راهنما کیت NRAS RQ

بهار ۱۴۰۵، ویراش ۱/۰

جهت بررسی جهش های NRAS به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene و StepOne

مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# NRASRQ24)

Σ 48 (Cat# NRASRQ48)

NG-WI-ASL-73-100

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان گیشا، خیابان چهارم، پلاک ۲۰. کد پستی: ۱۴۴۶۸۴۳۴۳۴

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۳
۲. حیطه کاربرد ۳
۳. اطلاعات زمینه ای ۳
۴. اساس آزمایش ۵
۵. محتویات کیت ۵
۶. مدل های بسته بندی ۶
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت ۶
۸. محدودیت کاربرد ۶
۹. سایر موارد مورد نیاز ۷
۱۰. احتیاط و نکات لازم ۷
۱۱. نمونه مناسب ۸
۱۲. استخراج DNA ۹
۱۳. روش کار: بررسی کیفیت DNA نمونه ۹
۱۴. دستگاه ها و نرم افزارها ۱۰
۱۵. تنظیم دستگاه Real-Time PCR ۱۰
۱۶. آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه ۱۲
۱۷. روش کار: بررسی جهش های NRAS ۱۵
۱۸. آنالیز نتایج برای جهش های NRAS ۱۷
۱۹. حساسیت ۲۷

۲۰. روش امحاء..... ۲۸
۲۱. پشتیبانی فنی..... ۲۸
۲۲. اطلاعات تماس..... ۲۸
۲۳. منابع..... ۲۸
۲۴. توضیحات برچسب..... ۲۹

۱. مقدمه

کیت NRAS RQ جهت بررسی جهش های ژن NRAS در کدون های ۱۲ ، ۱۳، ۵۹ و ۶۱ بوده و به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش DNA انسانی از نظر وجود جهش‌های NRAS به کمک پرایمرها و پروب های اختصاصی بررسی می‌شود. همچنین میکس‌های 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 NRAS RQ امکان بررسی نمونه بیمار جهت تشخیص جهش در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ از اگزون ۲ و کدون های ۵۹ و ۶۱ از اگزون ۳ را در ژن NRAS با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

خانواده‌ی ژن‌های RAS شامل HRAS ، KRAS و NRAS از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های مسیرهای انتقال پیام درون‌سلولی در فرایندهای تکثیر، بقا و تمایز سلولی هستند. بروز جهش‌های فعال‌کننده در این ژن‌ها می‌تواند با مختل کردن فعالیت GTPase منجر به فعال‌سازی مداوم مسیرهای پیام‌رسانی، به‌ویژه مسیر MAPK/ERK و سایر مسیرهای وابسته به کینازها شده و در نهایت در ایجاد و پیشرفت انواع بدخیمی‌ها نقش داشته باشد. براساس یافته های بالینی جهش های خانواده RAS در آسیب شناسی، پیش آگهی و موفقیت درمان بسیاری از انواع سرطان نقش دارند. لذا بررسی آنها در بیماران از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

در میان اعضای خانواده RAS، جهش های فعال کننده‌ی ژن NRAS به عنوان یک محرک در ایجاد و پیشرفت برخی سرطان ها از جمله ملانوما و لوسمی میلوییید حاد، سرطان تیروییید، سرطان کولورکتال و سرطان اندومتر نقش دارند. این انکوژن روی کروموزوم یک قرار دارد و جهش های آن در اگزون ۲ (کدون ۱۲ و ۱۳) و اگزون ۳ (کدون ۵۹ و ۶۱) و اگزون ۴ (کدون ۱۱۷ و ۱۴۶) می‌باشد. در بین جهش های مطرح شده، جهش در کدون Q61، از اهمیت بالینی ویژه‌ای برخوردار است و می‌تواند منجر به کاهش پاسخ درمانی و بروز مقاومت دارویی در بیماران شود. مهم‌ترین جهش های ژن NRAS در جدول شماره ۱ ذکر شده اند.

Exon	Codon	Protein Change	Base change
2	12	G12A	35G>C
2	12	G12C	34G>T
2	12	G12D	35G>A
2	12	G12R	34G>C
2	12	G12S	34G>A
2	12	G12V	35G>T
2	13	G13A	38G>C
2	13	G13C	37G>T
2	13	G13D	38G>A
2	13	G13R	37G>C
2	13	G13S	37G>A
2	13	G13V	38G>T
3	59	A59T	175G>A
3	59	A59D	176C>A
3	61	Q61E	181C>G
3	61	Q61H	183A>C
3	61	Q61H	183A>T
3	61	Q61K	181C>A
3	61	Q61L	182A>T
3	61	Q61R	182A>G

4	117	K117N	351G>C
4	117	K117N	351G>T
4	117	K117R	350A>G
4	146	A146P	436G>C
4	146	A146T	436G>A
4	146	A146V	437C>T

جدول ۱. جهش های ژن NRAS

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 و موارد مندرج در جدول شماره ۲ می‌باشد:

برچسب	محتوا	تعداد	حجم
Ctrl Mix	میکس PCR برای کنترل کیفی تست	۲	۴۸۰ میکرولیتر
G12 Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G13 Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G13	۱	۴۸۰ میکرولیتر
A59D Mix	میکس PCR برای بررسی جهش A59D	۱	۴۸۰ میکرولیتر
Q61H Mix	میکس PCR برای بررسی جهش Q61H	۱	۴۸۰ میکرولیتر

Q61K Mix	میکس PCR برای بررسی جهش Q61K	۱	۴۸۰ میکرولیتر
Q61L Mix	میکس PCR برای بررسی جهش Q61L	۱	۴۸۰ میکرولیتر
Q61R Mix	میکس PCR برای بررسی جهش Q61R	۱	۴۸۰ میکرولیتر
NRAS Pos	شاهد مثبت	۱	۲۵۰ میکرولیتر
NRAS Neg	شاهد منفی	۱	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۱	۲۰۰ میکرولیتر

جدول۲. محتویات کیت

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب بیست و چهار 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 اقدامات 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

برای بیماران مبتلا به تومور های سرطانی مثل سرطان کولورکتال و تیروئید، نمونه مناسب بلوک پارافینی (بافت فیکس شده در فرمالین) و در بدخیمی های خونی مانند AML خون محیطی یا آسپیراسیون مغز استخوان نمونه های مناسب محسوب

می‌شوند.

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 حداقل حجم DNA لازم برای انجام تست، ۵۰ میکرولیتر می‌باشد و پیشنهاد ما استخراج ۱۰۰ میکرولیتر DNA 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 جهش های NRAS ، 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 NRAS 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 ۵۰ میکرولیتر و ترجیحا حدود ۱۰۰ میکرولیتر می‌باشد.

در صورتیکه میزان نمونه کمتر از ۵۰ میکرولیتر باشد امکان انجام آزمایش وجود ندارد!

ابتدا تیوب میکس کنترل **(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 یک نمونه آب در نظر بگیرید.

به هر میکروتیوب، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از 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: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۴. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت NRAS RQ جهت کار با دستگاه های RotorGene و StepOne طراحی شده است.

