راهنما کیت BRAF RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویراش ۱/۲

جهت بررسی جهش های BRAF به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# BRAFRQ24)

48 (Cat# BRAFRQ48)

NG-WI-ASL-40-102

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۳
۲. حیطه کاربرد ۳
۳. اطلاعات زمینه ای ۳
۴. اساس آزمایش ۴
۵. محتویات کیت ۴
۶. مدل های بسته بندی ۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت ۵
۸. محدودیت کاربرد ۵
۹. سایر موارد مورد نیاز ۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم ۶
۱۱. نمونه مناسب ۷
۱۲. استخراج DNA ۷
۱۳. روش کار: بررسی کیفیت DNA نمونه ۸
۱۴. دستگاه ها و نرم افزارها ۹
۱۵. تنظیم دستگاه Real-Time PCR ۹
۱۶. آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه ۱۱
۱۷. روش کار: بررسی جهش های BRAF ۱۳
۱۸. آنالیز نتایج برای جهش های BRAF ۱۶
۱۹. حساسیت ۲۴

۲۰. روش امحاء ۲۴
۲۱. پشتیبانی فنی ۲۵
۲۲. اطلاعات تماس ۲۵
۲۳. منابع. ۲۵
۲۴. توضیحات برچسب ۲۶

۱. مقدمه

کیت BRAF RQ جهت بررسی جهش در کدون ۶۰۰ انکوژن BRAF به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش DNA انسانی از نظر وجود ۵ نوع جهش BRAF به کمک پرایمرها و پروب های اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین کنترل میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک توالی سنتتیک به عنوان کنترل داخلی می‌باشد.
این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت BRAF RQ امکان بررسی نمونه DNA انسانی را جهت شناسایی ۵ نوع جهش V600E, V600Ec, V600D, V600K, V600R در کدون ۶۰۰ انکوژن BRAF را با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

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

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی جهش با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش، توالی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود توالی را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۵. محتویات کیت

این کیت شامل دفترچه راهنما، فلش کارت 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

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب بیست وچهار و چهل و هشت واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می‌باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می‌باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می‌شود.

همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می‌گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده نمود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی‌باشد.

۹. 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
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA و تجهیزات و مواد مصرفی مورد نیاز
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۱۰. احتیاط و نکات لازم

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 لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می‌باشند. 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.

۱۱. نمونه مناسب

نمونه مناسب بلوک پارافینی (بافت فیکس شده در فرمالین) و یا بافت فیکس نشده می‌تواند باشد. توجه داشته باشید که بافت تومور ناهمگن 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.

۱۲. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه بافتی از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می‌نمائیم:

- QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Cat. no. 51404, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- Roche; High Pure FFPET 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 می‌باشد تا در صورت نیاز، امکان تکرار تست وجود داشته باشد.

در نظر داشته باشید نمونه استخراج شده باید حاوی ۱۰ الی ۵۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر باشد.

۱۳. روش کار: بررسی کیفیت DNA نمونه

پیش از بررسی نمونه برای وجود جهش‌های 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 می‌باشد 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 می‌باشد. 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 برروی بلوک سرد بگذارید. در این سری، علاوه بر یک میکروتیوب برای نمونه هر بیمار، دو میکروتیوب دیگر برای شاهد منفی و یک 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.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه *StepOne* لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۴. دستگاه ها و نرم افزارها

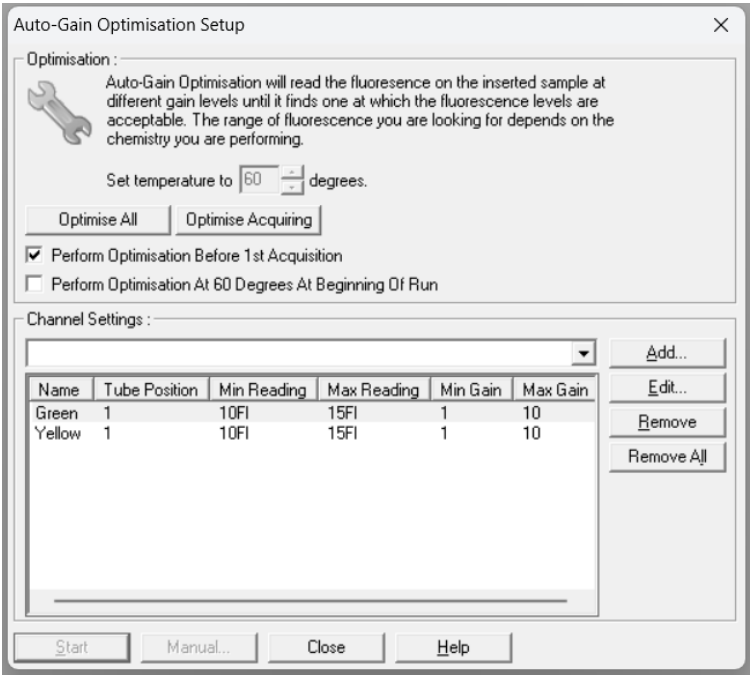
کیت BRAF RQ جهت کار با دستگاه‌های Rotor-Gene و یا StepOne طراحی شده است.

