

راهنمای کیت **BRAF RQ**

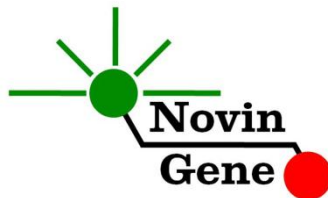
جهت بررسی جهش های BRAF
به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-40-100

ویرایش ۱/۰

پاییز ۱۳۹۹



فهرست مندرجات

۱. مقدمه..... ۲
۲. محتویات کیت..... ۲
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت..... ۳
۴. سایر موارد مورد نیاز..... ۳
۵. نکات قابل توجه..... ۴
۶. نمونه مناسب..... ۵
۷. استخراج DNA..... ۵
۸. روش کار: بررسی کیفیت DNA نمونه..... ۵
۹. تنظیم دستگاه Real-Time PCR..... ۶
۱۰. آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه..... ۷
۱۱. روش کار: بررسی جهش های BRAF..... ۱۰
۱۲. آنالیز نتایج برای جهش های BRAF..... ۱۲
۱۳. حساسیت..... ۲۰

کیت BRAF RQ جهت بررسی جهش در کدون ۶۰۰ انکوژن BRAF در DNA انسانی با استفاده از دستگاه Real-Time PCR طراحی شده است. این کیت مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

انکوژن BRAF، نقش مهمی در فعالیت های رشد و تمایز سلولی برعهده دارد. جهش های مربوط به این انکوژن که در کدون ۶۰۰ اتفاق می افتند در انواع سرطان ها رایج است. بر اساس گزارشات، جهش BRAF در ۴۰-۵۰٪ از بیماران مبتلا به ملانوما، ۱۰-۷۰٪ از سرطان های تیروئید و ۱۰٪ از سرطان های روده بزرگ (colorectal cancer) و ۳-۵٪ از سرطان ریه از نوع non small cell lung cancer (NSCLC) مشاهده می گردد.

بیشتر جهش های مشاهده شده BRAF در کدون ۶۰۰ این ژن شامل پنج جهش V600E, V600Ec, V600D, V600K, V600R می باشد. کیت حاضر مواد لازم را برای تشخیص این پنج جهش به روش Real-Time PCR فراهم می کند. در این روش با استفاده از پروب های نشان دار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. بنابراین علاوه بر کاهش زمان آزمایش، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار PCR پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل دفترچه راهنما، لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	تعداد	حجم
BRAF Ctrl Mix	میکس PCR برای کنترل کیفی DNA	۲	۴۸۰ میکرولیتر
V600E Mix	میکس PCR برای بررسی جهش V600E	۱	۴۸۰ میکرولیتر
V600Ec Mix	میکس PCR برای بررسی جهش V600EC	۱	۴۸۰ میکرولیتر
V600D Mix	میکس PCR برای بررسی جهش V600D	۱	۴۸۰ میکرولیتر
V600K Mix	میکس PCR برای بررسی جهش V600K	۱	۴۸۰ میکرولیتر
V600R Mix	میکس PCR برای بررسی جهش V600R	۱	۴۸۰ میکرولیتر
BRAF Pos	شاهد مثبت	۱	۲۵۰ میکرولیتر
BRAF Neg	شاهد منفی	۱	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۱	۲۰۰ میکرولیتر

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت که در جدول بالا ذکر شده است باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضای کیت که روی کیت و نیز روی هر تیوب درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر و بیش از سه بار این مواد به ویژه میکس PCR خودداری کنید، زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

- برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:
- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- ورتکس (Vortex Mixer)

- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA و تجهیزات و مواد مصرفی مورد نیاز
- میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- **هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.**
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به میکروتیوب های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به میکروتیوب PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- **در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.**

- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آن ها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب

نمونه مناسب بلوک پارافینی (بافت فیکس شده در فرمالین) و یا بافت فیکس نشده می تواند باشد. توجه داشته باشید که بافت تومور نا همگن بوده و تجمع سلولهای جهش یافته در نقاط مختلف تومور یکسان نیست. بنابراین نتیجه آزمایش از نظر وجود جهش BRAF با این کیت برای نقاط مختلف بافت تومور یکسان نخواهد بود.

۷. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه بافتی از روش ها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می نمائیم:

- QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Cat. no. 51404, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- Roche; High Pure FFPE DNA Isolation Kit (Cat. No. 06 650 767 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

توجه داشته باشید که میزان DNA لازم برای انجام تست، حداقل ۴۰ میکرولیتر و ترجیحا ۱۰۰ میکرولیتر می باشد تا در صورت نیاز، امکان تکرار تست وجود داشته باشد.

۸. روش کار: بررسی کیفیت DNA نمونه

پیش از بررسی نمونه برای وجود جهش های BRAF، ابتدا باید از کیفیت DNA استخراج شده از نمونه بیمار اطمینان یافت و در صورتی که نتایج در محدوده

مطلوب باشد آنگاه، آزمایش دوم که بررسی جهش های ژن BRAF می باشد انجام خواهد شد. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه بیمار به شرح زیر عمل نمایید.

توجه! حجم نمونه DNA را بررسی کنید و مطمئن شوید که بیش از ۴۰ میکرولیتر و ترجیحا حدود ۱۰۰ میکرولیتر می باشد. در صورتیکه میزان نمونه کمتر از ۴۰ میکرولیتر باشد امکان انجام آزمایش وجود ندارد!

ابتدا تیوب میکس کنترل (BRAF Ctrl Mix) را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آن ذوب شود. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن را در دور پایین، سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز میکروتیوب را بر روی بلوک سرد بگذارید. در این سری، علاوه بر یک میکروتیوب برای نمونه هر بیمار، دو میکروتیوب دیگر برای شاهد منفی و نمونه آب در نظر بگیرید.

به هر میکروتیوب، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از BRAF Ctrl Mix و سپس ۵ میکرولیتر از DNA نمونه، شاهد منفی و آب اضافه کنید و درپوش میکروتیوب ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

۹. تنظیم دستگاه Real-Time PCR

در صورتی که از دستگاه Rotor-Gene و یا StepOne استفاده می کنید، برای تنظیم دستگاه می توانید از فایل تمپلیت در لوح فشرده همراه کیت استفاده نمایید. همچنین می توانید این فایل ها را از وبسایت نوین ژن به آدرس www.novingene.com نیز دانلود نمایید. هنگام کار با RotorGene با توجه به نوع میکروتیوب استفاده شده، فایل "BRAF 0.2" و یا "BRAF 0.1" را

انتخاب نمایید و اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید! برای تنظیم سایر دستگاه ها از جدول زیر استفاده نمایید.