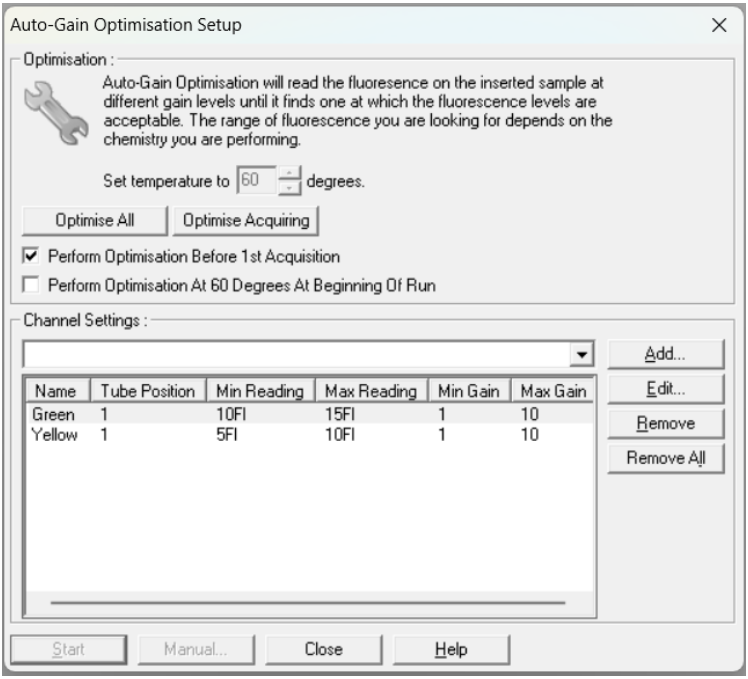
۱۵. تنظیم دستگاه Real-Time PCR

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

توجه فرمایید برای دستگاه روتورژن فایل NRAS 0.2 یا NRAS 0.1 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، 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 صفحه بعد برای هر دو کانال انجام دهید.

Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی 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.

همچنین می توانید دستگاه را مطابق جدول شماره ۳ تنظیم 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	

جدول ۳. برنامه تنظیم حرارتی دستگاه

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و در کانال های سبز و زرد تنظیم شود. میکس های 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 باید اطمینان یافت که آزمایش از نظر کیفی به نحو مطلوب انجام شده است و سپس می‌توان نتایج نمونه بیمار را آنالیز نمود. در ابتدا نتایج شاهدهای مثبت و منفی مورد بررسی قرار می‌گیرند.

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 سبز (Green)** مربوط به **DNA نمونه بیمار** و افزایش **تابش زرد (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 شاهد مثبت و منفی. در صورتی که:

۱) نمونه آب در کانال سبز، **منفی** و در کانال زرد، **مثبت** و دارای CT بین ۲۸ تا ۳۱ باشد و

۲) نمونه شاهد مثبت یا شاهد منفی در کانال سبز، **مثبت** و دارای CT بین ۲۴ تا ۲۸ و در کانال زرد، **مثبت** و دارای CT بین ۲۸ تا ۳۱ 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 شماره ۴ آمده است.

نمونه	کانال سبز	کانال زرد
نمونه فاقد DNA (آب)	Neg	Pos (CT 28-31)
شاهد مثبت/منفی	Pos (CT 24-28)	Pos (CT 28-31)

جدول ۴. 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 سبز دارای CT بین ۲۲ تا ۲۸ و در کانال زرد دارای CT بین ۲۸ تا ۳۱ باشد، نتیجه قابل قبول است. حال می‌توانید آزمایش بررسی NRAS را شروع نمائید. برای افزایش حساسیت تست، مطلوب آن است که نمونه بیمار در کانال سبز دارای CT بین ۲۲ تا ۲۸ باشد.

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال سبز دارای CT کمتر از ۲۲ و در کانال زرد دارای CT بین ۲۸ تا ۳۱ باشد، نمونه باید با آب رقیق شود تا CT آن در محدوده ۲۲ تا ۲۸ 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 NRAS را شروع نمایید.

– در صورتی که نمونه بیمار در کانال سبز دارای CT بالاتر از ۲۸ باشد، نتیجه قابل قبول نیست. در این حالت استخراج دوباره نمونه توصیه می‌شود.

– در صورتی که نمونه بیمار در کانال VIC/Yellow دارای CT بالاتر از ۳۱ و در کانال FAM/Green دارای CT بین ۲۲ الی ۲۸ باشد، نتیجه نامعتبر است. این حالت می‌تواند ناشی از خطا در آزمایش و یا وجود عوامل مزاحم در نمونه استخراج شده باشد.

خلاصه بررسی حالات مختلف نتایج نمونه بیمار در جدول شماره ۵ آمده است.

	FAM/Green	VIC/Yellow	Result
1	+ CT: 22-28	+ CT: 27-33	Valid
2	+ CT<22	+ CT: 27-33	Sample dilution
3	+ CT>28	+ CT: 27-33	Invalid
4	+ CT: 22-28	+ CT>33	Invalid

جدول ۵. بررسی نتایج کنترل کیفی DNA نمونه

پس از بررسی کیفیت DNA نمونه و تحلیل داده ها و در موارد لازم، اِعمال تغییر در غلظت نمونه ها، بررسی جهش های NRAS انجام می‌شود.

۱۷. روش‌کار: بررسی جهش های NRAS

برای بررسی جهش های NRAS، هر نمونه باید با ۸ میکس آزمایش شود. در این آزمایش ۷ جهش ژن NRAS در کدون های ۱۲ ، ۱۳ ، ۵۹ و ۶۱ هر کدام در یک میکروتیوب جداگانه با یکی از میکس های NRAS بررسی می‌شوند. علاوه بر ۷ میکروتیوب مذکور، یک میکروتیوب نیز به بررسی نمونه با میکس کنترل اختصاص می‌یابد. بنابراین برای بررسی یک نمونه بیمار، ۸ میکروتیوب برای آزمایش نمونه بیمار، ۸ میکروتیوب برای آزمایش شاهد مثبت و ۸ میکروتیوب برای آزمایش شاهد منفی و ۸ میکروتیوب برای آزمایش آب مورد نیاز می‌باشد و مجموعا ۳۲ میکروتیوب استفاده می‌شود. برای بررسی همزمان دو نمونه بیمار ۴۰ میکروتیوب و برای بررسی همزمان سه نمونه بیمار ۴۸ میکروتیوب مورد نیاز می‌باشد.

به عنوان مثال در تصویر شماره ۱ چیدمان تیوب ها جهت بررسی سه بیمار نشان داده شده است. که مجموعا ۴۸ لوله خواهد بود که به صورت ۶ سری ۸ تایی مرتب شده اند.

بر این اساس، تعداد مورد نیاز لوله PCR را به صورت سری های هشت تایی روی بلوک سرد بگذارید.

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

به هر یک از میکروتیوب های ردیف دوم ۲۰ میکرولیتر از G12 Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف سوم ۲۰ میکرولیتر از G13 Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف چهارم ۲۰ میکرولیتر از A59D Mix اضافه کنید.

