راهنمای کیت

KRAS RQ

جهت بررسی جهش های KRAS
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene 6000/Q
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-33-301
ویرایش ۳/۱
بهار ۱۴۰۱

Novin Gene

فهرست مندرجات

۱. مقدمه ۲
۲. محتویات کیت ۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت ۴
٤. سایر موارد مورد نیاز ۴
٥. نکات قابل توجه ۴
٦. نمونه مناسب ۵
۷. استخراج DNA ۵
۸. روش کار: بررسی کیفیت DNA نمونه ۶
۹. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۷
۱۰. آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه ۸
۱۱. روش کار: بررسی جهش های KRAS ۱۰
۱۲. آنالیز نتایج برای جهش های KRAS ۱۲
۱۳. حساسیت ۲۱

ذکیت KRAS RQ جهت بررسی جهش در کدون های ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS در DNA انسانی با استفاده از دستگاه Rotor-Gene 6000/Q طراحی شده است. این کیت مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

سرطان روده بزرگ (Colorectal cancer) به واسطه شیوع و درصد بالای مرگ و میر آن، مشکلی جهانی در عرصه پزشکی و سلامت می‌باشد. این بیماری ارتباط نزدیکی با انکوژن های خانواده RAS دارد و در حدود نیمی از بیماران جهش هایی در این انکوژن ها مشاهده می شود. بخش بزرگی از این جهش ها نیز در یکی از زیر گروه های آن به نام Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) اتفاق می‌افتد. این ژن بر روی کروموزم 12 قرار دارد و جهش در کُدون های ۱۲ و ۱۳ آن باعث تغییراتی در فعالیت های اصلی سلولی از جمله رشد و تقسیم سلولی و آپوپتوز می‌گردد.

در برخی روش های درمانی سرطان روده و سرطان ریه از نوع non small cell lung cancer (NSCLC) از آنتی بادی ها علیه گیرنده هورمون رشد سلولی یعنی epidermal growth factor receptor (EGFR) استفاده می شود. جالب توجه است که برخی جهش های KRAS باعث ایجاد مقاومت داروئی در برابر داروهای فوق نیز می‌شود. به همین دلیل پیش از آغاز درمان این بیماران، بایستی جهش های KRAS مورد بررسی گرفته و بر اساس نتایج حاصله، روش درمانی مناسبی انتخاب گردد.

بر اساس گزارشات بیش از ۹۵٪ جهش های KRAS در سرطان های روده بزرگ و بیش از ۸۸٪ این جهش ها در بیماران NSCLC، شامل هفت جهش در کدون های ۱۲ و ۱۳ این ژن بوده و شامل G12A, G12C, G12D, G12R, G12S G12V, G13D می‌باشد. کیت حاضر مواد لازم را برای تشخیص این هفت جهش به روش

Real-Time PCR فراهم می‌کند. در این روش با استفاده از پروب های نشان دار شده به رنگ های فلورسنت می‌توان محصول PCR را بررسی نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. بنابراین امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده است.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل دفترچه راهنما، لوح فشرده و موارد زیر برای انجام بیست و چهار واکنش PCR می باشد:

برچسب	محتوا	تعداد	حجم
Ctrl Mix	میکس PCR برای کنترل کیفی تست	۲	۴۸۰ میکرولیتر
G12A Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12A	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G12C Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12C	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G12D Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12D	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G12R Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12R	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G12S Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12S	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G12V Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12V	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G13D Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G13D	۱	۴۸۰ میکرولیتر
KRAS Pos	شاهد مثبت	۱	۲۵۰ میکرولیتر
KRAS Neg	شاهد منفی	۱	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۱	۲۰۰ میکرولیتر

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

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

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

٤. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

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

٥. نکات قابل توجه

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

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به میکروتیوب های PCR) و فضای

آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به میکروتیوب PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آن ها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب

برای بیماران سرطان روده بزرگ، نمونه مناسب بلوک پارافینی (بافت فیکس شده در فرمالین) و برای بیماران NSCLC، بافت بیوپسی سوزنی (core needle biopsy) یا آسپیراسیون سوزنی (aspiration fine needle) می‌باشد.

۷. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه بافتی از روش ها و کیت های 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 میزان 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.

۸. روش کار: بررسی کیفیت DNA نمونه

پیش از بررسی نمونه برای وجود جهش های KRAS ، 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 KRAS 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 برروی بلوک سرد بگذارید. در این سری، علاوه بر یک میکروتیوب برای نمونه هر بیمار، دو میکروتیوب دیگر برای شاهد مثبت و نمونه آب در نظر بگیرید.

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

۹. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن با کامپیوتر متصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت، روی فایل "KRAS 0.2" و یا "KRAS 0.1" (با توجه به نوع میکروتیوب استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.

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 برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 10 min**	1
2	**95°C x 20 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و در کانال های سبز (Green) و زرد (Yellow) 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.

۱۰. 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 شاهد های مثبت و منفی مورد بررسی قرار می گیرند.

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** می باشد.

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 ۲۶ تا ۲۹ 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 یک آمده است.

