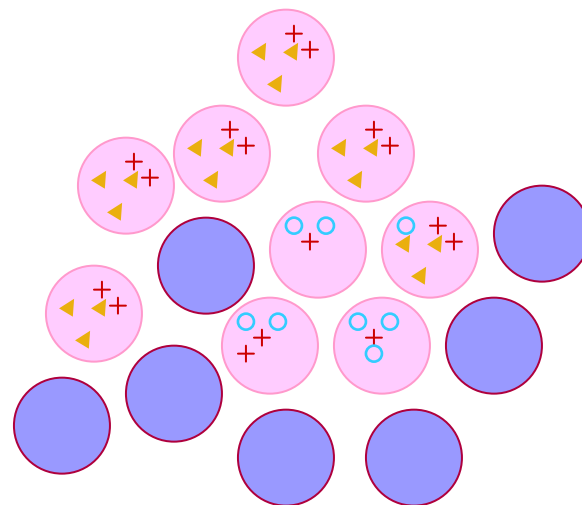


● 冰冻组织

- 外科手术标本
- 穿刺活检测标本

● 固定包埋组织

- 外科手术标本
- 穿刺活检测标本



正常细胞混杂
(Contamination with normal cells)

● 对检测方法敏感度有较高要求

EGFR突变检测方法概述

- 直接测序法
- PCR-RFLP/AS-PCR
- dHPLC/HRMA
- 实时荧光定量PCR
 - TaqMan
 - PNA-LNA clamp
 - ARMS