۱۵. تنظیم دستگاه Real-Time PCR

در صورتی که از دستگاه Rotor-Gene و یا StepOne استفاده می‌کنید، برای تنظیم دستگاه می‌توانید از فایل تمپلیت در فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). 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!

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقا مطابق تصویر زیر برای هر دو کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی BRAF Ctrl Mix باشد).

گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود. در پنجره نمونه ها، نام هر نمونه را وارد کنید. 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 کانالهای FAM/Green و VIC/Yellow تنظیم شود. میکس‌های کیت حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای شاهدها Positive Control و برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۶. آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه

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

از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold، دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار داده و دکمه OK را بزنید تا نتایج نشان داده شوند. سپس در منوی Analysis، مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کرده و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

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

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. 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 ۲۷ 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 می‌توانید نمونه بیمار را بررسی نمائید. نتایج بررسی نمونه های شاهد و شرایط اعتبار آزمایش به طور خلاصه در جدول ۱ آمده است.

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

جدول ۱. نتایج مورد انتظار در بررسی کیفیت DNA نمونه

توجه داشته باشید نمونه بیمار تنها زمانی قابل بررسی خواهد بود که نمونه‌های 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 می‌توانید 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 می‌نماید. پس از رقیق سازی نمونه می‌توانید آزمایش بررسی BRAF را شروع نمایید.
- در صورتی که نمونه بیمار در کانال FAM/Green دارای CT بالاتر از ۳۰ باشد، و در کانال VIC/Yellow دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد، نتیجه قابل قبول نیست. در این حالت استخراج دوباره نمونه توصیه می‌شود.
- در صورتی که نمونه بیمار در کانال سبز دارای CT بین۲۰ الی ۳۰ باشد و در کانال VIC/Yellow دارای CT بالاتر از ۳۳ باشد، نتیجه قابل قبول نیست. در این حالت استخراج دوباره نمونه توصیه می‌شود.

خلاصه بررسی حالات مختلف نتایج نمونه بیمار در جدول زیر 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
4	+ CT: 22-30	+ CT>33	Invalid

جدول۲. 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 می‌شود.

۱۷. روش کار: بررسی جهش های BRAF

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

به عنوان مثال برای بررسی سه نمونه بیمار، مطابق تصویر یک، شش ردیف شش‌تایی میکروتیوب مورد نیاز است. هر ردیف عمودی یا ستون برای یکی از شاهدهای مثبت، منفی یا نمونه بیمار استفاده می‌شود و در مجموع برای آزمایش ۳ نمونه، به ۱۸ میکروتیوب برای نمونه‌ها و ۱۸ میکروتیوب برای شاهدها نیاز داریم که مجموعا 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 میکروتیوب‌های ردیف اول ۲۰ میکرولیتر از BRAF Ctrl Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف دوم ۲۰ میکرولیتر از V600E Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف سوم ۲۰ میکرولیتر از V600Ec Mix اضافه کنید.

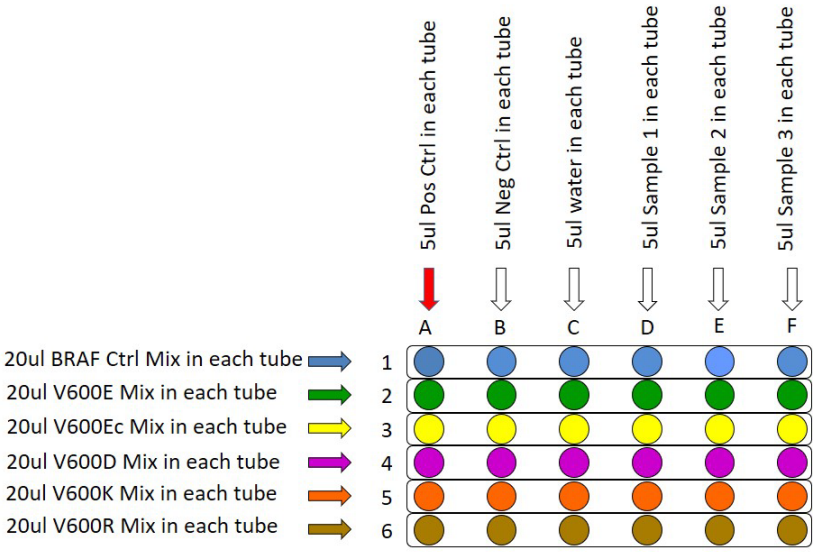
به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف چهارم ۲۰ میکرولیتر از V600D Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف پنجم ۲۰ میکرولیتر از V600K Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های 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 ستون‌های بعدی را برای نمونه‌های بیماران در نظر بگیرید.