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و در کانال های FAM/Green و VIC/Yellow تنظیم شود. میکس های کیت حاوی ROX می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

۱۰. آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه

تحلیل نتایج آزمایش کنترل کیفیت DNA بیمار در دو مرحله انجام می شود. در مرحله نخست باید با بررسی نتایج شاهدهای مثبت و منفی اطمینان یافت که آزمایش از نظر کیفی به نحو مطلوب انجام شده است و سپس می توان نتایج نمونه بیمار را آنالیز نمود.

برای تحلیل نتایج آستانه (threshold) را برای هر دو کانال FAM/Green و VIC/Yellow روی ۰/۱ قرار دهید.

در نظر داشته باشید که افزایش تابش FAM/Green مربوط به DNA نمونه بیمار و افزایش تابش VIC/Yellow حاصل از کنترل داخلی می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.

الف - بررسی شاهدهای منفی. در صورتی که:

(۱) نمونه آب در کانال FAM/Green، منفی و در کانال VIC/Yellow.

مثبت و دارای CT بین ۲۸ تا ۳۳ باشد و

(۲) نمونه شاهد منفی در کانال FAM/Green، مثبت و دارای CT بین ۲۳

تا ۲۸ و در کانال VIC/Yellow، مثبت و دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳

باشد،

آن گاه نتایج آزمایش معتبر است. اکنون می توانید نمونه بیمار را بررسی نمائید.

نتایج بررسی نمونه های شاهد و شرایط اعتبار آزمایش به طور خلاصه در

جدول یک آمده است.

VIC/Yellow	FAM/Green	نمونه
Pos (CT 27-33)	Neg	آب / NTC
Pos (CT 27-33)	Pos (CT 23-28)	شاهد منفی

جدول ۱. نتایج مورد انتظار در بررسی کیفیت DNA نمونه

توجه داشته باشید نمونه بیمار تنها زمانی قابل بررسی خواهد بود که نمونه های شاهد دارای شرایط فوق باشند. در غیر این صورت، آزمایش غیر معتبر بوده و کلیه نتایج فاقد ارزش می باشد.

ب- بررسی نمونه بیمار:

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال FAM/Green دارای CT بین ۲۲ تا ۳۰ و

در کانال VIC/Yellow دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد، نتیجه قابل قبول است و

می توانید آزمایش بررسی جهش BRAF را شروع نمائید. برای افزایش حساسیت

تست، مطلوب آن است که نمونه بیمار در کانال FAM/Green دارای CT بین

۲۲ تا ۲۷ باشد.

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال FAM/Green دارای CT کمتر از ۲۲ و در کانال VIC/Yellow دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد، نمونه باید با آب رقیق شود تا CT آن در محدوده ۲۲ تا ۲۷ قرار گیرد. در نظر داشته باشید که به ازای دو برابر رقیق سازی نمونه، CT آن یک واحد تغییر می نماید. پس از رقیق سازی نمونه می توانید آزمایش بررسی BRAF را شروع نمایید.

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال FAM/Green دارای CT بالاتر از ۳۰ باشد، نتیجه قابل قبول نیست. در این حالت استخراج دوباره نمونه توصیه می شود.

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال VIC/Yellow دارای CT بالاتر از ۳۳ باشد، نتیجه نامعتبر است. این حالت می تواند ناشی از خطا در آزمایش و یا وجود عوامل مزاحم در نمونه استخراج شده باشد.

خلاصه بررسی حالات مختلف نتایج نمونه بیمار در جدول دو آمده است.

	FAM/Green	VIC/Yellow	Result
1	+ CT: 22-30	+ CT: 27-33	Valid
2	+ CT<22	+ CT: 27-33	Sample dilution
3	+ CT>30	+ CT: 27-33	Invalid
	+ CT: 22-30	+ CT>33	Invalid

جدول ۲. بررسی نتایج کنترل کیفی DNA نمونه

پس از بررسی کیفیت DNA نمونه، تحلیل داده ها و در موارد لازم، تنظیم غلظت نمونه ها، بررسی جهش های BRAF انجام می شود.

۱۱. روش کار: بررسی جهش های BRAF

برای بررسی جهش های BRAF، هر نمونه باید با شش میکس آزمایش شود. در این آزمایش پنج جهش ژن BRAF شامل V600E/Ec/D/K/R هر کدام در یک میکروتیوب جداگانه با یکی از میکس های BRAF بررسی می شوند. علاوه بر پنج میکروتیوب مذکور، یک میکروتیوب نیز به بررسی نمونه با میکس کنترل اختصاص می یابد. بنابراین برای بررسی یک نمونه بیمار، ۶ میکروتیوب برای آزمایش نمونه، ۶ میکروتیوب برای آزمایش شاهد مثبت و ۶ میکروتیوب برای آزمایش شاهد منفی و ۶ میکروتیوب برای آزمایش شاهد منفی بدون DNA یعنی آب مورد نیاز می باشد و مجموعاً ۲۴ میکروتیوب استفاده می شود. برای بررسی همزمان دو نمونه بیمار ۳۰ میکروتیوب و برای بررسی همزمان سه نمونه بیمار ۳۶ میکروتیوب مورد نیاز می باشد.

به عنوان مثال برای بررسی سه نمونه بیمار، مطابق تصویر یک، شش ردیف شش تایی میکروتیوب مورد نیاز است. هر ردیف عمودی یا ستون برای یکی از شاهد های مثبت، منفی یا نمونه بیمار استفاده می شود و در مجموع برای آزمایش ۳ نمونه، به ۱۸ میکروتیوب برای نمونه ها و ۱۸ میکروتیوب برای شاهد ها نیاز داریم که مجموعاً ۳۶ لوله خواهد بود که به صورت ۶ ستون ۶ تایی مرتب شده اند. بر این اساس، تعداد مورد نیاز لوله PCR را به صورت ستون های شش تایی روی بلوک سرد بگذارید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف اول ۲۰ میکرولیتر از **BRAF Ctrl Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف دوم ۲۰ میکرولیتر از **V600E Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف سوم ۲۰ میکرولیتر از **V600Ec Mix** اضافه کنید.

