



博銖 KRAS 基因突變檢測試劑套組

IntelliPlex™ KRAS Mutation Plus Kit



82022-RT



For Research Use Only
僅供科研使用



操作本產品套組前請詳閱產品說明書

1. 效能

本產品需搭配“博銖”微量盤清洗機與“博銖”螢光分析儀進行檢測，其可定性分子檢測來自福馬林固定及石蠟包埋 (FFPE) 檢體中 27 個位於 KRAS 基因 2,3,4 外顯子的單核苷酸突變。本產品僅供科研使用，其檢測結果不作為疾病診斷、藥物治療或疾病管理之依據。

2. 簡介

許多癌症與上皮細胞生長因子接受體(epidermal growth factor receptor, EGFR)活性增加息息相關，因此上皮細胞生長因子接受體及其訊息傳遞路徑成為許多癌症治療藥物的開發標的，並分別廣泛應用於治療轉移性大腸直腸癌(metastatic colorectal cancer, mCRC)和非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。在上皮細胞生長因子接受體的訊息傳遞路徑中，KRAS 蛋白質做為 GDP/GTP 的調節開關，將訊息分子傳達至細胞外而影響細胞增殖、細胞凋亡以及細胞骨架重塑。一旦 KRAS 基因發生突變，其蛋白質會和 GTP 結合而維持被活化的型式，進而影響下游基因訊息傳遞，導致細胞增殖及癌化等現象。利用 SelectAmp 技術與博銖影像晶元磁片(πCode Technology)原理，在大量野生型 DNA 背景下，博銖 KRAS 基因突變檢測試劑套組可以在一次反應中同時偵測 KRAS 基因外顯子 2、3 和 4 上的 27 個單核苷酸突變位點 (詳列於表 1)。

表 1：可檢出之 KRAS 基因突變位點

Gene	Exon Codon	Amino Acid Change	Nucleotide Change	COSMIC ID
KRAS	Exon 2 Codon 12	p.G12A	c.35G>C	522
		p.G12D	c.35G>A	521
		p.G12V	c.35G>T	520
		p.G12C	c.34G>T	516
		p.G12R	c.34G>C	518
		p.G12S	c.34G>A	517
	Exon 2 Codon 13	p.G13A	c.38G>C	533
		p.G13D	c.38G>A	532
		p.G13V	c.38G>T	534
		p.G13C	c.37G>T	527
		p.G13R	c.37G>C	529
		p.G13S	c.37G>A	528

Gene	Exon Codon	Amino Acid Change	Nucleotide Change	COSMIC ID
	Exon 3 Codon 59	p.A59T	c.175G>A	546
		p.A59E	c.176C>A	547
		p.A59G	c.176C>G	28518
	Exon 3 Codon 61	p.Q61K	c.181C>A	549
		p.Q61E	c.181C>G	550
		p.Q61P	c.182A>C	551
		p.Q61R	c.182A>G (CAA>CGA)	552
		p.Q61L	c.182A>T (CAA>CTA)	553
		p.Q61H	c.183A>C	554
		p.Q61H	c.183A>T	555
	Exon 4 Codon 117	p.K117N	c.351A>C	19940
		p.K117N	c.351A>T	28519
	Exon 4 Codon 146	p.A146T	c.436G>A	19404
		p.A146P	c.436G>C	19905
		p.A146V	c.437C>T	19900

3. 技術原理

博錄 KRAS 基因突變檢測試劑套組係利用兩種核心技術-SelectAmp 及 π Code 技術，針對 27 種 KRAS 基因突變位點進行單一微孔多元檢測。

SelectAmp 技術

SelectAmp 技術是一突變擴充聚合酶鏈鎖反應原理，以提高博錄 KRAS 基因突變檢測試劑套組的靈敏度與專一性，其藉由鎖核甘酸(Locked Nucleic Acid, LNA)阻擋野生型 DNA 之擴大，進而擴增特定突變序列 DNA。因此，特定的突變基因序列可以選擇性地被擴增，接著與博錄晶元磁片(π Code MicroDisc)上鍵結的特定探針進行雜交反應，最後經過螢光標記與影像解碼分析完成 KRAS 基因突變的檢測。