نمونه	کانال سبز	کانال زرد
نمونه فاقد DNA (آب)	Neg	Pos (CT 28-31)
شاهد مثبت/منفی	Pos (CT 26-29)	Pos (CT 28-31)

جدول۱. 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 ۳۰ و در کانال زرد دارای CT بین ۲۸ تا ۳۱ باشد، نتیجه قابل قبول است. حال می‌توانید آزمایش بررسی KRAS را شروع نمائید. برای افزایش حساسیت تست، مطلوب آن است که نمونه بیمار در کانال سبز دارای CT بین ۲۲ تا ۲۷ 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 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 KRAS را شروع نمایید.

- در صورتی که نمونه بیمار در کانال سبز دارای CT بالاتر از ۳۰ باشد، نتیجه قابل قبول نیست. در این حالت استخراج دوباره نمونه توصیه می‌شود.

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

Green	Yellow	Result
+ CT: 22-30	+ CT: 28-31	Valid
+ CT<22	+ CT: 28-31	Sample dilution
- CT>30	CT<28 CT>31	Invalid

جدول۲. 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 KRAS انجام می‌شود.

۱۱. کار: بررسی جهش های KRAS

برای بررسی جهش های KRAS، هر نمونه باید با هشت میکس آزمایش شود.
در این آزمایش هفت جهش ژن KRAS هر کدام در یک میکروتیوب جداگانه با یکی از میکس های KRAS بررسی می شوند. علاوه بر هفت میکروتیوب مذکور، یک میکروتیوب نیز به بررسی نمونه با میکس کنترل اختصاص می یابد. بنابراین برای بررسی یک نمونه بیمار، ۸ میکروتیوب برای آزمایش نمونه، ۸ میکروتیوب برای ازمایش 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 می باشد.
به عنوان مثال برای بررسی سه نمونه بیمار، مطابق تصویر یک، شش سری هشت تائی میکروتیوب، هر سری برای یکی از شاهدهای مثبت، منفی و نمونه بیمار استفاده می‌شود و در مجموع برای آزمایش سه نمونه، به ۲۴ میکروتیوب برای نمونه ها و ۲۴

میکروتیوب برای شاهدها نیاز داریم 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 G12A Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف سوم ۲۰ میکرولیتر از G12C Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف چهارم ۲۰ میکرولیتر از G12D Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف پنجم ۲۰ میکرولیتر از G12R Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف ششم ۲۰ میکرولیتر از G12S Mix اضافه کنید.

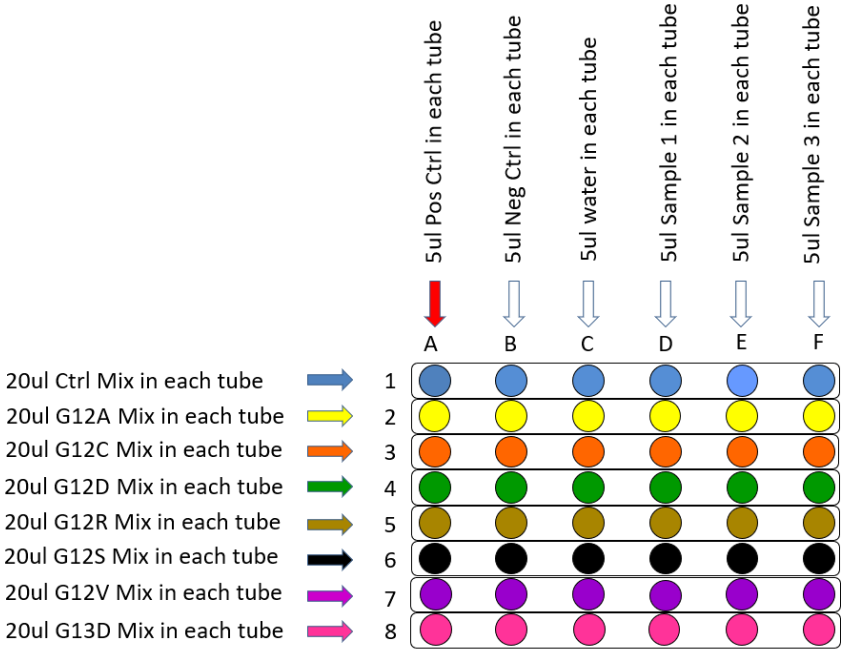
به هر یک از میکروتیوب های ردیف هفتم ۲۰ میکرولیتر از G12V Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب های ردیف هشتم ۲۰ میکرولیتر از G13D Mix اضافه کنید.

سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، شاهد مثبت و منفی 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.

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



تصویر۱. 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 ۹ دفترچه تنظیم نمائید.

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

۱۲. آنالیز نتایج برای جهش های KRAS

تحلیل نتایج آزمایش جهش های KRAS در دو مرحله انجام می شود. در مرحله نخست باید اطمینان یافت که آزمایش از نظر کیفی به نحو مطلوب انجام شده است،

سپس می توان نتایج نمونه بیمار را آنالیز نمود. در بخش نخست نتایج شاهد های 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 می شود.

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.