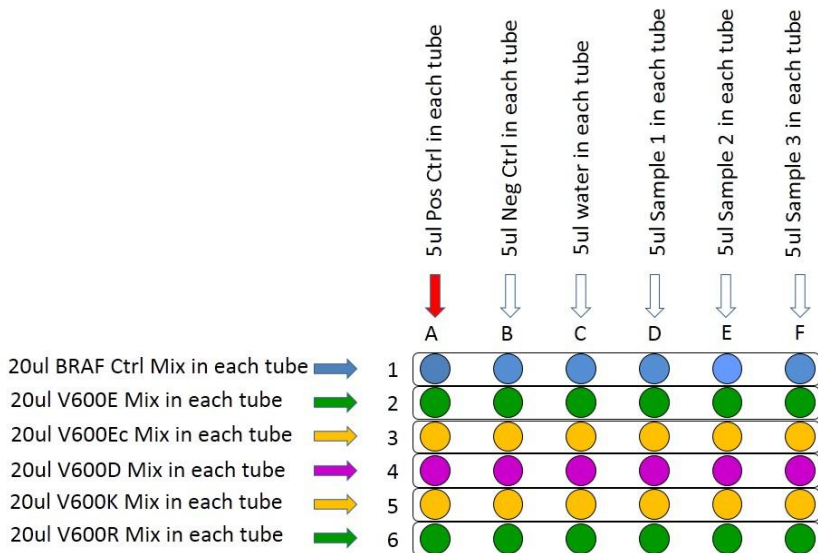
به هر یک از میکروتیوب های ردیف چهارم ۲۰ میکرولیتر از **V600D Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف پنجم ۲۰ میکرولیتر از **V600K Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف ششم ۲۰ میکرولیتر از **V600R Mix** اضافه کنید.

سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، **شاهد** یا آب به هر میکروتیوب اضافه کنید. به این منظور ستون اول را برای شاهد مثبت، ستون دوم و سوم را برای شاهد منفی و آب و ستون های بعدی را برای نمونه های بیماران در نظر بگیرید.

چیدمان تیوب ها به طور خلاصه در تصویر یک نشان داده شده است.



تصویر ۱. چیدمان میکروتیوب ها و اضافه نمودن میکس، شاهد ها و نمونه های بیماران

درپوش میکروتیوب ها را ببندید، سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید. دستگاه را مطابق توضیحات بخش ۹ دفترچه تنظیم نمایید.

۱۲. آنالیز نتایج برای جهش های BRAF

تحلیل نتایج آزمایش جهش های BRAF در دو مرحله انجام می شود. در مرحله نخست با توجه به نتایج شاهدهای مثبت و منفی باید اطمینان یافت که آزمایش از نظر کیفی به نحو مطلوب انجام شده است، سپس می توان نتایج نمونه بیمار را آنالیز نمود. بنابراین ابتدا نتایج شاهد های مثبت و منفی و همچنین نتیجه نمونه بیمار با میکس کنترل مورد بررسی قرار می گیرند و سپس نتایج هر یک از پنج میکس اختصاصی جهش ها برای نمونه بیمار تحلیل می شود. برای تحلیل نتایج آستانه (threshold) را برای هر دو کانال FAM/Green و VIC/Yellow روی ۰/۱ قرار دهید. در نظر داشته باشید که افزایش **تابش FAM/Green** مربوط به **DNA نمونه بیمار** و افزایش **تابش VIC/Yellow** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.

الف – کنترل کیفی آزمایش: در صورتی که:

- ۱) نمونه آب در کانال FAM/Green با کلیه میکس ها منفی باشد، و
- ۲) هر سه شاهد مثبت و منفی و شاهد آب در کانال VIC/Yellow با هر یک از میکس ها، دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشند، و

۳) شاهد مثبت با میکس کنترل در کانال FAM/Green دارای CT بین ۲۲ تا ۲۷ باشد و

۴) شاهد مثبت در کانال FAM/Green با میکس های اختصاصی دارای CT بین ۳۰ تا ۳۵ باشد، و

۵) نمونه بیمار در کانال VIC/Yellow با هر یک از میکس ها دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد،

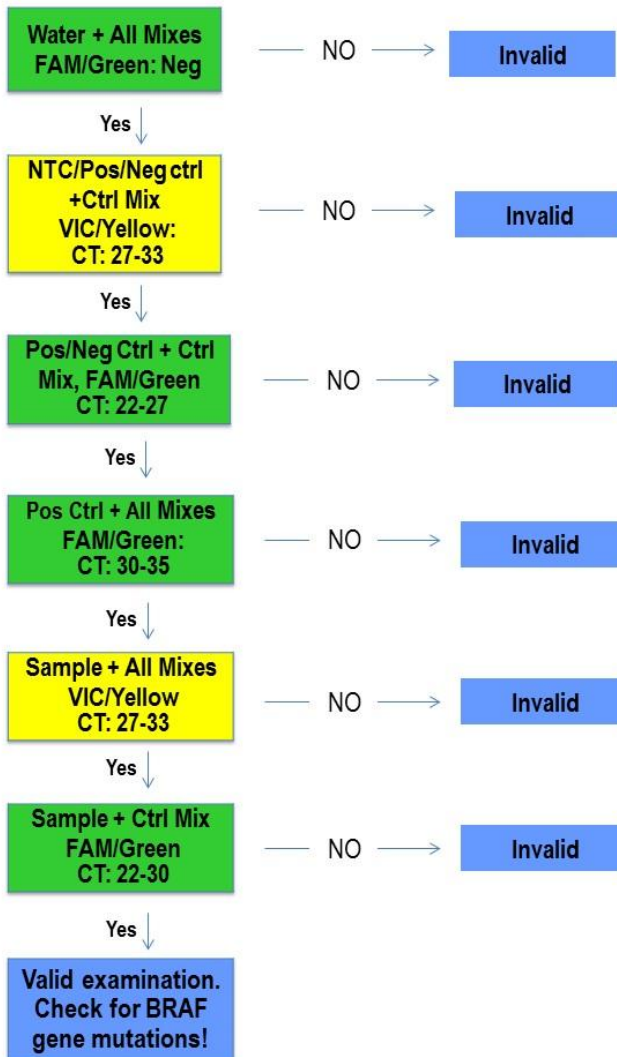
۶) نمونه بیمار در کانال FAM/Green با میکس کنترل دارای CT بین ۲۲ تا ۳۰ باشد،

آن گاه نتایج آزمایش معتبر است. اکنون می توانید نمونه بیمار را از نظر جهش های BRAF بررسی نمایید.

توجه داشته باشید جهش های BRAF تنها زمانی قابل بررسی خواهند بود که نمونه آب، شاهد مثبت و نمونه بیمار دارای شرایط فوق باشند. در غیر این صورت، آزمایش غیر معتبر بوده و کلیه نتایج فاقد ارزش می باشد.

