

2023 年 8 月

# “凱杰” 人類 KRAS 基因突變檢驗試劑組

## “QIAGEN” theascreen KRAS RGQ PCR Kit

*theascreen* KRAS RGQ PCR Kit 使用說明



版本 1



供體外診斷使用

可供與 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器搭配使用

衛部醫器輸字第 036224 號

使用前請務必詳閱原廠之使用說明書並遵照指示使用

搭配 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 使用

醫療器材商名稱：凱杰生物科技有限公司

醫療器材商地址：臺北市中正區羅斯福路2段100號5樓



870081



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden 德國



1124344TW

# 目錄

效能 .....	5
預期使用者 .....	6
說明及原理 .....	7
摘要及說明 .....	7
程序原理 .....	8
提供的材料 .....	11
試劑組內容物 .....	11
平台和軟體 .....	12
需要但並未提供的材料 .....	13
其他試劑 .....	13
耗材 .....	13
設備 .....	13
警告和注意事項 .....	15
<b>安全資訊</b> .....	15
<b>一般注意事項</b> .....	15
試劑儲存與處理 .....	17
檢體儲存與處理 .....	18
程序 .....	20
操作程序：DNA 萃取 .....	20
操作程序：DNA 樣本評估 .....	22
操作程序：KRAS 突變檢測 .....	35
結果判讀 .....	47

限制 .....	49
性能特性 .....	50
分析性能 .....	50
閾值 .....	50
空白極限 .....	51
與參考分析方法進行比較：CRC .....	51
與參考分析方法進行比較：NSCLC .....	54
檢測極限 (Limit of detection, LOD) .....	56
DNA 輸入和線性 .....	57
干擾物質 .....	61
交叉污染 .....	62
排他性/交叉反應性 .....	63
重複性和再現性 .....	65
樣本處理差異性 .....	77
樣本採集方法的等效性（僅 NSCLC） .....	78
臨床性能 .....	82
參考資料 .....	83
疑難排解指南 .....	87
由 <i>therascreen</i> KRAS Assay Package 軟體生成的標幟 .....	88
符號 .....	91
聯絡資訊 .....	92
附錄 A： <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit 手動操作程序 .....	93
結果判讀（手動） .....	109
軟體分析設定 .....	109

---

樣本評估資料分析 .....	110
樣本分析.....	113
附錄 B：安裝 therascreen KRAS Assay Package 軟體 .....	119
訂購資訊.....	123
文件修訂歷程記錄.....	125

# 效能

本產品是一款即時定性 PCR 檢測套組，本產品搭配 Rotor-Gene Q MDx 儀器用於檢測 KRAS 致癌基因第 12 和 13 號密碼子中的 7 種體細胞突變。

本試劑組適合檢測從結腸直腸癌 (Colorectal Cancer, CRC) 或非小細胞肺癌 (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) 樣本的福馬林固定石蠟包埋 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) 組織中萃取的 DNA，這些樣本可透過切除術、粗針組織切片 (Core Needle Biopsy, CNB) 或細針抽吸 (Fine Needle Aspiration, FNA) 採集。

KRAS 基因中的體細胞突變是 CRC 人類表皮生長因子 (Epidermal Growth Factor, EGFR) 靶向治療 (例如 panitumumab 和 cetuximab) 耐藥性的潛在預測性生物標記。

依據 KRAS G12C 突變偵測結果，本產品也可用於輔助識別適合接受 sotorasib 治療的 NSCLC 患者。KRAS 基因中的體細胞突變還可作為其他 NSCLC 治療的潛在預測性生物標記，幫助作出治療決定。

醫生在作出治療決定前，除了患者的突變狀態外，還會考慮其他疾病因素。不得僅僅根據 KRAS 突變狀態來為癌症患者作出治療決定。

本產品並非用於診斷 CRC、NSCLC 或任何其他疾病。

本產品屬於體外診斷醫療器材。

---

## 預期使用者

本試劑組專用於專業用途。

產品只能由接受過特定指導和分子生物學技術訓練並熟悉這項技術的專業人員使用。

# 說明及原理

## 摘要及說明

人類癌症常常伴隨 KRAS 致癌基因突變 (1 – 4)。本產品採用 Scorpions 和 ARMS (等位基因受阻突變體系) 技術 (5, 6), 能夠在野生型基因體 DNA 背景下檢測 KRAS 致癌基因第 12 和 13 號密碼子的 7 種突變 (表 1)。根據 COSMIC 資料庫中的資料 (2015 v72), 本產品檢測的 7 種突變佔 CRC 患者中報告的所有 KRAS 突變的 >95%, 以及佔 NSCLC 患者中報告的所有突變的 >88% (7)。

**表 1：突變和 COSMIC 識別編號清單**

突變	鹼基改變	COSMIC ID*
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC	532

\* COSMIC ID 摘自癌症體細胞突變目錄：(7) ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic))。

本檢測具有高專一性和靈敏度，能夠在野生型 DNA 背景下檢測低比例的突變型 DNA。如果有足夠的 DNA 拷貝數，則可以檢測野生型基因體 DNA 背景下 0.8% 的突變 (請參閱第 50 頁「性能特性」以瞭解每種突變的檢測極限資訊)。

本產品要在聚合酶鏈式反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 程序中使用。本試劑組的優勢是對靶標有高專一性，快速高效，且結果無主觀性。

## 程序原理

本產品採用 2 種技術 — ARMS 和 Scorpions — 用於在 real-time PCR 中檢測突變。

### 突變反應混合液

每份反應混合液採用突變專一性 ARMS 引子選擇性地擴增突變 DNA，然後採用 Scorpions 引子檢測擴增產物。

### ARMS

ARMS 利用 Taq DNA 聚合酶可以區分 PCR 引子 3' 端的配對和錯配鹼基的這一能力，實現等位基因專一性擴增。當引子完全匹配時，擴增將以全效率向前推進。若 3' 鹼基錯配，則僅可能發生低水平的背景擴增。因此，即使在大多數 DNA 未攜帶突變的樣本中，也可選擇性地對特定突變序列進行擴增。

### Scorpions

擴增檢測使用 Scorpions 執行。Scorpions 是雙官能分子，含有與探針共價結合的 PCR 引子。探針包含螢光團羧基螢光素 (FAM) 和猝滅基團。後者使螢光團的螢光猝滅。在 PCR 過程中，當探針與 ARMS 擴增子相結合時，螢光團便會與猝滅基團分離，促致螢光增強到可檢出水平。



## 試劑組型式

本產品包含 8 種檢測：

- 1 種品管檢測（品管反應混合液 [CTRL]）
- 7 種突變檢測 (12ALA、12ASP、12ARG、12CYS、12SER、12VAL、12ASP)

反應混合液分為兩部分，包含用於檢測靶標的 FAM 標記的試劑，以及 HEX™ 標記的內部品管劑。反應混合液和陽性品管組試劑包含 Tris EDTA 緩衝液，而陽性品管組包含載體 Poly A RNA。

## 檢測

本產品檢測程序分為兩步。在第一步中，進行品管檢測，以評估樣本中的可擴增 KRAS DNA 總量。在第二步中，進行突變和品管檢測，以確定是否存在突變型 DNA。

## 品管反應

CTRL 採用 Scorpions 引子和未標記引子來擴增 KRAS 基因外顯子 4 的短序列。品管反應用於確定樣本中是否含有適當水平的可擴增 DNA，並且是為確定突變狀態而進行的分析計算中的一個因子。

## 品管檢測

使用標記有 FAM 的品管檢測評估樣本中的可擴增 KRAS DNA 總量。品管檢測的擴增區域為 KRAS 基因外顯子 4。引子和 Scorpion 探針用於獨立擴增任何已知的 KRAS 基因型。

## 突變檢測

每種突變檢測均含有有用 FAM 標記的 Scorpions 探針和 ARMS 引子，用於區分野生型 DNA 和特定突變型 DNA。

## 品管

**備註：**所有實驗檢測必須含有陽性和陰性品管組。

## 內部品管

除了目標反應之外，每種反應混合液還含有一種內部品管試劑劑。失敗表示可能存在導致不準確結果的抑制物，或試管發生了操作者設定錯誤。如果內部品管試劑因 PCR 抑制而失敗，稀釋樣本可減少抑制物的作用。但請注意，這也會稀釋靶標 DNA。本試劑組隨附一管樣本稀釋用水 (Dil.)。必須使用此樣本稀釋用水 (Dil.) 執行樣本稀釋。

## 陽性品管組

每次檢測必須在試管 1 - 5 中裝入陽性品管組。本產品含有 KRAS 陽性品管組 (Positive Control, PC)，在陽性品管反應中用作模板。評估陽性品管組結果，以確保試劑組在聲明的標準限度內進行檢測。

## 陰性品管組

每輪檢測必須在試管 9 - 13 內裝入陰性品管組（即「無模板品管組」）。本產品含有 NTC 用水作為無模板品管的「模板」。無模板品管組用於評估運轉設定過程中任何可能的污染，並用於評估內部品管劑反應的性能。

## 樣本評估

本產品隨附的品管反應混合液 (Control Reaction Mix, CTRL) 用於對樣本中的可擴增 KRAS DNA 總量進行評估。品管檢測的擴增區域為 KRAS 基因外顯子 4。我們建議僅為品管檢測添加樣本，使用 KRAS 陽性品管組 (Positive Control, PC) 作為陽性品管組，使用 NTC 用水作為無模板品管組。

# 提供的材料

## 試劑組內容物

therascreen KRAS RGQ PCR Kit				(24)
產品編號				870081
製備次數		試管識別碼		24
顏色 標識				體積
紅色	Control Reaction Mix (品管反應混合液)	1	CTRL	2 x 600 µl
紫色	12ALA Reaction Mix (12ALA 反應混合液)	2	12ALA	600 µl
橙色	12ASP Reaction Mix (12ASP 反應混合液)	3	12ASP	600 µl
粉紅色	12ARG Reaction Mix (12ARG 反應混合液)	4	12ARG	600 µl
綠色	12CYS Reaction Mix (12CYS 反應混合液)	5	12CYS	600 µl
黃色	12SER Reaction Mix (12SER 反應混合液)	6	12SER	600 µl
灰色	12VAL Reaction Mix (12VAL 反應混合液)	7	12VAL	600 µl
藍色	13ASP Reaction Mix (13ASP 反應混合液)	8	13ASP	600 µl
米色	KRAS Positive Control (KRAS 陽性品管組)	9	PC	250 µl
薄荷色	Taq DNA Polymerase (Taq DNA 聚合酶)		Taq	80 µl
白色	Water for NTC (NTC 用水)		NTC	1.9 ml
白色	Water for Sample Dilution (樣本 稀釋用水)		Dil.	1.9 ml
therascreen KRAS RGQ PCR Kit 使用手冊 (英文)				1

---

## 平台和軟體

本產品專門設計用於與 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器搭配使用。Rotor-Gene Q 軟體和 *therascreen* KRAS Assay Package 軟體可從網路下載或以 CD 形式單獨提供。

必須按照儀器使用者手冊中的要求維護 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器。有關儀器資訊，請參見使用者手冊。

安裝說明請參閱第 119 頁「附錄 B：安裝 *therascreen* KRAS Assay Package 軟體」。

# 需要但並未提供的材料

## 其他試劑

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit（產品編號 60404；請參閱第 20 頁「操作程序：DNA 萃取」）
- 二甲苯
- 乙醇 (96 - 100%)\*

## 耗材

- 帶過濾器的無菌滴管吸頭（為了避免交叉污染，我們推薦使用帶有氣溶膠屏障的滴管吸頭）
- 用於配製主混合液的無菌微量離心管
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps（排管和蓋，0.1 ml），與 72 孔轉子搭配使用（產品編號 981103 或 981106）

## 設備†

- 帶 Cycling Green 和 Cycling Yellow 螢光通道（分別用於檢測 FAM 和 HEX）的 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM
- Rotor-Gene Q 軟體版本 2.3 與 KRAS Assay Package 軟體（版本 3.1.1），用於自動化突變檢測（請參閱「附錄 B：安裝 theascreen KRAS Assay Package 軟體」）。

**備註：**手動突變檢測時，可僅使用 Rotor-Gene Q 軟體而無需 KRAS Assay Package 軟體。請參閱「附錄 A：theascreen KRAS RGQ PCR Kit 手動操作程序」。

\* 不要使用含有甲醇或甲基乙基酮等其他物質的變性乙醇。

† 使用前，確保按照製造業者的建議檢查並校準儀器。

- 熱混合器\*、加熱迴轉式培養箱、加熱塊，或能夠在 56°C 和 90°C 下反應的水浴箱
- 帶轉子的桌上型離心機<sup>†</sup>，適合 1.5 ml 反應管使用
- 桌上型漩渦震盪器<sup>†</sup>
- 樣本製備專用移液管（可調式）<sup>†</sup>
- PCR 主混合液製備專用移液管（可調式）\*
- 模板 DNA 分注專用移液管（可調式）\*

\* 使用前，確保按照製造業者的建議檢查並校準儀器。

<sup>†</sup> 不要使用含有甲醇或甲基乙基酮等其他物質的變性乙醇。


# 警告和注意事項

## 安全資訊

在操作化學物質時，務必穿戴合適的實驗室工作服、拋棄式手套和護目鏡。如需瞭解更多資訊，請參閱相應的安全資料表 (Safety Data Sheets, SDS)。這些安全資料表以簡潔方便的 PDF 格式在線上提供：[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)，對於每種 QIAGEN 試劑組和每種試劑組成分，您可以從中找到、瀏覽並列印 SDS。

- 所有化學物質和生物材料都具有潛在的危險性。檢體和樣本具有潛在的感染性，必須作為生物危害材料處理。
- 根據當地安全程序丟棄樣本和檢測廢棄物。

### 一般注意事項

 <p><b>CAUTION</b></p>	<p><b>CAUTION</b> 一詞用於告知您以下情況： 可能導致儀器或其他設備損壞。 有關這些情況的詳細信息會在這樣的框中列出。</p>	<p>(W2)</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------	-------------

使用者使用本產品時應始終注意以下事項：

- 將陽性材料（檢體和陽性對照組）與所有其他試劑分開儲存和萃取，在空間分隔區域中將其加入反應混合液中。
- 要特別小心地預防合成對照材料所造成的 PCR 污染。我們建議使用單獨的專用移液管預備反應混合液並加入 DNA 模板。反應混合液的製備與分注必須在不同於模板添加區域的一個單獨區域進行。Rotor-Gene Q 管在 PCR 運轉結束之後不得打開。這是為了防止 PCR 後產物造成實驗室污染。

- 本產品中的試劑已經進行了最佳稀釋。我們不建議進一步稀釋試劑，否則可能導致性能喪失。我們不建議反應體積小於 25  $\mu$ l，因為這將增加偽陰性結果的風險。
- 本產品中的所有試劑均經過專門配製而具有最佳性能。本產品中的任何試劑僅適合與同一試劑組中的其他試劑搭配使用。如要維持最佳性能，請勿替換試劑組中的試劑。
- 只能使用本試劑組中提供的 *Taq* DNA 聚合酶 (*Taq*)。不要採用來自同一類型或任何其他類型的其他試劑組中的 *Taq* DNA 聚合酶替換，或採用來自另一家供應商的 *Taq* DNA 聚合酶替換。
- 為盡量減少品管組和樣本的標幟，應嚴格遵守本產品使用說明指南，包括但不限於：
  - 需要正確混合試劑，並且必須確保在測定設置期間的每個混合步驟。
  - 根據安裝程序和現場需求裝置 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器。