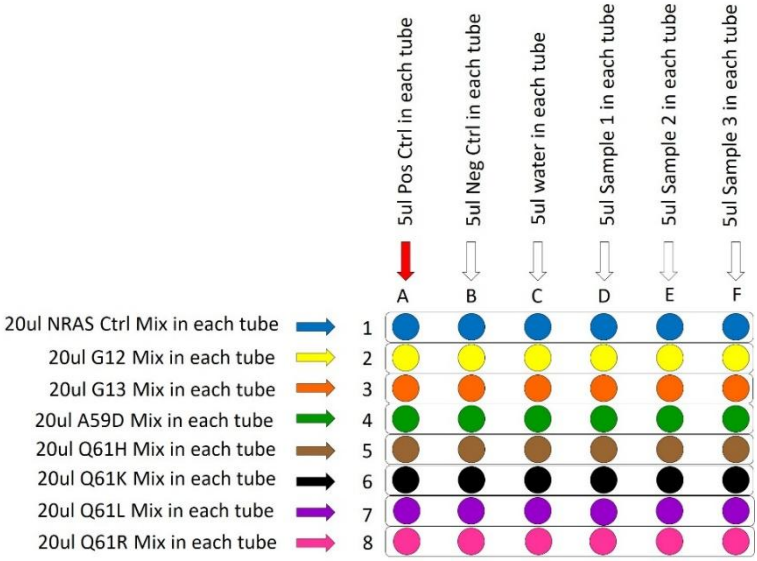
به هر یک از میکروتیوب های ردیف پنجم ۲۰ میکرولیتر از Q61H Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف ششم ۲۰ میکرولیتر از Q61K Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف هفتم ۲۰ میکرولیتر از Q61L Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف هشتم ۲۰ میکرولیتر از Q61R Mix اضافه کنید.

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



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.

۱۸. آنالیز نتایج برای جهش های NRAS

تحلیل نتایج آزمایش جهش های NRAS در دو مرحله انجام می شود. در مرحله نخست باید اطمینان یافت که آزمایش از نظر کیفی به نحو مطلوب انجام شده است، سپس می‌توان نتایج نمونه بیمار را آنالیز نمود. در بخش نخست نتایج

شاهدهای مثبت و منفی و همچنین نتیجه نمونه بیمار با میکس کنترل مورد بررسی قرار می گیرند و در بخش دوم نتایج هر یک از هفت میکس اختصاصی جهش ها برای نمونه بیمار تحلیل می‌شود.

برای دستگاه RotorGene ابتدا 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. برای دستگاه StepOne نیز آستانه را برای هر دو کانال FAM و VIC روی ۰/۱ تنظیم نمایید.

در نظر داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green/FAM)** مربوط به **جهش‌های NRAS** و افزایش **تابش زرد (Yellow/VIC)** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

توجه داشته باشید که نمونه با میکس کنترل (Ctrl Mix) در هر دو کانال سبز و زرد بررسی می شود، و نتایج سایر میکس ها تنها در کانال سبز قابل مشاهده بوده، نتیجه آن ها در کانال زرد ارزشی ندارد.

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 سبز با کلیه میکس ها منفی باشد، و

۲) نمونه آب در کانال زرد با میکس کنترل، دارای CT بین ۲۸ تا ۳۱ باشد، و

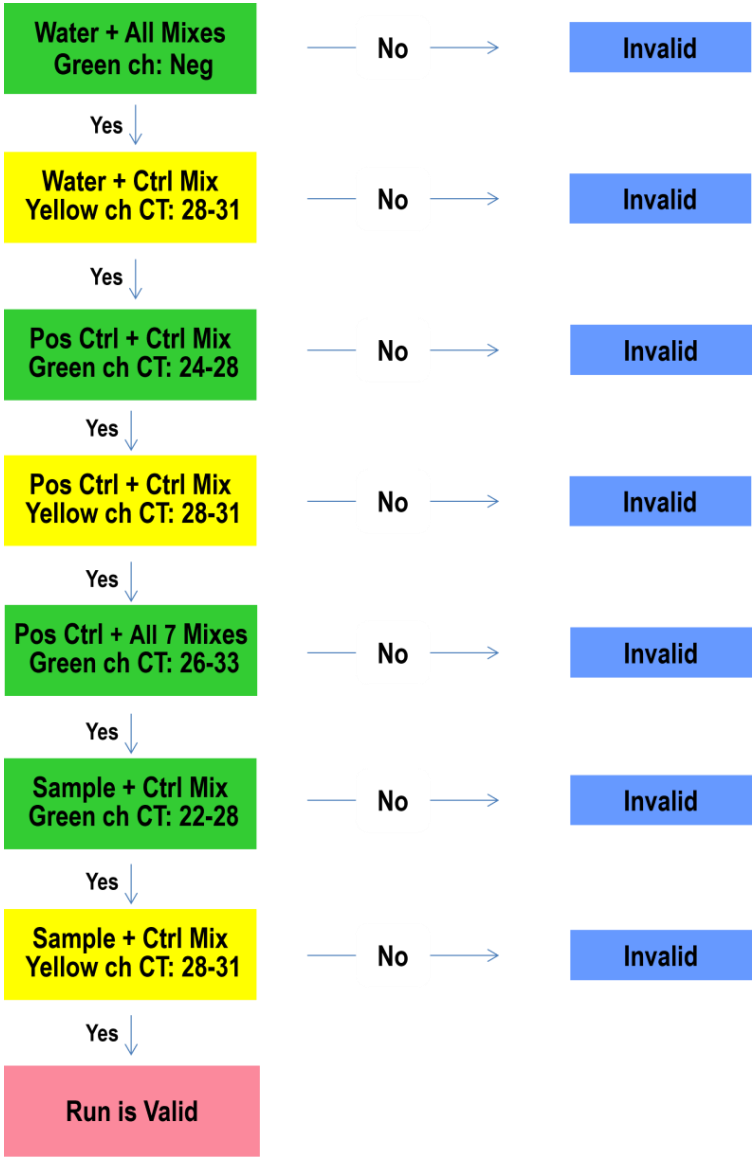
۳) شاهد مثبت با میکس کنترل در کانال سبز دارای CT بین ۲۴ تا ۲۸ باشد و

۴) شاهد مثبت با میکس کنترل در کانال زرد دارای CT بین ۲۸ تا ۳۱ باشد، و
۵) شاهد مثبت در کانال سبز با میکس های اختصاصی دارای CT بین ۲۶ تا ۳۳ باشد، و
۶) نمونه بیمار در کانال سبز با میکس کنترل دارای CT بین ۲۲ تا ۲۸ باشد، و
۷) نمونه بیمار در کانال زرد با میکس کنترل دارای CT بین ۲۸ تا ۳۱ باشد،

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

توجه داشته باشید جهش های NRAS 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 میباشد.

ترتیب نحوه بررسی نمونه ها در کنترل کیفی تست بررسی جهش های NRAS به طور خلاصه در نمودار ۱ آمده است.