توالی بررسی نمونه ها در کنترل کیفی تست بررسی جهش های BRAF به طور خلاصه در نمودار یک آمده است.

BRAF RQ (V1.0)



نمودار ۱. بررسی کنترل کیفی آزمایش جهش های BRAF

ب- تحلیل نتایج بررسی جهش های BRAF

- (۱) میکروتیوب هایی را که در آنها نمونه بیمار با یکی از میکس های اختصاصی در کانال FAM/Green مثبت شده و CT آن بین ۲۰ تا ۴۰ می باشد انتخاب نمائید و مقادیر آن را در جدول شماره سه ثبت نمائید.
- (۲) برای میکروتیوب های مشخص شده، ΔCT را محاسبه نمائید یعنی میزان اختلاف CT نمونه بیمار در میکس اختصاصی با CT آن در میکس کنترل. این محاسبه بر اساس مقادیر CT نمونه در کانال FAM/Green می باشد.
- به طور ساده:

$$\Delta CT = \text{Mutation Mix CT} - \text{Control Mix CT}$$

- (۳) سپس داده های بدست آمده را در جدول سه ثبت نمائید. در صورتی که نتیجه در محدوده قابل قبول باشد، نمونه دارای جهش و مثبت می باشد.
- (۴) در صورتی که یک نمونه برای بیش از یک میکس BRAF دارای ΔCT قابل قبول باشد، نمونه در واکنشی که کوچک ترین ΔCT را دارد مثبت است و برای سایر جهش ها منفی خواهد بود.

نتیجه	ΔCT نمونه	ΔCT قابل قبول	CT نمونه	CT قابل قبول	میکس BRAF مورد بررسی
Pass		-		۲۲-۳۰	Ctrl Mix
V600E or V600K Pos		$\leq 7/3$		۲۰-۴۰	V600E Mix
V600Ec Pos		$\leq 10/6$		۲۰-۴۰	V600Ec Mix
V600D Pos		$\leq 9/6$		۲۰-۴۰	V600D Mix
V600K Pos		≤ 9		۲۰-۴۰	V600K Mix
V600R Pos		$\leq 8/3$		۲۰-۴۰	V600R Mix

جدول ۳. مقادیر قابل قبول CT و ΔCT در بررسی نمونه های بیماران و تفسیر آن به عنوان مثال، در صورتی که CT نمونه بیمار با میکس کنترل ۲۴/۷، با میکس

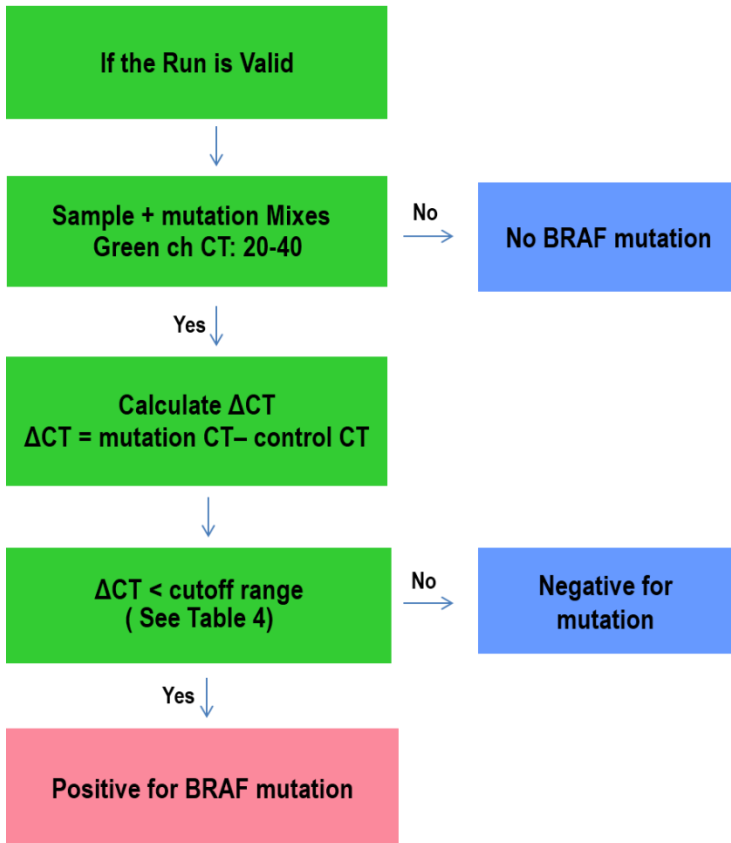
V600E معادل ۳۲/۲ ، با میکس V600Ec برابر ۲۵/۵ ، با میکس V600D برابر ۳۷/۴ ، در میکس V600K برابر ۳۹/۱ و نهایتاً با بقیه میکس ها منفی باشد، اختلاف CT ها برای میکس V600E، ۱۰/۵ (۲۴/۷ - ۳۵/۲) و برای میکس V600Ec، ۵/۸ (۲۴/۷ - ۳۰/۵) ، برای میکس V600D، ۱۵/۷ ، برای میکس V600K، ۱۷/۴ و برای میکس V600R برابر ۱۸/۸ خواهد بود (جدول چهار). اکنون نتایج برای برای میکس V600Ec در محدوده قابل قبول می‌باشد. در این حالت بیمار برای جهش V600Ec مثبت است.

نتیجه	ΔCT نمونه	ΔCT قابل قبول	CT نمونه	CT قابل قبول	میکس BRAF مورد بررسی
قابل قبول		-	۲۴/۷	۲۲-۳۰	BRAF Ctrl Mix
منفی	۱۰/۵	$\leq ۷/۳$	۳۵/۲	۲۰-۴۰	V600E Mix
مثبت	۵/۸	$\leq ۱۰/۶$	۳۰/۵	۲۰-۴۰	V600Ec Mix
منفی	۱۵/۷	$\leq ۹/۶$	۴۰/۴	۲۰-۴۰	V600D Mix
منفی	۱۷/۴	≤ ۹	۴۲/۱	۲۰-۴۰	V600K Mix
منفی	۱۸/۸	$\leq ۸/۳$	۴۳/۵	۲۰-۴۰	V600R Mix

جدول ۴. نمونه ای از جدول ثبت داده ها برای یک نمونه بیمار.