博錄影像晶元磁片 π Code MicroDisc

博錄影像晶元磁片(π Code MicroDisc)係利用光罩微影建構製程，產生高達 85,000 種不同的圖像於磁片圓盤上以應用於多元檢測技術。每個影像晶元磁片各有不同圖像，對應於結合在磁片上的特定標的，各種結合不同標的物的影像晶元磁片匯集後，能夠在一次的樣本反應中同時檢測多種標的。

試驗原理

- I. 自福馬林固定石蠟包埋組織塊檢體(FFPET)萃取檢體 DNA
- II. 聚合酶鏈鎖反應同步多元擴增特定突變基因
- III. 將 PCR 擴增子產物與已鍵結特定突變探針的晶元磁片進行雜交反應
- IV. SA-PE 反應進行螢光標記
- V. 以博錄螢光分析儀檢測螢光訊號並進行磁片影像解碼分析

4. 警語與注意事項

- 僅供科研使用。
- 此檢測試劑套組僅供專業的實驗室人員使用。
- 實驗室空間及設備需區分為 PCR 擴增前與 PCR 擴增後專用，且操作流程需為單向以避免污染。
- PCR 擴增前之操作流程需於生物安全櫃內進行。

- 切勿使用過期的試劑套組或試劑。
- 請注意腫瘤組織檢體並非同質性，同一份腫瘤組織樣本亦可能包含正常的組織細胞而造成偽陰性結果。
- 反應試劑已經過適當地稀釋處理，不建議自行再進行稀釋等配製。
- 所有化學、生物原料、以及來自人類來源的原料或檢體均需被視為有潛在風險或具感染性，應依照感染性廢棄物作適當處置。
- 依照標籤或說明書指示儲存檢測試劑套組及其內容物。
- 不得混用不同批次生產的試劑
- 遵循中央/聯邦、州、地方法規規範處理未使用的試劑、檢體和實驗操作廢棄物
- 請穿戴無粉手套操作實驗，並請勿觸碰實驗操作孔盤底部或畫記任何記號，其指紋殘留或記號將會影響訊號或影像解碼的判讀。
- 請遵守一般實驗室安全守則：
 - 請勿用口吸量
 - 請穿著手套、實驗衣及護目裝置
 - 請勿於實驗室飲食及吸菸
 - 請於操作檢體或試劑後清潔雙手
- 實驗工作區域及實驗相關耗材於使用前皆須徹底清潔，建議先使用 0.5%次氯酸鈉漂白水(家用漂白水以 1:10 稀釋)擦拭後，再以 70%酒精進行清潔。
- 物質安全資料表可向博錄客服人員索取或經由博錄官網下載

5. 品質控管

博錄 KRAS 基因突變檢測試劑套組包含一系列內部控制組 π Code MicroDiscs，用於監控 PCR 擴增、SA-PE 反應程序與成像背景值。上述監控值須符合規範，並且維持在單一測試中每個反應孔(well)具備同等的反應強度，否則擇判定為無效測試。其外部控制組(陽性和陰性對照)則負責監控整個測試過程，以避免偽陽性及偽陰性測試結果的發生。套組中任一控制組件未通過時，則認定該測試無效。

6. 試劑套組內容物

博錄KRAS基因突變檢測試劑套組可提供24次反應數，其套組內容物詳列如下：

(1) KRAS Plus KIT Reaction Mix

料號: 20188-R

數量及體積: 1 管, 240 μ L/管

描述: 使用於聚合酶鏈鎖反應

成份: 5倍擴增反應緩衝液、氯化鎂溶液、dNTPs及活化劑、DNA聚合酶 (微生物來源)

(2) KRAS Plus KIT Primer Mix

料號: 20187-R

數量及體積: 1 管, 240 μ L/管

描述: 使用於聚合酶鏈鎖反應

成份: ~4 μ M 引子 (含生物素標記引子)