در نظر داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **جهش های KRAS** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** 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:

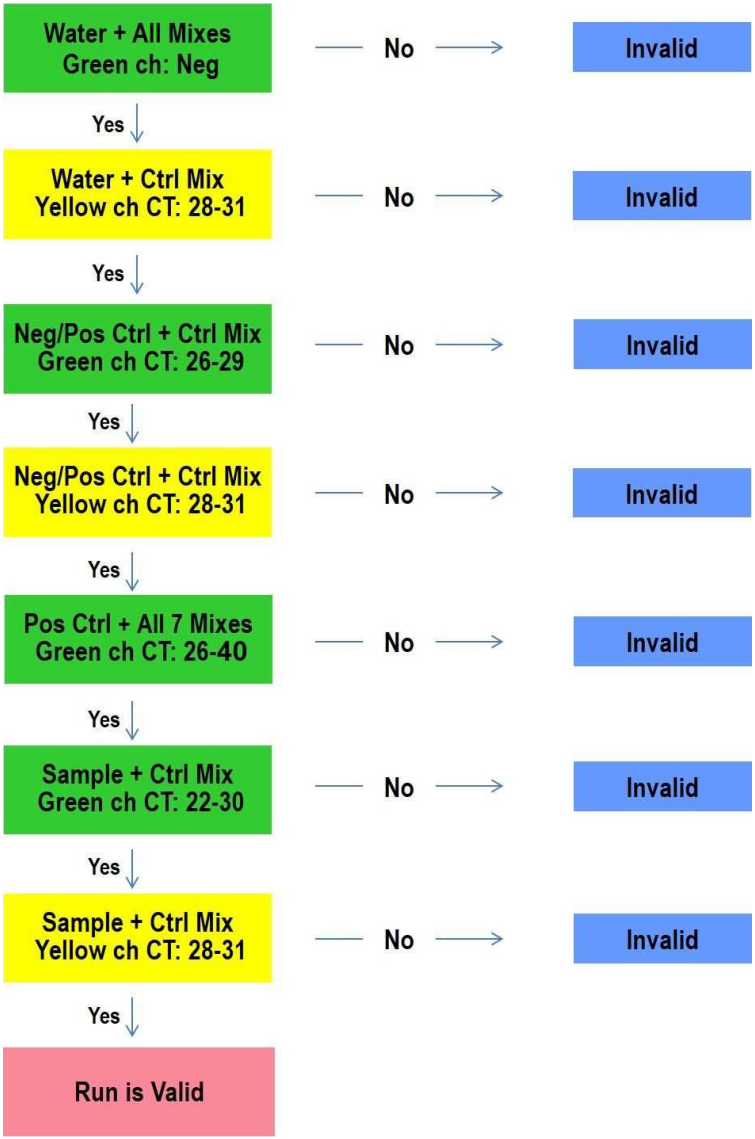
۱) نمونه آب در کانال سبز با کلیه میکس ها منفی باشد، و
۲) نمونه آب در کانال زرد با میکس کنترل، دارای CT بین ۲۸ تا ۳۱ باشد، و
۳) شاهد مثبت با میکس کنترل در کانال سبز دارای CT بین ۲۶ تا ۲۹ باشد و
۴) شاهد مثبت با میکس کنترل در کانال زرد دارای CT بین ۲۸ تا ۳۱ باشد، و

۵) شاهد مثبت در کانال سبز با میکس های اختصاصی دارای CT بین ۲۶ تا ۴۰ باشد، و
۶) نمونه بیمار در کانال سبز با میکس کنترل دارای CT بین ۲۲ تا ۳۰ 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 KRAS بررسی نمائید.

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

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



نمودار۱. بررسی کنترل کیفی آزمایش جهش های KRAS

ب- تحلیل نتایج بررسی جهش های KRAS

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 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 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 سه 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 KRAS 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 KRAS مورد بررسی	CT قابل قبول	CT نمونه	ΔCT قابل قبول	ΔCT نمونه	نتیجه
Ctrl Mix	۳۰-۲۲		-		
G12A Mix	۴۰-۲۰		≤۱۲		
G12C Mix	۴۰-۲۰		≤۱۳		
G12D Mix	۴۰-۲۰		≤۸		
G12R Mix	۴۰-۲۰		≤۷		
G12S Mix	۴۰-۲۰		≤۸		
G12V Mix	۴۰-۲۰		≤۳		
G13D Mix	۴۰-۲۰		≤۶		