توجه داشته باشید که نمونه طبیعی و فاقد جهش نیز می تواند با میکس های فوق، واکنش غیر اختصاصی داشته باشد، اما در این حالت، مقدار اختلاف CT آن (ΔCT) همواره از میزان قابل قبول ذکر شده در جدول سه بیشتر خواهد بود. به عبارت دیگر، اگرچه وجود CT در محدوده ۲۰ تا ۴۰، شرط اولیه بررسی نمونه می‌باشد، اما در نهایت معیار مثبت یا منفی بودن نمونه، اختلاف CT (ΔCT) محاسبه شده برای آن است، نه مقدار CT. نمودار دو، مراحل بررسی نمونه بیمار را برای شناسایی جهش های BRAF نشان می دهد.

همچنین توجه داشته باشید چنانچه نمونه با میکس V600E مثبت شود، میتواند حاوی جهش V600E و یا V600K باشد.



نمودار ۲. مراحل بررسی نتایج نمونه بیمار برای شناسایی جهش های ژن BRAF در کانال FAM/Green

بر این اساس نتایج هر واکنش به صورت زیر تفسیر می شود:

- در صورتی که یک نمونه در همه میکس های BRAF در کانال FAM/Green منفی یا دارای CT بالاتر از ۴۰ باشد، نمونه از نظر جهش BRAF **منفی** است.

- در صورتی که نمونه در یک یا چند میکس BRAF در کانال FAM/Green دارای CT بین ۲۰ تا ۴۰ و ΔCT بیشتر از مقدار قابل قبول (مقادیر جدول سه) باشد، نمونه از نظر جهش BRAF **منفی** است.

- در صورتی که نمونه در کانال FAM/Green با یکی از میکس های پنج گانه BRAF دارای CT و ΔCT قابل قبول (مقادیر جدول سه) باشد، از نظر جهش مورد نظر ژن BRAF **مثبت** است. به طور خلاصه، اگر نمونه:

○ با میکس V600E دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 7/3$ باشد، دارای جهش V600E یا V600K است.

○ با میکس V600Ec دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 10/6$ باشد، دارای جهش V600Ec است.

○ با میکس V600D دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 9/6$ باشد، دارای جهش V600D است.

○ با میکس V600K دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 9$ باشد، دارای جهش V600K است.

○ با میکس V600R دارای $CT \leq 40$ و $\Delta CT \leq 8/3$ باشد، دارای جهش V600R است.

- در صورتی که یک نمونه در کانال FAM/Green برای بیش از یک میکس BRAF دارای CT و ΔCT قابل قبول (مقادیر جدول چهار) باشد، نمونه در واکنشی که کوچک ترین ΔCT را دارد از نظر جهش BRAF مثبت است. خلاصه تفسیر نتایج آزمایش BRAF در جدول پنج آمده است.

نتیجه گیری	ΔCT نمونه	CT نمونه	میکس BRAF
برای جهش V600E منفی	-	>40	V600E Mix
برای جهش V600E منفی	$>7/3$	$20-40$	
برای جهش V600E یا V600K مثبت	$\leq 7/3$	$20-40$	
برای جهش V600Ec منفی	-	>40	V600Ec Mix
برای جهش V600Ec منفی	$>10/6$	$20-40$	
برای جهش V600Ec مثبت	$\leq 10/6$	$20-40$	
برای جهش V600D منفی	-	>40	V600D Mix
برای جهش V600D منفی	$>9/6$	$20-40$	
برای جهش V600D مثبت	$\leq 9/6$	$20-40$	
برای جهش V600K منفی	-	>40	V600K Mix
برای جهش V600K منفی	>9	$20-40$	
برای جهش V600K مثبت	≤ 9	$20-40$	
برای جهش V600R منفی	-	>40	V600R Mix
برای جهش V600R منفی	$>8/3$	$20-40$	
برای جهش V600R مثبت	$\leq 8/3$	$20-40$	

جدول ۵. تفسیر نتایج آزمایش BRAF

- توجه داشته باشید در صورتیکه نمونه با این کیت از نظر جهش های BRAF منفی باشد حالات زیر را نیز باید در نظر گرفت:
- نمونه از نظر جهش های بررسی شده BRAF منفی است.

- نمونه از نظر جهش های بررسی شده BRAF مثبت است اما درصد آن کمتر از حساسیت کیت می باشد.
- نمونه از نظر جهش های بررسی شده منفی است اما می تواند برای سایر جهش های BRAF مثبت می باشد.

۱۳. حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت معادل درصدی از DNA جهش یافته ی BRAF است که قابل شناسائی می باشد. این میزان حساسیت با توجه به میزان DNA نمونه تغییر می کند. حداکثر حساسیت کیت زمانی قابل وصول است که CT نمونه در کانال FAM/Green با میکس کنترل بین ۲۲ تا ۲۷ باشد. در صورتی که این مقدار بین ۲۸ تا ۳۰ باشد برای برخی از جهش ها میزان حساسیت کاهش می یابد. برای جزئیات بیشتر به جدول شش مراجعه نمائید.

واکنش مورد بررسی	CT در میکس کنترل: ۲۲ تا ۲۷	CT در میکس کنترل: ۲۸ تا ۳۰
V600E	٪۱	٪۲
V600Ec	٪۰/۵	٪۱
V600D	٪۰/۵	٪۱
V600K	٪۱	٪۲
V600R	٪۲	٪۴

جدول ۶. میزان حساسیت بر حسب درصد DNA جهش یافته

BRAF RQ

Kit Manual

**For Real-Time PCR
Detection of BRAF Mutations**

Research use only

NG-WI-ASL-40-100
Version 1.0
Fall 2020

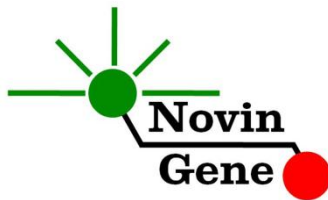


Table of Contents:

1. Introduction 2

2. Kit Contents 2

3. Storage and Stability 3

4. General Precautions..... 3

5. Additionally Required Items 4

6. Specimen 4

7. DNA Extraction..... 4

8. Protocol: DNA Sample Assessment 5

9. Programming Real-Time PCR 5

10. Analysis: Sample Assessment..... 6

11. Protocol: Detection of BRAF mutation..... 8

12. BRAF Mutation Detection Analysis 9

13. Analytical Sensitivity16

BRAF RQ kit is intended for the detection BRAF V600 mutations in human genomic DNA. This kit is designed for use with Real-Time PCR machine. This kit is for research use only!

1- Introduction

BRAF oncogene is among the most frequently mutated kinases in human cancer. Mutations in codon V600 have been reported in different types of cancers including 40-50% of melanomas, 10-70% of thyroid carcinomas, 10% of colorectal cancers and 3-5% of non-small cell lung cancers (NSCLC).