直接测序法

PCR/巢式PCR/突变富集PCR



纯化



测序反应



纯化

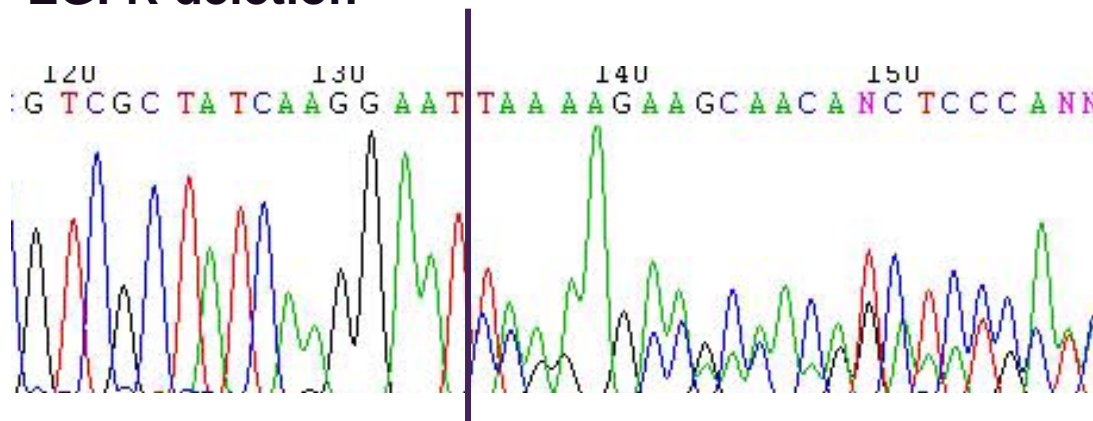


测序仪毛细管电泳

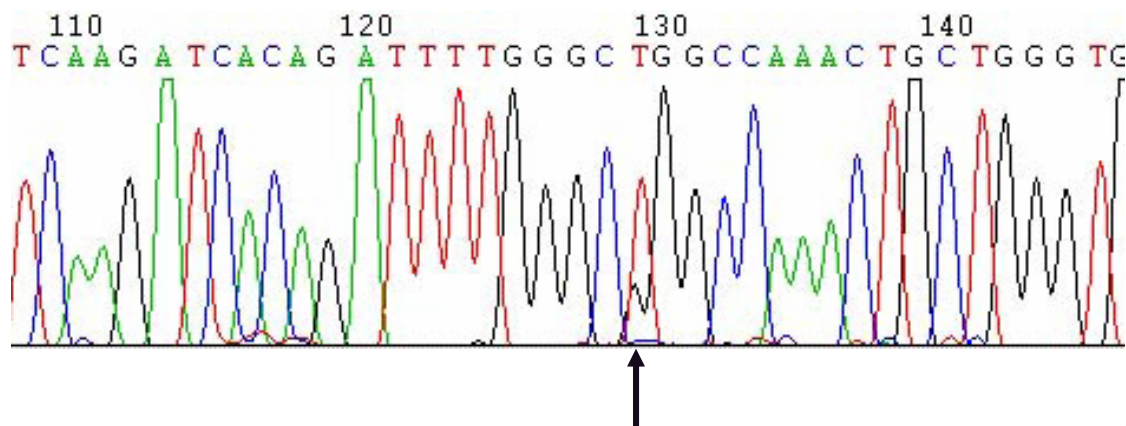


数据分析

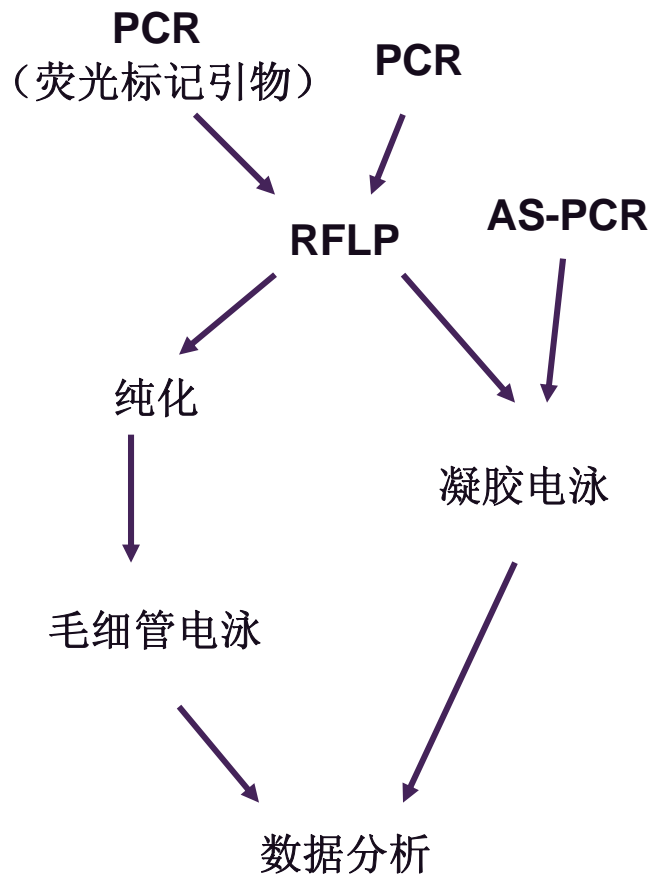
EGFR deletion



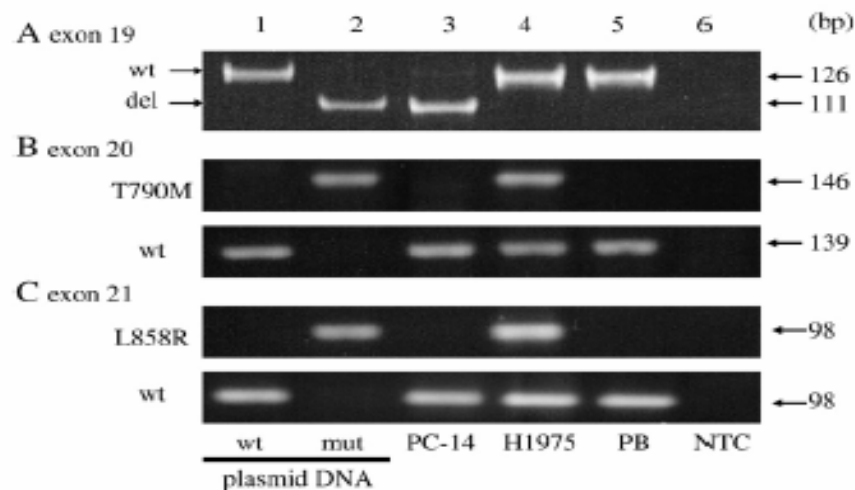
EGFR L858R



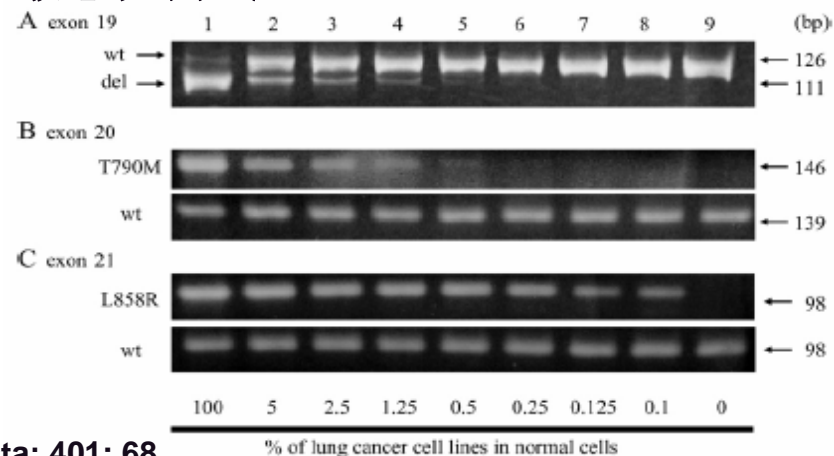
PCR-RFLP/AS-PCR



特异性测试



敏感性测试