جدول۳. مقادیر قابل قبول CT وΔCT در بررسی نمونه های بیماران

به عنوان مثال، در صورتی که CT نمونه بیمار در میکس کنترل ۲۶/۷، در میکس

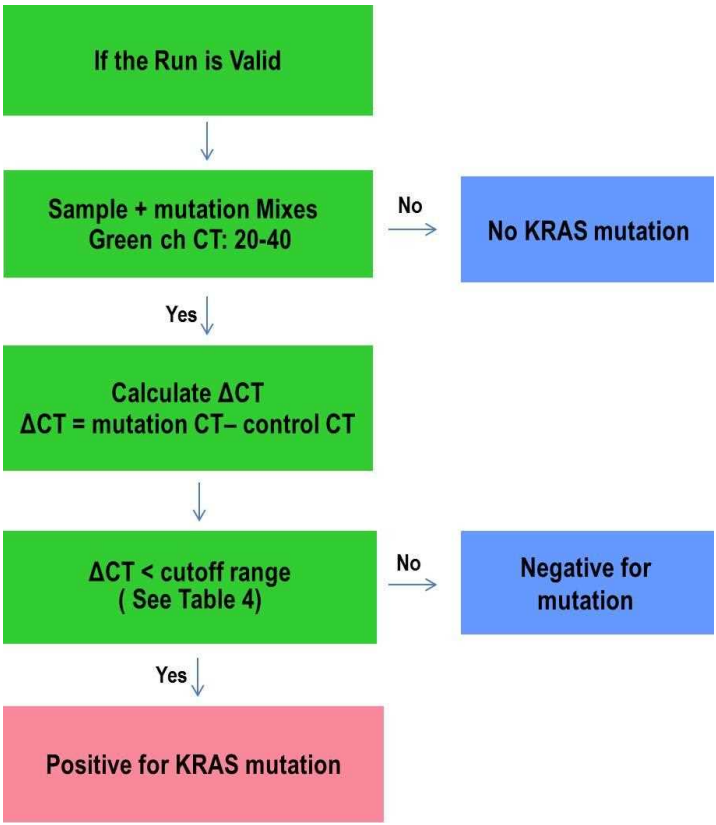
G21C معادل ۳۲/۴ ، در میکس G12R برابر ۳۰/۲، در میکس G12V برابر ۳۴/۷، در میکس G13D برابر ۴۰ و نهایتا با بقیه میکس ها منفی باشد، اختلاف CT ها برای میکس G12C، ۵/۷ (۲۶/۷ – ۳۲/۴) و برای میکس G12R، ۳/۵ (۲۶/۷ – ۳۰/۲) ، برای میکس G12V، ۸ و برای میکس G13D برابر ۱۳/۳ خواهد بود (جدول چهار). اکنون نتایج برای برای هر دو میکس G12C و G12R در محدوده قابل قبول می‌باشد. در این حالت بیمار برای جهش G12R که اختلاف CT آن عدد کوچکتری می‌باشد مثبت است.

میکس KRAS مورد بررسی	CT قابل قبول	CT نمونه	ΔCT قابل قبول	ΔCT نمونه	نتیجه
Ctrl Mix	۳۰-۲۲	۲۶/۷	-	-	منفی
G12A Mix	۴۰-۲۰	منفی	≤۱۲	-	منفی
G12C Mix	۴۰-۲۰	۳۲/۴	≤۱۳	۵/۷	مثبت
G12D Mix	۴۰-۲۰	منفی	≤۸	-	منفی
G12R Mix	۴۰-۲۰	۳۰/۲	≤۷	**۳/۵**	**مثبت**
G12S Mix	۴۰-۲۰	منفی	≤۸	-	منفی
G12V Mix	۴۰-۲۰	۳۴/۷	≤۳	۸	منفی
G13D Mix	۴۰-۲۰	۴۰	≤۶	۱۳/۳	منفی

جدول ۴. 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 دو، مراحل بررسی نمونه بیمار را برای شناسائی جهش های KRAS نشان می دهد.



نمودار۲. مراحل بررسی نتایج نمونه بیمار برای شناسائی جهش های ژن KRAS در کانال سبز

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

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

- در صورتی که نمونه در یک یا چند میکس KRAS در کانال سبز دارای CT بین ۲۰ تا ۴۰ و ΔCT بیشتر از مقدار قابل قبول (مقادیر جدول چهار) باشد، نمونه از نظر جهش KRAS **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در کانال سبز در یکی از میکس های هفت گانه KRAS دارای CT و ΔCT قابل قبول (مقادیر جدول چهار) باشد، از نظر جهش مورد نظر ژن KRAS **مثبت** است. به طور خلاصه، اگر نمونه:
  - در میکس G12A دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۱۲ باشد، دارای جهش G12A است.
  - در میکس G12C دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۱۳ باشد، دارای جهش G12C است.
  - در میکس G12D دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۸ باشد، دارای جهش G12D است.
  - در میکس G12R دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۷ باشد، دارای جهش G12R است.
  - در میکس G12S دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۸ باشد، دارای جهش G12S است.
  - در میکس G12V دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۳ باشد، دارای جهش G12V است.
  - در میکس G13D دارای CT≤۴۰ و ΔCT≤۶ باشد، دارای جهش G13D است.

- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز برای بیش از یک میکس KRAS دارای CT و ΔCT قابل قبول (مقادیر جدول چهار) باشد، نمونه در واکنشی که کوچک ترین ΔCT را دارد از نظر جهش KRAS مثبت است.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش KRAS در جدول پنج آمده است.