نمودار ۱. بررسی کنترل کیفی آزمایش جهش های NRAS

ب- تحلیل نتایج بررسی جهش های NRAS

۱) میکروتیوب هایی را که در آنها نمونه بیمار با یکی از میکس های اختصاصی در کانال سبز مثبت شده و CT آن بین ۲۰ تا ۴۰ می باشد انتخاب نمائید و مقادیر آن را در جدول شماره ۶ 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 سبز می باشد. به طور ساده:

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

۳) سپس داده های بدست آمده را در جدول ۶ 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 NRAS 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 NRAS مورد بررسی	CT قابل قبول	CT نمونه	ΔCT قابل قبول در RotorGene	ΔCT قابل قبول در stepOne	ΔCT نمونه	نتیجه
Ctrl Mix	۲۸-۲۲		-	-		
G12 Mix	۴۰-۲۰		≤ ۷/۴	≤ ۷/۴		
G13 Mix	۴۰-۲۰		≤۱۱/۲	≤۱۱/۸		
A59D Mix	۴۰-۲۰		≤ ۸/۴	≤ ۹/۷		
Q61H Mix	۴۰-۲۰		≤ ۸	≤ ۱۰/۲		
Q61K Mix	۴۰-۲۰		≤ ۹/۶	≤ ۱۰/۹		
Q61L Mix	۴۰-۲۰		≤۱۲/۴	≤۱۲/۸		
Q61R Mix	۴۰-۲۰		≤۱۲/۴	≤۱۲/۸		

جدول ۶. مقادیر قابل قبول CT وΔCT در بررسی نمونه های بیماران

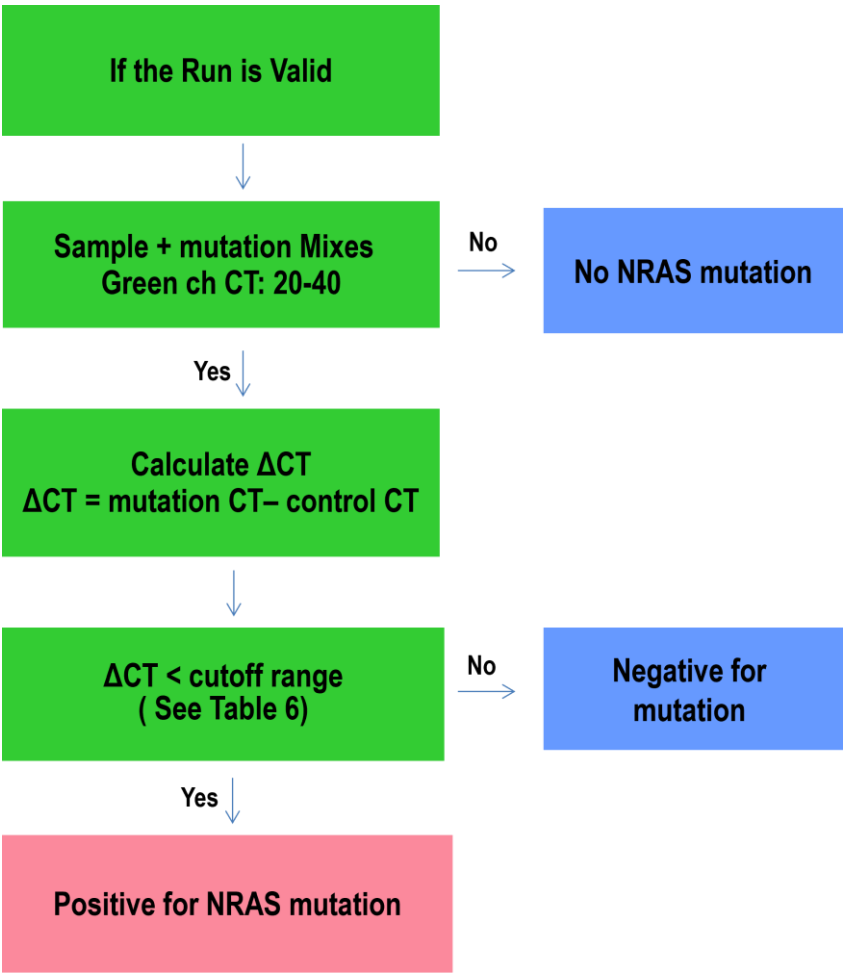
به عنوان مثال، در صورتی که در دستگاه روتورژن، CT نمونه بیمار در میکس کنترل ۲۵/۴، در میکس G12 معادل ۳۵/۱، در میکس G13 برابر ۳۲/۵ باشد، در میکس A59D برابر ۳۶/۸ باشد، در میکس Q61H برابر ۳۷/۸ باشد، در میکس Q61K برابر ۳۸/۱ باشد، در میکس Q61L برابر ۴۰ و با میکس Q61R برابر ۳۹ باشد،

در این صورت اختلاف CT ها برای میکس G12، ۹/۷ (۲۵/۴ – ۳۵/۱) و برای میکس G13، ۷/۱ (۲۵/۴ – ۳۲/۵) خواهد بود. برای میکس A59D، ۱۱/۴ (۲۵/۴ – ۳۶/۸)، برای میکس Q61H، ۱۲/۴ (۲۵/۴ – ۳۷/۸)، برای میکس Q61K ، ۱۲/۷ (۲۵/۴ – ۳۸/۱)، برای میکس Q61L ، ۱۴/۶ (۲۵/۴ – ۴۰) و برای میکس Q61R ، ۱۳/۶ (۲۵/۴ – ۳۹) می‌باشد. (جدول ۷). اکنون نتایج برای برای میکس G13 در محدوده قابل قبول می‌باشد. در این حالت بیمار برای جهش G13 مثبت می‌باشد.

میکس NRAS مورد بررسی	CT قابل قبول	CT نمونه	ΔCT قابل قبول در RotorGene	ΔCT قابل قبول در stepOne	ΔCT نمونه	نتیجه
Ctrl Mix	۲۲-۲۸	۲۵/۴	-	-	-	قابل قبول
G12 Mix	۲۰-۴۰	۳۵/۱	≤ ۷/۴	≤ ۷/۴	۹/۷	منفی
G13 Mix	۲۰-۴۰	۳۲/۵	≤۱۱/۲	≤۱۱/۸	۷/۱	مثبت
A59D Mix	۲۰-۴۰	۳۶/۸	≤ ۸/۴	≤ ۹/۷	۱۱/۴	منفی
Q61H Mix	۲۰-۴۰	۳۷/۸	≤ ۸	≤ ۱۰/۲	۱۲/۴	منفی
Q61K Mix	۲۰-۴۰	۳۸/۱	≤ ۹/۶	≤ ۱۰/۹	۱۲/۷	منفی
Q61L Mix	۲۰-۴۰	۴۰	≤۱۲/۴	≤۱۲/۸	۱۴/۶	منفی
Q61R Mix	۲۰-۴۰	۳۹	≤۱۲/۴	≤۱۲/۸	۱۳/۶	منفی

جدول ۷. نمونه ای از جدول ثبت داده ها برای یک نمونه بیمار.

توجه داشته باشید که نمونه طبیعی 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 ۲، مراحل بررسی نمونه بیمار را برای شناسائی جهش های NRAS نشان می‌دهد.



نمودار ۲. مراحل بررسی نتایج نمونه بیمار برای شناسائی جهش های ژن NRAS در کانال سبز

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

در صورتی که یک نمونه در همه ی میکس های NRAS در کانال سبز، منفی یا دارای CT بالاتر از ۴۰ باشد، نمونه از نظر جهش NRAS **منفی** است.

- در صورتی که نمونه در یک یا چند میکس NRAS در کانال سبز دارای CT بین ۲۰ تا ۴۰ و ΔCT بیشتر از مقدار قابل قبول (مقادیر جدول ۷) باشد، نمونه از نظر جهش NRAS **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در کانال سبز در یکی از میکس های جهش های NRAS دارای CT و ΔCT قابل قبول (مقادیر جدول ۷) باشد، از نظر جهش مورد نظر ژن NRAS **مثبت** است.
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز برای بیش از یک میکس NRAS دارای CT و ΔCT قابل قبول باشد، نمونه در واکنشی که کوچک ترین ΔCT را دارد از نظر جهش NRAS مثبت است.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش NRAS در جدول ۸ آمده است.