(from Clinica Chimica Acta; 401: 68

dHPLC/HRMA

PCR/
巢式PCR/
突变富集PCR



异源双链形成



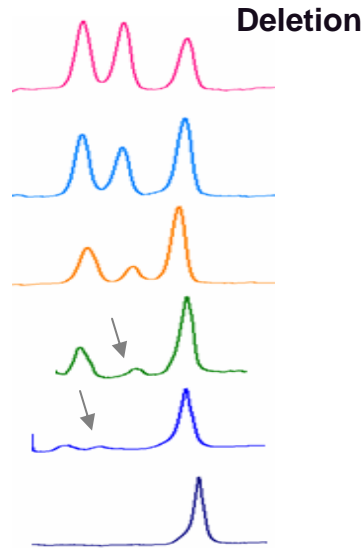
dHPLC/
HRMA

dHPLC

(from Dr. Wang
group in BTH)

HRMA

(from Am J Clin
Pathol; 126: 608)



50%

25%

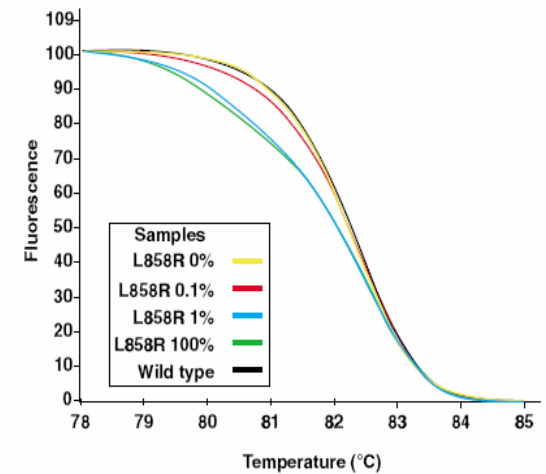
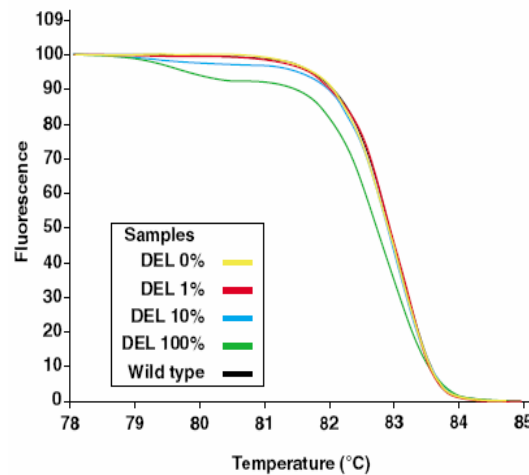
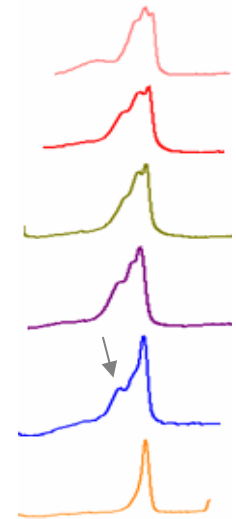
12.5%