Most of the BRAF mutations are located in codon 600 and constitute V600E, V600Ec, V600D, V600K, V600R.

BRAF RQ Kit provides ready to use reagents for detection of these five mutations based on Real-Time PCR technology. In this method application of fluorescent probes and analysis of fluorescent kinetics allows detection of amplified product without requiring post-amplification analysis. Therefore, test is accomplished much faster and possibility of contamination with the PCR product is reduced sharply. This kit also includes internal control for preventing false negative results due to failure in DNA extraction or PCR reaction.

2- Kit Contents

The kit contains a manual and CD and following reagents:

Label	Content	Quantity	Volume
BRAF Ctrl Mix	PCR Mix for quality control	2	480 µl
V600E Mix	PCR Mix to check V600E mutation	1	480 µl
V600EC Mix	PCR Mix to check V600Ec mutation	1	480 µl

V600D Mix	PCR Mix to check V600D mutation	1	480 μ l
V600K Mix	PCR Mix to check V600K mutation	1	480 μ l
V600R Mix	PCR Mix to check V600R mutation	1	480 μ l
BRAF Pos	1% Positive control	1	250 μ l
BRAF Neg	Negative control	1	250 μ l
Water	PCR Grade Water	1	200 μ l

3- Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws especially for PCR Mix more than few times to prevent reduced sensitivity.

4- General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious.**
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction; b) Reagent preparation where the Master Mix is aliquoted into tubes; and c) Reaction preparation area for addition of templates to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

5- Additionally Required Items

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- Vortex Mixer
- DNA extraction kit and required equipment/items
- PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

6- Specimen

Sections of fixed tissue (paraffin block) or unfixed tissue can be examined. Note that tumor tissue is heterogeneous with uneven distribution of mutant cells; therefore different parts of tissue may produce different results.

7- DNA Extraction

DNA extraction can be performed with different kits from various manufacturers. We recommend using:

- QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Cat. no. 51404, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- Roche; High Pure FFPE DNA Isolation Kit (Cat. No. 06 650 767 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

Note that, the minimum volume of DNA required for the test is 40 microliters. We recommend extracting 100 microliters or higher volume of DNA, enough to repeat the test if necessary.

8- Protocol: DNA Sample Assessment

Before examining a sample for BRAF mutations, quality of DNA should be assessed. If the results are within the desired range, then the second test for detecting BRAF mutations will be performed. To qualify DNA extraction, follow steps below.

Note! Check the volume of extracted DNA sample and make sure it is more than 40 microliters and preferably about 100 microliters. Volumes less than 40 microliters are not enough to proceed.

First, thaw the **BRAF Ctrl Mix** on ice completely, mix by inversion followed by a quick spin and store on crushed ice after. Place the required number of microtubes on cold block including one for each sample, plus two for negative control and water.

Pipette 20µl of BRAF Ctrl Mix to each microtube. Continue by adding 5µl of DNA sample, Negative control and Water to each tube.

Cap the tubes and inspect visually to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

9- Programming Real-time PCR

Rotor-Gene or StepOne could be setup using templates provided in the CD. Templates may also be downloaded from our website www.novingene.com. For Rotor-Gene, select “BRAF 0.2” or “BRAF 0.1” according to the PCR tubes.

You may also set up the machine as below.

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM/Green and VIC/Yellow dyes/channels.

All mixes contain ROX with final concentration of 300nM in the reaction.

10-Analysis: Sample Assessment

Data Analysis is performed in two steps. First, the test validity is assessed and then DNA sample analysis. As the initial step, results of negative control will be evaluated.

Perform quantitative analysis for both **DNA sample (FAM/Green channel)** and **internal control (VIC/Yellow channel)** with the threshold set at 0.1 for both channels.

Note that, a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of sigmoid graph and log phase, sample can not be considered as positive (even CT present) result is not reliable.

Test is valid only if:

- 1) Water sample is **Negative** in FAM/Green channel and it is **Positive** in VIC/Yellow channel with CT of 27-33.
- 2) Negative controls is **Positive** in VIC/Yellow channel with CT of 27-33.
- 3) Negative control is **Positive** in FAM/Green channel with CT of 23-28.

Expected results for a valid test are summarized in Table1.

Sample	VIC/Yellow	FAM/Green
NTC	Pos (CT: 27-33)	Neg
Negative Ctrl	Pos (CT: 27-33)	Pos (CT: 23-28)

Table1. Expected results for valid Sample Assessment.

If above are met, then the test results are valid and may proceed to DNA sample assessment.

B) DNA sample Quality Analysis:

DNA sample is qualified only if sample is positive in FAM/Green channel with CT of 22-30 and positive in VIC/Yellow channel with CT of 27-33. This sample can be further examined for BRAF mutations.

Sample should be diluted with water, if a sample is positive in FAM/Green channel with CT of less than 22 and positive in VIC/Yellow channel with CT of 27-33. Dilute the sample to reach CT of 22-27. By 2X dilution of sample, CT is increased one cycle. After diluting the sample, proceed to the BRAF mutation test.

Result is invalid, if a sample in FAM/Green channel has CT above 30 or if VIC CT is below 27 or above 33. In this case, repeating DNA extraction is recommended.

DNA sample Quality Analysis is summarized in Table 2.

	FAM/Green	VIC/Yellow	Result
1	CT: 22-30	CT: 27-33	Valid
2	CT<22	CT: 27-33	Sample dilution
3	CT>30	CT<27 or CT>33	Invalid

Table2. DNA Quality Analysis

11-Protocol: Detection of BRAF mutations

To detect BRAF mutations, each sample should be examined with six mixes, one for DNA quantitation and one for each of five mutations. Therefore, to examine only one sample, 24 microtubes are required; six for the sample, 6 for the Positive control, six for the Negative control and six for NTC. Respectively for each extra sample, 6 microtubes will be added. Therefore, for two samples, 30 microtubes and for three samples 36 microtubes are required. Figure1 shows tube setup for three samples.

To start, Place required number of tubes on cold block organized in series of six each.

Pipette 20µl of BRAF Ctrl Mix to each tube in the first series.

Pipette 20µl of V600E Mix to each tube in the second series.

Pipette 20µl of V600Ec Mix to each tube in the third series.

Pipette 20µl of V600D Mix to each tube in the fourth series.

Pipette 20µl of V600K Mix to each tube in the fifth series.

Pipette 20µl of V600R Mix to each tube in the sixth series.