میکس NRAS	CT نمونه	ΔCT نمونه در RotorGene	ΔCT نمونه در StepOne	نتیجه گیری
G12 Mix	>۴۰	-	-	برای جهش G12 منفی
	۴۰-۲۰	>۷/۴	>۷/۴	برای جهش G12 منفی
	۴۰-۲۰	≤۷/۴	≤۷/۴	برای جهش G12 مثبت
G13 Mix	>۴۰	-		برای جهش G13 منفی
	۴۰-۲۰	>۱۱/۲	>۱۱/۸	برای جهش G13 منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۱/۲	≤۱۱/۸	برای جهش G13 مثبت
A59D Mix	>۴۰	-	-	برای جهش A59D منفی
	۴۰-۲۰	>۸/۴	>۹/۷	برای جهش A59D منفی
	۴۰-۲۰	≤۸/۴	≤۹/۷	برای جهش A59D مثبت
Q61H Mix	>۴۰	-	-	برای جهش Q61H منفی
	۴۰-۲۰	>۸	>۱۰/۲	برای جهش Q61H منفی
	۴۰-۲۰	≤۸	≤۱۰/۲	برای جهش Q61H مثبت
Q61K Mix	>۴۰	-	-	برای جهش Q61K منفی
	۴۰-۲۰	>۹/۶	>۱۰/۹	برای جهش Q61K منفی
	۴۰-۲۰	≤۹/۶	≤۱۰/۹	برای جهش Q61K مثبت
Q61L Mix	>۴۰	-	-	برای جهش Q61L منفی
	۴۰-۲۰	>۱۲/۴	>۱۲/۸	برای جهش Q61L منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۲/۴	≤۱۲/۸	برای جهش Q61L مثبت
Q61R Mix	>۴۰	-	-	برای جهش Q61R منفی
	۴۰-۲۰	>۱۲/۴	>۱۲/۸	برای جهش Q61R منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۲/۴	≤۱۲/۸	برای جهش Q61R مثبت

جدول ۸. تفسیر نتایج آزمایش NRAS

توجه داشته باشید در صورتی که نمونه با این کیت از نظر جهش های NRAS منفی باشد حالات زیر را نیز باید در نظر گرفت:

- نمونه از نظر جهش های بررسی شده NRAS منفی است.
- نمونه از نظر جهش های بررسی شده NRAS 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 NRAS مثبت باشد.

۱۹. حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت معادل درصدی از DNA جهش یافته‌ی NRAS است که قابل شناسائی می‌باشد. این میزان حساسیت با توجه به میزان DNA نمونه تغییر می‌کند. حداکثر حساسیت کیت زمانی قابل وصول است که نمونه استخراج شده حاوی ۱۰ الی ۵۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر باشد و CT نمونه در کانال سبز با میکس کنترل بین ۲۲ تا ۲۸ باشد. در صورتی که این مقدار کمتر از ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر باشد، میزان حساسیت کاهش می‌یابد. برای جزئیات بیشتر به جدول شماره ۹ مراجعه نمائید.

واکنش مورد بررسی	حساسیت (CT نمونه در میکس کنترل: ۲۲ تا ۲۸)
G12	٪ ۰/۸
G13	٪ ۰/۳
A59D	٪ ۱/۴
Q61H	٪ ۰/۷
Q61K	٪ ۰/۵
Q61L	٪ ۰/۵
Q61R	٪ ۱/۲

جدول ۹. 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 گیشا، خیابان چهارم، پلاک ۲۰. کد پستی: ۱۴۴۶۸۴۳۴۳۴

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

۲۳. منابع

- Kelleher, F.C. and McArthur, G.A., 2012. Targeting NRAS in melanoma. The Cancer Journal, 18(2), pp.132-136.

- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Mulligan, G., Lichter, D.I., Di Bacco, A., Blakemore, S.J., Berger, A., Koenig, E., Bernard, H., Trepicchio, W., Li, B., Neuwirth, R. and Chattopadhyay, N., 2014. Mutation of NRAS but not KRAS significantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 123(5), pp.632-639.
- Muñoz-Couselo, E., Adelantado, E.Z., Ortiz, C., García, J.S. and Perez-Garcia, J., 2017. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. OncoTargets and therapy, pp.3941-3947.
- Yang, X. and Wu, H., 2024. 'RAS signaling in carcinogenesis, cancer therapy and resistance mechanisms', Journal of Hematology & Oncology, 17(1).

۲۴. توضیحات برچسب

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

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

NRAS RQ
Kit Manual

Spring 2026, Version 1.0

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

Σ 24 (Cat# NRASRQ24)
Σ 48 (Cat# NRASRQ48)
NG-WI-ASL-73-100

RUO

NovinGene ParsVira
No. 20, 4th St, Gisha, Tehran, Iran 1446843434.

Novin Gene

Table of Contents

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

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

1. Introduction

NRAS RQ Kit is a ready-to-use real-time PCR assay for the detection of NRAS gene mutations in codons 12, 13, 59, and 61 in human genomic DNA. All required reagents are included in the provided PCR Mixes. All Mutation Mixes contains specific primers and probes for detecting mutations as well as an internal control based on a synthetic DNA sequence.
This kit is intended for Research Use Only (RUO).

2. Intended Use

NRAS RQ kit is intended for detecting of NRAS gene mutations in codons 12, 13, 59 and 61 in human genomic DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene and StepOne machines.

3. Background Information

The RAS gene family, consisting of HRAS, KRAS, and NRAS, functions as critical molecular switches in intracellular signaling pathways. These proteins regulate a wide range of cellular processes, including proliferation, differentiation, migration, survival, and apoptosis. Activating mutations in RAS genes impair their intrinsic GTPase activity, resulting in persistent activation of downstream signaling pathways, particularly MAPK/ERK pathway and other kinase-dependent pathways. Consequently, aberrant RAS signaling promotes uncontrolled cell growth and contributes to tumor initiation and progression in numerous human malignancies. In clinical studies, the presence of RAS mutations has been linked to distinct clinicopathological features, prognosis, and responses to therapeutic interventions.

Among the members of RAS family, NRAS plays a prominent oncogenic role in several cancers, most notably melanoma, acute myeloid leukemia (AML), and thyroid carcinoma, colorectal cancer, and endometrial cancer. NRAS gene is located on chromosome 1, and its mutations are primarily found in exon 2 (codons 12 and 13), exon 3 (codons 59 and 61), and exon 4 (codons 117 and 146). Among these alterations, mutations affecting codon Q61 are of particular clinical significance, and can be associated with reduced treatment efficacy and, in some cases, the development of drug resistance. The most important NRAS mutations are listed in Table 1.