چیدمان تیوب ها به طور خلاصه در تصویر ۱ نشان داده شده است.



تصویر ۱. چیدمان میکروتیوب ها و اضافه نمودن میکس، شاهدها 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 ۱۵ دفترچه تنظیم نمائید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه *StepOne* لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۸. آنالیز نتایج برای جهش های BRAF

تحلیل نتایج آزمایش جهش های BRAF در دو مرحله انجام می‌شود. 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 می‌توان نتایج نمونه بیمار را آنالیز نمود. بنابراین ابتدا نتایج شاهدهای مثبت و منفی و همچنین نتیجه نمونه بیمار با میکس کنترل مورد بررسی قرار می‌گیرند و سپس نتایج هر یک از پنج میکس اختصاصی جهش ها برای نمونه بیمار تحلیل می‌شود.

از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold، دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار داده و دکمه OK را بزنید تا نتایج نشان داده شوند. سپس در منوی Analysis، مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کرده و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

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

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 می‌شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.

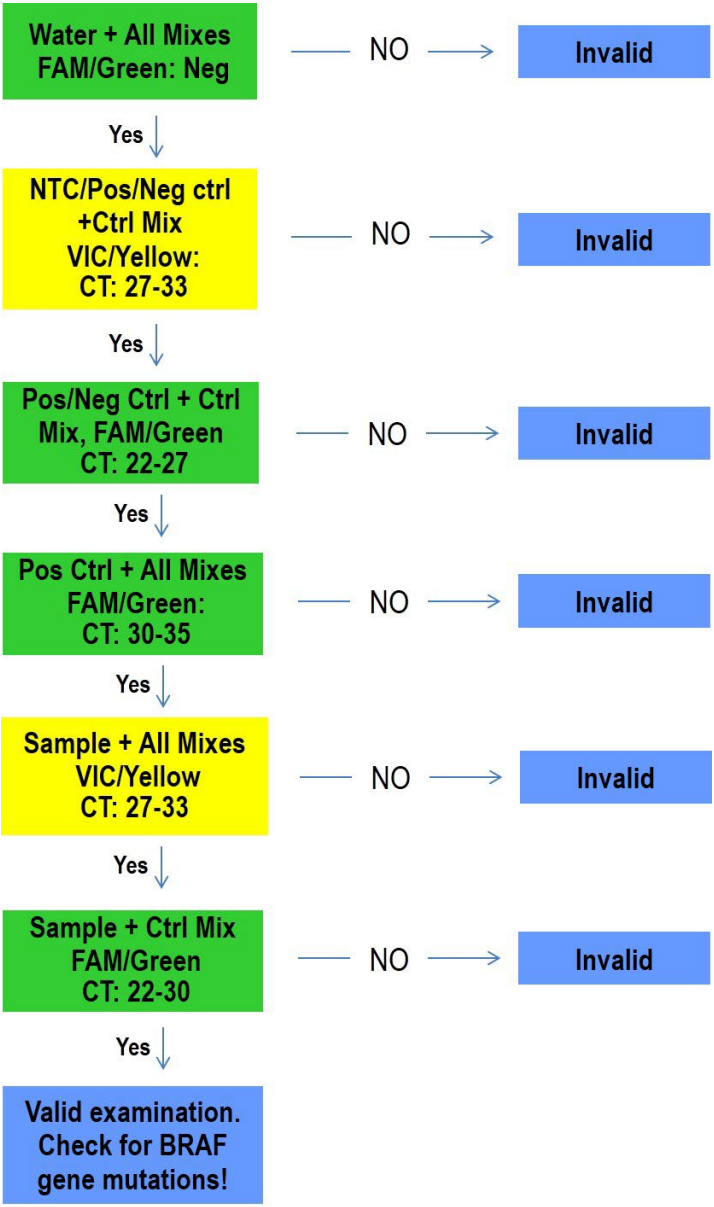
الف – کنترل کیفی آزمایش. در صورتی که:

۱) نمونه آب در کانال FAM/Green با کلیه میکس ها منفی باشد، و
۲) هر سه شاهد مثبت و منفی و آب در کانال VIC/Yellow با هر یک از میکس‌ها، دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشند، و
۳) شاهد مثبت و منفی با میکس کنترل در کانال FAM/Green دارای CT بین ۲۲ تا ۲۷ باشد و
۴) شاهد مثبت در کانال FAM/Green با میکس‌های اختصاصی دارای CT بین ۳۰ تا ۳۵ باشد، و
۵) نمونه بیمار در کانال VIC/Yellow با همه میکس‌ها دارای CT بین ۲۷ تا ۳۳ باشد،
۶) نمونه بیمار در کانال FAM/Green با میکس کنترل دارای CT بین ۲۲ تا ۳۰ باشد،

آن‌گاه نتایج آزمایش معتبر است. اکنون می‌توانید نمونه بیمار را از نظر جهش‌های BRAF بررسی نمائید.