(3) KRAS Plus KIT π Code MicroDisc

料號: 20191-R

數量及體積: 1 管, 480 μ L/管

描述: 使用於捕捉PCR反應擴增子

成份: 晶元磁片、甘油及磷酸鹽緩衝液、0.1% 小牛血清白蛋白 (生物性來源)、<0.1% 乙二胺四乙酸、<0.1% 疊氮化鈉

(4) KRAS Plus KIT POS Control

料號: 20189-R

數量及體積: 1 管, 120 µL/管

描述: 試劑套組陽性對照品

成份: KRAS第二外顯子質體DNA (微生物來源)、Tris-EDTA 緩衝液

(5) NEG Control

料號: 20549-R

數量及體積: 1 管, 120 µL/管

描述: 試劑套組陰性對照品

成份: 無核酸酶水

(6) SA-PE Solution

料號: 20302

數量及體積: 1 瓶, 7 mL/瓶

描述: 鏈霉親和素-藻紅蛋白螢光呈色劑

成份: 磷酸鹽緩衝液、0.5% 鏈霉親和素-藻紅蛋白、1%小牛血清白蛋白 (生物性來源)、<0.1% 疊氮化鈉

(7) Hy Buffer

料號: 20547-R

數量及體積: 1 瓶, 2.4 mL/瓶

描述: 雜交反應緩衝液

成份: 磷酸鈉鹽EDTA緩衝液

備註: POS Control, NEG Control與Hy Buffer分別代表陽性對照品(Positive Control)、陰性對照品(Negative Control)與雜交反應緩衝液(Hybridization Buffer)。

7. 試驗所需材料與儀器設備(套組未提供)

搭配 IntelliPlex 試劑必需使用之材料與儀器:

- 96 孔盤 (PlexBio; Cat. No. 80025 或 Greiner Bio-one; Cat. No. 655101)
- “博銖”微量盤清洗機(衛部醫器製壹字第 006641 號) (PlexBio; Cat. No. 80033)
- “博銖”螢光分析儀(衛部醫器製壹登字第 006602 號) (PlexBio; Cat. No. 80000)
- U 型底槽 (PlexBio; Cat. No. 80023)
- V 型底槽 (PlexBio; Cat. No. 80024)
- DeXipher 分析軟體(RUO 版) (PlexBio; Cat. No. 80050)
- 博銖 10 倍檢測清洗緩衝液(10X Assay Wash Buffer) (PlexBio; 料號: 80220)
- 無核酸酶水; 供博銖 10 倍檢測清洗緩衝液(PlexBio; 料號:. 80220)稀釋使用

試驗流程所需之材料:

- Qubit™ 螢光定量儀及其搭配定量試劑 (Invitrogen; 任何型號) 或相似品
- FFPE 檢體 DNA 萃取試劑組 (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen; Cat. No. 56404)或相似品
- 乾淨的 PCR 擴增管; 建議使用 0.2ml PCR 平蓋獨立八連排 (Gunster; Cat. No. MB-P08A)或相似品
- 專用的微量吸量器*
- 濾芯吸量管*
- 拋棄式無粉手套
- 震盪器
- 微量離心機
- Eppendorf® PCR 保冷盒或相似品(非必要)

- 聚合酶鏈鎖反應儀(建議使用 MiniAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems™; Cat. No. A37834 或相似品)
- 電腦；建議使用工業電腦 (PlexBio; Cat. No. 80002) 或相似品

8. 儲存、安定性及運送條件

儲存

博錄 KRAS 基因突變檢測試劑套組中所有試劑組成分應貯藏於 2°C-8°C。

安定性

請勿使用過期的博錄 KRAS 基因突變檢測試劑套組。所有未開封試劑組成份若遵循標籤指示適當儲存，其效期可保障至標籤所示的有效期限。

運送條件

博錄 KRAS 基因突變檢測試劑套組的運送溫度為 2 至 8°C，若收件時有破裂損壞或缺少內容物等情況，請盡速聯繫博錄客服人員。

9. 儀器與軟體

儀器

請遵循各儀器產品使用手冊操作流程(聚合酶鏈鎖反應儀、“博錄”微量盤清洗機及“博錄”螢光分析儀)。

軟體安裝

KRAS 基因突變試劑套組須搭配使用指定的 APP 應用程式和 ENC 檔案。試劑套組 APP 包含預設的 π Code 磁片號碼，ENC 檔案則載有批號和有效期限等資訊。在進行首次分析前，請確認試劑套組 APP 已安裝於 DeXipher 軟體並完成 ENC 檔案匯入。

試劑套組 APP 安裝

1. 自博錄官網 www.plexbio.com 下載 KRAS Plus Kit App 應用程式。
2. 開啟試劑套組 APP，執行安裝檔“Installer.exe”，並依循指示安裝應用程式。