Exon	Codon	Protein Change	Base change
2	12	G12A	35G>C
2	12	G12C	34G>T
2	12	G12D	35G>A
2	12	G12R	34G>C
2	12	G12S	34G>A
2	12	G12V	35G>T
2	13	G13A	38G>C
2	13	G13C	37G>T
2	13	G13D	38G>A
2	13	G13R	37G>C
2	13	G13S	37G>A
2	13	G13V	38G>T
3	59	A59T	175G>A
3	59	A59D	176C>A
3	61	Q61E	181C>G
3	61	Q61H	183A>C
3	61	Q61H	183A>T
3	61	Q61K	181C>A
3	61	Q61L	182A>T

3	61	Q61R	182A>G
4	117	K117N	351G>C
4	117	K117N	351G>T
4	117	K117R	350A>G
4	146	A146P	436G>C
4	146	A146T	436G>A
4	146	A146V	437C>T

Table1. NRAS Mutations

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 and following reagents:

Label	Content	Quantity	Volume
Ctrl Mix	PCR Mix for quality control	2	480 µl
G12 Mix	PCR Mix to check G12 mutations	1	480 µl
G13 Mix	PCR Mix to check G13 mutations	1	480 µl
A59D Mix	PCR Mix to check A59D mutations	1	480 µl
Q61H Mix	PCR Mix to check A61H mutations	1	480 µl
Q61K Mix	PCR Mix to check A61K mutations	1	480 µl
Q61L Mix	PCR Mix to check A61L mutations	1	480 µl
Q61R Mix	PCR Mix to check A61R mutations	1	480 µl
NRAS Pos	Positive control	1	250 µl
NRAS Neg	Negative control	1	250 µl
Water	PCR Grade Water	1	200 µl

Table 2. Kit Contents

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 expiry 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 equipments
- Nuclease-free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves

- Cold block

10. General Precaution

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 paraffin block are the proper sample for patients with solid tumor such as colorectal cancer and thyroid. If tissue is not feasible, plasma sample can be used. In hematological malignancies such as AML, peripheral blood or bone marrow aspirate are standard specimens.

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 50 microliters. We recommend extracting 100 microliters or 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 NRAS mutations, quality of DNA should be assessed. If the results are within the desired range, then the second test for detecting NRAS 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 50 microliters and preferably about 100 microliters. Volumes less than 50 microliters are not enough to proceed.
First, thaw the **Ctrl Mix** on ice completely, mix by flickering 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 controls and water.
Pipette 20µl of Ctrl Mix to each microtube. Continue by adding 5µl of DNA sample, Negative control and water to each tube.
Cap the tubes and visually inspect to make sure all are caped securely. Place tubes in the machine.
Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

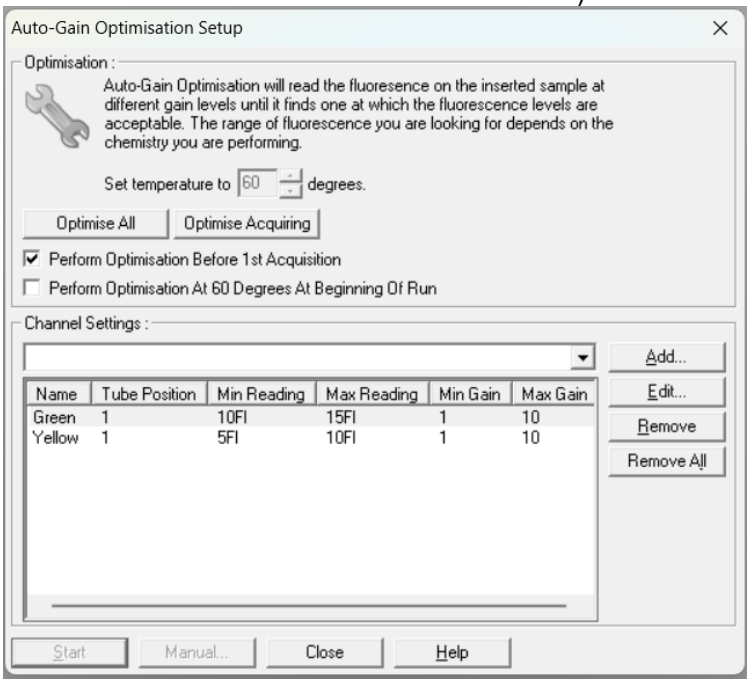
14. Devices and software

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

15. Programming Real-Time PCR

Open the NRAS template file for Rotor-Gene or StepOne machine (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). In RotorGene template NRAS 0.1 is for strip tubes and NRAS 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 below image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain 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 can also use table 3:

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

Table 3. Temperature Profile

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes.

Mix contain ROX with final concentration of 300nM in 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. In the first step, results of positive and negative controls will be evaluated.

Perform quantitative analysis for both **DNA sample (the Green channel)** and **Internal control (the 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.

A) Test is valid only if:

1) Water sample is **Negative** in the Green channel, and it is **Positive** in Yellow channel with CT of 28-31.

2) Positive control/Negative control is **Positive** in the Green channel with CT of 24-28. And it is **Positive** in the Yellow channel with CT of 28-31.

Expected results for a valid test are summarized in the Table 4.

Sample	Yellow	Green
NTC	Pos CT: 28-31	Neg
Pos/Neg Ctrl	Pos CT: 28-31	Pos CT: 24-28

Table 4. Expected results for Sample Assessment Test validity.

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 the Green channel with CT of 22-28 and also positive in the Yellow channel with CT of 28-31. This sample can be further examined for NRAS mutations.

- Sample should be diluted with water, if a sample in is positive in the Green channel with CT of less than 22 and also positive in the Yellow channel with CT of 28-31. Dilute the sample to reach CT of 22-28. By 2X dilution of sample, CT is increased one cycle. After diluting the sample, proceed to the NRAS mutation test.

- Result is invalid, if a sample in the Green channel has CT above 28. In this case, repeating DNA extraction is recommended.

DNA sample Quality Analysis is summarized in Table 5.

	FAM/Green	VIC/Yellow	Result
1	+ CT: 22-28	+ CT: 28-31	Valid
2	+ CT<22	+ CT: 28-31	Sample dilution
3	+ CT>28	+ CT: 27-33	Invalid
4	+ CT: 22-28	+ CT>33	Invalid

Table 5. DNA Quality Analysis

17. Protocol: Detection of NRAS mutations

To detect NRAS mutations, each sample should be examined with 8 mixes, one for DNA quantitation and one for each of NRAS mutations, each in a separate microtube. Therefore, to examine only one sample, 32 microtubes are required; 8 for the sample, 8 for the Positive control, 8 for the Negative control and 8 for water (NTC). Respectively for each extra samples 8 microtubes will be added. Therefore for 2 samples, 40 microtubes and for 3 samples 48 microtubes are required. Figure1 shows tube setup for 3 samples. Place required number of tubes on cold block organized in series of 3 for each sample.

Pipette 20µl of Ctrl Mix to each tube in the first series.
Pipette 20µl of G12 Mix to each tube in the 2nd series.
Pipette 20µl of G13 Mix to each tube in the 3th series.
Pipette 20µl of A59D Mix to each tube in the 4th series.
Pipette 20µl of Q61H Mix to each tube in the 5th series.
Pipette 20µl of Q61K Mix to each tube in the 6th series.
Pipette 20µl of Q61L Mix to each tube in the 7th series.
Pipette 20µl of Q61R Mix to each tube in the 8th series.

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

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are caped securely. Place tubes in the machine and program it according to the section 15.