## 試劑儲存與處理

應注意試劑組上和所有成分標籤上的保存期限和儲存條件。請勿使用過期或儲存不當的成分。

本產品用乾冰運輸。如果本產品的任何組件到達時未處於冷凍狀態、在運輸過程中外包裝已經打開，或貨物中缺少裝箱單、使用手冊或試劑，請聯絡其中一個 QIAGEN 公司技術服務部或當地經銷商（請參閱封底或瀏覽 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)）。

本產品應在收到後立即置於恆溫冰箱中以  $-30$  至  $-15^{\circ}\text{C}$  的溫度避光儲存。與用螢光標記的所有分子一樣，Scorpions 必須避光，以避免光漂白和性能喪失。

當以原包裝儲存在建議的儲存條件下時，本產品保持穩定至規定的保存期限。應避免反覆冷凍解凍。請勿超過最多 6 次冷凍解凍循環。

# 檢體儲存與處理

**備註：**所有樣本必須視為潛在感染性材料。

樣本材料必須是從 FFPE 組織中萃取的人類基因體 DNA。檢體必須按照標準的病理學方法運送，以確保檢體的品質。

腫瘤樣本為異質性，腫瘤樣本得出的數據可能與來自同一腫瘤的其他切片不一致。腫瘤樣本也可能含有非腫瘤組織。預期非腫瘤組織的 DNA 不含有本產品檢測的突變。

## 腫瘤樣本製備

**備註：**使用乾燥解剖刀。請勿在層流或通風櫥中執行此步驟。

- 對於每個樣本，使用新的解剖刀從切片上將腫瘤組織刮到帶標籤的微量離心管中。

## 製備用於 DNA 萃取的組織樣本 (CRC)

- 使用標準材料和方法，將組織檢體固定在 10% 中性福馬林緩衝液 (Neutral Buffered Formalin, NBF)，並將組織檢體包埋於石蠟中。使用切片機從石蠟塊切取 5  $\mu\text{m}$  的連續切片，並將其貼附於載玻片上。
- 必須讓受過訓練的人員（例如病理學家）評估蘇木素及伊紅 (H&E) 染色的切片，以確定腫瘤含量和面積。標記染色的載玻片以區分腫瘤和正常組織。使用連續切片進行 DNA 萃取。
- 使用腫瘤含量（按面積算）>20% 的切片進行免手工刮取的處理（請參閱下文）。
- 對於腫瘤含量（按面積算）<20% 的切片，則對一塊或多塊切片進行手工刮取。丟棄非腫瘤組織。
- 對於面積 <4  $\text{mm}^2$  的切片，則處理 2 塊或更多塊切片以使總腫瘤面積至少達到 4  $\text{mm}^2$ （適用於需要或無需手工刮取的樣本）。丟棄非腫瘤組織。
- 使用新的無菌解剖刀從組織上刮掉多餘的石蠟。

## 製備用於 DNA 萃取的組織樣本 (NSCLC)

- 使用標準材料和方法將組織檢體固定在 10% NBF 中，並將組織檢體嵌入石蠟中。使用切片機從石蠟塊切取 5  $\mu\text{m}$  的連續切片，並將其貼附於載玻片上。
- 必須讓受過訓練的人員（例如病理學家）評估 H&E 染色的切片，以確認含有腫瘤。使用連續切片進行 DNA 萃取。
- 使用新的無菌解剖刀從組織上刮掉多餘的石蠟。

## 檢體儲存

在室溫下儲存 FFPE 塊和載玻片。載玻片在 DNA 萃取之前可在室溫下最多儲存 4 週。

基因體 DNA 在萃取後可於 2 - 8°C 儲存 1 週，或者在使用前可於 -30 至 -15°C 最多儲存 8 週。

# 程序

## 操作程序：DNA 萃取

### DNA 萃取（CRC 樣本）

- 使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, cat. no. 60404) 並依下述修改流程，從 FFPE CRC 檢體中製備純化基因體 DNA。

**備註：本產品使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 萃取的 DNA 進行驗證。不要使用任何其他 DNA 萃取產品。**

- 按照 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook (Version 1) 中的說明進行 DNA 萃取，注意以下幾點：
  - 請查閱 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 之產品說明書，了解 DNA 萃取之前的樣本準備方法。
  - 只能手動使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit。
  - 切勿使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 使用手冊所述的 RNase 步驟。
  - 切勿使用 QIAGEN Deparaffinization Solution。僅使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 使用手冊所述的二甲苯/乙醇脫蠟方法。
- 使用分子生物學等級之乙醇\*進行所有必需的步驟。
- 每次萃取使用 1 張載玻片。
- 蛋白酶 K 消化（QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 使用手冊的步驟 11）必須執行 1 小時。
- 必須使用取自 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 的 200 µl 洗脫緩衝液（Buffer ATE）洗脫樣本。

**備註：萃取後之基因體 DNA 在 2-8°C 保存 1 週，使用前在 -30 至 -15°C 保存最多 8 週。**

## DNA 萃取 (NSCLC 樣本)

使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, cat. no. 60404) 並依下述修改流程，從 FFPE NSCLC 標體中製備純化基因體 DNA。

**備註：本產品使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 萃取的 DNA 進行驗證。不要使用任何其他 DNA 萃取產品。**

根據 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook 中的說明進行 DNA 萃取，注意以下幾點：

- 不要使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook 中描述的 RNase 步驟。
- 請勿使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 中提供的 QIAGEN Deparaffinization Solution。僅使用二甲苯/乙醇方法進行脫蠟，如 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Handbook 中所述。
- 使用分子生物學等級之乙醇\*進行所有必需的步驟。
- 每次萃取使用 2 x 5 µm 切片。
- 只能手動使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit。
- 切勿使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 使用手冊的 RNase 步驟。
- 切勿使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 中的 QIAGEN Deparaffinization Solution。僅使用 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 使用手冊所述的二甲苯/乙醇脫蠟方法。
- 蛋白酶 K 消化 (QIAamp DNA DSP FFPE Tissue Kit 使用手冊的步驟 11) 必須執行 1 小時。
- 從 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 中移取 60 µl 洗脫緩衝液 (ATE) 並在室溫下反應 2.5 分鐘。
- 全速離心 1 分鐘。
- 從 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 中再移取 60 µl 洗脫緩衝液 (ATE) 並在室溫下反應 2.5 分鐘。
- 全速離心 1 分鐘。

**備註：萃取後之基因體 DNA 在 2-8°C 保存 1 週，使用前在 -30 至 -15°C 保存最多 8 週。**

## 操作程序：DNA 樣本評估

對於自動樣本評估，本操作程序用於透過 KRAS CE 樣本評估鎖定模板 (檢測套件軟體包) 評估樣本中的可擴增 DNA 總量。

**備註：**對於人工樣本評估，請參閱第 93 頁的「附錄 A：therascreen KRAS RGQ PCR Kit 手動操作程序」。

### 開始前之重要要點

本程序用於使用 KRAS CE 樣本評估鎖定模板 (檢測組) 評估樣本中的總擴增 DNA，以進行自動樣本評估。

**備註：**DNA 樣本評估並非用於檢測 PCR 抑制劑的存在，因為僅使用品管試劑反應評估樣本中的總擴增 DNA。

**備註：**該評估務必按下文所述使用 品管反應混合液 (Control Reagent Mix)，而不得使用分光光度法或其他替代方法。嚴重降解的 DNA 可能無法擴增，即使引子生成短 DNA 片段。

- 可用的品管反應混合液 CTRL 最多可評估 24 份樣本。
- 檢測前，使用 CTRL 評估 DNA。
- 為了高效利用 本產品中的試劑，儘可能批處理 DNA 樣本以實現滿載運行。如果逐份檢測樣本或以較小批量運行檢測，將使用更多的試劑並將減少單個 本產品可檢測的總樣本數目。
- 不要振盪 Taq DNA 聚合酶 (Taq 管) 或任何含有 Taq DNA 聚合酶的混合物，因為這可能會使酶失去活性。
- 吸取 Taq DNA 聚合酶要將移液器吸頭小心地放在液體表面下方，避免吸頭被過量的酶包被。
- 為了盡量減少品管組的標幟，必須嚴格遵守 therascreen KRAS RGQ PCR 試劑盒使用說明指南正確的混合試劑，並且必須確保檢測設定期間的每個混合步驟。

### 開始前要做的事情

- 為了盡量減少品管組的標幟，必須嚴格遵守 theascreen KRAS RGQ PCR 試劑盒使用說明指南正確的混合試劑，並且必須確保檢測設定期間的每個混合步驟。
- 首次使用 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器前，請確保已安裝與 Rotor-Gene 軟體版本對應的 Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package 軟體（見附件 2：theascreen KRAS Assay Package 的安裝）。
- 每次使用前，所有試劑需在室溫（15-25°C）下完全解凍至少 1 小時，顛倒 10 次混勻，短暫離心收集管底內容物。在測定設置期間必須確保試劑正確混合。
- 每次使用前請確保 Taq DNA 聚合酶（Taq 管）處於室溫（15–25°C）。將試管短暫離心以在試管底部收集酶。

### 程序

1. 在環境溫度（15 – 25°C）下完全解凍品管反應混合液（試管 CTRL）、無模板品管組（No Template Control, NTC）用無核酸酶水和 KRAS 陽性品管組（Positive Control, PC），時間最少為 1 小時。

開始運轉前的試劑解凍時間、PCR 設置時間和儲存時間，如表 2 所示。

**表 2：解凍時間、PCR 設置時間和儲存溫度**

最小	解凍時間		PCR 設置完成後的儲存* 溫度	PCR 設置和儲存的最長時間
		最大		
1 小時		4.5 小時	室溫 (15 – 25°C)	7 小時
1 小時		4.5 小時	2 – 8°C	18 小時

\* 儲存是指完成 PCR 設置直到在 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器上開始運轉 PCR 的間隔時間。

**備註：**在室溫下完成 PCR 設置。

2. 每個試管上下反轉 10 次混合解凍後的試劑，以避免鹽分局部集中，然後短暫離心試管以收集試管底部的成分。

**備註：**切勿振盪 Taq DNA 聚合酶 (Taq) 或任何含有 Taq 的混合液，因為這可能會導致酶失活。

**備註：**在檢測設置期間必須確保試劑正確混合。。

3. 按照表 3 中的體積為以下項目製備足夠的主混合液（品管反應混合液 [CTRL] 加 Taq DNA 聚合酶 [Taq]）：

- 所有 DNA 樣本
- 1 次 KRAS 陽性品管組 (Positive Control, PC) 反應
- 1 份無模板品管組 (No Template Control, NTC) 反應用無核酸酶水
- 1 份額外樣本，以允許 PCR 設置時有充分的過剩  
品管檢測之主混合液中包含除樣本外的 PCR 所需的所有成分。

**表 3：品管檢測主混合液的製備**

成分	體積
品管反應混合液 (Control Reaction Mix, CTRL)	19.76 $\mu\text{l}$ x (n+1)*
Taq DNA 聚合酶 (Taq)	0.24 $\mu\text{l}$ x (n+1)*
總體積	20 $\mu\text{l}$ /反應

\* n = 反應次數（樣本加品管液）。

製備足夠用於一份額外樣本 (n+1) 的主混合液，以允許 PCR 設置時有充分的過剩。

n 值不得超過 24（加品管液），因為 24 是一次運轉中可裝載的最大樣本數。

**備註：**製備主混合液時，首先將所需體積的品管反應混合液 (CTRL) 添加到相關試管中，最後添加 Taq DNA 聚合酶 (Taq)。

**備註：**移取 Taq DNA 聚合酶時小心地將滴管吸頭插入至略低於液面，以避免吸頭被過量酵素包覆。

4. 根據表 4 中的佈局，將適當數量的 PCR 4 連排管（每排有 4 根試管）放置在載入塊。請勿蓋上試管蓋子。

**備註：**將蓋子留在塑膠容器中，等到需要時才取出。



**表 4：DNA 樣本評估時載入塊中的運轉佈局**

檢測									
品管組	1 (PC)	9	17	25	-	-	-	-	-
品管組	2 (NTC)	10	18	26	-	-	-	-	-
品管組	3	11	19	-	-	-	-	-	-
品管組	4	12	20	-	-	-	-	-	-
品管組	5	13	21	-	-	-	-	-	-
品管組	6	14	22	-	-	-	-	-	-
品管組	7	15	23	-	-	-	-	-	-
品管組	8	16	24	-	-	-	-	-	-

\* 數字表示載入塊中的位置，並指示最終轉子位置。

- 將移液管設定到比反應主混合液總體積小的容量，並透過全容量上下抽吸 10 次充分混合。  
**備註：**在檢測設置期間必須確保試劑正確混合。
- 立即將 20 µl 主混合液添加到每個 PCR 排管中。  
**備註：**有關試管佈局請參閱表 4。對於 DNA 樣本評估，應將品管檢測主混合液添加到一根陽性品管試管、一根無模板品管試管和每個 DNA 樣本的一根試管中。
- 立即將 5 µl 無模板品管組 (No Template Control, NTC) 用無核酸酶水添加到 NTC 試管 (試管位置 2) 中並加蓋。
- 將 5 µl 各 DNA 樣本添加到樣本試管 (試管位置 3 – 26) 中並加蓋。
- 將 5 µl KRAS 陽性品管組 (Positive Control, PC) 添加到 PC 試管 (試管位置 1) 中並加蓋。  
**備註：**每個試管應含有 25 µl 的總反應液 (20 µl 表 3 中製備的主混合液，加 5 µl 的 NTC/樣本/PC)。
- 使用永久性標記工具標記每排 PCR 4 連排試管中位置編號最小的首根試管 (例如位置 1、5 和 9) 的蓋子，以指示將試管裝載到 Rotor Gene Q MDx 5plex HRM 儀器 72 孔轉子時的裝載方向。

11. 將加蓋試管上下反轉 4 次，以混合樣本和反應混合液。
12. 以方向標記為參考，依據運行排列方式（表 4），將所有 PCR 4 連排試管插入 72 孔轉子的適當位置中。  
**備註：**如果轉子未滿載，用加蓋的空試管填充轉子上的所有空位置。這可以確保維持 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器的熱效率。
13. 將 72 孔轉子裝入 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器中。確保密封圈（隨 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器提供）放置在轉子頂部，以便在運轉期間固定試管。
14. 在連接到 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器（圖 1）的電腦，按兩下桌面的「therascreen KRAS QC Locked Template」（therascreen KRAS QC 鎖定模板）圖示，以啟動 Rotor-Gene Q 軟體。



