

Таблица 1П. Описание методик детекции мутаций EGFR
Table 1P. Description of methods for detecting EGFR mutations

Тип мутации	Праймеры	Состав ПЦР-смеси	Условия ПЦР/ Оборудование
Анализ плавления ПЦР-продуктов с высоким разрешением (HRMA)			
Делеции в 19 экзоне	Forward: CCTTCTCTCTGTTCATAGGGACTCTGGA Reverse: CCCACACAGCAAAGCAGAAACTCAC	1 µl ДНК, 0,15 у урацил-ДНК-гликозилазы (uracil-DNA glycosylase, UDG), 0,75 у ДНК-полимеразы, ПЦР-буфер GeneAmp™ 10X PCR Buffer I (Applied Biosystems), 2,5 mM MgCl ₂ , 1x EvaGreen, 200 µM dNTPs, 0,3 µM праймеров в общем объеме 20 µl	Обработка урацил-ДНК-гликозилазой: 15 мин, 37°C; активация Taq-полимеразы: 10 мин, 95°C; затем 45 циклов (денатурация: 20 с, 95°C; отжиг и синтез: 60 с, 72°C); затем анализ плавления с высоким разрешением (увеличение температуры от 65 до 95°C с шагом 0,07°C/1 с и регистрации флуоресценции), Оборудование: ПЦР-амплификатор Light-Cycler® 96 Instrument (Roche)
Инсерции в 20 экзоне	Forward: CACCATGCGAAGCCACACTGACGT Reverse: TGATGAGATGCACGGTGGAGGTGAG		
Точечные мутации в 18 экзоне (включая кодон G719)	Forward: CCCAGCTTGTGGAGCCTCTTACAC Reverse: CTGTGCCAGGGACCTTACCTTATACACC		
Алель-специфическая ПЦР			
EGFR L858R	Wild-type: TCCGCACCCAGCAGTTTGGCTA Mutant: TCCGCACCCAGCAGTTTGGCTC Common: GCATGAACTACTTGGAGGAC	1 µl ДНК, 0,75 у ДНК-полимеразы, ПЦР-буфер GeneAmp™ 10X PCR Buffer I (Applied Biosystems), 2,0 mM MgCl ₂ , 0,2x SYBR Green I, 200 µM dNTPs, 0,3 µM праймеров в общем объеме 15 µl	Активация Taq-полимеразы: 10 мин, 95°C; затем 50 циклов (денатурация: 15 с, 95°C; отжиг: 30 с, 58°C; синтез: 30 с, 72°C), Оборудование: ПЦР-амплификатор CFX-96 (Bio-Rad)
EGFR L861Q	Wild-type: TTTCTCTTCCGCACCCAGCA Mutant: TTTCTCTTCCGCACCCAGCT Common: GCATGAACTACTTGGAGGAC		
EGFR T790M	Wild-type: TCCACCGTGCAGCTCATTAC Mutant: TCCACCGTGCAGCTCATTAT Common: CTTCCCTGATTACCTTGGCGA		
EGFR S768I	Wild-type: TGGGGGTTGTCCACGCT Mutant: TGGGGGTTGTCCACGAT Common: CTTCTGGCCACCATGCG		
Цифровая капельная ПЦР			
Делеции в 19 экзоне*	Forward: gggactctggatcccagaag Reverse: cacacagcaaaagcagaactca Probe 1: [FAM]CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCCT[BHQ1] Probe 2: [R6G]AGAAAGTAAAATCCCGTCGCTA[BHQ1]	2 µl ДНК, 4 µl микса ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (Bio-Rad), 0,5 µM праймеров и меток в объеме 20 µl	Активация Taq-полимеразы: 10 мин, 95°C; затем 50 циклов (денатурация: 30 с, 94°C; отжиг и синтез: 60 с, 58°C), Оборудование: T100 Thermal Cycler (Bio-Rad); QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad)
EGFR L858R	Forward: CACCGCAGCATGTCAAGAT Reverse: CTTTCTCTTCCGCACCCAG Probes: Wild-type: [FAM]CACAGATTTTGGGCTGGCCTAAC[BHQ1] Mutant: [JOE]CACAGATTTTGGGCGGGCCTAAC[BHQ1]		
EGFR T790M	Forward: TCTGCCTCACCTCCACCGT Reverse: GGACATAGTCCAGGAGGCA Probes: Wild-type: [FAM]ATCACGCAGCTCATGCCCTTC[BHQ1] Mutant: [R6G]ATCATGCAGCTCATGCCCTTC[BHQ1]		

Тип мутации	Праймеры	Состав ПЦР-смеси	Условия ПЦР/ Оборудование
Аллель-дискриминационная ПЦР			
EGFR G719X	Forward: AGCTCTCTTGAGGATCTTGAA Reverse: CTTACCTTATACACCGTGCC Probes: Wild-type: [R6G]AGTGCTGGGCTCCGGT[BHQ1] Mutant G719A: [FAM]AGTGCTGGCCTCCGGT[BHQ1] Mutant G719S: [Cy5]AGTGCTGAGCTCCGGT[BHQ2] Mutant G719C: [ROX]AGTGCTGTGCTCCGGT[BHQ2] Mutant G719D: [Cy5,5]AGTGCTGGACTCCGGT[BHQ3]	1 µl ДНК, 0,75 у ДНК-полимеразы, ПЦР-буфер GeneAmp™ 10X PCR Buffer I (Applied Biosystems), 2,0 mM MgCl ₂ , 0,2x SYBR Green I, 200 µM dNTPs, 0,3 µM праймеров в общем объеме 15 µl	Активация Taq-полимеразы: 10 мин, 95°C; затем 50 циклов (денатурация: 15 с, 95°C; отжиг: 30 с, 58°C; синтез: 30 с, 72°C), Оборудование: ПЦР-амплификатор CFX-96 (Bio-Rad)

*Последовательности праймеров и меток взяты из работы Oskina et al., 2017 [11]