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 جهش‌های BRAF به طور خلاصه در نمودار صفحه بعد آمده است.



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 ۳ ثبت نمایید. در صورتی که نتیجه در محدوده قابل قبول باشد، نمونه دارای جهش و مثبت می‌باشد.

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.

میکس BRAF مورد بررسی	CT قابل قبول	CT نمونه	ΔCT قابل قبول	ΔCT نمونه	نتیجه
Ctrl Mix	۳۰-۲۲		-		
V600E Mix	۴۰-۲۰		≤۷/۳		
V600Ec Mix	۴۰-۲۰		≤۱۰/۶		
V600D Mix	۴۰-۲۰		≤۹/۶		
V600K Mix	۴۰-۲۰		≤۹		
V600R Mix	۴۰-۲۰		≤۸/۳		

جدول ۳. مقادیر قابل قبول CT وΔCT 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 ۳۵/۲ ، با میکس V600Ec برابر ۳۰/۵، با میکس V600D برابر ۴۰/۴، در میکس V600K برابر ۴۲/۱ و نهایتا با میکس V600R برابر با ۴۳/۵ 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 ۴). اکنون نتایج برای برای میکس V600Ec در محدوده قابل قبول می‌باشد. در این حالت بیمار برای جهش V600Ec مثبت است.

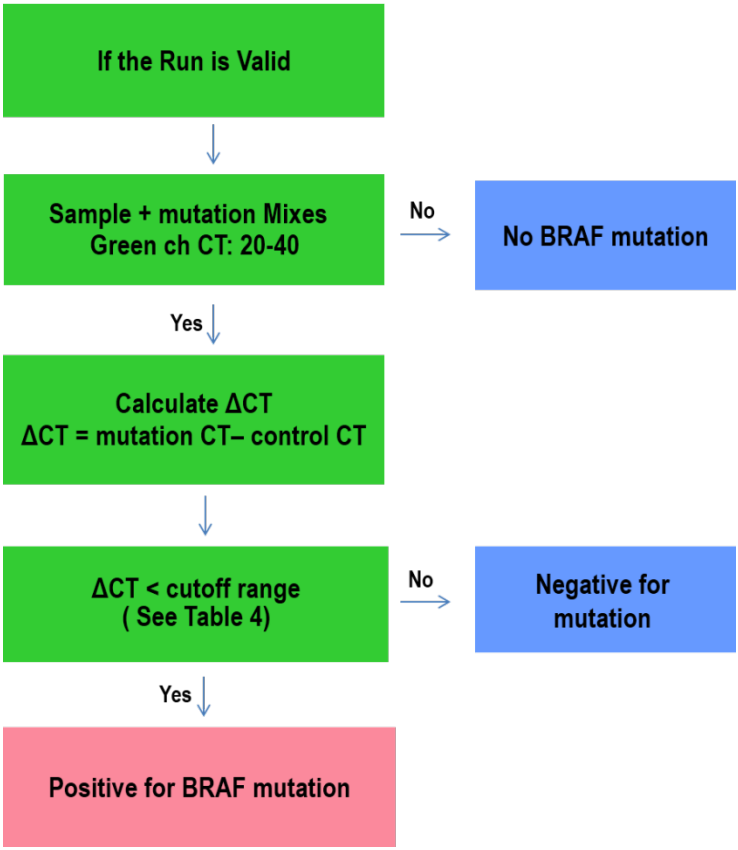
میکس BRAF مورد بررسی	CT قابل قبول	CT نمونه	ΔCT قابل قبول	ΔCT نمونه	نتیجه
BRAF Ctrl Mix	۲۲-۳۰	۲۴/۷	-		قابل قبول
V600E Mix	۲۰-۴۰	۳۵/۲	≤۷/۳	۱۰/۵	منفی
V600Ec Mix	۲۰-۴۰	۳۰/۵	≤۱۰/۶	۵/۸	مثبت
V600D Mix	۲۰-۴۰	۴۰/۴	≤۹/۶	۱۵/۷	منفی
V600K Mix	۲۰-۴۰	۴۲/۱	≤۹	۱۷/۴	منفی
V600R Mix	۲۰-۴۰	۴۳/۵	≤۸/۳	۱۸/۸	منفی

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

توجه داشته باشید که نمونه طبیعی و فاقد جهش نیز می‌تواند 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 ۲، مراحل بررسی نمونه بیمار

را برای شناسائی جهش های BRAF نشان می‌دهد.