圖 1：「therascreen KRAS QC Locked Template」（therascreen KRAS QC 鎖定模板）圖示。

「Setup」（設定）標籤將按預設顯示（圖 2）。

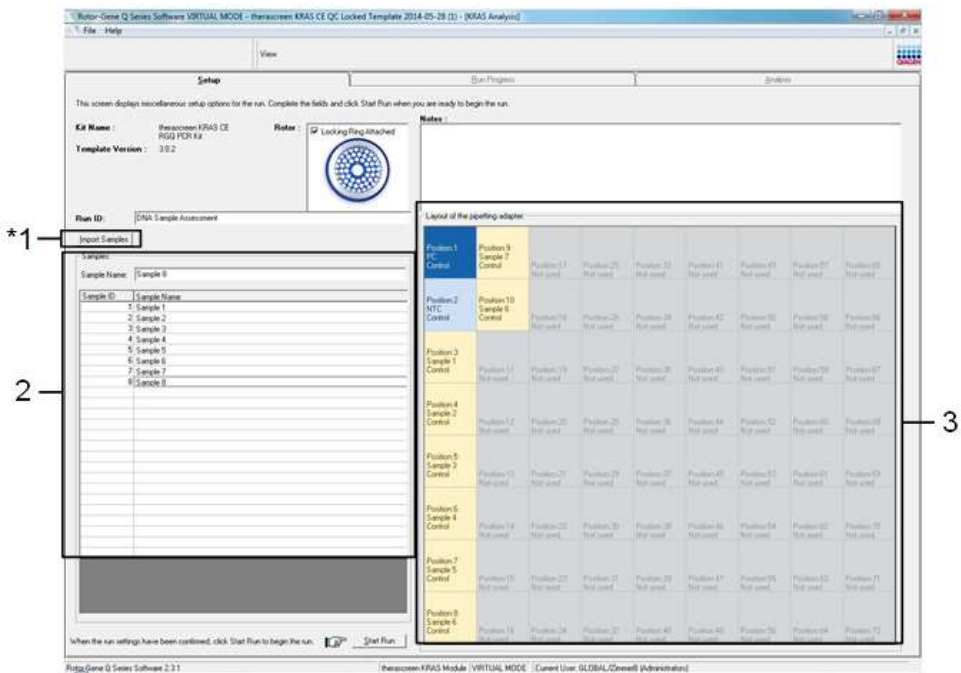


圖 2：「Setup」（設定）標籤和「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊。1 = 「Setup」（設定）標籤，2 = 「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊。

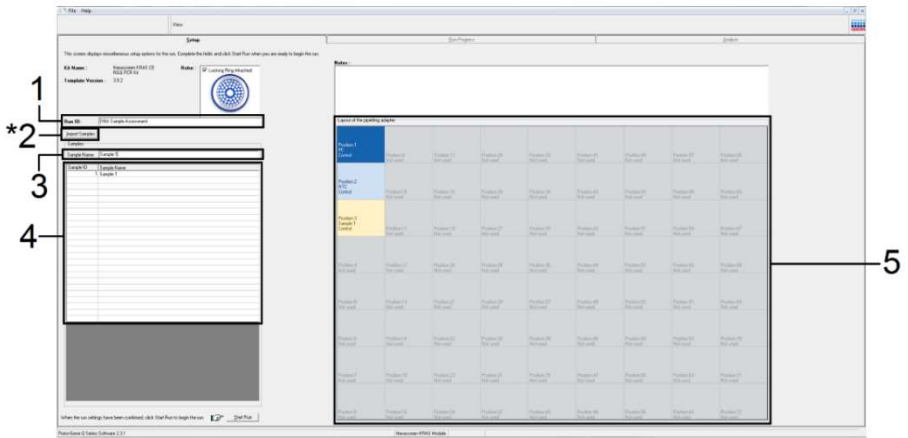
15. 確保密封圈連接正確，然後勾選「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊。關閉 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器蓋。
16. 根據當地的命名慣例，在「Run ID」（運轉 ID）欄位中輸入運轉 ID。根據當地的命名慣例，在「Sample Name」（樣本名稱）欄位中輸入樣本名稱，然後按「Return」（返回）鍵。

這樣會將樣本名稱新增到下面的樣本清單中，並為樣本指定「Sample ID」（樣本 ID）（1、2、3 等）。此外，右側的「Layout of the pipetting adapter」（移液接頭的佈局）面板將更新，以納入樣本名稱（圖 3）。

或者，可以使用「Import Samples」（匯入樣本）按鈕，匯入以 \*.smp（Rotor-Gene Q 樣本檔案）或 \*.csv（逗點分隔值檔案）格式儲存的樣本名稱。樣本名稱將使用此方法自動填入。

**備註：**在「Layout of the pipetting adapter」（移液接頭的佈局）面板中，檢查新增的樣本名稱是否以顏色變化反白顯示，以及樣本名稱是否在樣本位置（圖 3）。

**備註：**超過 8 個字元的樣本名稱，可能無法完全顯示在「Layout of the pipetting adapter」（移液接頭的佈局）面板中。



**圖 3：**輸入「Run ID」（運轉 ID）和「Sample Name」（樣本名稱）。1 = 「Run ID」（運轉 ID）對話方塊欄位；2 = 「Import Samples」（匯入樣本）按鈕；3 = 「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位；4 = 「Sample List」（樣本清單）；5 = 「Layout of the pipetting adapter」（移液接頭的佈局）面板。

17. 重複步驟 16 以輸入其他所有樣本的名稱（圖 4）。

**備註：**如需編輯樣本名稱，按一下樣本清單中的「Sample Name」（樣本名稱），選取的樣本將顯示在上面的「Sample Name」（樣本名稱）欄位。根據當地的命名慣例編輯樣本名稱，然後按「Return」（返回）鍵更新名稱。

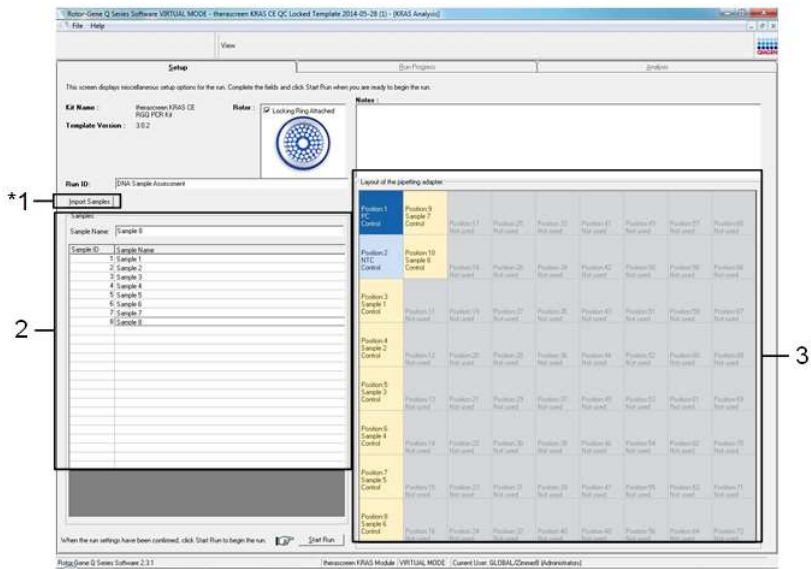


圖 4：在「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位中輸入額外的樣本名稱。\*1 = 「Import Sample」（匯入樣本）按鈕，2 = 「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位和樣本清單，3 =帶額外樣本名稱的「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板。

- 輸入所有樣本名稱後，驗證是否正確。如有必要，在「Notes」（備註）欄位中新增其他任何資訊，然後按一下「Start Run」（開始運轉）（圖 5）。

**備註：**如果有任何未使用的轉子位置，將顯示一條「Warning」（警告）（圖 5 和圖 6），以提醒使用者，轉子上所有未使用位置都必須用加蓋的空試管放滿。確認所有未使用的轉子位置都已放滿加蓋的空試管，然後按一下「OK」（確定）以繼續。

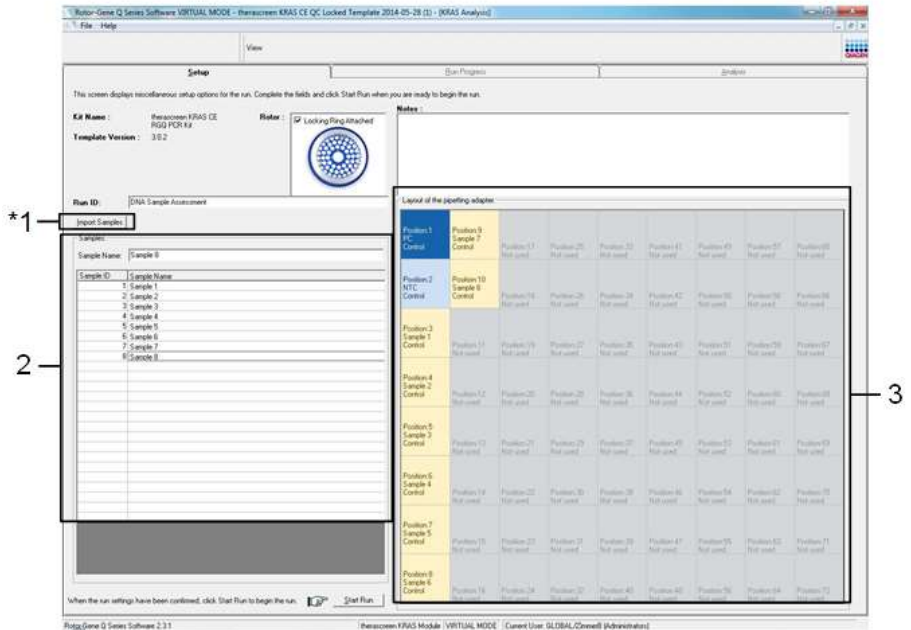


圖 5：「Notes」（備註）對話方塊欄位、「Start Run」（開始運轉）和未使用的轉子位置「Warning」（警告）。

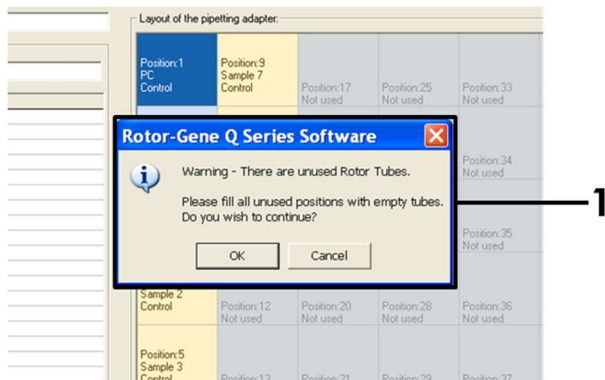


圖 6：1 = 空轉子位置「Warning」（警告）。

19. 將顯示「Save As」（另存新檔）視窗。選擇適當的檔案名稱，並將 PCR 運轉作為 \*.rex 實驗檔案儲存到所選位置。按一下「Save」（儲存）（圖 7）。

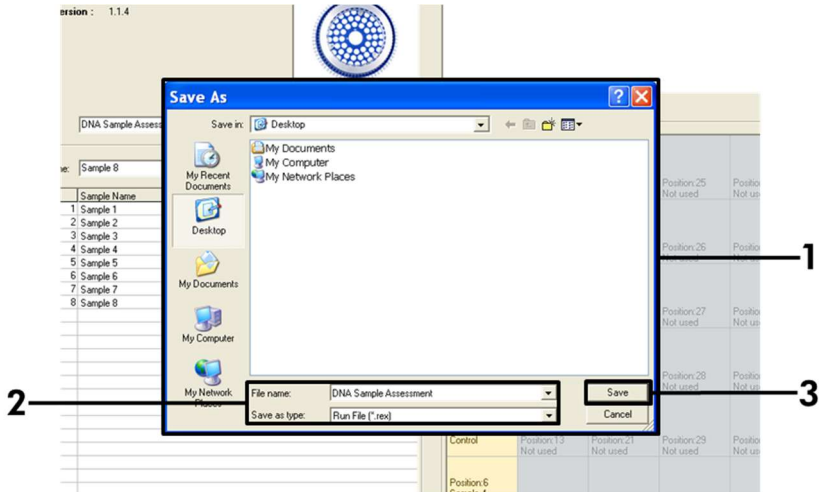


圖 7：儲存運轉檔案。1 = 「Save As」（另存新檔）視窗，2 = 「File name」（檔案名稱）和「save as type」（檔案類型）\*.rex 檔案，3 = 「Save」（儲存）。

PCR 運轉將開始。

**備註：**運轉開始時，將自動開啟「Run Progress」（運轉進度）標籤，以顯示溫度追蹤和剩餘運轉時間（圖 8）。

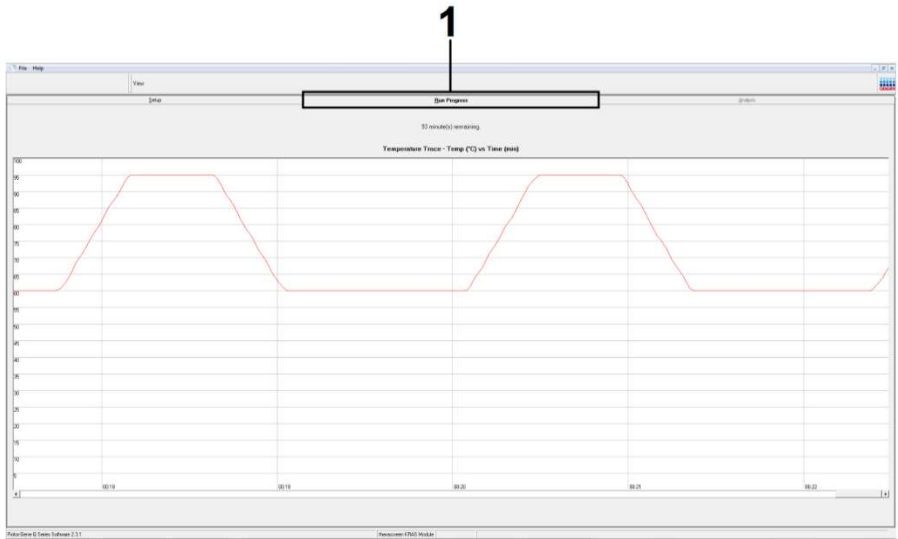


圖 8：「Run Progress」（運轉進度）標籤。

運轉完成後，將自動開啟「Analysis」（分析）標籤。

**備註：**如果「Analysis」（分析）標籤無法開啟，按一下「Analysis」（分析）標籤（圖 9）。

**備註：**計算方法的說明提供於第 47 頁「結果判讀」。



Tube ID	Sample Name	Control Assay Ct	Flags/Warnings	Status
1	PC Control	26.50	-	Valid
2	NTC Control	-	-	Valid
3	03771078B	28.39	-	Valid
4	03771078B	27.38	-	Valid
5	03771078B	30.07	-	Valid
6	03771078B	26.53	-	Valid
7	03771078B	29.95	-	Valid
8	03771078B	28.45	-	Valid
9	03771078B	29.95	-	Valid
10	03771078B	29.02	-	Valid
11	03771078B	31.42	-	Valid
12	03771078B	28.93	-	Valid
13	03771098B	29.60	-	Valid
14	03771098B	31.44	-	Valid
15	03771098B	31.02	-	Valid
16	03771098B	28.09	-	Valid
17	03771098B	29.91	-	Valid
18	03771098B	30.33	-	Valid
19	03771098B	30.22	-	Valid
20	03771098B	27.17	-	Valid
21	03771098B	29.87	-	Valid
22	03771098B	29.32	-	Valid
23	03771098B	28.22	-	Valid
24	03771098B	28.57	-	Valid
25	03771098B	29.80	-	Valid
26	03771098B	30.41	-	Valid

圖 9：「Analysis」（分析）標籤和結果報告。1 = 「Analysis」（分析）標籤，2 = 「Sample QC Result Table」（樣本 QC 結果表）。