6.25%

3.125%

1.6%

L858R



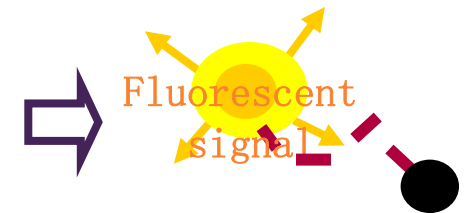
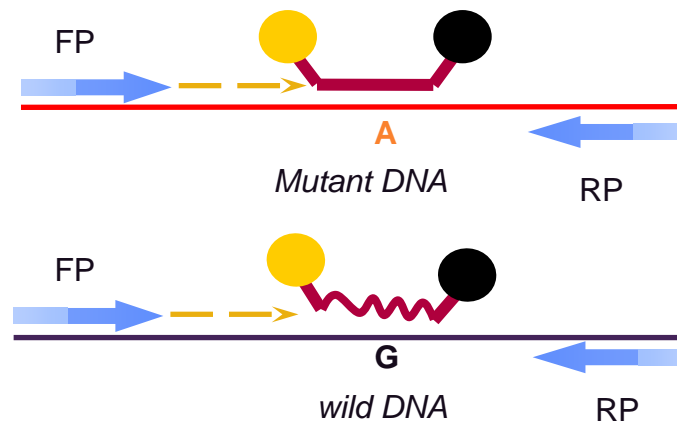
实时荧光定量PCR

实时荧光定量PCR

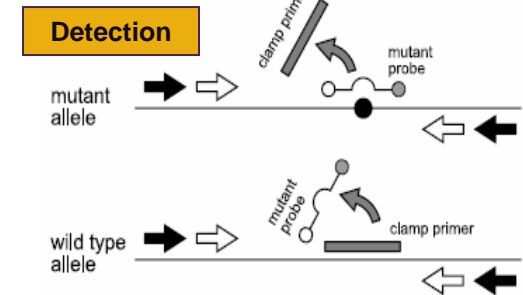
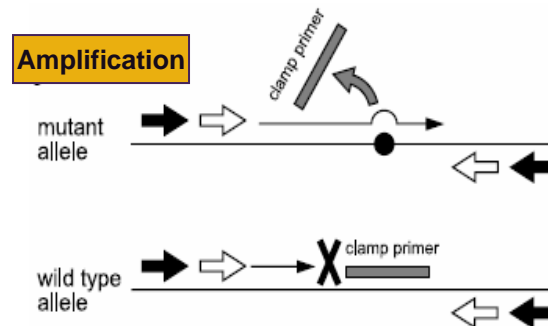


数据分析

● TaqMan assay



● PNA-LNA clamp



● TaqMan

● PNA-LNA clamp

● ARMS

(from Cancer Res; 65: 7276)

EGFR突变检测主要方法及敏感度

方法	敏感度
● 直接测序法	10-20%
● PCR-RFLP/AS-PCR	N/A
● dHPLC/HRMA	3-12%
● 实时荧光定量PCR	
--TaqMan	>10%
--PNA-LNA clamp	1%
--ARMS	1%