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 شناسائی 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≤۴۰ و ΔCT≤۷/۳ باشد، دارای جهش V600E یا V600K است.
  - با میکس V600Ec دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۱۰/۶ باشد، دارای جهش V600Ec است.
  - با میکس V600D دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۹/۶ باشد، دارای جهش V600D است.
  - با میکس V600K دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۹ باشد، دارای جهش V600K است.
  - با میکس V600R دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۸/۳ 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 ۵ آمده است.

میکس BRAF	CT نمونه	ΔCT نمونه	نتیجه گیری
V600E Mix	>۴۰	-	برای جهش V600E منفی
	۴۰-۲۰	>۷/۳	برای جهش V600E منفی
	۴۰-۲۰	≤۷/۳	برای جهش V600E یا V600K مثبت
V600Ec Mix	>۴۰	-	برای جهش V600Ec منفی
	۴۰-۲۰	>۱۰/۶	برای جهش V600Ec منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۰/۶	برای جهش V600Ec مثبت
V600D Mix	>۴۰	-	برای جهش V600D منفی
	۴۰-۲۰	>۹/۶	برای جهش V600D منفی
	۴۰-۲۰	≤۹/۶	برای جهش V600D مثبت
V600K Mix	>۴۰	-	برای جهش V600K منفی
	۴۰-۲۰	>۹	برای جهش V600K منفی
	۴۰-۲۰	≤۹	برای جهش V600K مثبت
V600R Mix	>۴۰	-	برای جهش V600R منفی
	۴۰-۲۰	>۸/۳	برای جهش V600R منفی
	۴۰-۲۰	≤۸/۳	برای جهش V600R مثبت

جدول ۵. تفسیر نتایج آزمایش BRAF

توجه داشته باشید در صورتیکه نمونه با این کیت از نظر جهش‌های BRAF منفی باشد حالات زیر را نیز باید در نظر گرفت:

- نمونه از نظر جهش‌های بررسی شده BRAF منفی است.
- نمونه از نظر جهش‌های بررسی شده BRAF مثبت است اما درصد آن کمتر از حساسیت کیت می‌باشد.
- نمونه از نظر جهش‌های بررسی شده منفی است اما می‌تواند برای سایر جهش های BRAF مثبت می‌باشد.

۱۹. حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت معادل درصدی از DNA جهش یافته‌ی BRAF است که قابل شناسائی می‌باشد. این میزان حساسیت با توجه به میزان DNA نمونه تغییر می‌کند. 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 جهش‌ها میزان حساسیت کاهش می‌یابد. برای جزئیات بیشتر به جدول ۶ 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

۲۰. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۱. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۲. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

۲۳. منابع

- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Sepulveda, A.R. and Lynch, J.P., 2013. Molecular Pathology of Neoplastic Gastrointestinal Diseases. Springer Science & Business Media.
- Sullivan, R.J. ed., 2014. BRAF targets in melanoma: biological mechanisms, resistance, and drug discovery (Vol. 82). Springer.
- Xing, M.B.R.A.F., 2005. BRAF mutation in thyroid cancer. Endocrine-related cancer, 12(2), pp.245-262.

۲۴. توضیحات برچسب

RUO	جهت مصارف پژوهشی		تولید کننده		دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید
LOT	کدبهر (شماره بچ)	Σ	تعداد <n> آزمون کافی		تاریخ انقضاء
REF	شماره کاتالوگ	SN	شماره سریال	-10°C -30°C	محدوده دمایی

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

BRAF RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.2

For Real-Time PCR Detection of BRAF Mutations
For use with Rotor-Gene and StepOne
For Research Use Only

24 (Cat# BRAFRQ24)
48 (Cat# BRAFRQ48)
NG-WI-ASL-40-102

RUO

NovinGene ParsVira
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Novin Gene

Table of Contents

1. Introduction 1
2. Intended Use 1
3. Background Information 1
4. Test Principle 1
5. Kit Contents 2
6. Packaging models 2
7. Storage and Stability 2
8. Product Use Limitations 2
9. Additionally Required Items 3
10. General Precautions 3
11. Specimen 4
12. DNA Extraction 4
13. Protocol: DNA Sample Assessment 4
14. Devices and software 5
15. Programming Real-time PCR 5
16. Analysis: Sample Assessment 7
17. Protocol: Detection of BRAF mutations 9
18. BRAF Mutation Detection Analysis 10

19. Analytical Sensitivity 17
20. Disposal Method 18
21. Technical Support 18
22. Contact Information..... 18
23. References 18
24. Symbols 19

1. Introduction

BRAF RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting BRAF V600 mutations in human genomic DNA. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. Control Mix also contains a different series of primers and probe for detecting a synthetic DNA sequence. The kit supplies this synthetic DNA sequence as an Internal Control (IC).
This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

BRAF RQ kit is intended for detecting BRAF V600 mutations in human genomic DNA. Most of the BRAF mutations are located on codon 600 and constitute V600E, V600Ec, V600D, V600K, V600R. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene or StepOne machines.