備註：品管結果在「Sample QC Result Table」（樣本 QC 結果表）（圖 9 中的項目 2）中報告如下。

- **運轉品管**（試管位置 1 和 2 分別為陽性品管和無模板品管）：如果結果在可接受範圍內，將顯示「Valid」（有效）。否則將顯示「Invalid」（無效）結果。
- **樣本品管反應  $C_T > 32.00$** ：顯示「Invalid」（無效）。DNA 數量不足以進行突變分析。重新檢測樣本。如果 DNA 數量仍然不足，則萃取更多的腫瘤組織（若可取得）（請參見第 87 頁的「疑難排解指南」）。
- **樣本品管反應  $C_T < 21.92$** ：顯示「Invalid」（無效）。DNA 濃度過高而無法進行突變分析。使用稀釋用無核酸酶水 (Dil.) 進行稀釋並重新檢測。稀釋至  $C_T$  為 21.92 – 32.00。1:1 稀釋可使  $C_T$  值增加約 1.0。
- **樣本品管反應  $C_T$  為 21.92 – 32.00 ( $21.92 \leq$  品管  $C_T \leq 32.00$ )**：顯示「Valid」（有效）。DNA 濃度適合進行突變分析。

備註：如果需要重新萃取或稀釋，則重複品管反應以確認 DNA 濃度適合使用。

20. 如需生成報告檔案，按一下「Report」（報告）。「Report Browser」（報告瀏覽器）視窗將出現。在「Templates」（模版）下選擇「KRAS Analysis Report」（KRAS 分析報告），然後按一下「Show」（顯示）（圖 10）。

**備註：**可以透過按一下每個報告左上角的「Save As」（另存新檔）按鈕，以網頁封存格式將報告儲存到其他位置。

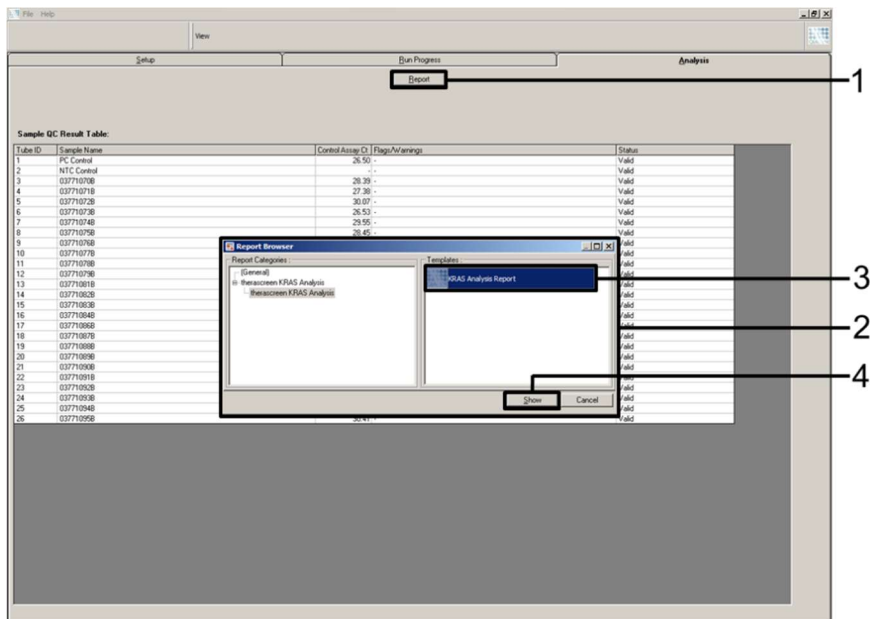


圖 10：選擇「KRAS Analysis Report」（KRAS 分析報告）。1 = 「Report」（報告），2 = 「Report Browser」（報告瀏覽器）視窗，3 = 「KRAS Analysis Report」（KRAS 分析報告）選項，4 = 「Show」（顯示）。

## 操作程序：KRAS 突變檢測

本操作程序用於 KRAS 突變檢測。

### 重要要點

- 樣本經過樣本評估後，可採用 KRAS 突變檢測進行檢測。
- 為了高效利用 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit，樣本必須 7 個分為一批（以裝滿 72 孔轉子）。批量較小表示 *本產品* 可檢測的樣本較少。
- 必須使用本產品提供的所有反應混合液檢測樣本。
- 不要振盪 Taq DNA 聚合酶（Taq 管）或任何含有 Taq DNA 聚合酶的混合物，因為這可能會使酶失去活性。
- 吸取 Taq DNA 聚合酶要將移液器吸頭小心地放在液體表面下方，避免吸頭被過量的酶包被。
- 為了盡量減少品管組的標幟，必須嚴格遵守 *therascreen* KRAS RGQ PCR 試劑盒使用說明指南正確的混合試劑，並且必須確保檢測設定期間的每個混合步驟。
- 在首次使用 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器前，請確保安裝了與 Rotor-Gene Q 軟體版本相對應的 *therascreen* KRAS Assay Package 軟體（請參閱第 119 頁「附錄 B：安裝 *therascreen* KRAS Assay Package 軟體」）。

### 開始前要做的事情

- 每次使用前，所有試劑需在室溫（15-25°C）下完全解凍至少 1 小時，顛倒 10 次混勻，短暫離心收集管底內容物。
- 每次使用前確保 Taq DNA 聚合酶（Taq 管）處於室溫（15–25°C）。將試管短暫離心以在試管底部收集酶。在測定設置期間必須確保試劑正確混合。

## 程序

1. 在室溫 (15–25°C) 下完全解凍所有反應混合管、用於無模板品管組試管 (NTC) 的無核酸酶水和 KRAS 陽性品管 (管 PC) 至少 1 小時。

開始運行前解凍試劑、PCR 設置和儲存的時間如下表所示。

**表 5 解凍試劑的時間**

解凍時間			
最少	最多	PCR 設置後之儲存溫度	PCR 設置後之最大儲存時間
1 小時	4.5 小時	室溫(15–25°C)	7 小時
1 小時	4.5 小時	2–8°C	18 小時

**備註：**PCR 設置應在室溫下進行。“存儲”是指在 Rotor-Gene Q MDx 儀器上完成 PCR 設置和開始 PCR 運轉之間的時間。

**備註：**將 Taq DNA 聚合酶 (Taq 管) 與其他試劑同時置於室溫 (15–25°C) (參見試劑儲存和處理)。將試管短暫離心以在試管底部收集酶。

2. 試劑解凍後，將每個試管顛倒 10 次以混合它們以避免鹽份局部集中，然後直接離心以收集試管底部的內容物。

**備註：**在檢測設置期間必須確保試劑正確混合。

3. 依據下表所示的每個對應反應混合液，標示 8 根微量離心管 (未提供)。依據表中的體積，製備足夠主混合液 (品管或組或突變反應混合液 [試管 CTRL、12ALA、12ASP、12ARG、12CYS、12SER、12VAL 或 13ASP] 加 Taq DNA 聚合酶 [Taq])，用於 DNA 樣本、一次 KRAS 陽性品管組 (試管 PC) 反應和一次無模板品管組 (試管 NTC) 反應用無核酸酶水。包括用於 1 份額外樣本的試劑，以允許 PCR 設置時有充分的過剩。主備註: 混合液包含除了樣本以外，PCR 所需的所有組分。

檢測及反應混合液試管	反應混合液體積	Taq DNA 聚合酶體積
品管組 (試管 CTRL)	19.76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0.24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12ALA (試管 12ALA)	19.76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0.24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12ASP (試管 12ASP)	19.76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0.24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12ARG (試管 12ARG)	19.76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0.24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12CYS (試管 12CYS)	19.76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0.24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12SER (試管 12SER)	19.76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0.24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12VAL (試管 12VAL)	19.76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0.24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
13ASP (試管 13ASP)	19.76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0.24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)

\* n = 反應次數 (樣本加品管液)。  
製備足夠用於 1 份額外樣本 (n + 1) 的主混合液，以允許 PCR 設置時有充分的過剩。n 值不得超過 7 (加品管液)，因為 7 是一次運轉中可裝載的最大樣本數。

**備註：**在製備檢測預混液時，首先將所需體積的品管或突變反應混合物添加到相關管中，最後添加 Taq DNA 聚合酶 (Taq 管)。

- 根據表 4 中的配置將適當數量的 PCR 4 連排試管 (每排有 4 管) 放置在載入塊中。在載入塊中進行配置以進行 DNA 樣本評估。數字表示加載塊中的位置並表示最終轉子位置。不要蓋上管子的蓋子。

**備註：**直到需要前都將蓋子留在塑膠容器中，

- 將移液管設定到比反應混合液總體積小的容量，並透過全容量吹打 10 次以徹底混合主混合液。

**備註：**在檢測設置期間必須確保試劑正確混合。

- 為檢測 KRAS 突變，每個 DNA 樣本應添加到 8 個 PC 管、8 個 NTC 管和 8 個檢測預混液的管中。
- 立即將 20  $\mu\text{l}$  主混合液添加到相應的每個 PCR 排管中。

**備註：**請參閱表 5 以瞭解製備反應混合液時的試管排列方式。對於 KRAS 突變檢測，應將主混合液添加到 8 根 PC 試管、8 根 NTC 試管和每個 DNA 樣本的 8 根試管中。

**表 6：KRAS 突變檢測時載入塊中的運轉佈局**

檢測	品管組		樣本編號						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
CTRL	1*	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68
12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
13ASP	8	16	24	32	40	48	56	64	72

\* 數字表示載入塊中的位置，並指示最終轉子位置。

- 立即將 5 µl 無模板品管組 (No Template Control, NTC) 用無核酸酶水添加到 NTC 試管 (試管位置 9 – 16) 中並加蓋。
- 將 5 µl 各 DNA 樣本添加到樣本試管 (試管位置 17 – 72) 中並加蓋。
- 將 5 µl KRAS 陽性品管組 (Positive Control, PC) 添加到 PC 試管 (試管位置 1 – 8) 中並加蓋。
- 使用永久性標記工具標記每排 PCR 4 連排試管中位置編號最小的首根試管 (例如位置 1、5 和 9) 的蓋子，以指示將試管裝載到 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器 72 孔轉子時的裝載方向。
- 將加蓋試管上下反轉 4 次，以混合樣本和反應混合液。  
備註：在檢測設置期間必須確保試劑正確混合。
- 以方向標記為參考，依據運行排列方式 (表 5)，將所有 PCR 4 連排試管插入 72 孔轉子的適當位置中。

**備註：**每次 PCR 運轉最多可以包含 7 個樣本。如果轉子未滿載，用加蓋的空試管填充轉子上的所有空位置。這可以確保維持 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器的熱效率。

14. 將 72 孔轉子裝入 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器中。確保密封圈（隨 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器提供）放置在轉子頂部，以便在運轉期間固定試管。
15. 在連接到 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器（圖 11）的電腦，按兩下桌面的「therascreen KRAS Locked Template」（therascreen KRAS 鎖定模板）圖示，以啟動 Rotor Gene Q MDx 5plex HRM 軟體。

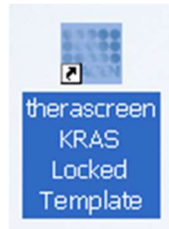


圖 11：「therascreen KRAS Locked Template」（therascreen KRAS 鎖定模板）圖示。

「Setup」（設定）標籤將按預設顯示（圖 12）。

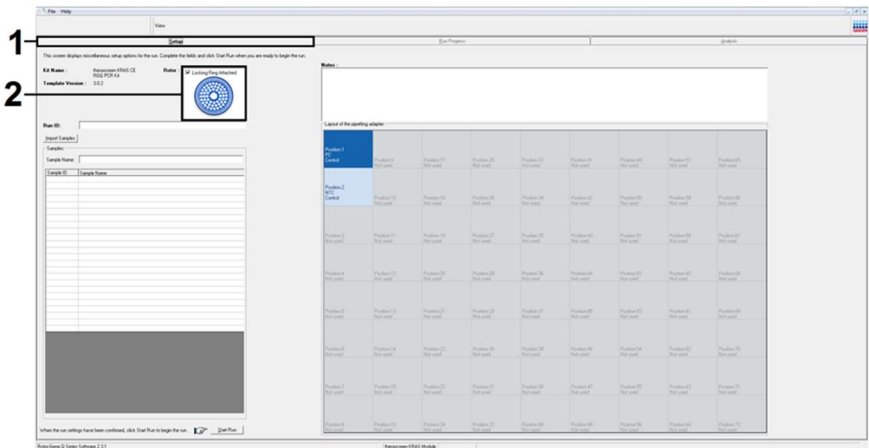


圖 12：1 = 「Setup」（設定）標籤，2 = 「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊。

16. 確保密封圈連接正確，然後勾選「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊。關閉 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器蓋。
17. 根據當地的命名慣例，在「Run ID」（運轉 ID）欄位中輸入運轉 ID。

18. 根據當地的命名慣例，在「Sample Name」（樣本名稱）欄位中輸入樣本名稱，然後按「Return」（返回）鍵。

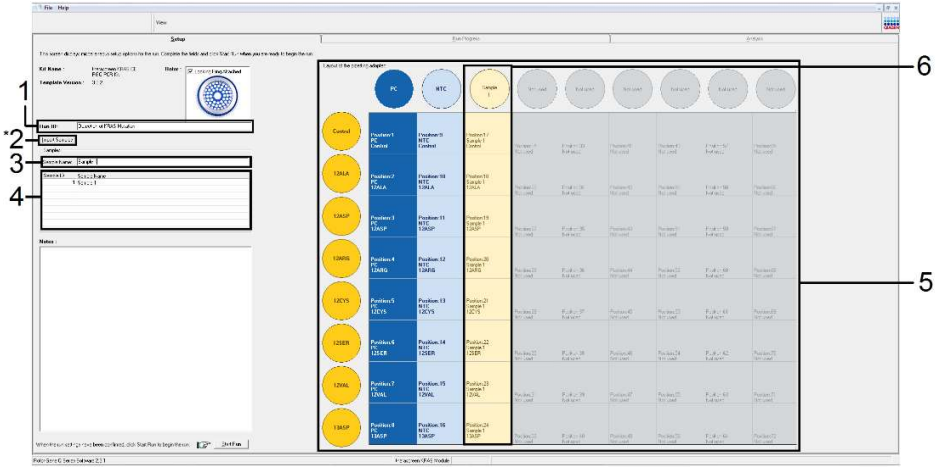
這樣會將樣本名稱新增到下面的樣本清單中，並為樣本指定「Sample ID」（樣本 ID）（1、2、3 等）。此外，右側的「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板將更新，以納入樣本名稱（圖 13）。

**備註：**在「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板中，檢查新增的樣本名稱是否以顏色變化反白顯示，以及樣本圓圈下方一欄中的所有 8 項檢測均反白顯示（表 13）。

**備註：**最多可以新增 7 個樣本。樣本 ID（位於樣本圓圈中）將自動指定，範圍從 1 到 7。

**備註：**超過 8 個字元的樣本名稱，可能無法完全顯示在「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板中。

19. 或者，可以使用「Import Samples」（匯入樣本）按鈕，匯入以 \*.smp（Rotor-Gene Q 樣本檔案）或 \*.csv（逗點分隔值檔案）格式儲存的樣本名稱。樣本名稱將使用此方法自動填入。



**圖 13：輸入「Run ID」（運轉 ID）和「Sample Name」（樣本名稱）。** 1 = 「Run ID」（運轉 ID）對話方塊欄位，2 = 「Import Sample」（匯入樣本）（軟件版本 2.1 無此項），3 = 「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位，4 = 樣本清單，5 = 「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板；6 = 反白顯示的樣本圓圈及下面的 8 項檢測欄。