備註：試劑套組 APP 僅需於首次操作試驗前進行安裝，若有版本更新將由客服進行通知。

試劑 ENC 檔案安裝

1. 自博錄官網 www.plexbio.com 下載 KRAS Mutation Plus Kit ENC 檔案。每一批號試劑都有其對應的 ENC 檔案，若購入不同批號之試劑必須重新下載新的 ENC 檔案。請確認選取相對應的試劑批號(Lot no.)之 ENC 檔案。
2. 將 ENC 檔案儲存於電腦。
3. 請依循“博錄”螢光分析儀說明書操作匯入 ENC 檔案。

10. 檢體條件

檢體採集

博錄 KRAS 基因突變檢測試劑套組經驗證可使用福馬林固定石蠟包埋組織塊檢體(FFPET)。為確保整體試驗及萃取後檢體 DNA 品質，建議使用 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) (Qiagen; Cat. No. 56404)的萃取試劑套組。

備註：

- 自 FFPET 檢體採集及處理後，其可於 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 環境下儲存至 12 個月。最佳的組織固定時間需小於 72 小時。
- 需使用 10- μm 厚度並至少含有 10%腫瘤組織的組織切片進行檢測，若腫瘤組織小於 10%，應於脫蠟前進行 macro-dissected。
- 請勿使用染色後的 FFPET 檢體進行測試，其將導致無效試驗或錯誤結果。

萃取後 DNA 儲存

萃取後的 DNA 若立即使用可儲存於 2-8°C (≤24 小時)，若要長期儲存 (>24 小時) 請置放於 -20°C 環境中。萃取後的 DNA 請避免重複的冷凍/解凍循環。

11. 操作前注意事項

1. 請確認已完成安裝試劑 APP 和 ENC 檔案於 DeXipher 軟體。
2. 請檢查是否已準備足夠的萃取 DNA (≥ 0.5ng/μL) 以供分析。

12. 試驗流程

警告: 操作前請詳閱說明書並遵循每一個操作步驟。

12.1 DNA 定量

1. 請遵循 Qubit 螢光定量儀及其搭配之試劑(或類似品)之操作步驟進行萃取後 DNA 濃度測量，並依照 DNA 萃取試劑製造商所提供的產品說明書操作。
2. 操作博鍊 KRAS 基因突變檢測試劑套組時，為確保試驗順利執行，建議萃取後 DNA 濃度 ≥ 0.5 ng/μL，每個檢體進行 PCR 擴增建議使用 20 μL 的 0.5 ng/μL DNA (DNA 總量為 10ng)。請於執行 PCR 擴增前完成 DNA 樣品製備。不建議 DNA 總量低於或高於 10ng。

12.2 多元聚合酶鏈鎖反應擴增

1. 將每個檢體 DNA 使用前震盪混勻。
2. 快速離心後將檢體 DNA 置於冰上。
3. 遵循下表配置 PCR 反應液，操作時特別注意，避免檢體 DNA 操作時交叉汙染：

PCR 反應液製備*

KRAS Plus Reaction Mix	10 μL
KRAS Plus Primer Mix	10 μL
樣本/陽性對照品/陰性對照品	20 μL
總計	40 μL

*備註

- PCR 反應液製備時，若反應數較多，則依比例計算所需反應數的總體積，再分別加入 PCR 反應管，最後分別加入萃取後檢體 DNA 或陽(陰)性對照品。
 - 每一次試驗都需包含陽性對照品與陰性對照品。
4. 輕彈反應管混勻並快速離心後，將 PCR 反應管置入聚合酶鏈鎖反應儀，並設定擴增條件如下表：

PCR 擴增反應條件*

Temp. (°C)	Time	Cycles
95	5 min	-
95	20 sec	36
70	20 sec	
60	60 sec	
4	Hold	-

備註: Ramp rate: 3°C/sec (ABI MiniAmp™ Cat. No. A37834).