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

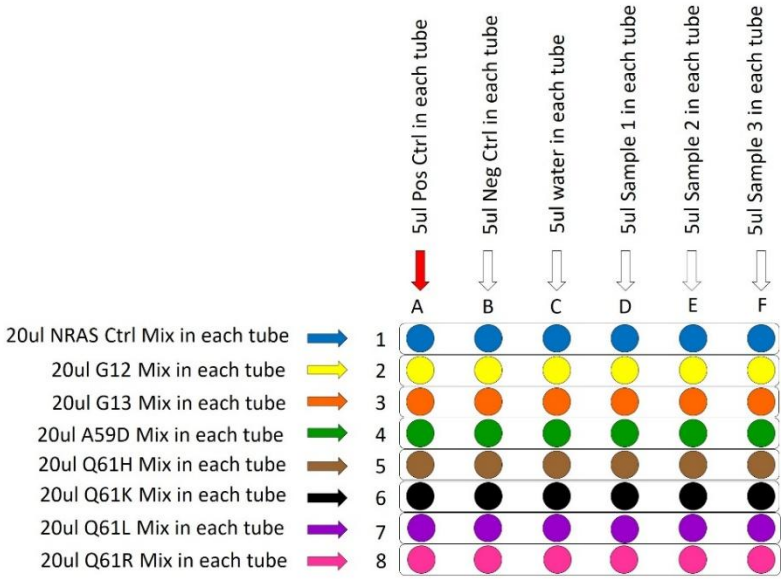


Fig 1. Tubes setup for Mixes and samples.

18. NRAS Mutation Detection Analysis

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

Briefly, for RotorGene software 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.
Also put threshold at 0.1 for FAM and VIC in StepOne.
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) Water sample is Negative in the Green channel with all Mixes, and
2) Water sample is Positive in the Yellow channel with Control Mix with a CT of 28-31, and
3) Positive control is Positive in the Green channel with Control Mix with a CT of 26-29, and
4) Pos control is Positive in the Yellow channel with Control Mix and CT of 28-31, and
5) Positive control is Positive in the Green channel **with all seve NRAS mutation Mixes** with a CT of 26-40, and
6) Sample is Positive in the Green channel with Control Mix with a CT of 22-30 and Positive in Yellow channel with CT of 28-31.

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 NRAS mutations.

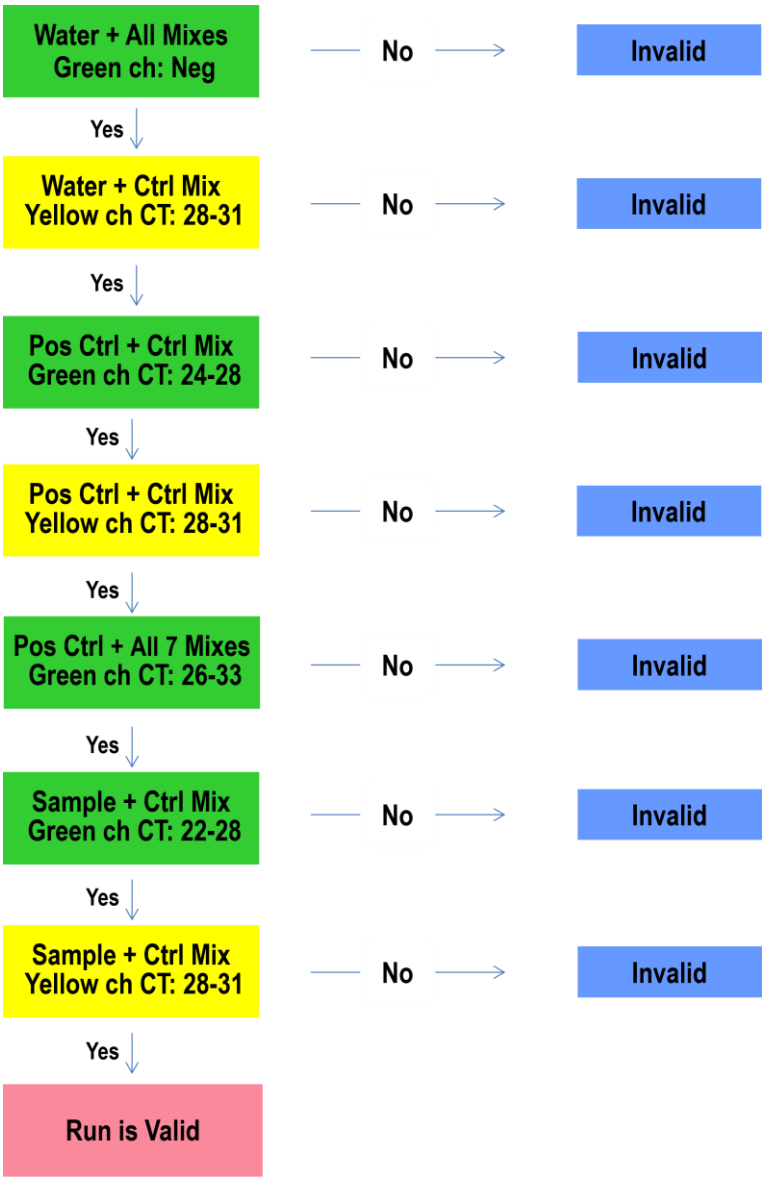


Fig 2. Test validation flowchart

B) Data analysis for NRAS mutations

1) Select the patient's samples which are positive in the Green channel with NRAS specific mixes with a CT of 20-40, and document the CTs in the Table 6.
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 6 too.
4) If the ΔCT is within the valid range as mentioned in the Table 3, the sample has the NRAS mutation.
5) If a sample is positive for two or more NRAS mutations, it is considered positive for the mutation with the lowest ΔCT and negative for the other mutations.

Above steps for detection of NRAS mutations are summarized in Figure 3.

NRAS Mix	Valid CT	Sample CT	Valid ΔCT in RotorGene	Valid ΔCT in StepOne	Sample ΔCT	Result
Ctrl Mix	22-28		NA	NA		
G12 Mix	20-40		≤ 7.4	≤ 7.4		
G13 Mix	20-40		≤ 11.2	≤ 11.8		
A59D Mix	20-40		≤ 8.4	≤ 9.7		
Q61H Mix	20-40		≤ 8	≤ 10.2		
Q61K Mix	20-40		≤ 9.6	≤ 10.9		
Q61L Mix	20-40		≤ 12.4	≤ 12.8		
Q61R Mix	20-40		≤ 12.4	≤ 12.8		

Table 6. Valid CT and ΔCT ranges for NRAS Mixes.

As an example, If CT of a sample is 25.4 with Control Mix, and 35.1 with G12 Mix, 32.5 with G13 Mix, 36.8 with A59D Mix, 37.8 with Q61H Mix, 38.1 with Q61K Mix, 40 with Q61L Mix and 39 with Q61R Mix, then ΔCT is 9.7 for G12 (35.1 – 25.4), 7.1 for G13 (32.5-25.4), 11.4 for A59D (36.8-25.4),12.4 for Q61H (37.8-25.4),12.7 for Q61K (38.1-25.4), 14.6 for Q61L (40-25.4), 13.6 for Q61R (39-25.4), (Table. 7). So, results of G12 and G13 are in valid range. In this case, patient is Positive for G13.