20. 重複步驟 14 以輸入其他所有樣本的名稱（圖 14）。

**備註：**如需編輯樣本名稱，按一下樣本清單中的「Sample Name」（樣本名稱），選取的樣本將顯示在上面的「Sample Name」（樣本名稱）欄位。根據當地的命名慣例編輯樣本名稱，然後按「Return」（返回）鍵更新名稱。

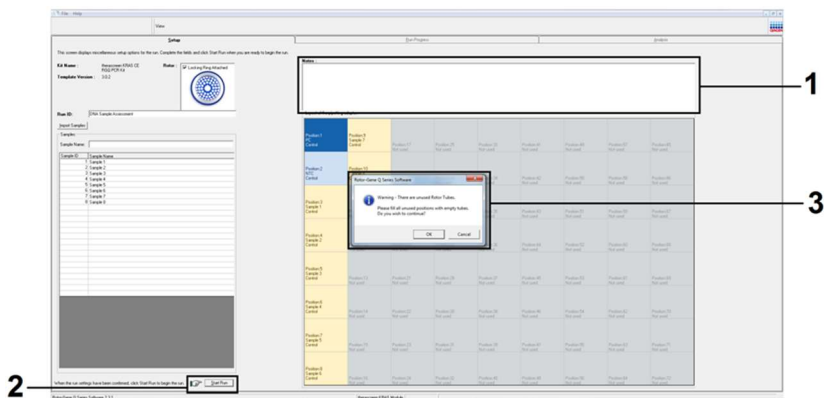


圖 14：在「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位中輸入額外的樣本名稱。1 = 「Sample Name」（樣本名稱）對話方塊欄位，2 = 樣本清單，3 = 帶額外樣本名稱的「Layout of the pipetting adaptor」（移液接頭的佈局）面板。

21. 輸入所有樣本名稱後，驗證是否正確。如有必要，在「Notes」（備註）欄位中新增其他任何資訊，然後按一下「Start Run」（開始運轉）（圖 15）。

**備註：**如果有任何未使用的轉子位置，將顯示一條「Warning」（警告）（圖 15 和圖 16），以提醒使用者，轉子上所有未使用位置都必須用加蓋的空試管放滿。確認所有未使用的轉子位置都已放滿加蓋的空試管，然後按一下「OK」（確定）以繼續。

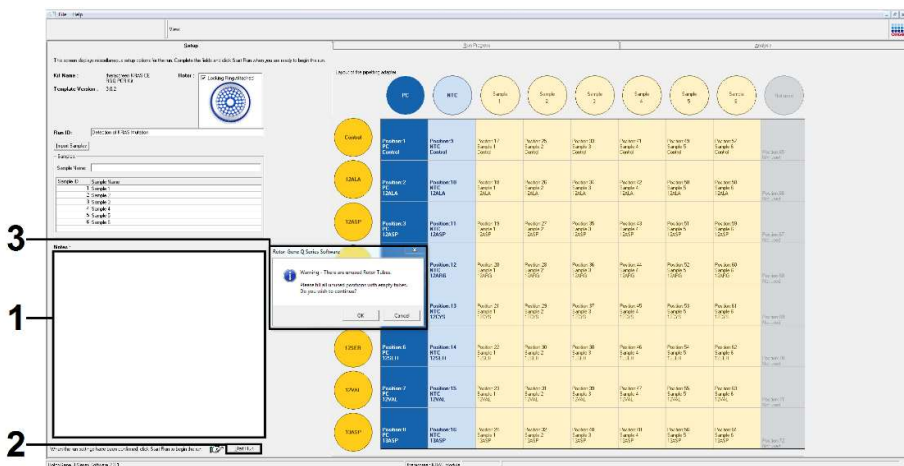


圖 15：1 = 「Notes」（備註）對話方塊欄位，2 = 「Start Run」（開始運轉），3 = 未使用的轉子位置「Warning」（警告）。

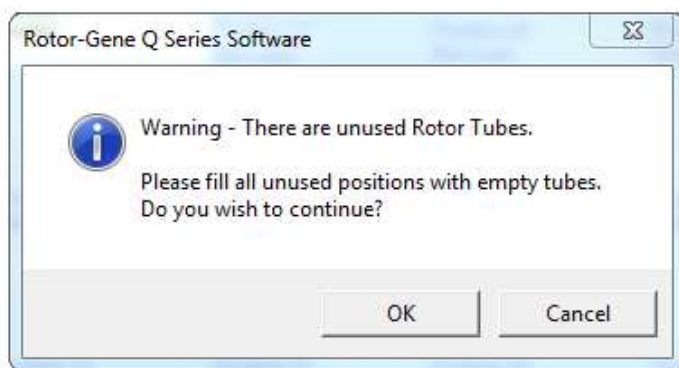


圖 16：空轉子位置「Warning」（警告）。

22. 在「Save As」（另存新檔）視窗選擇適當的檔案名稱，並將 PCR 運轉作為 \*.rex 實驗檔案儲存到所選位置（圖 17）。

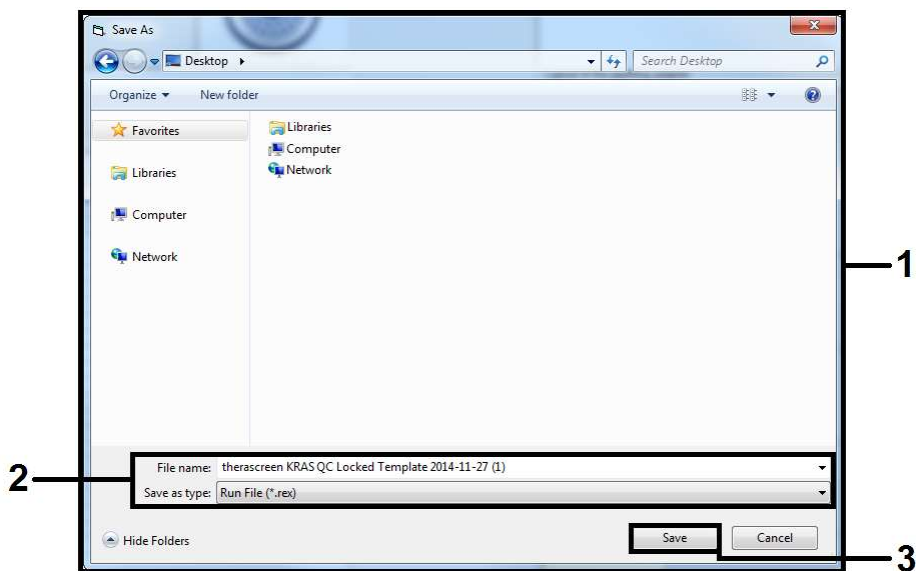


圖 17：儲存運轉檔案。

PCR 運轉將開始。

**備註：**運轉開始時，將自動開啟「Run Progress」（運轉進度）標籤，以顯示溫度追蹤和剩餘運轉時間（圖 18）。

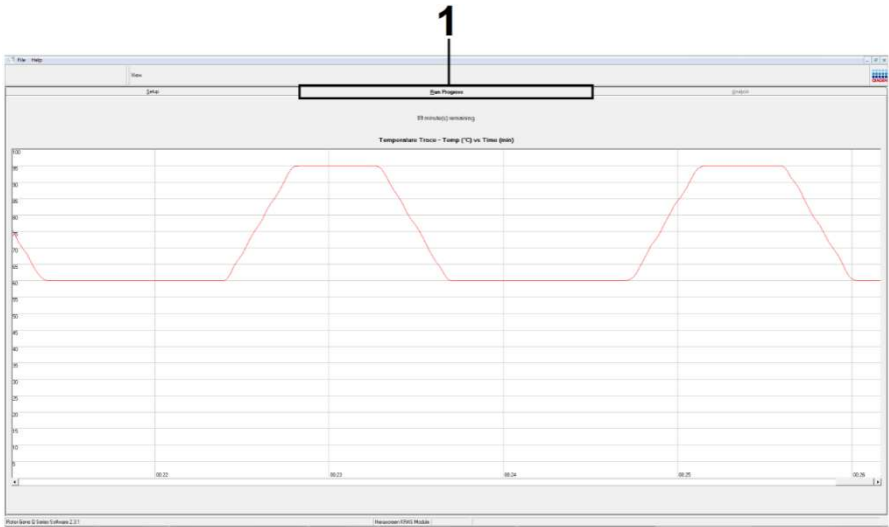


圖 18：「Run Progress」（運轉進度）標籤。

運轉完成後，將自動開啟「Analysis」（分析）標籤。

**備註：**如果「Analysis」（分析）標籤無法開啟，按一下「Analysis」（分析）標籤（圖 19）。

**備註：**計算方法的說明提供於第 47 頁「結果判讀」。

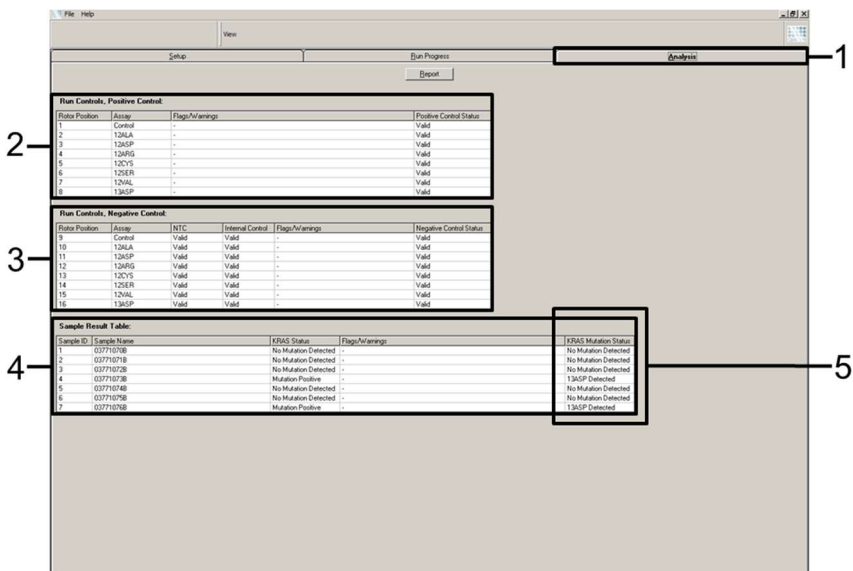


圖 19：「Analysis」（分析）標籤和結果報告。1 = 「Analysis」（分析）標籤，2 = 「Run Controls, Positive Control」（運轉品管，陽性品管組），3 = 「Run Controls, Negative Control」（運轉品管，陰性品管組）面板；4 = 「Sample Result Table」（樣本結果表）；5 = 「KRAS Mutation Status」（KRAS 突變狀態）欄。

檢測結果將報告如下（圖 19）。

- 「Run Controls, Positive Control」（運轉品管，陽性品管組）面板：如果結果在可接受範圍內，「Positive Control Status」（陽性品管組狀態）將顯示「Valid」（有效），否則將顯示「Invalid」（無效）結果。
- 「Run Controls, Negative Control」（運轉品管，陰性品管組）面板：如果「NTC」（無模板品管）和「Internal Control」（內部品管劑）結果均在可接受範圍內，「Negative Control Status」（陰性品管組狀態）將顯示「Valid」（有效），否則將顯示「Invalid」（無效）結果。
- 「Sample Result Table」（樣本結果表）面板：將在「KRAS Mutation Status」（KRAS 突變狀態）欄下報告突變陽性樣本的具體突變。

23. 如需生成報告檔案，按一下「Report」（報告）。「Report Browser」（報告瀏覽器）視窗將出現。在「Templates」（模版）下選擇「KRAS Analysis Report」（KRAS 分析報告），然後按一下「Show」（顯示）（圖 20）。

**備註：**可以透過按一下每個報告左上角的「Save As」（另存新檔），以網頁封存格式將報告儲存到其他位置。

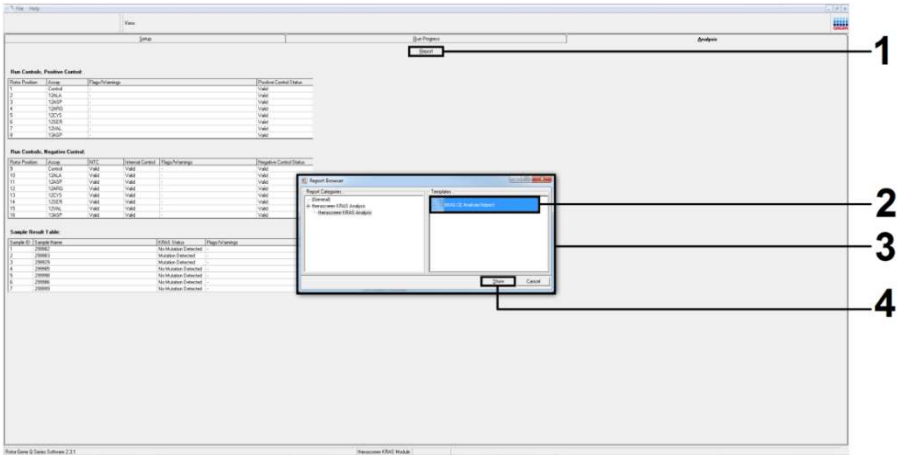


圖 20：選擇「KRAS Analysis Report」（KRAS 分析報告）。1 = 「Report」（報告），2 = 「Report Browser」（報告瀏覽器）視窗，3 = 「KRAS Analysis Report」（KRAS 分析報告）選項，4 = 「Show」（顯示）。

**僅針對 NSCLC 樣本的注意事項：**為了避免調用錯誤的 G12C (12CYS) 突變結果，具有下列標幟的樣本必須被解釋為無效。

- SAMPLE\_INT\_CTRL\_EARLY\_CT
- SAMPLE\_POSITIVE\_AND\_INVALID
- SAMPLE\_INT\_CTRL\_FAIL
- MUTATION\_EARLY\_CT
- SAMPLE\_INVALID\_DATA

# 結果判讀

當運轉完成後，Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 將自動執行分析和突變檢出。以下資訊說明了 *therascreen* KRAS Assay Package 如何進行分析和突變識別。

**備註：**對於人工分析，請參閱第 93 頁「附錄 A：*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 手動操作程序」。

將特定反應的螢光超過閾值的 PCR 循環定義為  $C_T$  值。 $C_T$  值表示特定 DNA 樣本的含量。低  $C_T$  值表示較高的 DNA 樣本含量，高  $C_T$  值表示較低的 DNA 樣本含量。具有  $C_T$  值的反應被歸類為陽性擴增。

Rotor-Gene Q 軟體在任何 2 個記錄值之間插入螢光訊號。 $C_T$  值因此可為 0 至 40 範圍內的任何實數（不限於整數）。

對於 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit，閾值設為 0.05 相對螢光單位。Green 和 Yellow 螢光通道的該值均在 *therascreen* KRAS Assay Package 軟體中設定。該閾值在 *本產品* 的開發期間確定。

$\Delta C_T$  值是透過以下方程式算出：

$$\Delta C_T = [\text{突變檢測 } C_T \text{ 值}] - [\text{品管檢測 } C_T \text{ 值}]$$

評估運轉品管（陽性品管組、NTC 及內部品管劑），以確保滿足可接受的  $C_T$  值，且反應正確進行。

樣本  $\Delta C_T$  值是用同一樣本的突變檢測  $C_T$  減去品管檢測  $C_T$  得出。如果樣本的  $\Delta C_T$  小於或等於該檢測的臨界  $\Delta C_T$  值，則該樣本被歸類為突變陽性。如果大於該閾值，則該樣本含有的突變百分比低於本產品所能檢測到的突變百分比（超出檢測極限）或者該樣本為突變陰性，將報告為「No Mutation Detected」（未檢測到突變）。

突變反應中沒有擴增，將記錄為「No Mutation Detected」（未檢測到突變）。根據背景擴增計算的  $\Delta C_T$  值預計將大於臨界  $\Delta C_T$  值，樣本將歸類為「No Mutation Detected」（未檢測到突變）。