میکس KRAS	CT نمونه	ΔCT نمونه	نتیجه گیری
G12A Mix	>۴۰	-	برای جهش G12A منفی
	۴۰-۲۰	>۱۲	برای جهش G12A منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۲	برای جهش G12A مثبت
G12C Mix	>۴۰	-	برای جهش G12C منفی
	۴۰-۲۰	>۱۳	برای جهش G12C منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۳	برای جهش G12C مثبت
G12D Mix	>۴۰	-	برای جهش G12D منفی
	۴۰-۲۰	>۸	برای جهش G12D منفی
	۴۰-۲۰	≤۸	برای جهش G12D مثبت
G12R Mix	>۴۰	-	برای جهش G12R منفی
	۴۰-۲۰	>۷	برای جهش G12R منفی
	۴۰-۲۰	≤۷	برای جهش G12R مثبت
G12S Mix	>۴۰	-	برای جهش G12S منفی
	۴۰-۲۰	>۸	برای جهش G12S منفی
	۴۰-۲۰	≤۸	برای جهش G12S مثبت
G12V Mix	>۴۰	-	برای جهش G12V منفی
	۴۰-۲۰	>۳	برای جهش G12V منفی
	۴۰-۲۰	≤۳	برای جهش G12V مثبت
G13D Mix	>۴۰	-	برای جهش G13D منفی
	۴۰-۲۰	>۶	برای جهش G13D منفی
	۴۰-۲۰	≤۶	برای جهش G13D مثبت

جدول ۵. تفسیر نتایج آزمایش KRAS

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

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

۱۳. حساسیت

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

واکنش مورد بررسی	CT در میکس کنترل: ۲۲ تا ۲۷
G12A	٪۱
G12C	٪۴
G12D	٪۱
G12R	٪۲
G12S	٪۱
G12V	٪۴
G13D	٪۴

جدول۶. میزان حساسیت بر حسب درصد DNA جهش یافته

KRAS RQ
Kit Manual

For Real-Time PCR Detection of KRAS Mutations

For use with Rotor-Gene
Research use only

NG-WI-ASL-33-301
Version 3.1
Spring 2022

Novin Gene

Table of Contents:

1. Introduction.....2
2. Kit Contents.....3
3. Storage and Stability 3
4. General Precautions.....3
5. Additionally Required Items.....4
6. Specimen 4
7. DNA Extraction 4
8. Protocol: DNA Sample Assessment.....5
9. Programming of Rotor-Gene 6
10. Analysis: Sample Assessment.....6
11. Protocol: Detection of KRAS mutation.....8
12. KRAS Mutation Detection Analysis 10
13. Analytical Sensitivity ……...…..……...17

KRAS RQ kit is intended for the detection of mutation in codons 12 and 13 of KRAS in human genomic DNA. This kit is designed for use with Rotor-Gene. This kit is for research use only!

1- Introduction

Colorectal cancer (CRC) is among the most prevalent cancers worldwide. Treatment with monoclonal antibodies against Epidermal Growth Factor Receptor (Anti-EGFR) has shown to be effective for CRC patients. However, Anti-EGFR would be in-effective in presence of some KRAS mutations including mutations in codons 12 and 13. This is the same for treating non small cell lung cancer (NSCLC) with Anti-EGFR. Therefore, determining the KRAS mutation status is essential for these patients. It should be noted that, 95% and 88% of KRAS mutations in CRC and NSCLC patients respectively are reported in codons 12 and 13 including G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V and G13D.

KRAS RQ Kit provides ready to use mixes for detection of these 7 mutations based on Real-Time PCR technology. In this method application of fluorescent probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to detection of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product. This kit also takes advantage of Internal control for preventing false negative results due to failure in DNA extraction or PCR reaction. This kit is designed to be used with Rotor-Gene.

2- Kit Contents

The kit contains a manual or a quick guide and following reagents:

Label	Content	Quantity	Volume
Ctrl Mix	PCR Mix for quality control	2	480 µl
G12A Mix	PCR Mix to check G12A mutation	1	480 µl
G12C Mix	PCR Mix to check G12C mutation	1	480 µl
G12D Mix	PCR Mix to check G12D mutation	1	480 µl
G12R Mix	PCR Mix to check G12R mutation	1	480 µl
G12S Mix	PCR Mix to check G12S mutation	1	480 µl
G12V Mix	PCR Mix to check G12V mutation	1	480 µl
G13D Mix	PCR Mix to check G13D mutation	1	480 µl
KRAS Pos	Positive control	1	250 µl
KRAS Neg	Negative control	1	250 µl
Water	PCR Grade Water	1	200 µl

3- Storage and Stability

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

4- General Precaution

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

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction; b) Reagent preparation

where the Master Mix is aliquoted into tubes; and c) Reaction preparation area for addition of templates to the tubes.

- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

5- Additionally Required Items

To use this kit, you need the following items:

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

6- Specimen

Sections of paraffin block are the proper sample for patients with colorectal cancer and for NSCLC patients, core needle biopsy or aspiration fine needle sample may be used.

7- DNA Extraction

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

- QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Cat. no. 51404, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- Roche; High Pure 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.

8- Protocol: DNA Sample Assessment

Before examining a sample for KRAS mutations, quality of DNA should be assessed. If the results are within the desired range, then the second test for detecting KRAS 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 positive and negative controls.