Continue by adding 5µl of extracted DNA, Positive control, Negative Control and water to each tube. Consider the first and second tube in each series for positive control and Negative control and the third for water/NTC. The next tubes would be for samples.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine and program it according to the section 9.

Note: if using Rotor-Gene attach the locking ring too.

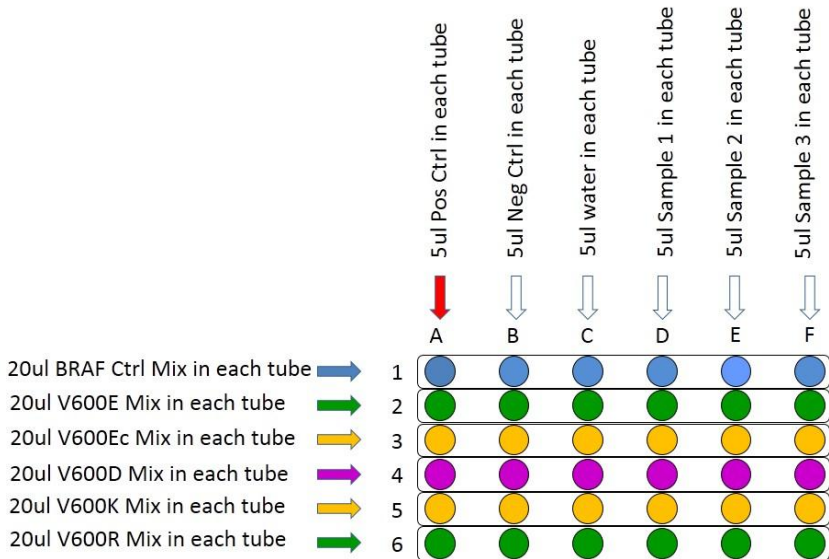


Fig1. Tubes setup for Mixes and samples.

12-BRAF Mutation Detection Analysis

Before analyzing results for BRAF mutations, test validity should be verified. To do so, results of positive and negative controls and samples with Control Mix will be examined. If the test is valid, then may proceed to BRAF mutation analysis.

To analyze results, set threshold at 0.1 for FAM/Green and VIC/Yellow channel.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable. In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

A) Test is valid only if:

- 1) NTC is Negative in FAM/Green channel with all Mixes, and
- 2) Positive Ctrl, Negative Ctrl and NTC are Positive in VIC/Yellow channel with each Mix with a CT of 27-33, and
- 3) Positive and Negative controls are Positive in FAM/Green channel with Control Mix with a CT of 22-27, and
- 4) Positive control is Positive in FAM/Green channel **with each of specific Mixes** with a CT of 30-35, and
- 5) Sample is Positive in VIC/Yellow channel with all mixes with CT of 27-33.
- 6) Sample is Positive in FAM/Green channel with Control Mix with a CT of 22-30 and

Above steps for Test validation are summarized in Figure 1.

If all above are met, then the Test is valid and results can be analyzed further for BRAF mutations.

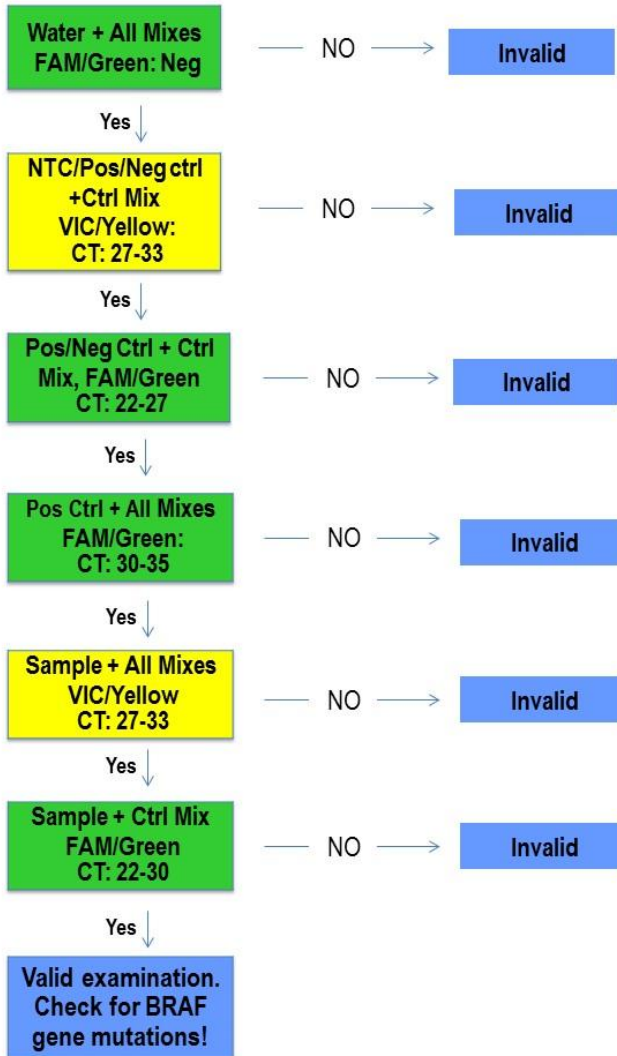


Fig 1. Test validation flowchart

B) Data analysis for BRAF mutations

- 1) Select the patient's samples, which are positive in FAM/Green channel with BRAF specific mixes with a CT of 20-40, and document the CTs in the Table 3.
- 2) Calculate ΔCT for the above selected samples through the following equation.

$$\Delta CT = \text{Mutation Mix CT} - \text{Control Mix CT}$$

- 3) Document the ΔCT in the Table 3 too.
- 4) If the ΔCT is within the valid range as mentioned in the Table 3, the sample has the BRAF mutation.
- 5) If a sample is positive for two or more BRAF mutations, it is considered positive for the mutation with the lowest ΔCT and negative for the other mutations.

Above steps for detection of BRAF mutations are summarized in Figure 2.

BRAF Mix	Valid CT	Sample CT	Valid ΔCT	Sample ΔCT	Result
Ctrl Mix	22-30		-		Pass
600E Mix	20-40		≤ 7.3		V600E or V600K Pos
600Ec Mix	20-40		≤ 10.6		V600Ec Pos
600D Mix	20-40		≤ 9.6		V600D Pos
V600K Mix	20-40		≤ 9		V600K Pos
V600R Mix	20-40		≤ 8.3		V600R Pos

Table 3. Valid CT and ΔCT ranges for BRAF Mixes.