檢測結果將顯示為「mutation name」Detect（檢測到突變[突變名稱]）、「No Mutation Detected」（未檢測到突變）、「Invalid」（無效）或「Run Control Failed」（運轉品管失敗）（如果運轉品管不成功）。對於突變陽性樣本，將報告特異性突變。

有關 Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package 生成的標幟的解釋，請參閱 theascreen KRAS Assay Package 生成的標幟。

至於可能顯示的其他結果，本使用手冊的「操作程序：DNA 樣本評估」有相關論述。

**注意：**在罕見情況下，一個腫瘤可以含有多個突變。在這種情況下，將標出  $\Delta C_T$  值最小的突變。



# 限制

本檢測用於偵測 KRAS 基因第 12 和 13 號密碼子的 7 種突變。報告結果為「No Mutation Detected」（未檢測到突變）的樣本可能攜帶沒有被本檢測檢出的 KRAS 突變（例如 13CYS）。

突變的檢出取決於樣本完整性以及檢體中可擴增 DNA 的數量。如果初步的樣本 DNA 評估顯示數量不足或過多而不適宜進行突變分析，則應重新執程序。

本產品要在聚合酶鏈式反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 程序中使用。和所有 PCR 程序一樣，樣本可能被檢測環境中的外部 DNA 源污染，以及被陽性品管組中的 DNA 污染。注意避免樣本和反應混合試劑受污染。

therascreen KRAS RGQ PCR 試劑盒不得用於診斷任何疾病。

針對 CRC 檢體，本產品僅用於區分野生型和突變型。本檢測經過設計，待檢特定突變的每種突變反應達到最靈敏。但在檢出突變的樣本中，可能與其他突變反應發生交叉反應。如果多個突變反應為陽性，將以  $\Delta C_T$  值最小的突變作為結果。

therascreen KRAS RGQ PCR 試劑盒僅針對福爾馬林固定、石蠟包埋的結直腸癌組織和非小細胞肺癌組織進行驗證。

本產品僅驗證了與 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 搭配使用時有效。僅 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 經過驗證而適合與本產品搭配使用。

# 性能特性

## 分析性能

採用從 CRC 患者和 NSCLC 患者採集的 FFPE 組織樣本進行研究，進而確定本產品的特定性能特性。NSCLC 樣本的採集方法包括粗針組織切片 (Core Needle Biopsy, CNB)、細針抽吸 (Fine Needle Aspirate, FNA) 和切除術。對每種樣本類型採用 8 種 FFPE 人類細胞株，其中 7 種攜帶可用本檢測法檢出的已知 KRAS 突變，還有 1 種攜帶 KRAS 野生型（即第 12 和 13 號密碼子無突變）。樣本的突變狀態透過雙向 Sanger 定序確認。

## 閾值

採用符合 CLSI EP17-A (2004) (8) 指南的方法，檢測 220 例 FFPE 樣本，以確定本檢測法的閾值。品管反應  $C_T$  範圍確定為 21.92 – 32.00。閾值是用突變反應的  $C_T$  減去品管反應的  $C_T$  得出 ( $\Delta C_T$ )，各閾值如表 7 所示。

表 7：每種突變檢測的已確立閾值。

	突變檢測						13ASP
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	
閾值 ( $\leq \Delta C_T$ )	8.0	6.6	8.0	8.0	8.0	7.5	7.5

## 空白極限

為了評估 本產品在缺少突變陽性模板時的性能，並為了確保空白樣本不產生可能指示低濃度突變的分析信號，將對沒有模板的樣本進行評估。結果顯示，任何突變或品管反應試管中都沒有可檢出的品管或突變 C<sub>t</sub> 值（內部品管劑 C<sub>t</sub> 值全部有效）。

## 與參考分析方法進行比較：CRC

進行了兩項研究以證明 本產品與雙向定序這兩種方法在檢測 CRC 樣本的突變狀態時的一致性。本產品與雙向定序這兩種方法對總共 137 份 FFPE 樣本均得出有效的結果。

表 8 顯示全部結果。表 9 顯示 本產品和雙向定序之間的分析一致性。

**表 8：本產品與雙向 Sanger 定序**

		雙向定序的突變檢出							總計	
		陰性	12AL A	12AR G	12AS P	12CY S	12SE R	12VA L		13AS P
therascreen KRAS RGQ PCR Kit 檢出	陰性	80	-	-	1	-	-	-	1	82
	陽性 12ALA	-	3	-	-	-	-	-	-	3
	陽性 12ARG	-	-	-	1	-	-	-	-	1
	陽性 12ASP	-	-	-	20	-	-	-	-	20
	陽性 12CYS	-	-	-	-	3	-	-	-	3
	陽性 12SER	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	陽性 12VAL	2	-	-	-	-	-	14	-	16
	陽性 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	11	12
	總計	83	3	0	22	3	0	14	12	137

表 9：一致性分析

一致性指標	頻率 (%)	95% 信賴區間 (Confidence Interval, CI)
總體一致性百分比	132/137 (96.35)	92.69–98.21
陽性一致性百分比	52/54 (96.30)	89.41–98.77
陰性一致性百分比	80/83 (96.39)	91.30–98.55

還評估了另一組不同的樣本，以補充第一項研究得出的資料。採集了 271 份 CRC FFPE 樣本；透過 250 份未知突變狀態的樣本及 21 份已知突變狀態的樣本（用於豐富罕見突變）與雙向 Sanger 定序進行比較，如上所述。

對 247 份具有有效的雙向定序和 本產品結果的樣本進行一致性分析。有 9 份樣本不一致。總一致性為 96.4%。這些資料支持 本產品的準確性（表 10 和表 11）。

表 10：本產品與雙向 Sanger 定序（第二項研究）

		雙向定序的突變檢出									
		陰性	12AL A	12A RG	12A SP	12C YS	12SE R	12V AL	13A SP	總計	
therascreen KRAS RGQ PCR Kit 檢出	陰性	132	-	-	-	-	1	-	-	133	
	陽性 12ALA	-	10	-	-	-	-	-	-	10	
	陽性 12ARG	5	-	-	5	-	-	-	-	10	
	陽性 12ASP	-	-	-	-	31	-	-	-	31	
	陽性 12CYS	1	-	-	-	-	11	-	-	12	
	陽性 12SER	-	-	-	-	-	-	13	-	13	
	陽性 12VAL	2	-	-	-	-	-	25	-	27	
	陽性 13ASP	-	-	-	-	-	-	-	11	11	
	總計	140	10	-	5	31	11	14	25	11	247

表 11：一致性分析（第二項研究）

一致性指標	頻率 (%)	95% 信賴區間 (Confidence Interval, CI)
總體一致性百分比	238/247 (96.36)	93.73–98.09
陽性一致性百分比	106/107 (99.07)	95.64–99.95
陰性一致性百分比	132/140 (94.29)	89.93–97.13

---

## 與參考分析方法進行比較：NSCLC

為了證明 *本產品*與雙向 Sanger 定序這兩種方法在檢測 NSCLC 樣本突變狀態時的一致性，透過切除術、CNB 或 FNA 採集臨床 FFPE NSCLC 樣本。先從每份樣本中萃取 DNA，再使用 *本產品*進行檢測。此檢測的結果與雙向 Sanger 定序得出的結果進行比較。

*本產品*和雙向 Sanger 定序對總共 360 份樣本均得出有效結果，其中 340 份樣本的結果一致。

表 12 顯示 *本產品*與雙向定序之間的一致性。透過雙向 Sanger 定序，有兩份樣本得出雙突變結果。由於其中一種突變與 *本產品*結果一樣，在總體一致性、陽性一致性和陰性一致性分析中，這些樣本歸類為一致（表 13）。

表 12：本產品與雙向 Sanger 定序

		雙向定序的突變檢出								總計	
		陰性	12ALA	12ALA _12CY S	12AR G	12ASP	12CYS	12CYS _12VA L	12VAL		13ASP
therascreen KRAS RGQ PCR Kit 檢出	陰性	261	-	-	-	-	-	-	-	1	262
	陽性 12ALA	1	4	1	-	-	-	-	-	-	6
	陽性 12ARG	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
	陽性 12ASP	4	-	-	-	14	-	-	-	-	18
	陽性 12CYS	6	-	-	-	-	35	-	-	-	41
	陽性 12SER	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	陽性 12VAL	5	-	-	-	-	-	1	17	-	23
	陽性 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	-	4	5
	總計	280	4	1	3	14	35	1	17	5	360

表 13：一致性分析

一致性指標	頻率 (%)	95% 信賴區間 (Confidence Interval · CI)
總體一致性百分比	340/360 (94.44)	92.03 – 96.29
陽性一致性百分比	79/80 (98.75)	94.21 – 99.94
陰性一致性百分比	261/280 (93.21)	90.20 – 95.51

## 檢測極限 (Limit of detection, LOD)

本產品的工作範圍基於檢體中的總體可擴增 DNA 含量，而該 DNA 含量由品管反應  $C_T$  值確定。本檢測規定的輸入範圍是預先指定的品管  $C_T$  範圍 21.92 至 32.00。

LOD 是指當可擴增 DNA 總量在規定的輸入範圍內時，在野生型背景下可檢出的且仍低於臨界  $\Delta C_T$  值的最低突變型 DNA 比例。

### CRC

進行了一項研究以確定本產品所包含 7 種突變專一性反應各自的 LOD。對於 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit，在野生型 DNA 背景下檢測突變 DNA 時的檢測極限是指，在每份突變陽性樣本有 95% 的重複檢測為陽性的前提下最小的稀釋因子。

對每種檢測單獨採用低輸入和高輸入 DNA 資料集建立邏輯斯迴歸模型。在這些模型中，反應變數為「檢測到突變」（檢測 = 1）和「未檢測到突變」（檢測 = 0）的二元輸出，連續解釋變數為  $\log_2$  % 突變稀釋度。LOD 按預測檢出率為 0.95 時的突變稀釋度百分數計算（表 14）。

**表 14：檢測 FFPE 細胞株時每種突變檢測的 LOD 值**

檢測	LOD $C_{95}$ (野生型 DNA 中的突變型 DNA 比例)
12ALA	0.8
12ARG	2.6
12ASP	6.4
12CYS	1.5
12SER	5.6
12VAL	1.6
13ASP	6.4



## NSCLC

已使用 CRC 組織測定並驗證了 本產品檢測的 LOD。這些 LOD 結果被重新驗證是否適用於 NSCLC 組織。

該研究分為 2 部分。在第 1 部分中，將代表每種突變的 7 份突變型 FFPE NSCLC 細胞株的 60 個複製品稀釋至相應檢測的 LOD，並進行檢測。每份被評估樣本的所有 60 個有效的 FFPE 細胞株複製品顯示，在評估後的 LOD 水平下相應突變反應的檢出率為 100%。

在第 2 部分中，將代表 3 種採集方法（切除術、CNB 和 FNA）下每種突變的 96 個臨床 FFPE NSCLC 樣本複製品稀釋至相應檢測的 LOD 並進行檢測。

12ALA、12ASP、12ARG、12VAL 和 13ASP 的 96 個有效複製品顯示 100% 的檢出率。12CYS 和 12SER 的檢測在 LOD 水平下顯示 95.8% 的檢出率。

這表明在評估 NSCLC 組織樣本和臨床 FFPE NSCLC 樣本/FFPE 細胞株/患者匹配樣本時，之前測定的 LOD 值經驗證適用於所有突變檢測。

## DNA 輸入和線性

### DNA 輸入濃度對 $\Delta C_T$ 值的影響

當總 DNA 濃度不同的樣本含有相同比例的突變型 DNA 時，預計測得的  $\Delta C_T$  值保持一致。本研究的目的是證明本產品的性能，在檢測的總 DNA 輸入（品管 CT）範圍內是一致的。使用從 8 個 FFPE 細胞株萃取的 DNA 配製 DNA 混合液，使其具有可達到的最低品管反應  $C_T$ 。隨後稀釋濃縮的 DNA 原液以產生涵蓋工作範圍的 DNA 濃度（總共 5 次稀釋，包括最初的濃縮原液）。

對於工作範圍內的每一點準備足夠的材料進行 6 次重複測試。每種突變反應的稀釋度範圍以及根據結果算出的  $\Delta C_T$  平均值列於表 15 和表 16。在 本產品的整個工作範圍內，所有檢測的全部  $\Delta C_T$  值保持一致，這表明 DNA 濃度不影響樣本突變檢出的準確性。

表 15：在整個品管反應 C<sub>T</sub> 輸入範圍內 DNA 輸入對 ΔC<sub>T</sub> 值的影響 — CRC FFPE 細胞株

檢測	ΔC <sub>T</sub>				
	稀釋 1 ~20 - 21 C <sub>T</sub>	稀釋 2 ~23 - 24 C <sub>T</sub>	稀釋 3 ~26 - 27 C <sub>T</sub>	稀釋 4 ~29 - 30 C <sub>T</sub>	稀釋 5 ~32 - 33 C <sub>T</sub>
12ALA	1.56	1.25	1.16	1.14	1.27
12ASP*	2.46	2.18	2.11	2.11	1.75
12ARG	1.18	0.63	1.08	0.94	1.06
12VAL	0.29	0.25	0.15	0.26	- 0.1
12SER	2.91	2.21	2.15	2.15	2.08
12CYS	0.98	0.71	0.58	0.81	0.67
13ASP	3.57	2.84	2.54	2.46	2.62

\* 12ASP 的複製品總數為 27。

表 16：在整個品管反應 C<sub>T</sub> 輸入範圍內 DNA 輸入對 ΔC<sub>T</sub> 值的影響 — NSCLC FFPE 樣本

檢測	ΔC <sub>T</sub>				
	稀釋 1 ~20 - 21 C <sub>T</sub>	稀釋 2 ~23 - 24 C <sub>T</sub>	稀釋 3 ~26 - 27 C <sub>T</sub>	稀釋 4 ~29 - 30 C <sub>T</sub>	稀釋 5 ~32 - 33 C <sub>T</sub>
12ALA	3.40	3.25	3.11	2.90	3.31
12ASP	3.63	2.92	2.55	2.46	- *
12ARG	2.49	2.22	2.25	2.23	1.40
12VAL	1.70	1.71	1.70	1.77	1.01
12SER	5.34	4.50	4.30	3.92	- *
12CYS	1.34	1.23	1.18	1.13	0.97
13ASP	6.24	5.36	5.14	4.87	- *

\* 由於 DNA 濃度低，沒有突變反應 C<sub>T</sub> 返回，因此沒有計算 ΔC<sub>T</sub>。

## DNA 輸入對線性/擴增效率的影響

在本產品的整個工作範圍內，每種突變反應相比品管反應的 PCR 線性和擴增效率已得到證實。每種突變反應和品管反應的擴增效率的計算方法為  $[10(-1/\text{斜率})] - 1$ 。