Pipette 20µl of Ctrl Mix to each microtube. Continue by adding 5µl of DNA sample, Positive control or 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.

9- Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure the locking ring is attached to the rotor!

Open the CD provided in the kit and double click on “KRAS 0.2” or on “KRAS 0.1” depending to tubes used. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save the run file.

You can also use the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 10 min**	1
2	**95°C x 20 sec**	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. Mix contain ROX with final concentration of 300nM in reaction.

10- 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 (Green channel)** and **Internal control (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 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 sigmoid graph and log phase, sample can not be considered as positive (even CT present) result is not reliable.

A) Test is valid only if:

1) Water sample is **Negative** in Green channel and it is **Positive** in Yellow channel with CT of 28-31.
2) Positive control/Negative control is **Positive** in Green channel with CT of 26-29. And it is **Positive** in the Yellow channel with CT of 28-31.

Expected results for a valid test are summarized in Table1.

Sample	Yellow	Green
NTC	Pos CT: 28-31	Neg
Pos/Neg Ctrl	Pos CT: 28-31	Pos CT: 26-29

Table1. 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 Green channel with CT of 22-30 and also positive in Yellow channel with CT of 28-31. This sample can be further examined for KRAS mutations.

Sample should be diluted with water, if a sample in is positive in Green channel with CT of less than 22 and also positive in Yellow channel with CT of 28-31. 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 KRAS mutation test.

Result is invalid, if a sample in Green channel has CT above 30. In this case, repeating DNA extraction is recommended.

DNA sample Quality Analysis is summarized in Table 2.

Green	Yellow	Result
+ CT: 22-30	+ CT: 28-31	Valid
+ CT<22	+ CT: 28-31	Sample dilution
- CT>30	CT<28 CT>31	Invalid

Table2. DNA Quality Analysis

11- Protocol: Detection of KRAS mutations

To detect KRAS mutations, each sample should be examined with eight mixes, one for DNA quantitation and one for each of seven 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 8 each.

Pipette 20µl of Ctrl Mix to each tube in the first series.
Pipette 20µl of G12A Mix to each tube in the 2nd series.
Pipette 20µl of G12C Mix to each tube in the 3rd series.
Pipette 20µl of G12D Mix to each tube in the 4th series.
Pipette 20µl of G12R Mix to each tube in the 5th series.
Pipette 20µl of G12S Mix to each tube in the 6th series.
Pipette 20µl of G12V Mix to each tube in the 7th series.
Pipette 20µl of G13D 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.
See Fig 1 for details.
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 9.
Note: if using Rotor-Gene attach the locking ring too.

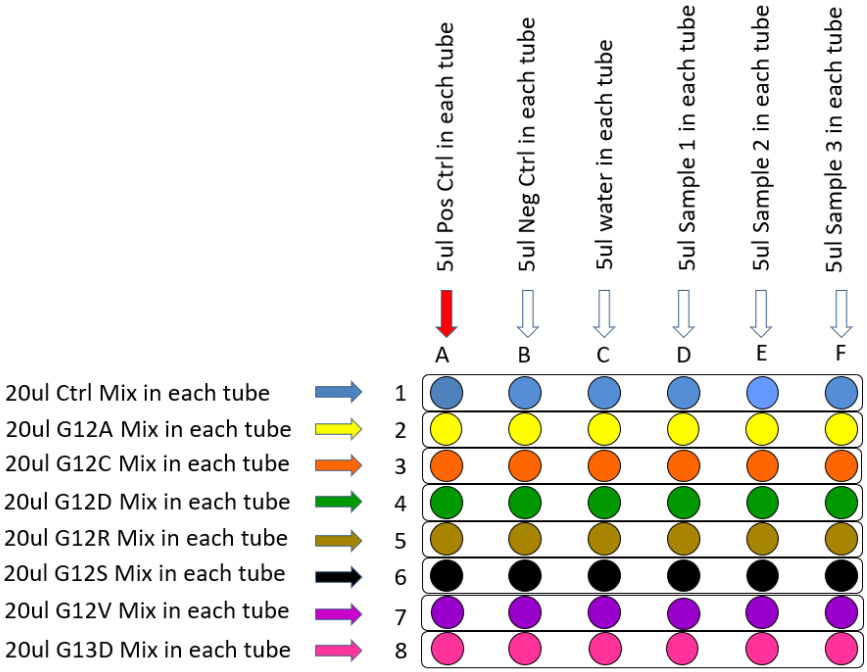


Fig1. Tubes setup for Mixes and samples.

12- KRAS Mutation Detection Analysis

Before analyzing results of KRAS 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 KRAS 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 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 sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

A) Test is valid only if:

1) Water sample is Negative in Green channel with all Mixes, and
2) Water sample is Positive in Yellow channel with Control Mix with a CT of 28-31, and
3) Positive control is Positive in Green channel with Control Mix with a CT of 26-29, and
4) Pos control is Positive in Yellow channel with Control Mix and CT of 28-31, and
5) Positive control is Positive in Green channel **with all 7 KRAS mutation Mixes** with a CT of 26-40, and
6) Sample is Positive in Green channel with Control Mix with a CT of 22-30 and also Positive in Yellow channel with CT of 28-31.