测序法与ARMS法比较

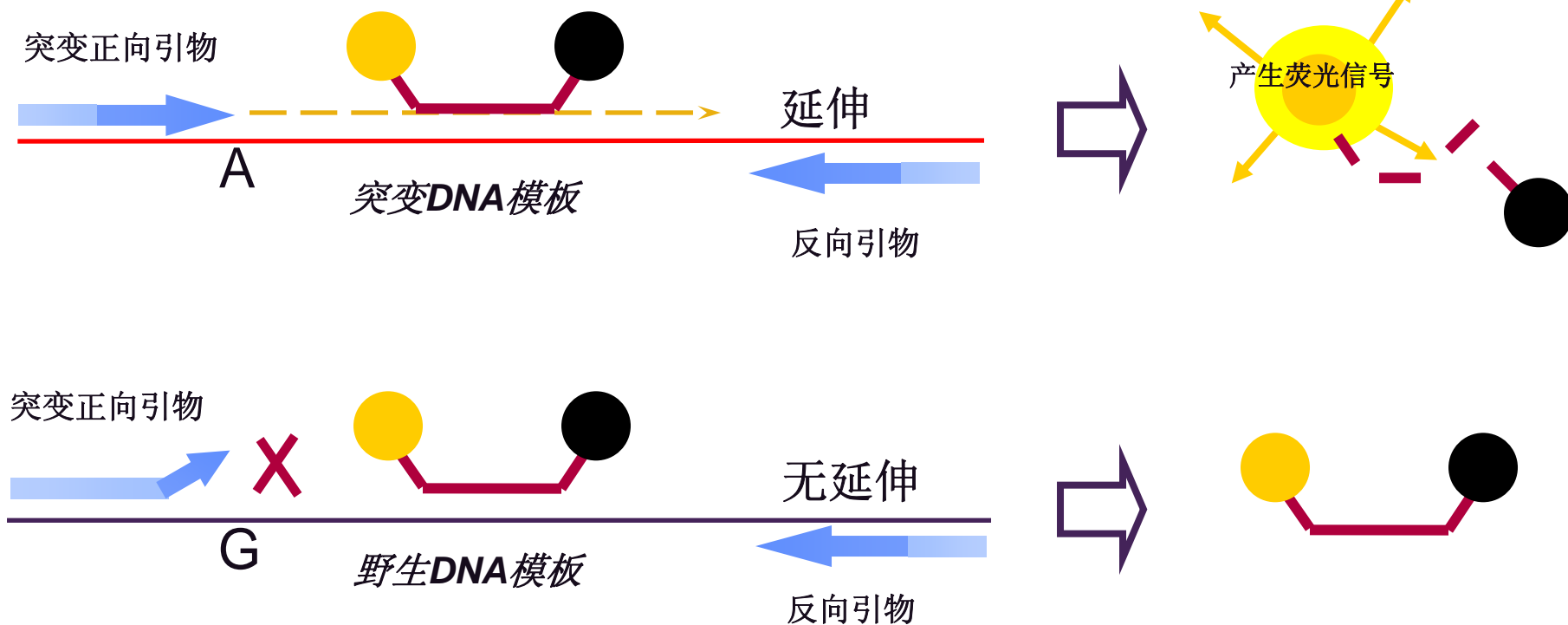
	测序法	ARMS
敏感度	10-20%	1%
FFPE标本成功率	低	高
商用试剂盒	无	有
流程与速度	复杂/慢	简单/快
数据分析要求	高	低
试剂成本	低	略高
仪器成本	高	低