12.3 DNA 雜交及 SA-PE 螢光標記反應

- 將 10 倍檢測清洗緩衝液(10X Assay Wash Buffer)倒入“博錄”微量盤清洗機(IntelliPlex 1000 πCode Processor)提供的清洗緩衝液瓶，並加入 900 毫升的無核酸酶水以稀釋至 1 倍清洗緩衝液(1X Wash Buffer) 並充分混合後備用。

備註：配製完成的 1 倍清洗緩衝液(1X Wash Buffer)最多可存放一周。請注意，檢測清洗緩衝液是否足夠反應操作，使用者可依需求另行添購博錄 10 倍檢測清洗緩衝液(料號: 80220)。

“博錄”微量盤清洗機(IntelliPlex 1000 πCode Processor)清洗緩衝液耗損體積:

程序	清洗緩衝液耗損體積(mL)
初始化檢查	50 mL
DNA & RNA 程序 (1 排, 8 個反應為上限)	150 mL
DNA & RNA 程序 (3 排, 24 個反應為上限)	220 mL

- 加入 20 μL 晶元磁片(πCode)至 96 孔盤：**將 KRAS Plus 晶元磁片(πCode)震盪 10 秒混勻後，快速取出 20 μL 晶元磁片直接加入 96 孔盤反應微孔(well)，以微量吸量管作來回抽吸。(每加 4 個微孔後，須將晶元磁片重新震盪混勻，確保磁片的均勻分布)。

備註：每管擴增後產物(含樣本、陽性/陰性品管) 都需各別的反應微孔，且應依第 1 排 A1, B1...至 H1，再至第 2 排 A2, B2...至 H2 的順序方向使用 96 孔盤。

- 每個反應微孔加入 100 μL 雜交緩衝液(Hy Buffer)。
- 快速離心 PCR 擴增子產物。
- 將 PCR 擴增後產物放入聚合酶鍊鎖反應儀進行變性解螺旋，設定程式為 **95°C; 7 分鐘**，變性後的 PCR 擴增產物，請快速離心後立即置於冰上 (4°C；例如使用 Eppendorf® PCR 保冷盒或相似品)，使用前先離心並於一個小時內使用完畢。

備註：於聚合酶鍊鎖反應儀取出變性後 PCR 擴增產物時，請注意上蓋高溫避免燙傷。

- 每個反應微孔加入 20 μL 變性後 PCR 擴增子產物。
- 以微量吸量管吸取足夠的 SA-PE 溶液到 SA-PE 溶液槽(V 型底槽)中，請注意 V 型底槽的基本耗損量為 500μL，當反應排數達 6 排以上，基本耗損量應調整至 800μL。操作一排的 SA-PE 溶液基本使用體積為 900μL。

使用體積計算範例：

假設反應排數共 3 排，所需要的 SA-PE 溶液體積至少為 **400 μL X 3 排 + 500 μL = 1.7mL** 為確保分注管能夠吸取足夠體積進行分注，建議吸取多於計算體積的反應液至 V 型底槽中。

備註：SA-PE 溶液添加量對照如下表

反應排數	SA-PE 溶液體積(μL)
1	900
2	1300
3	1700
4	2100
5	2500
6	2900
7	3600

反應排數	SA-PE 溶液體積(μL)
8	4000
9	4400
10	4800
11	5200
12	5600

- SA-PE 溶液需要避光。
- 切勿重複使用殘留於 V 型底槽的 SA-PE 溶液及使用過的 V 型底槽。

8. **雜交與清洗程序:** 此反應使用“博錄”微量盤清洗機當中分子測定視窗中的 **DNA & RNA 程序**。請參閱“博錄”微量盤清洗機之使用說明書執行內建試劑反應程序 (首頁/ 分子檢測/ 選擇反應排數/ DNA&RNA/ 確認使用者介面顯示的反應條件正確/ 開始執行), 反應執行完畢後, 微孔盤即可進行解碼分析。

備註:

- “博錄”微量盤清洗機必需定期進行保養維護。
- 切勿於儀器操作中開啟儀器前門。
- 本試劑足以使用 6 次含陽性及陰性品管之檢測, 至多進行 24 個樣本測試。

12.4 影像解碼與螢光偵測

1. 依照“博錄”螢光分析儀使用說明書進行影像與螢光資訊讀取。

備註:

- “博錄”螢光分析儀需每個月以校正盤定期進行校正。
- 確認試劑相對應的 ENC 檔案已匯入完成。

2. 開啟 DeXipher 軟體執行 **Qualitative Assay** 檢測。

3. 在 DeXipher 軟體介面選擇待分析的反應微孔, 並輸入每一微孔的檢體資訊。

4. 輸入欲儲存的試驗名稱(“Assay Name”)並將反應完成的 96 孔盤如螢幕所示的擺盤方向置入“博錄”螢光分析儀中進行影像解碼與螢光偵測。

5. 檢測數據結果將透過 ENC 檔案進行分析並產出檢測報告。

備註:

- 96 孔盤單次讀取可提供 2–96 次測試(含陽性品管與陰性品管), 若同時檢測超過 24 個檢體, 需使用多個同批號的試劑盒進行測試。

13. 免責聲明

陰性檢測結果

陰性的檢測結果表示, 試劑套組沒有檢測出測試樣本含有目標基因突變, 但無法排除檢體中仍含有某種突變位點的可能性。實驗錯誤或其他原因亦可能導致偽陰性檢測結果。在進行這些結果的分析解讀時應參考所有可能的影響因素。

陽性檢測結果

陽性的檢測結果表示, 試劑套組檢測出測試樣本含有目標基因突變位點, 但不排除檢體並無基因突變的可能性。實驗錯誤或其他原因亦可能導致偽陽性檢測結果。在進行這些結果的分析解讀時應參考所有可能的影響因素。

14. 結果判讀

表 2: 結果判讀對照表

分析結果	報告格式	判讀
偵測到突變	參照表一	檢測出目標突變位點
未偵測到突變	未偵測到	未檢測出任何突變位點
無效試驗	無效	可能發生原因: 1. PCR 抑制反應 (檢體中含有 PCR 抑制物) 2. 試劑不適當儲存 3. 萃取後檢體 DNA 濃度太低或品質不佳 4. πCode 數量不足(添加時未均勻混合) 5. 未正確添加試劑 6. 空白 πCode 控制組失效 7. 組織檢體品質或儲存條件不佳

備註:

- 所有測試及驗證皆由專用試劑 APP 應用程式搭配“博錄”微量盤清洗機與“博錄”螢光分析儀進行。
- 在檢體異質性或同時存在多種基因突變的狀態下，僅呈現產出最高訊號值的基因突變位點，「偵測到突變」表示至少一個突變位點之信號值高於 cutoff 值，當多個突變位點同時存在時，檢測報告僅呈現最高訊號值之基因突變位點。

15. 非臨床效能評估

空白值偵測極限 (LoB)

空白值偵測極限 (LoB) 是在 3 天試驗測試中，分別針對野生型 KRAS 基因細胞株(K562)進行 12 次重複測試及 12 個野生型 KRAS 基因石蠟包埋檢體進行各 4 重複測試所得到的結果。另外並使用了 43 個來自不同採購年份及生物資料庫的野生型石蠟包埋檢體進行雙重複測試。“未偵測到突變”的結果僅會出現在野生型 KRAS 基因的 DNA 樣本或該樣本未含任何 DNA 樣本。在各突變位點所得到的 1.4 倍背景螢光最大值被視為博錄 KRAS 基因突變檢測試劑套組中各突變點的臨界值。

偵測極限 (LoD)

博錄 KRAS 基因突變檢測試劑套組可檢測的外顯子 2、3 和 4 上 27 個單核苷酸突變位點的偵測極限分別是將 KRAS 突變的質體 DNA 及野生型 KRAS 細胞株(K562)DNA 混合備製成混合質體來進行偵測極限的測定。每個含有 KRAS 突變的 DNA 檢體樣本皆經由序列稀釋，稀釋濃度範圍從 5%至 0.05% (包含 5%、2.5%、1%、0.5%、0.25%、0.1%及 0.05%的突變百分比)。每個突變 DNA 樣本分別使用兩個批號的博錄 KRAS 基因突變檢測試劑套組進行測試，各樣本濃度於每批試劑套組分 3 天進行共 21 次重複測試。在 PriProbit 分析下預測到各突變位點 $\geq 95\%$ 陽性命中率最低濃度結果顯示於表 3，其偵測極限範圍為 0.36-3.07%。

表 3. 各 KRAS 突變位點的偵測極限

Amino Acid Change	Nucleotide Change	LoD (% Mutation)
p.G12A	c.35G>C	0.82
p.G12D	c.35G>A	1.0
p.G12V	c.35G>T	1.5
p.G12C	c.34G>T	1.83