Above steps for Test validation are summarized in Figure 1.

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

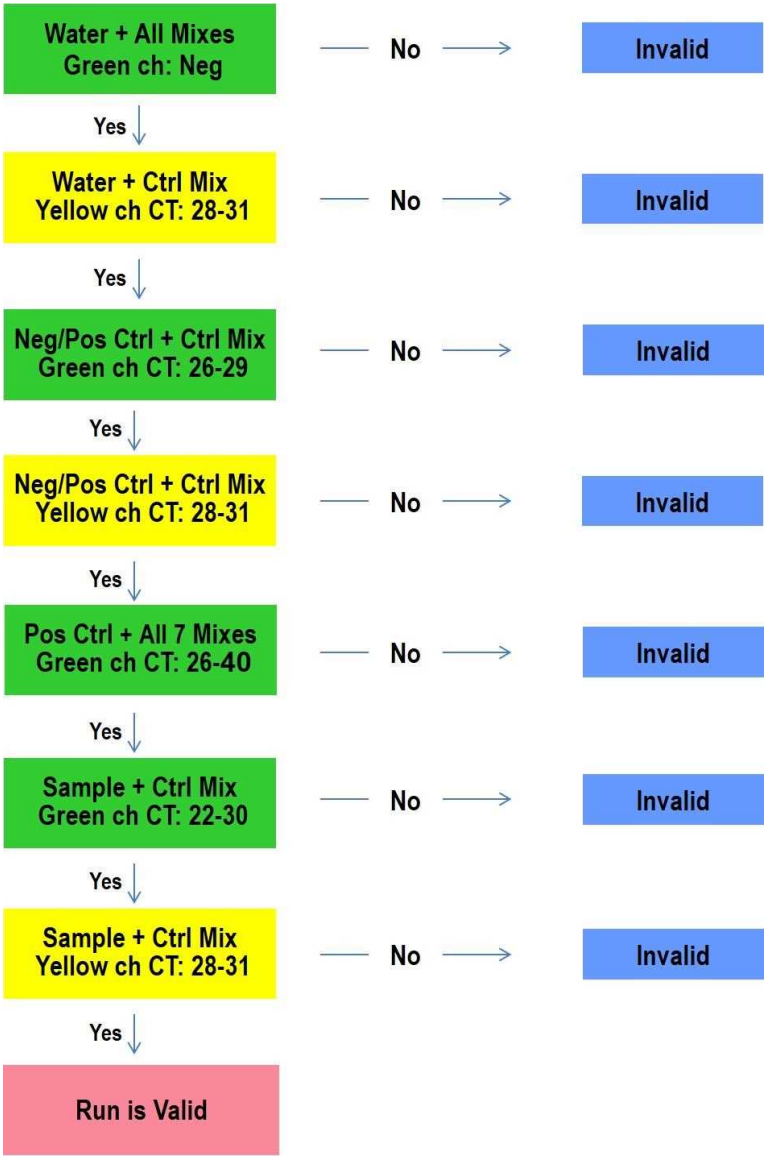


Fig 1. Test validation flowchart

B) Data analysis for KRAS mutations

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

   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 KRAS mutation.
5) If a sample is positive for two or more KRAS mutations, it is considered positive for the mutation with the lowest ΔCT and negative for the other mutations.

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

KRAS Mix	Valid CT	Sample CT	Valid ΔCT	Sample ΔCT	Result
Ctrl Mix	22-30		NA		
G12A Mix	20-40		≤12		
G12C Mix	20-40		≤13		
G12D Mix	20-40		≤8		
G12R Mix	20-40		≤7		
G12S Mix	20-40		≤8		
G12V Mix	20-40		≤3		
G13D Mix	20-40		≤6		

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

As an example, If CT of a sample is 26.7 with Control Mix, and 32.4 with G12C Mix, 30.2 with G12R Mix, 34.7 with G12V Mix, 40 with G13D Mix and negative for other mixes, then ΔCT is 5.7 for G12C (32.4 - 26.7), 3.5 for G12R (30.2-26.7), 8 for G12V and 13.3 for G13D (Table. 4). So, results of G12C and G12R are in valid range. In this case, patient is Positive for G12R since ΔCT is lower for this mutation.

KRAS Mix	Valid CT	Sample CT	Valid ΔCT	Sample ΔCT	Result
Ctrl Mix	22-30	26.7	-	-	Neg
G12A Mix	20-40	Neg	≤12	-	Neg
G12C Mix	20-40	32.4	≤13	**5.7**	**Positive**
G12D Mix	20-40	Neg	≤8	-	Neg
G12R Mix	20-40	30.2	≤7	**3.5**	**Positive**
G12S Mix	20-40	Neg	≤8	-	Neg
G12V Mix	20-40	34.7	≤3	8	Neg
G13D Mix	20-40	40	≤6	13.3	Neg

Table 4. KRAS 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 KRAS mutation mixes, will only considered positive only if ΔCT is within the valid range.