BRAF RQ (V1.0)

As an example, If CT of a sample is 24.7 with Control Mix, 32.2 with V600E Mix, 25.5 with V600Ec Mix, 37.4 with V600D Mix, 39.1 with V600K Mix and 43.5 for V600R mix, then ΔCT is 10.5 for V600E (35.2 - 24.7), 5.8 for V600Ec (30.5-24.7), 15.7 for V600D and 17.4 for V600K, 18.8 for V600R (Table. 4). According to table 3, delta CT for V600Ec is in valid range, and patient is Positive for V600Ec.

BRAF Mix	Valid CT	Sample CT	Valid ΔCT	Sample ΔCT	Result
Ctrl Mix	22-30	24.7	-		Valid
V600E Mix	20-40	35.2	≤ 7.3	10.5	Neg
V600Ec Mix	20-40	30.5	≤ 10.6	5.8	Positive
V600D Mix	20-40	40.4	≤ 9.6	15.7	Neg
V600K Mix	20-40	42.1	≤ 9	17.4	Neg
V600R Mix	20-40	43.5	≤ 8.3	18.8	Neg

Table 4. BRAF mutation analysis for a specific sample.

Note that a normal sample may cross-react with some of the mutation specific mixes. However, the calculated ΔCT will always fall outside the valid range. Therefore, a sample with CT of 20-40 in FAM/Green channel for BRAF mutation mixes, will only considered positive only if ΔCT is within the valid range.

Note: if sample is positive with V600E Mix, it could be positive for either of V600E and V600K Mutation.

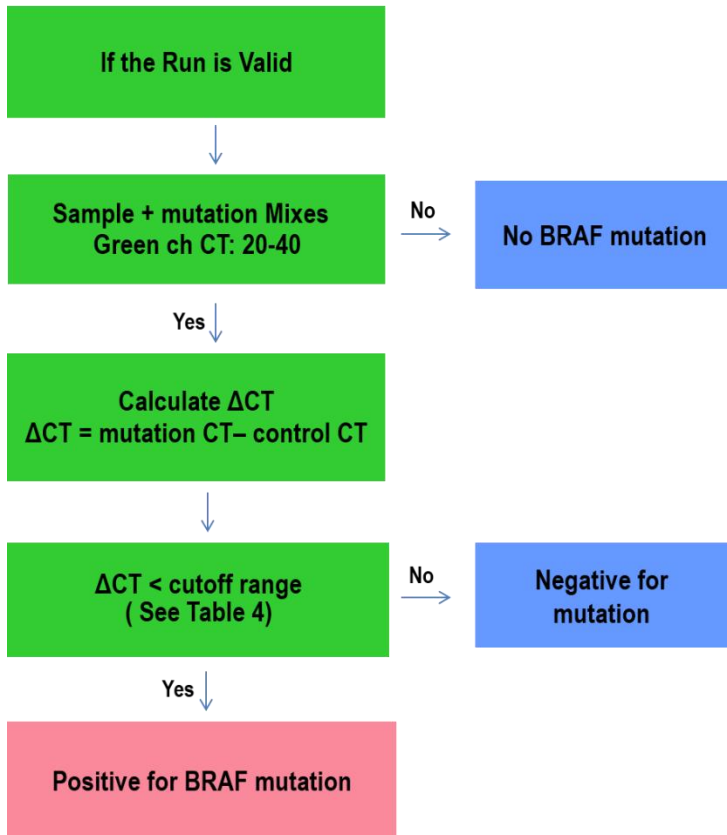


Fig 2. Sample analysis flowchart for BRAF mutation detection

Results can also be interpreted as below

- Sample is **Negative** for BRAF mutations, if it is negative in FAM/Green channel with all mixes or has CT above 40.
- Sample is **Negative** for BRAF mutations if it is positive in FAM/Green channel with CT of 20-40 for one or more BRAF mixes, but ΔCT is higher than cutoff range (Table 3).

BRAF RQ (V1.0)

- Sample is **Positive** for BRAF mutations, if sample has a valid CT and ΔCT is lower than cutoff range (Table 3) in FAM/Green channel for one of the five BRAF mixes. Briefly,
 - It is Positive for V600E or V600K if with V600E Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 7.3$.
 - It is Positive for V600Ec if with V600Ec Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 10.6$.
 - It is Positive for V600D if with V600D Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 9.6$.
 - It is Positive for V600K if with V600K Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 9$.
 - It is Positive for V600R if with V600R Mix has a $CT \leq 40$ and $\Delta CT \leq 8.3$.
- If a sample has a valid CT and ΔCT (Table 3) for more than one Mix, sample is Positive for the BRAF mutation, which has the lowest ΔCT .

Interpretation of results for BRAF mutation test are summarized in Table 5.

Note that, if a sample is Negative with this kit in terms of BRAF mutations, the following conditions should be considered:

- Sample is Negative only for BRAF mutations which was mentioned and it could be Positive for other BRAF mutations.
- Sample is Positive for BRAF mutations in quantities below the sensitivity of the kit.

BRAF Mix	Sample CT	Sample Δ CT	Conclusion
600E Mix	>40	-	Neg for 600E mutation
	20-40	>7.3	Neg for 600E mutation
	20-40	$\leq$ 7.3	Pos for 600E or 600K mutation
600Ec Mix	>40	-	Neg for 600Ec mutation
	20-40	>10.6	Neg for 600Ec mutation
	20-40	$\leq$ 10.6	Pos for 600Ec mutation
600D Mix	>40	-	Neg for 600D mutation
	20-40	>9.6	Neg for 600D mutation
	20-40	$\leq$ 9.6	Pos for 600D mutation
V600K Mix	>40	-	Neg for 600K mutation
	20-40	>9	Neg for 600K mutation
	20-40	$\leq$ 9	Pos for 600K mutation
600R Mix	>40	-	Neg for 600R mutation
	20-40	>8.3	Neg for 600R mutation
	20-40	$\leq$ 8.3	Pos for 600R mutation

Table 5. Interpretation of results for BRAF mutation.

13-Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of this assay is equivalent to the percentage of mutated BRAF DNA that can be identified in the background of wild-type DNA and is mentioned in Table 6. The sensitivity depends on the DNA quantity in a sample. Maximum sensitivity of is achieved when a sample with Control Mix has a CT of 22-27 in FAM/Green channel; with CT of 28-30, the sensitivity will decrease for some mutations.

Reaction	Ctrl Mix CT: 22-27	Ctrl Mix CT: 28-30
V600E	1%	2%
V600Ec	0.5%	1%
V600D	0.5%	1%
V600K	1%	2%
V600R	2%	4%

Table 6. Sensitivity of the BRAF mutation detection assay.