Amino Acid Change	Nucleotide Change	LoD (% Mutation)
p.G12R	c.34G>C	0.49
p.G12S	c.34G>A	0.73
p.G13A	c.38G>C	1.29
p.G13D	c.38G>A	1.14
p.G13V	c.38G>T	1.58
p.G13C	c.37G>T	0.92
p.G13R	c.37G>C	1.71
p.G13S	c.37G>A	1.0
p.A59G	c.176C>G	1.56
p.A59T	c.175G>A	1.63
p.A59E	c.176C>A	1.4
p.Q61H	c.183A>C	1.02
p.Q61H	c.183A>T	1.44
p.Q61K	c.181C>A	1.1
p.Q61P	c.182A>C	0.48
p.Q61E	c.181C>G	0.64
p.Q61R	c.182A>G (CAA>CGA)	3.07
p.Q61L	c.182A>T (CAA>CTA)	2.01
p.K117N	c.351A>T	0.61
p.K117N	c.351A>C	0.57
p.A146T	c.436G>A	1.5
p.A146P	c.436G>C	0.36
p.A146V	c.437C>T	1.0

16. 疑難排解










下述疑難排除表列出了檢測過程中可能出現的問題與解決方式：

狀況	可能原因	解決方式
無法辨識檢測項目 (No Valid Assay Assigned)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 未放置 96 孔盤 2. 96 孔盤放置方向錯誤 3. 未安裝 APP 應用程式 4. 未匯入 ENC 檔案 5. 混用不同批號試劑套組 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 確認放入 96 孔盤並重新讀取 2. 確認放入 96 孔盤方向正確並重新讀取 3. 確認正確安裝 APP 應用程式並重新讀取 4. 確認正確匯入 ENC 檔案並重新讀取 5. 多個樣品同次檢測請使用同批號試劑

狀況	可能原因	解決方式
陽性品管或陰性品管失敗 (Assay Control(s) Failed)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 未添加陽性/陰性品管或陽性/內部品管未正確回溶 2. DNase 汙染 3. 試驗失敗 4. 檢測出現交叉汙染 5. 陽性/陰性品管檢測孔設置錯誤 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 確認陽性品管正確回溶，並不重覆冷凍解凍使用。確認依步驟添加陽性/陰性品管。 2. 確保於不含 DNase 環境正確依循檢測操作流程。 3. 確保正確依循所有檢測操作流程。 4. 清潔所有儀器設備及空間，並區分為 PCR 擴增前與 PCR 擴增後專用，單向操作流程以避免汙染。 5. 正確選取陽性/陰性品管檢測孔並重新讀取。
晶元磁片數目失敗 (π Code MicroDiscs Count Fail)	DeXipher 軟體無法偵測足量晶元磁片進行分析	
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 微孔內晶元磁片未均勻散佈 2. 未添加足夠晶元磁片於微孔中 3. 緩衝液產生微生物汙染 4. 儀器設備異常 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 重新震散孔盤並重新讀取 2. 晶元磁片添加前，確保晶元磁片均勻震散並適量取出。 3. 雜交反應時請使用新鮮配製的清洗緩衝液及無核酸酶水以降低晶元磁片流失率。 4. 請通知博錄客服人員
SA-PE 監測品管失敗 (SA-PE Monitor Control Fail)	SA-PE 溶液效能以 SA-PE 監測品管進行評估	
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 未添加或未使用足量的 SA-PE 溶液 2. SA-PE 溶液失效 3. "博錄"微量盤清洗機反應排數設定錯誤 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 確保正確遵循所有檢測程序，計算足夠的 SA-PE 溶液體積於溶液槽內。 2. 確保 SA-PE 溶液正確避光儲存，請勿使用過期的 SA-PE 溶液。 3. 重新檢測並正確選取反應排數。
背景值品管失敗 (Blank Control Fail)	背景值品管是不應產生訊號的內部品管	
	<ol style="list-style-type: none"> 1. "博錄"微量盤清洗機反應程序設定錯誤 2. SA-PE 溶液殘留於微孔中 3. "博錄"螢光分析儀未定期校正 4. 孔盤底部標註記號 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 確認試劑反應程序設置正確 2. 請準備足量且新鮮配製的清洗液及無核酸酶水進行清洗反應程序 3. 每個月定期校正"博錄"螢光分析儀 4. 請勿在孔盤底部作任何標記
內部品管失敗 (Internal Control Fail)	內部品管用於監控所有操作流程，有效試驗必須通過內部品管檢測	
	<ol style="list-style-type: none"> 1. DNA 萃取失敗或 PCR 干擾物殘留導致 PCR 抑制反應 2. PCR 操作流程未正確執行 3. DNase 汙染 4. 雜交反應失敗 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 正確操作檢體萃取純化步驟，確保溫度與離心操作條件正確，並避免乙醇殘留。 2. 確保正確遵循 PCR 操作流程，並正確儲存試劑。請勿使用過期試劑或混用不同批號試劑。 3. 確保於不含 DNase 環境正確依循檢測操作流程。 4. 確保正確遵循所有檢測程序，且擴增後產物在變性後隨即操作下一步驟。