品管反應相比突變反應的擴增效率表明， $\Delta C_T$  及突變檢出在本檢測的整個工作範圍內保持一致。資料摘要請參閱表 17 和表 18。

**表 17：品管和突變反應中的擴增效率：CRC 細胞株**

樣本		截距	截距標準誤差	計算斜率	標準誤差 (斜率)	雙側 95% 信賴區間下 限 (斜率)	雙側 95% 信賴區間上 限 (斜率)	擴增效率	擴增效率 差異
12ALA	品管 $C_T$	21.060	0.060	-1.008	0.007	-1.023	-0.993	0.989	0.03
	12ALA $C_T$	22.476	0.103	-0.987	0.013	-1.013	-0.961	1.019	
12ASP	品管 $C_T$	20.825	0.083	-1.035	0.01	-1.056	-1.014	0.954	0.056
	12ASP $C_T$	23.237	0.083	-0.993	0.011	-1.016	-0.97	1.01	
12ARG	品管 $C_T$	20.385	0.13	-1.013	0.16	-1.046	-0.98	0.982	-0.003
	12ARG $C_T$	21.347	0.065	-1.015	0.008	-1.032	-0.999	0.979	
12CYS	品管 $C_T$	23.437	0.063	-0.981	0.01	-1.003	-0.96	1.026	0.032
	12CYS $C_T$	24.289	0.039	-0.961	0.006	-0.974	-0.947	1.058	
12SER	品管 $C_T$	22.568	0.050	-1.003	0.008	-1.02	-0.986	0.996	0.105
	12SER $C_T$	25.212	0.087	-0.934	0.014	-0.963	-0.904	1.101	
12VAL	品管 $C_T$	21.208	0.047	-0.995	0.006	-1.007	-0.983	1.007	0.033
	12VAL $C_T$	21.532	0.043	-0.972	0.005	-0.983	-0.961	1.04	
13ASP	品管 $C_T$	23.207	0.056	-1.001	0.009	-1.02	-0.982	0.999	0.145
	12ASP $C_T$	26.466	0.106	-0.909	0.017	-0.945	-0.873	1.144	

表 18：品管和突變反應中的擴增效率：NSCLC 樣本

樣本	截距	截距標準誤差	計算斜率	標準誤差 (斜率)	雙側 95% 信賴區間下 限 (斜率)	雙側 95% 信賴區間上 限 (斜率)	
12ALA	品管 C <sub>T</sub> 12ALA C <sub>T</sub>	22.74 24.11	0.04 0.16	-0.15 -1.06	0.02 0.07	-0.19 -1.20	-0.11 -0.93
12ASP	品管 C <sub>T</sub> 12ASP C <sub>T</sub>	21.92 24.44	0.03 0.02	-0.07 -0.98	0.01 0.01	-0.09 -0.99	-0.05 -0.96
12ARG	品管 C <sub>T</sub> 12ARG C <sub>T</sub>	21.73 22.69	0.05 0.03	-0.13 -0.97	0.02 0.01	-0.17 -1.00	-0.08 -0.95
12CYS	品管 C <sub>T</sub> 12CYS C <sub>T</sub>	21.73 22.77	0.04 0.03	-0.11 -1.01	0.01 0.01	-0.14 -1.03	-0.08 -0.99
12SER	品管 C <sub>T</sub> 12SER C <sub>T</sub>	23.03 25.34	0.05 0.03	-0.06 -0.97	0.02 0.01	-0.10 -0.99	-0.02 -0.94
12VAL	品管 C <sub>T</sub> 12VAL C <sub>T</sub>	22.13 23.34	0.04 0.08	-0.03 -0.95	0.02 0.03	-0.07 -1.01	0.01 -0.88
13ASP	品管 C <sub>T</sub> 12ASP C <sub>T</sub>	22.63 25.14	0.02 0.07	0.02 -0.94	0.01 0.03	0.001 -1.00	0.04 -0.88

## 突變百分比對線性/擴增效率的影響

該研究的目的是，從大約 22 - 23C<sub>T</sub> 的 C<sub>T</sub> 輸入水平開始，在 本產品的工作範圍內評估連續稀釋突變陽性樣本對擴增效率的影響。

CRC: 在使用 本產品執行 PCR 之前，先根據 OD 讀數評估從 CRC FFPE 細胞株和 NSCLC 樣本中萃取的 DNA。然後將 DNA 原液配製成管反應 C<sub>T</sub> 約為 23C<sub>T</sub> 的溶液。為了在改變模板中的突變型 DNA 百分比的同時維持總野生型 DNA 不變，使用野生型 DNA 連續稀釋原液，每次稀釋兩倍。

每種突變配製足夠 6 個複製品份量的 DNA 混合液。計算每種稀釋水平下每種突變的 C<sub>T</sub> 和 ΔC<sub>T</sub> 資料。以 C<sub>T</sub> 對 log<sub>2</sub> DNA 輸入稀釋度繪製突變反應的線性迴歸模型。該研究顯示，在

恆定野生型 DNA 濃度背景下，突變稀釋不會導致擴增效率顯著變化至超出上述線性研究測定的值。

NSCLC：本研究使用從 9 個 FFPE NSCLC 樣本（4 個細胞株和 5 個臨床樣本）中萃取的 DNA，旨在通過檢測具有不同突變百分比之高輸入濃度 DNA 樣本來評估連續稀釋突變陽性樣本對擴增效率的影響（約 23.00CT 的控制反應）。來自臨床 FFPE NSCLC 和 FFPE 細胞系樣品庫的 DNA 被稀釋至對應於大約 22.00-23.00CT 的品管反應 CT 值的光密度。將突變體 DNA 連續稀釋 2 倍到標準化的野生型 DNA 中，為每個突變體 DNA 樣本創建一系列 5 個稀釋度，突變百分比各不相同（目標為 100%、50%、25%、12.5% 和 6.25% 突變體百分比）。野生型 DNA 相對於樣本中存在的突變體 DNA 的擴增效率不影響  $\Delta$ CT 值，因此不受突變影響。

## 干擾物質

### CRC

本研究的目的是評估潛在干擾物質對本產品性能的影響。評估方法是，透過不同濃度的摻入實驗分析每種物質對檢體  $\Delta$ C<sub>T</sub> 值和突變狀態的影響。測試了以下 DNA 萃取過程潛在干擾物質：Buffer AL、Buffer ATL、乙醇、石蠟、蛋白酶 K、清洗緩衝液 AW1、清洗緩衝液 AW2 和二甲苯。試劑組中的最終洗脫緩衝液（Buffer ATE）也作為空白品管被測試。

在正常使用中預計會遇到的濃度下，被評估的所有潛在干擾物質均不影響本產品在識別突變陽性和突變陰性樣本方面的能力。

除了此干擾物質研究，還評估了臨床樣本中壞疽的潛在影響，以確定腫瘤樣本中高水平的壞疽組織是否影響生成有效資料的能力。在參考分析方法比較研究的總共 421 份樣本中，有 29 份樣本經病理學檢查確定壞疽含量 >50%。在這 29 份樣本中，28 份得出與雙向 Sanger 定序法一致的有效結果。一個結果無效。

## NSCLC

本研究的目的是證明在使用本產品檢測時，潛在干擾物質的存在不會產生任何偽陽性或偽陰性結果。鑑定八 (8) 種來自 DNA 萃取過程的潛在干擾物質：石蠟、二甲苯、乙醇、緩衝液 ATL、蛋白酶 K、緩衝液 AL、緩衝液 AW1 和緩衝液 AW2。每種物質都使用從八種 FFPE 細胞系中萃取的 DNA 進行測試，代表本產品檢測到的七種突變中的每一種，以及野生型樣本。突變樣本的測試濃度相當於檢測限的大約三倍 (3xLoD)。兩種分析物 (突變和野生型樣品) 都加入了三種不同濃度的八種潛在干擾物質：最高預期殘留 (1x)、最高預期殘留 (10x) 和 100 倍最高的預期殘留 (100x)。作為陰性品管，兩種分析物都加入了緩衝液 ATE，即 DNA 萃取過程中的最終洗脫緩衝液。研究表明，從 FFPE DNA 萃取試劑盒中鑑定出的可能會轉移到本產品中的物質在 1x 干擾濃度下對檢測的性能沒有任何不利影響；對於大多數檢測的樣本條件 (64 個條件中的 58 個，在 1x 濃度)，總是給出正確的突變檢測，並且干擾物質的存在對  $\Delta CT$  平均值的差異沒有統計學意義的影響。對於確實顯示出統計學上顯著差異的六個樣本，觀察到的每個樣本平均值的差異在  $\pm 2xSD$  的研究接受標準內 (從再現性研究中獲得的 SD 估計值)。

進行了另一項研究以評估血紅蛋白 (Hb) 對本產品的影響。在這項研究中，使用了具 12ALA、12ASP、12ARG、12VAL、12CYS 和 13ASP 突變的臨床切除樣本。由於突變的罕見性，未評估 12SER 臨床樣本。將臨床 KRAS 野生型 FFPE 樣本納入研究樣本集中，以評估在突變陰性狀態的樣本中的任何潛在干擾。測試樣本中添加了兩種不同濃度的 Hb；最高預期殘留 (0.5x) 和最高預期殘留 (1x) 的一半。建議的檢測濃度 (1x)(2g/L) 來自 CLSI EP07-A2。該研究表明，本產品對 12ASP、12ARG、12VAL、12CYS 和 13ASP 突變的檢測不受潛在干擾物血紅蛋白的影響。然而，當濃度為 0.50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Hb 或更高時，本產品對 12ALA 突變的檢測會受到影響。

## 交叉污染

本研究的目的是確定使用本產品時，DNA 樣本之間的交叉污染程度，這可能導致偽陽性結果。潛在的交叉污染源包括以下方面：

- 樣本萃取 (例如玻片刮削碎屑)
- 樣本移取
- 樣本試管的封閉 (「加蓋」)

- 使用期間試劑組試劑污染
- 將檢測試管加載到 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器

本研究使用了 FFPE 標準品：野生型標準品和 12ALA 標準品（由於 12ALA 反應是本試劑組中 LOD 最低的反應）。

本研究包括 10 輪 PCR 運轉，以分析 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器運轉之內和之間的污染可能性。在這些檢測運轉中，使用裝有野生型 DNA 的試管來檢查突變型 DNA 污染。

本研究的結果顯示，在任何用於檢測交叉污染的野生型 DNA 萃取物中均無可檢出的污染。

## 排他性/交叉反應性

本產品包含 8 種不同的反應：一項單一品管反應，檢測 KRAS 基因的非多狀區域，以及 7 個反應用於檢測突變特定區域。沒有反應專門用於檢測第 12 和 13 號密碼子的野生型 KRAS 序列。當導致陽性突變結果的 7 種突變均不存在時，則生成 KRAS 「No Mutation Detected」（未檢測到突變）結果（即野生型）。

因此，有必要確認非專一性擴增的數量，或者確認在過量 KRAS 野生型 DNA 下每種反應的交叉反應性，以確保無偽陽性結果發生。以類似的方式評估了非檢測靶標 KRAS 突變的非專一性擴增。結果表明在過量野生型 DNA 下，突變反應之間的交叉反應量沒有導致錯誤的突變檢出。由於本檢測的 DNA 輸入基於  $C_T$  範圍 (21.92 – 32.00)，因此最高的 DNA 輸入濃度具有的  $C_T$  值大約為 22。

### 非專一性擴增/交叉反應性：野生型 KRAS DNA

評估了用於擴增特定突變的反應混合液中野生型 DNA 的非專一性擴增量。使用本產品以最高的可擴增 DNA 輸入濃度評估了總共 60 份野生型 FFPE 細胞株 DNA 的複製品以及 60 份 NSCLC 樣本。

品管 C<sub>T</sub> 值大約為 22 – 23。這些結果顯示 ΔC<sub>T</sub> 值超過規定的閾值，且至少 95% 的野生型複製品被正確檢出。

### 非專一性擴增/交叉反應性/排他性：突變陽性 KRAS DNA

針對所有反應混合液測試了高 DNA 輸入濃度的突變樣本。分別使用 CRC 和 NSCLC FFPE 細胞株配製 DNA 樣本，使品管反應 C<sub>T</sub> 大約為 23。從這些稀釋液中，每份突變樣本製作 6 個複製品進行評估。樣本中的突變百分按細胞株 DNA 中的突變百分比算。

表 19 和表 20 中的 ΔC<sub>T</sub> 平均值表明突變反應之間存在交叉反應。在所有檢測中，結果顯示匹配的突變反應檢出正確的突變（即最小的 ΔC<sub>T</sub> 值是正確的突變檢出）。所有其他檢測無檢出或超出 ΔC<sub>T</sub> 閾值。

表 19：使用高輸入範圍的 CRC FFPE 細胞株 DNA 時，突變反應之間的交叉反應性 (ΔC<sub>T</sub>)

突變 DNA 閾值	檢測 ΔC <sub>T</sub>						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
<b>12ALA</b> 8	<b>1.42*</b>	12.66	NA	<b>5.81<sup>†</sup></b>	<b>2.78<sup>†</sup></b>	<b>6.31<sup>†</sup></b>	13.21
<b>12ASP</b> 6.6	12.56	<b>2.42*</b>	NA	NA	13.44	11.21	13.55
<b>12ARG</b> 8	13.12	11.56	<b>1.12*</b>	11.42	NA	13.43	12.66
<b>12CYS</b> 8	14.2	12.48	9.23	<b>0.98*</b>	NA	<b>7.96<sup>†</sup></b>	12.88
<b>12SER</b> 8	NA	13.39	13.31	NA	<b>3.02*</b>	12.99	13.97
<b>12VAL</b> 7.5	<b>6.83<sup>†</sup></b>	NA	NA	NA	13.38	<b>0.28*</b>	13.74
<b>13ASP</b> 7.5	NA	13.29	13.89	NA	NA	14.36	<b>4.5*</b>

NA：無交叉反應。

\* 匹配反應得出的 ΔC<sub>T</sub> 值。

<sup>†</sup> 交叉反應性反應得出之低於閾值的 ΔC<sub>T</sub>。



表 20：使用高輸入範圍的 NSCLC FFPE 細胞株 DNA 時，突變反應之間的交叉反應性 ( $\Delta C_T$ )

突變	DNA 閾值	檢測 $\Delta C_T$						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	<b>1.31*</b>	12.8	NA	<b>5.01<sup>†</sup></b>	<b>2.26<sup>†</sup></b>	<b>5.57<sup>†</sup></b>	12.65
12ASP	6.6	12.61	<b>1.66*</b>	NA	NA	NA	10.3	12.69
12ARG	8	12.98	11.08	<b>0.81*</b>	11.24	NA	12.66	12.62
12CYS	8	NA	12.22	<b>7.84<sup>†</sup></b>	<b>0.56*</b>	NA	13.06	11.84
12SER	8	NA	12.87	13.21	NA	<b>1.93*</b>	13.25	12.93
12VAL	7.5	<b>5.93<sup>†</sup></b>	14.29	NA	NA	13.14	<b>0.45*</b>	12.39
13ASP	7.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<b>2.02*</b>

NA：無交叉反應。

\* 匹配反應得出的  $\Delta C_T$  值。

<sup>†</sup> 交叉反應性反應得出之低於閾值的  $\Delta C_T$ 。

## 重複性和再現性

### CRC

本產品的精密度結合 CLSI EP12-A 和 EP5-A2 計畫書而確定 (21, 22)。本評估採用臨床 CRC 樣本。在 3 個地點，每個地點讓 2 個操作員每天使用 本產品 檢測一份野生型樣本和每種突變的一份樣本，每份樣本使用 3 個批次的本產品進行檢測，共進行 5 天，每天 2 輪運轉，每次運轉之每個樣品重複 2 個。還透過方差成分分析來分析每份樣本中每種反應得出的  $C_T$  和  $\Delta C_T$ 。

驗證了本產品在低濃度突變型 (3x LOD) 和野生型樣本中的再現性，在實驗室之內和實驗室之間多個批次、平台和操作員的所有檢測的正確突變檢出率至少為 39/40。表 21 和表 22 列出了使用 C50 和 3xLOD 樣本顯示的方差估計值 (1x 標準差)。