3. Background Information

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).

4. Test Principle

The target is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-

amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card 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 µl
V600K Mix	PCR Mix to check V600K mutation	1	480 µl
V600R Mix	PCR Mix to check V600R mutation	1	480 µl
BRAF Pos	1% Positive control	1	250 µl
BRAF Neg	Negative control	1	250 µl
Water	PCR Grade Water	1	200 µl

6. Packaging models

The kit is available in 24 and 48 reactions of 25 microliters.

7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The user manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.

- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

9. Additionally Required Items

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit and required equipment/items
- Nuclease-free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

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.

11. 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.

12. 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 FFPET 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 a higher volume of DNA, enough to repeat the test if necessary.
Note: Extracted sample should contain 10-50 ng/ul DNA.

13. Protocol: DNA Sample Assessment

Before examining a sample for BRAF mutations, the quality of DNA should be assessed. If the results are within the desired range, then a second test for detecting BRAF mutations will be performed. To qualify DNA extraction, follow these steps:
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 a 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 ensure all are capped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

14. Devices and software

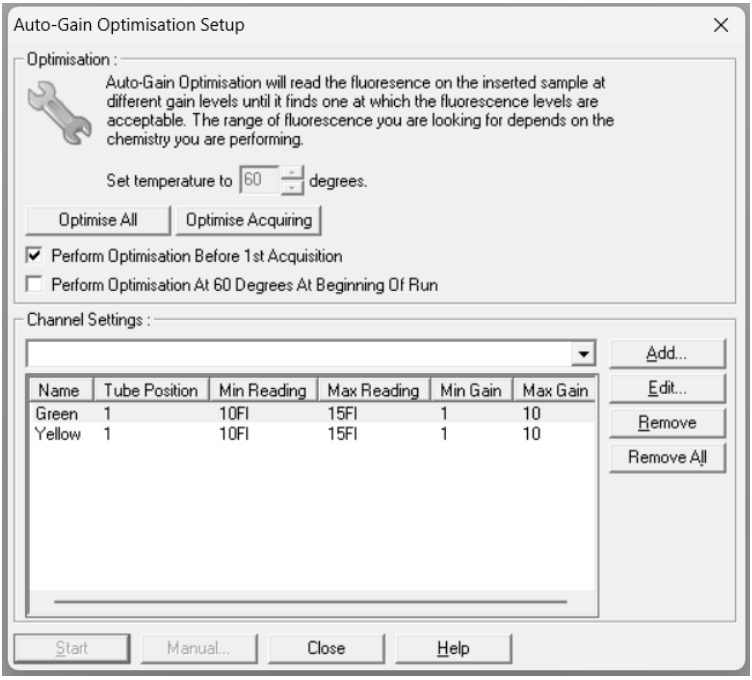
BRAF RQ kit is designed to work with Rotor-Gene and StepOne.

15. Programming Real-time PCR Machine

Rotor-Gene or StepOne could be setup using templates provided in the flash card, or accessible by kit QR code. For the Rotor-Gene, select “BRAF 0.1” is for strip tubes and “BRAF 0.2” is for 0.2ml tubes, Program starts.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the following image.

Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain BRAF Ctrl Mix).



Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine.
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 a final concentration of 300nM in the reaction.

Make sure that in the sample menu, the Positive controls have been defined as “Positive control”. Patient samples are defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.

16. 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 (the FAM/Green channel)** and **internal control (the VIC/Yellow channel)**. Briefly, click on Analysis menu and then, under Quantitation tab double click on “Cycling A. Green”. Close the pop-up window and manually set threshold at 0.1. Repeat above for the Yellow channel and set the threshold at 0.1.

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 a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

Test is valid only if:

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

Expected results for a valid test are summarized in the 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 the 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 the FAM/Green channel has CT above 30 and, in the VIC/Yellow channel CT of 27-33. Also, the result is invalid if a sample in the VIC/Yellow channel has CT above 33 and in the FAM/Green channel has CT of 22-30. 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: 27-33	Invalid

4	+ CT: 22-30	+ CT>33	Invalid

Table 2. DNA Quality Analysis

17. 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.

Tubes setup for mixes and samples is shown in Fig 1.