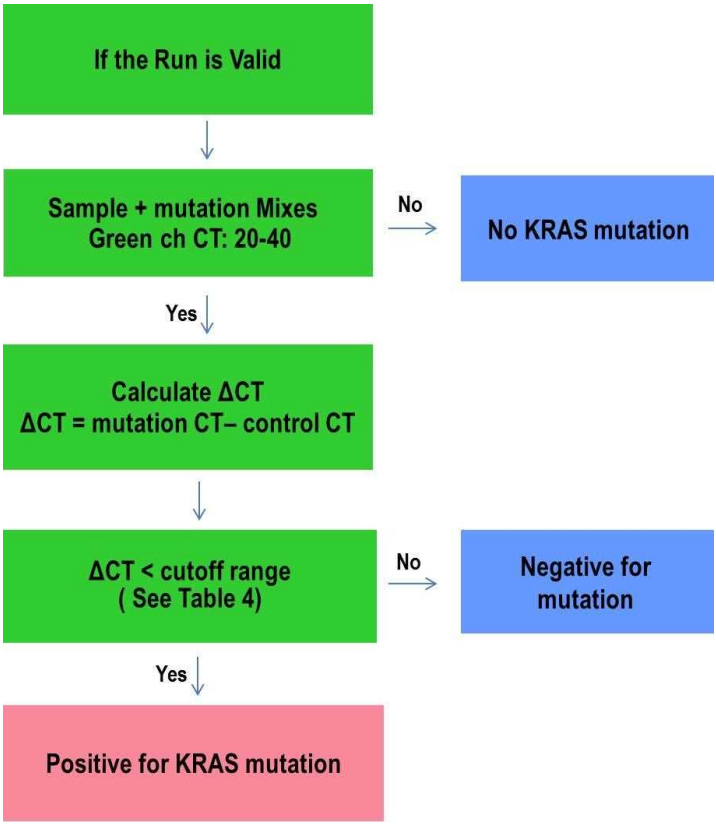


Fig 2. Sample analysis flowchart for KRAS mutation detection

Results can also be interpreted as below;

- Sample is **Negative** for KRAS mutations, if it is negative in Green channel with all mixes or has CT above 40.
- Sample is **Negative** for KRAS mutations if it is positive in Green channel with CT of 20-40 for one or more KRAS mixes, and a ΔCT above valid range (which mentioned in Table 3).

- Sample is **Positive** for KRAS mutations, if sample has a valid CT and ΔCT (Table 3) in Green channel for one of the seven KRAS mixes. Briefly,
  - It is Positive for G12A if G12A Mix CT≤40 and ΔCT≤12.
  - It is Positive for G12C if G12C Mix CT≤40 and ΔCT≤13.
  - It is Positive for G12D if G12D Mix CT≤40 and ΔCT≤8.
  - It is Positive for G12R if G12R Mix CT≤40 and ΔCT≤7.
  - It is Positive for G12S if G12S Mix CT≤40 and ΔCT≤8.
  - It is Positive for G12V if G12V Mix CT≤40 and ΔCT≤3.
  - It is Positive for G13D if G13D Mix CT≤40 and ΔCT≤6.
- If a sample has a valid CT and ΔCT (Table 3) for more than one of the KRAS Mix, sample is Positive for a KRAS mutation which has a lowest ΔCT.

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

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

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

KRAS Mix	Sample CT	Sample ΔCT	Conclusion
G12A Mix	>40	-	Neg for G12A mutation
	20-40	>12	Neg for G12A mutation
	20-40	≤12	Pos for G12A mutation
G12C Mix	>40	-	Neg for G12C mutation
	20-40	>13	Neg for G12C mutation
	20-40	≤13	Pos for G12C mutation
G12D Mix	>40	-	Neg for G12D mutation
	20-40	>8	Neg for G12D mutation
	20-40	≤8	Pos for G12D mutation
G12R Mix	>40	-	Neg for G12R mutation
	20-40	>7	Neg for G12R mutation
	20-40	≤7	Pos for G12R mutation
G12S Mix	>40	-	Neg for G12S mutation
	20-40	>8	Neg for G12S mutation
	20-40	≤8	Pos for G12S mutation
G12V Mix	>40	-	Neg for G12V mutation
	20-40	>3	Neg for G12V mutation
	20-40	≤3	Pos for G12V mutation
G13D Mix	>40	-	Neg for G13D mutation
	20-40	>6	Neg for G13D mutation
	20-40	≤6	Pos for G13D mutation

Table 5. Interpretation of results for KRAS mutation.

13- Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of this assay is equivalent to the percentage of mutated KRAS DNA that can be identified in the background of wild-type DNA and is mentioned in Table 6. The sensitivity depends on the DNA quantity in a sample. Maximum sensitivity of is obtained when a sample with Control Mix has a CT of 22-27 in

Green channel. If CT range is 28-30, the sensitivity will decrease for some mutations.

Reaction	Ctrl Mix CT: 22-27
G12A	1%
G12C	4%
G12D	1%
G12R	2%
G12S	1%
G12V	4%
G13D	4%

Table 6. Sensitivity of the KRAS mutation detection assay.