ARMS方法

- ARMS基本原理
- 操作流程及数据解读
- 两种商品ARMS试剂盒
- 两种ARMS突变判读与对比

ARMS基本原理

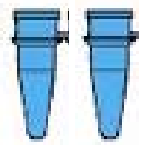
等位基因特异性PCR + 荧光探针 = ARMS方法



操作流程及数据解读



DNA

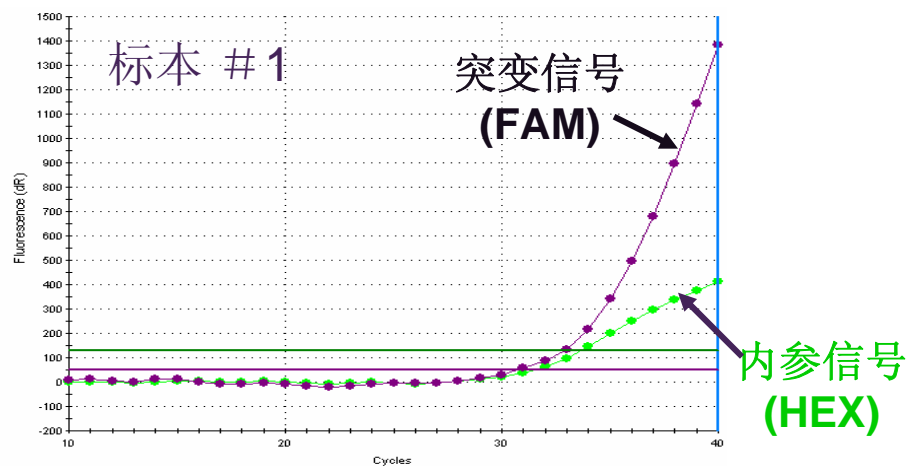


ARMS反应



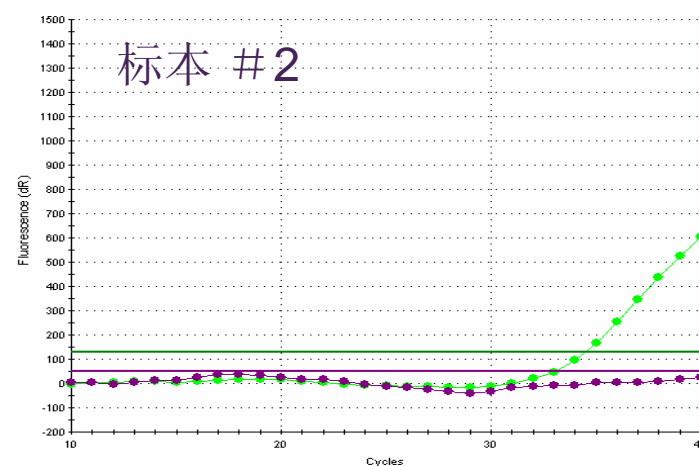
实时定量 PCR

数据分析



突变: +

内参: +



-

+

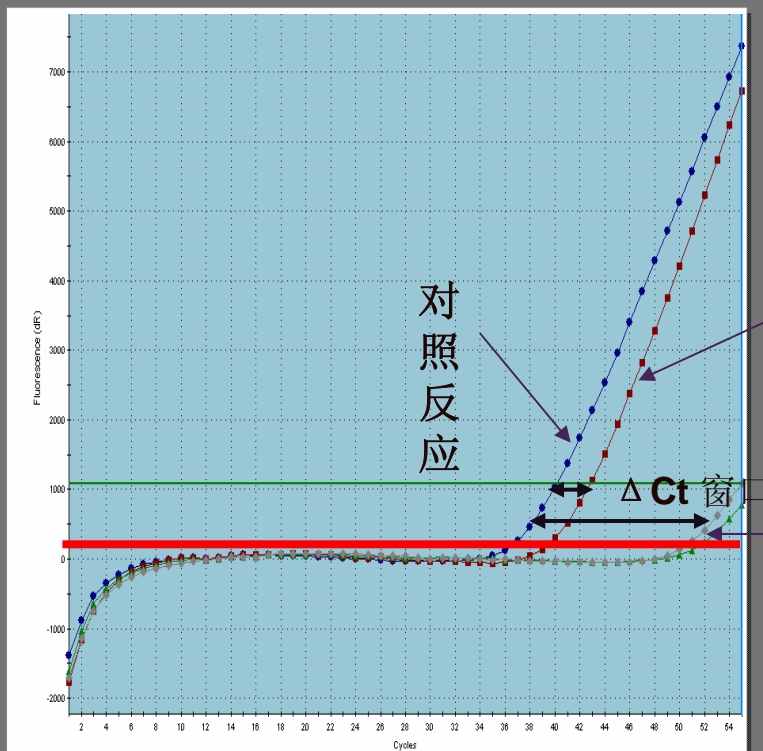
DxS ARMS 与 ADx ARMS

	DxS ARMS	ADx ARMS
生产厂商	英国DxS公司	中国厦门艾德
引物与探针设计	蝎形引物与探针	双环引物与探针
检测突变种类	29种	29种
突变判读	FAM信号, Δ Ct值	FAM信号, Ct值
DNA用量	<20ng/Rnx	<10ng/Rnx
适用qPCR机型	Stratagene Mx系列, ABI系列	Stratagene Mx系列, ABI系列, Lightcycler480