Cap the tubes and visually inspect to ensure all are capped securely. Place tubes in the machine and program it according to the section 15.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

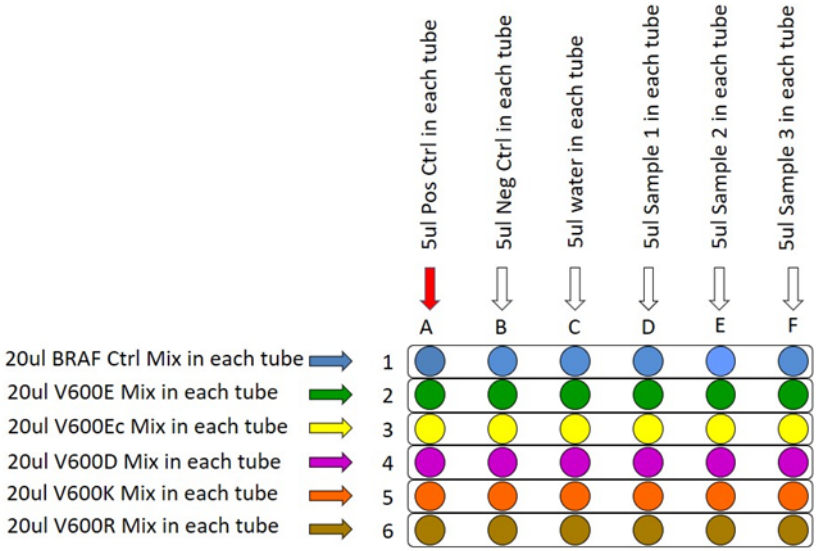


Fig1. Tubes setup for Mixes and samples.

18. 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.

Briefly, click on Analysis menu and then, under Quantitation tab double click on “Cycling A. Green”. Close the pop-up window and manually set threshold at 0.1. Repeat above for the Yellow channel and set the threshold at 0.1.

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 a sigmoid graph and log phase,

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

Above steps for Test validation are summarized in Figure 2.

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

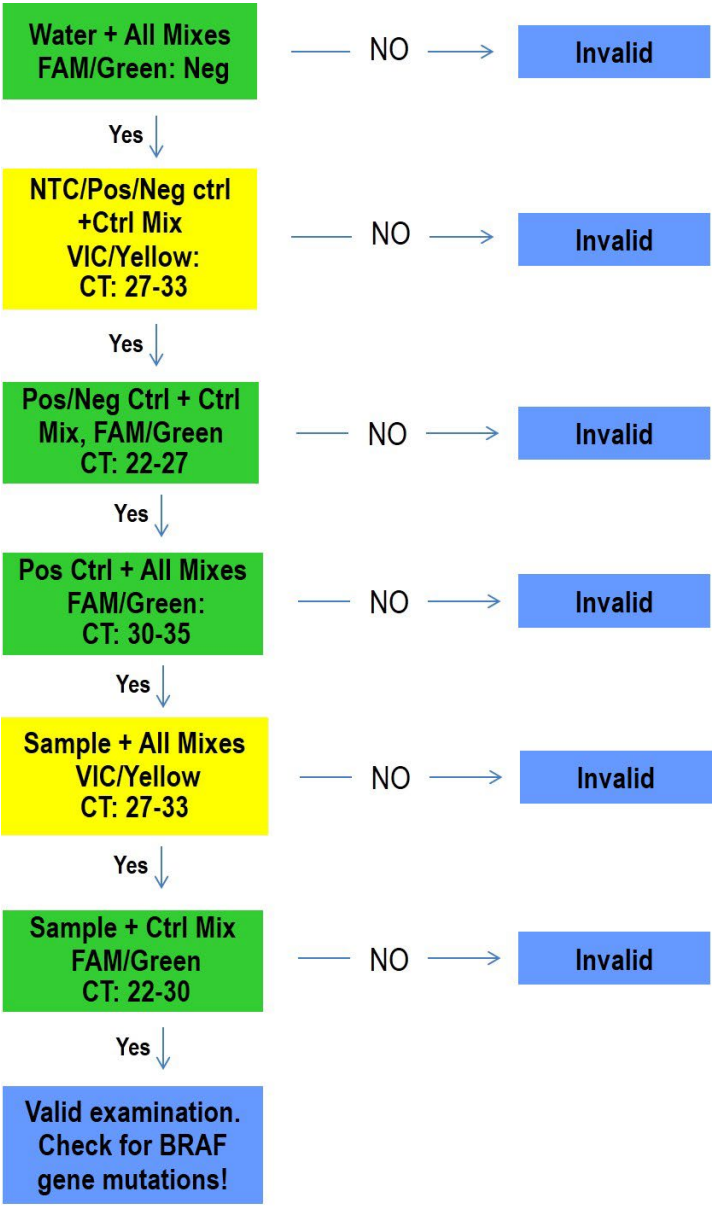


Fig 2. Test validation flowchart

B) Data analysis for BRAF mutations

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

   ΔCT = Mutation Mix CT – 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 3.