狀況	可能原因	解決方式
參考基因品管失敗 (Reference Gene Fail)	參考基因品管用於監控測試檢體之品質，有效試驗必須通過參考基因品管檢測	
	1. 未添加檢測樣品或未使用人類來源之 DNA 檢體 2. 檢體檢測總量不足或檢體品質不佳 3. DNA 萃取失敗或 PCR 干擾物殘留導致 PCR 抑制反應 4. PCR 操作流程未正確執行	1. 確認添加檢測樣品，並重新操作，若使用人工改造之 DNA 檢體將導致無效試驗結果。 2. 定量檢體濃度並確認檢體品質，重新測試後若仍為無效試驗，請確認檢體採集方式合乎標準。若必須請重新採集檢體再進行測試。 3. 正確操作檢體萃取純化步驟，確保溫度與離心操作條件正確，並避免乙醇殘留。 4. 確保正確遵循 PCR 操作流程，並正確儲存試劑。請勿使用過期試劑或混用不同批號試劑。

17. 符號

符號	定義	符號	定義
	僅科研使用		銷售料號
	批號		詳閱使用說明書
	製造廠		保存期限
	溫度限制		製造日期
	內含足夠 <n> 次反應試劑		

18. 參考文獻

- Class Labeling Changes to anti-EGFR monoclonal antibodies, cetuximab (Erbix) and panitumumab (Vectibix): KRAS Mutations.
(<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm172905.htm>)
- <http://www.uniprot.org/uniprot/P01116>
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. (2004) EGFR receptor gene mutations are common in lung cancerws from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. Proc Natl Acad Sci USA. 101(36):13306-11
- Lie`vre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Co`te JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuimab therapy in colorectal cancer. Cancer Res. 66(8):3992-5
- Baynes RD, Gansert J. (2009) KRAS mutational status as a predictor of epidermal growth factor receptor inhibitor efficacy in colorectal cancer. Am J Ther. 16(6):554-61
- Sakuma, M. (2000) PriProbit, ver. 1.63. Available from James E. Throne USDA-ARS GMPRC, Manhattan, KS (<http://bru.usgml.ksu.edu/throne/>)
- Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. (2009) Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. Pathol Res Pract. 2009; 205:858–862.

商標、版權和知識產權

本產品以及相關儀器所使用的技術，其相關知識產權為博錄生技股份有限公司所有，包括一個或多個美國專利：(US10302640B2, US10859910B2, EP3307867A1, US10894975B2, US10436778B2, US10436776B2, US9063044B2, US10019815B2)或者美國及其它國家/地區的一個或多個其它專利或待批專利申請。除了購買產品的特定使用權，博錄生技股份有限公司並未授予任何其他許可證或權利。有關產品的更多信息，請聯繫博錄生技股份有限公司。

 PlexBio™, IntelliPlex™, πCode™, πCode™, DeXipher™, DigiPlex™, 是博錄生技股份有限公司的商標或註冊商標。所有其他商標僅用於識別目的，並可能是其各自所有者的商標或註冊商標。

©2022 版權所有，博錄生技股份有限公司保留所有權利。

醫療器材商名稱：博錄生技股份有限公司

醫療器材商地址：臺北市內湖區陽光街 351 號 5 樓之 1、6 樓之 1、6 樓之 2、7 樓之 5

醫療器材製造廠名稱：博錄生技股份有限公司

醫療器材製造廠地址：臺北市內湖區陽光街 351 號 6 樓之 1、之 2

規格：82022-RT