NRAS Mix	Valid CT	Sample CT	Valid ΔCT in RotorGene	Valid ΔCT in StepOne	Sample ΔCT	Result
Ctrl Mix	22-28	25.4	NA	NA		
G12 Mix	20-40	35.1	≤ 7.4	≤ 7.4	9.7	Negative
G13 Mix	20-40	32.5	≤ 11.2	≤ 11.8	7.1	**Positive**
A59D Mix	20-40	36.8	≤ 8.4	≤ 9.7	11.4	Negative
Q61H Mix	20-40	37.8	≤ 8	≤ 10.2	12.4	Negative
Q61K Mix	20-40	38.1	≤ 9.6	≤ 10.9	12.7	Negative
Q61L Mix	20-40	40	≤ 12.4	≤ 12.8	14.6	Negative
Q61R Mix	20-40	39	≤ 12.4	≤ 12.8	13.6	Negative

Table 7. NRAS mutation analysis for a specific sample.

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

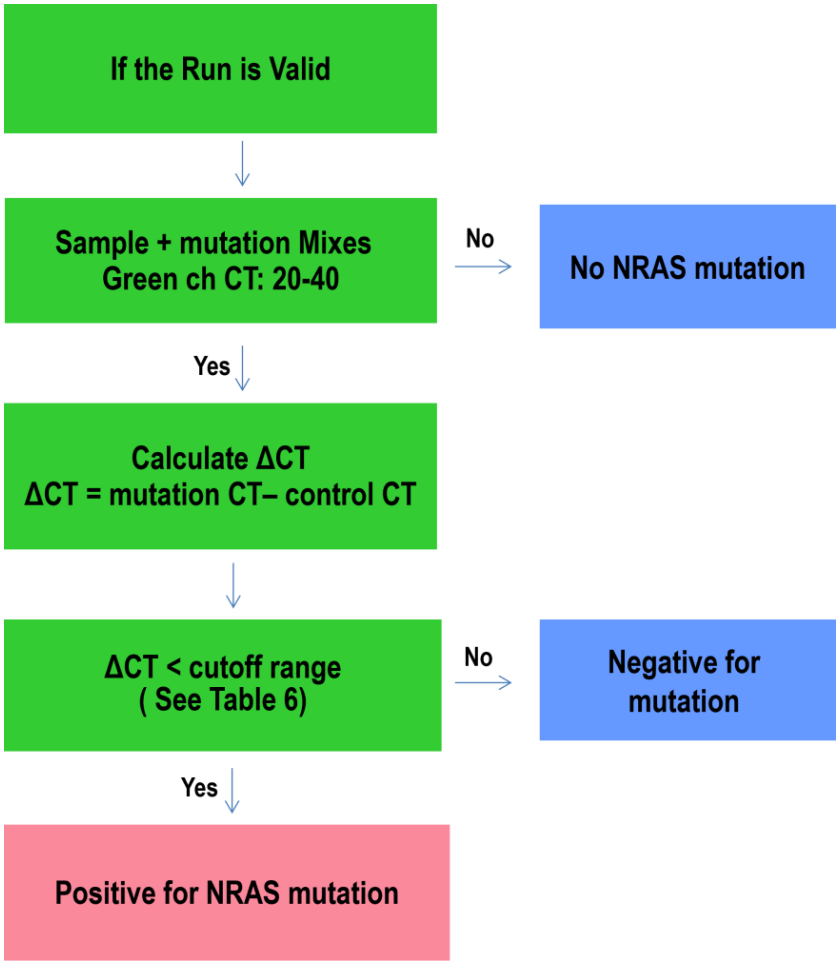


Fig 3. Sample analysis flowchart for NRAS mutation detection

Results can also be interpreted as below;

- Sample is **Negative** for NRAS mutations, if it is negative in the Green channel with all mixes or has CT above 40.
- Sample is **Negative** for NRAS mutations if it is positive in the Green channel with CT of 20-40 for one or more NRAS mixes, and a ΔCT above valid range (which mentioned in Table 6).
- Sample is **Positive** for NRAS mutations, if sample has a valid CT and ΔCT (Table 6) in the Green channel for one of the seven NRAS mixes. Briefly,
- If a sample has a valid CT and ΔCT for more than one of the NRAS Mix, sample is Positive for a NRAS mutation which has a lowest ΔCT.

Interpretation of results for NRAS mutation test are summarized in Table 8.

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

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

NRAS Mix	Sample CT	ΔCT In RotorGene	Sample ΔCT In StepOne	Conclusion
G12 Mix	>40	-	-	Neg for G12 mutations
	20-40	>7.4	>7.4	Neg for G12 mutations
	20-40	≤7.4	≤7.4	Pos for G12 mutations
G13 Mix	>40	-	-	Neg for G13 mutations
	20-40	>11.2	>11.8	Neg for G13 mutations
	20-40	≤11.2	≤11.8	Pos for G13 mutations
A59D Mix	>40	-	-	Neg for A59D mutations
	20-40	>8.4	>9.7	Neg for A59D mutations
	20-40	≤8.4	≤9.7	Pos for A59D mutations
Q61H Mix	>40	-	-	Neg for Q61H mutation
	20-40	>8	>10.2	Neg for Q61H mutation
	20-40	≤8	≤10.2	Pos for Q61H mutation
Q61K Mix	>40	-	-	Neg for Q61K mutation
	20-40	>9.6	>10.9	Neg for Q61K mutation
	20-40	≤9.6	≤10.9	Pos for Q61K mutation
Q61L Mix	>40	-	-	Neg for Q61L mutation
	20-40	>12.4	>12.8	Neg for Q61L mutation
	20-40	≤12.4	≤12.8	Pos for Q61L mutation
Q61R Mix	>40	-	-	Neg for Q61R mutation
	20-40	>12.4	>12.8	Neg for Q61R mutation
	20-40	≤12.4	≤12.8	Pos for Q61R mutation

Table 8. Interpretation of results for NRAS mutation.

19. Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of this assay is equivalent to the percentage of mutated NRAS DNA that can be identified in the background of wild-type DNA and is mentioned in Table 9. The sensitivity depends on the DNA quantity in a sample. Maximum sensitivity is obtained when an extracted sample contains 10-50 ng/ul DNA. Also, Sample

with Control Mix has a CT of 22-28 in the Green channel. If CT range is 28-30, the sensitivity will decrease for some mutations.

Reaction	Sensitivity
G12	٪0.8
G13	٪0.3
A59D	٪1.4
Q61H	٪0.7
Q61K	٪0.5
Q61L	٪0.5
Q61R	٪1.2

Table 9. Sensitivity of the NRAS 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. 20, 4th St, Gisha St, Tehran, Iran 1446843434.
Tel: +98 21-88837393
+98 990-1813124

Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

23. References

- Kelleher, F.C. and McArthur, G.A., 2012. Targeting NRAS in melanoma. The Cancer Journal, 18(2), pp.132-136.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Mulligan, G., Lichter, D.I., Di Bacco, A., Blakemore, S.J., Berger, A., Koenig, E., 2014. Mutation of NRAS but not KRAS significantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 123(5), pp.632-639.
- Muñoz-Couselo, E., Adelantado, E.Z., Ortiz, C., García, J.S. and Perez-Garcia, J., 2017. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. OncoTargets and therapy, pp.3941-3947.
- Yang, X. and Wu, H., 2024. 'RAS signaling in carcinogenesis, cancer therapy and resistance mechanisms', Journal of Hematology & Oncology, 17(1).

24. Symbols

RUO Research use only	Manufacturer	Consult instructions for use
LOT Lot number	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