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

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

As an example, If CT of a sample is 24.7 with Control Mix, 35.2 with V600E Mix, 30.5 with V600Ec Mix, 40.4 with V600D Mix, 42.1 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 the FAM/Green channel for BRAF mutation mixes, will only be considered positive only if ΔCT is within the valid range.

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

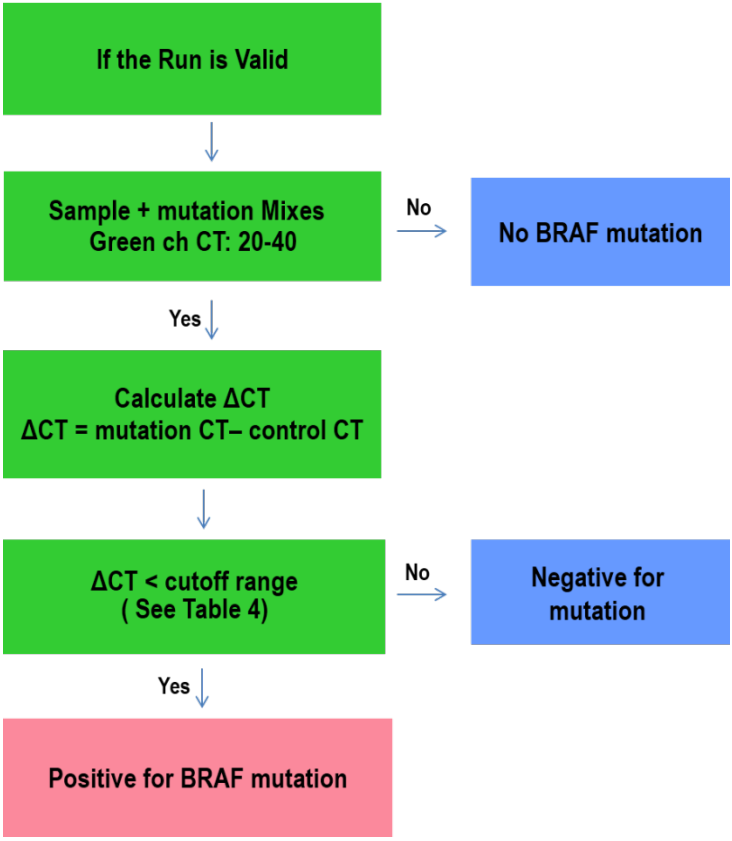


Fig 3. Sample analysis flowchart for BRAF mutation detection

Results can also be interpreted as below:

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

- Sample is **Positive** for BRAF mutations, if sample has a valid CT and ΔCT is lower than cutoff range (Table 3) in the 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≤40 and ΔCT≤7.3.
  - It is Positive for V600Ec if with V600Ec Mix has a CT≤40 and ΔCT≤10.6.
  - It is Positive for V600D if with V600D Mix has a CT≤40 and ΔCT≤9.6.
  - It is Positive for V600K if with V600K Mix has a CT≤40 and ΔCT≤9.
  - It is Positive for V600R if with V600R Mix has a CT≤40 and ΔCT≤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 ΔCT	Conclusion
600E Mix	>40	-	Neg for 600E mutation
	20-40	>7.3	Neg for 600E mutation
	20-40	≤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	≤10.6	Pos for 600Ec mutation
600D Mix	>40	-	Neg for 600D mutation
	20-40	>9.6	Neg for 600D mutation
	20-40	≤9.6	Pos for 600D mutation
V600K Mix	>40	-	Neg for 600K mutation
	20-40	>9	Neg for 600K mutation
	20-40	≤9	Pos for 600K mutation
600R Mix	>40	-	Neg for 600R mutation
	20-40	>8.3	Neg for 600R mutation
	20-40	≤8.3	Pos for 600R mutation

Table 5. Interpretation of results for BRAF mutation.

19. 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 is achieved when a sample with Control Mix has a CT of 22-27 in the FAM/Green channel; with CT of 28-30 in VIC/Yellow, 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.

20. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

21. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98 993-6223241
Email: info@novingene.com

22. Contact Information

NovinGene ParsVira
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21-88837393
+98 990-1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

23. References

- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Sepulveda, A.R. and Lynch, J.P., 2013. Molecular Pathology of Neoplastic Gastrointestinal Diseases. Springer Science & Business Media.
- Sullivan, R.J. ed., 2014. BRAF targets in melanoma: biological mechanisms, resistance, and drug discovery (Vol. 82). Springer.
- Xing, M.B.R.A.F., 2005. BRAF mutation in thyroid cancer. Endocrine-related cancer, 12(2), pp.245-262.

24. Symbols

RUO	Research use only		Manufacturer		Consult instructions for use
LOT	Lot number	Σ	Content sufficient for <n> tests		Use-by date
REF	Catalogue number	SN	Serial number	-10°C -30°C	Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com