突变判读

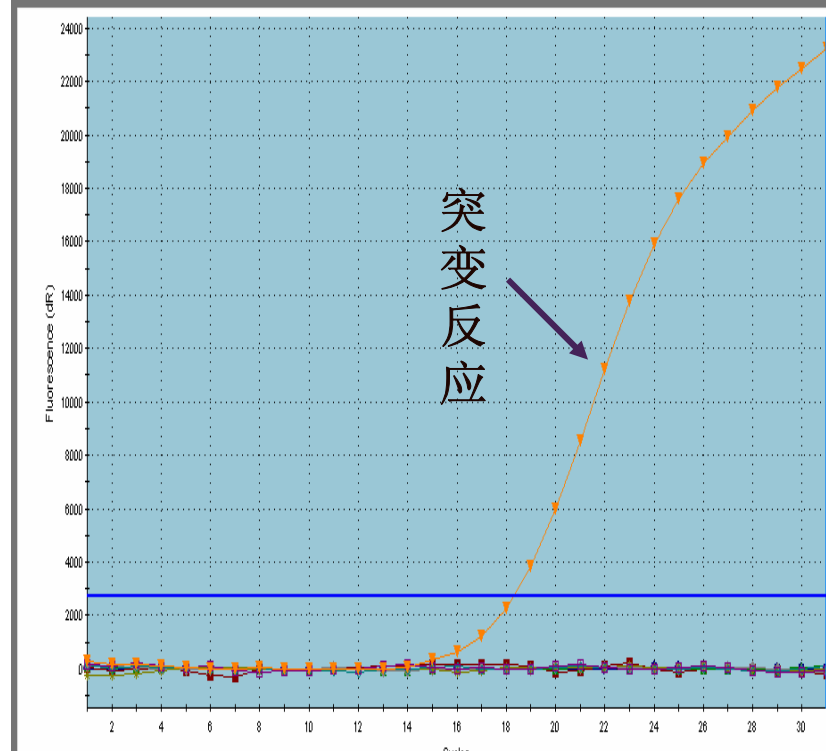
DxS ARMS

Sensitivity test V617F



ADx ARMS

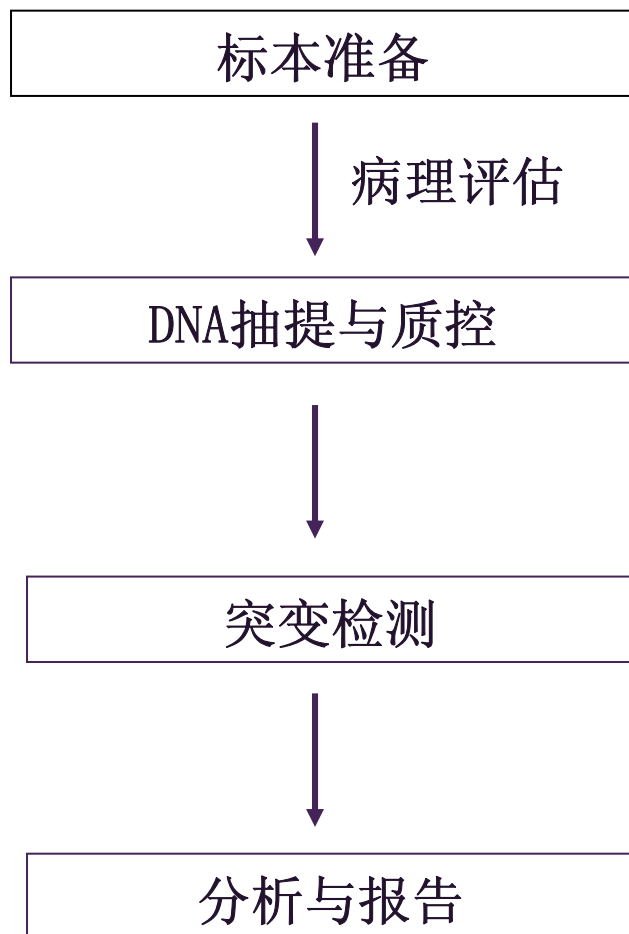
Amplification Plots



Conclusion on validation of ADx ARMS vs DxS ARMS



工作流程与质量控制



- 标本种类
- 标本量

- SOP
- OD 260/280
- QPCR

- SOP
- 阳性及阴性对照
- 问题及解决

- SOP
- 判读标准
- 报告形式及检查

Q & A