表 21：方差估計值

Assay	%CV for $\Delta C_T$		%CV for mutant $C_T$		%CV for control $C_T$		
	3xLOD	C50	3xLOD	C50	3xLOD	C50	WT
12ALA	13.14	8.32	1.87	2.02	0.97	1.12	1.12
12ARG	10.79	8.04	1.59	1.96	1.24	1.51	1.15
12ASP	12.86	5.87	1.11	1.00	0.90	0.90	1.04
12CYS	17.61	10.83	1.86	2.02	1.54	1.22	1.15
12SER	13.97	10.43	1.71	2.11	0.94	1.19	1.15
12VAL	9.66	15.47	1.52	1.65	1.11	3.74	1.26
13ASP	13.73	9.35	1.91	2.08	1.11	1.41	1.19

表 22：重複性精密度估計值

Assay	%CV for $\Delta C_T$		%CV for mutant $C_T$		%CV for control $C_T$		
	3xLOD	C50	3xLOD	C50	3xLOD	C50	WT
12ALA	10.71	7.51	1.69	1.76	0.77	0.90	0.79
12ARG	9.83	8.04	1.21	1.76	0.84	1.33	0.90
12ASP	10.16	4.08	0.93	0.89	0.80	0.76	0.76
12CYS	13.15	8.80	1.31	1.76	1.40	1.01	0.76
12SER	6.76	6.18	1.10	1.48	0.80	0.90	0.90
12VAL	9.21	15.32	1.40	1.42	0.91	3.49	0.94
13ASP	8.67	7.01	1.30	1.65	0.91	1.19	0.97

使用 3xLOD 樣本檢測突變體和野生型樣本的估計比例在整體和每個地點內進行了報告。對於所有檢測和樣本組合，80 次重複中至少有 79 次給出了正確的突變調用。整體正確檢出比例為 99.6% (1115/1120)；突變陽性 (3xLOD) 樣本為 99.6% (558/560)，未檢測到突變 (野生型) 樣本為 99.5% (557/560) (表 23)。

表 23：總體正確檢出

突變	正確檢出	
	3xLOD 樣本	野生型樣本 (低)
12ALA	79/80	80/80
12ARG	80/80	79/80
12ASP	80/80	80/80
12CYS	79/80	80/80
12SER	80/80	79/80
12VAL	80/80	79/80
13ASP	80/80	80/80

## NSCLC

評估本產品之實驗室內精密度（重複性）。報告突變結果的正確性和  $\Delta CT$  值的精密度（突變反應和品管反應之間的 CT 值差異）。

共準備 15 個測試組別；KRAS 試劑盒可檢測到的 7 種突變中的每一種（LOD 和 2xLOD），以及一個野生型 (WT) 測試組。突變檢測組由 FFPE 細胞株或臨床樣本為代表(依可得性)。所有樣本以品管 CT 27 進行標準化，突變樣本在野生型 DNA 中稀釋，以產生足夠的材料製備突變濃度為 1x LOD 和 2x LOD 的樣本。

表 24 中顯示了每個檢測組的正確檢出比例、定量精密度顯示在表 25 中。

表 24：正確檢出比例

各檢測組變量		比例		雙側 95% 信賴區間界限	
Sample level	檢測	正確檢出	比率	低	高
2xLOD	12ALA	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12ARG*	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12ASP	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12CYS	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12SER*	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12VAL	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	13ASP*	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
LOD	12ALA	39/40	97.50%	86.84%	99.94%
	12ARG	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12ASP	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12CYS	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12SER*	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12VAL	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	13ASP*	38/40	95.00%	83.08%	99.39%
WT	All	28/28	100.00%	87.66%	100.00%

\* 以 FFPE 細胞株為代表

表 25：以 SD 和 %CV 表示的方差分量 - 可重複性

Analysis variable	Sample level	Assay	# of observations	Mean	Bet. Day*	Bet. Run N*	Bet. Rgt*	Bet. Kit lot*	Bet. Operator*	Residual*	Total
Delta C <sub>T</sub>	2xLOD	12ALA	28	5.54	(0.0000, 0.00%)	(0.1221, 2.20%)	(0.0443, 0.80%)	(0.0385, 0.70%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1335, 2.41%)	(0.1843, 3.33%)
		12ARG	28	4.80	(0.0000, 0.00%)	(0.1891, 3.94%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3244, 6.76%)	(0.3737, 7.79%)
		12ASP	28	4.72	(0.0860, 1.82%)	(0.1446, 3.06%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1463, 3.10%)	(0.1374, 2.91%)	(0.1751, 3.71%)	(0.2797, 5.93%)
		12CYS	28	5.66	(0.0563, 0.99%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0995, 1.76%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0390, 0.69%)	(0.2306, 4.08%)	(0.2498, 4.41%)
		12SER	28	5.36	(0.1429, 2.67%)	(0.0274, 0.51%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0647, 1.21%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1753, 3.27%)	(0.2129, 3.97%)
		12VAL	28	4.26	(0.0000, 0.00%)	(0.1016, 2.39%)	(0.0593, 1.39%)	(0.1128, 2.65%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2095, 4.92%)	(0.2457, 5.77%)
		13ASP	28	5.23	(0.0000, 0.00%)	(0.2892, 5.53%)	(0.0157, 0.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2171, 4.15%)	(0.3575, 6.83%)
LOD	12ALA	40	6.36	(0.0000, 0.00%)	(0.1584, 2.49%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2346, 3.69%)	(0.2819, 4.43%)
	12ARG	40	5.45	(0.0036, 0.07%)	(0.1639, 3.01%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0797, 1.46%)	(0.1674, 3.07%)	(0.2397, 4.40%)	
	12ASP	40	4.73	(0.0000, 0.00%)	(0.2485, 5.25%)	(0.1087, 2.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0816, 1.72%)	(0.1041, 2.20%)	(0.2837, 6.00%)	
	12CYS	40	6.62	(0.1688, 2.55%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2056, 3.11%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2909, 4.40%)	(0.3652, 5.52%)	
	12SER	40	6.37	(0.1006, 1.58%)	(0.3153, 4.95%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0340, 0.53%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2253, 3.54%)	(0.3854, 6.05%)	
	12VAL	40	5.13	(0.2874, 5.60%)	(0.0976, 1.90%)	(0.0227, 0.44%)	(0.0874, 1.71%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1629, 3.18%)	(0.2965, 5.78%)	
	13ASP	38	6.26	(0.3433, 5.48%)	(0.1227, 1.96%)	(0.0778, 1.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3459, 5.52%)	(0.4738, 7.57%)	

\* SD, %CV

Analysis variable	Sample level	Assay	# of observations	Mean	Bei. Day*	Bei. Run N*	Bei. Rgq*	Bei. Kit lot*	Bei. Operator*	Residual*	Total
Green C <sub>T</sub>	2xLOD	12ALA	28	32.09	(0.0000, 0.00%)	(0.1314, 0.41%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0675, 0.21%)	(0.1073, 0.33%)	(0.1158, 0.36%)	(0.1957, 0.61%)
		12ARG	28	31.50	(0.0000, 0.00%)	(0.2598, 0.82%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3324, 1.06%)	(0.4189, 1.33%)
		12ASP	28	31.30	(0.0000, 0.00%)	(0.1891, 0.60%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0920, 0.29%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1800, 0.58%)	(0.2667, 0.85%)
		12CYS	28	32.07	(0.0000, 0.00%)	(0.2523, 0.79%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1606, 0.50%)	(0.2011, 0.63%)	(0.1512, 0.47%)	(0.3388, 1.06%)
		12SER	28	32.06	(0.0000, 0.00%)	(0.2049, 0.64%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1250, 0.39%)	(0.1177, 0.37%)	(0.1263, 0.39%)	(0.2648, 0.83%)
		12VAL	28	30.65	(0.0000, 0.00%)	(0.1772, 0.58%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1198, 0.39%)	(0.1063, 0.35%)	(0.1656, 0.54%)	(0.2639, 0.86%)
		13ASP	28	31.98	(0.0000, 0.00%)	(0.3773, 1.18%)	(0.0497, 0.16%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1813, 0.57%)	(0.4138, 1.29%)
LOD	LOD	12ALA	40	32.86	(0.0000, 0.00%)	(0.2332, 0.71%)	(0.0516, 0.16%)	(0.0840, 0.26%)	(0.1319, 0.40%)	(0.1780, 0.54%)	(0.3144, 0.96%)
		12ARG	40	31.90	(0.0000, 0.00%)	(0.2186, 0.69%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2289, 0.72%)	(0.1519, 0.48%)	(0.3106, 0.97%)
		12ASP	40	31.02	(0.0000, 0.00%)	(0.1762, 0.57%)	(0.1093, 0.35%)	(0.1296, 0.42%)	(0.2492, 0.80%)	(0.1005, 0.32%)	(0.2908, 0.94%)
		12CYS	40	33.14	(0.1216, 0.37%)	(0.0493, 0.15%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3468, 1.05%)	(0.0501, 0.15%)	(0.3155, 0.95%)	(0.4216, 1.27%)
		12SER	40	33.08	(0.0832, 25%)	(0.2591, 0.78%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2424, .73%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2258, 0.68%)	0.3864, 1.17%
		12VAL	40	31.62	(0.2858, 0.90%)	(0.0951, 0.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2244, 0.71%)	(0.0344, 0.11%)	(0.1763, 0.56%)	0.3432, 1.09%
		13ASP	38	33.09	(0.3237, 0.98%)	(0.1009, 0.31%)	(0.1409, 0.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2785, 0.84%)	0.4133,

Analysis variable	Sample level	Assay	# of observations	Mean	Bet. Day*	Bet. Run N*	Bet. Rgq*	Bet. Kit lot*	Bet. Operator*	Residual*	Total
Yellow C <sub>T</sub>	2xLOD	12ALA	28	33.20	(0.0000, 0.00%)	(0.0515, 0.16%)	(0.0330, 0.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0607, 0.18%)	(0.2117, 0.64%)	(0.2235, 0.67%)
		12ARG	28	33.05	(0.1397, 0.42%)	(0.1321, 0.40%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2393, 0.72%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3792, 1.15%)	(0.4559, 1.38%)
		12ASP	28	33.00	(0.0597, 0.18%)	(0.2131, 0.65%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1313, 0.40%)	(0.1954, 0.59%)	(0.3059, 0.93%)
		12CYS	28	33.19	(0.0646, 0.19%)	(0.0971, 0.29%)	(0.0233, 0.07%)	(0.0679, 0.20%)	(0.0863, 0.26%)	(0.1943, 0.59%)	(0.2378, 0.72%)
		12SER	28	32.85	(0.0525, 0.16%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0337, 0.10%)	(0.0937, 0.29%)	(0.1320, 0.40%)	(0.1588, 0.48%)
		12VAL	28	33.11	(0.0000, 0.00%)	(0.1026, 0.31%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1469, 0.44%)	(0.1469, 0.44%)	(0.2912, 0.88%)	(0.3458, 1.04%)
		13ASP	28	33.03	(0.0000, 0.00%)	(0.1928, 0.58%)	(0.1015, 0.31%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1450, 0.44%)	(0.2493, 0.75%)
	LOD	12ALA	40	33.37	(0.0000, 0.00%)	(0.2010, 0.60%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1942, 0.58%)	(0.2177, 0.65%)	(0.3257, 0.98%)
		12ARG	40	33.14	(0.0000, 0.00%)	(0.2168, 0.65%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3061, 0.92%)	(0.1637, 0.49%)	(0.1748, 0.53%)	(0.3717, 1.12%)
		12ASP	40	32.98	(0.0000, 0.00%)	(0.2599, 0.79%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1735, 0.53%)	(0.2228, 0.68%)	(0.3618, 1.10%)
		12CYS	40	33.31	(0.0000, 0.00%)	(0.2028, 0.61%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1209, 0.36%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2132, 0.64%)	(0.3050, 0.92%)
		12SER	40	33.08	(0.1254, 0.38%)	(0.2847, 0.86%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1505, 0.46%)	(0.3263, 0.99%)
		12VAL	40	33.29	(0.3133, 0.94%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2621, 0.79%)	(0.3574, 1.07%)
13ASP	40	33.13	(0.1101, 0.33%)	(0.1326, 0.40%)	(0.1666, 0.50%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1925, 0.58%)	(0.2804, 0.85%)		

Analysis variable	Sample level		# of observations	Mean	Bet. Day*	Bet. Run N*	Bet. Rgq*	Bet. Kit lot*	Bet. Operator*	Residual*	Total
	WT	Assay									
Yellow C <sub>T</sub>	WT	12ALA	28	33.41	(0.1443, 0.43%)	(0.1997, 0.60%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2269, 0.68%)	(0.3248, 0.97%)
		12ARG	28	33.30	(0.0875, 0.26%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.4098, 1.23%)	(0.0904, 0.27%)	(0.2368, 0.71%)	(0.3983, 1.20%)
		12ASP	28	33.12	(0.1591, 0.48%)	(0.1748, 0.53%)	(0.0477, 0.14%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2131, 0.64%)	(0.3075, 0.93%)
		12CYS	28	33.42	(0.0000, 0.00%)	(0.2009, 0.60%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1444, 0.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2121, 0.63%)	(0.3077, 0.92%)
		12SER	28	33.22	(0.2485, 0.75%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0633, 0.19%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1497, 0.45%)	(0.2517, 0.76%)
		12VAL	28	33.35	(0.0000, 0.00%)	(0.2591, 0.78%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1429, 0.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2721, 0.82%)	(0.3863, 1.16%)
		13ASP	28	33.45	(0.0000, 0.00%)	(0.1194, 0.36%)	(0.0526, 0.16%)	(0.0341, 0.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1651, 0.49%)	(0.2078, 0.62%)

\* SD, %CV

評估本產品實驗室間的精密度（重現性）。使用了三個不同的實驗室（測試地點）。本研究使用與重複性研究相同的測試組別。在每個地點，實驗室條件因 RGQ 儀器、操作員、KRAS 套件批次而異，每天運行一次，每個地點在 22 天不連續的時間內總共運行 88 次。

正確突變檢出的比例見表 26。定量精密度值見表 26。本產品的總再現性見表 27 的 #Total (SD, CV%) 列。



表 26：所有地點正確檢出比例

Grouping variables		Proportion		Two-sided 95% confidence limit	
Sample level	Assay	Fraction	Percentage	Lower	Upper
2xLOD	12ALA	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12ARG*	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12ASP	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12CYS	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12SER*	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12VAL	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	13ASP*	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
LOD	12ALA	118/120	98.33%	94.11%	99.80%
	12ARG	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	12ASP	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	12CYS	119/120	99.17%	95.44%	99.98%
	12SER*	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	12VAL	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	13ASP*	118/120	98.33%	94.11%	99.80%
WT	All	82/84	97.62%	91.66%	99.71%

\*以 FFPE 細胞株為代表

表 27：以 SD 和 %CV 表示的方差分量 - 再現性

Analysis variable	Sample level	Assay	# of observations	Mean	Bet. site*	Bet. Day*	Bet. Run N*	Bet. Rpt*	Bet. Kit lot*	Bet. Operator*	Residual	Total
Delta Ct	2xLOD	12ALA	84	5.48	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1669, 3.05%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1287, 2.35%)	(0.1679, 3.07%)	(0.2640, 4.82%)
		12ARG	84	4.81	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1172, 2.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2729, 5.67%)	(0.2967, 6.16%)
		12ASP	84	4.57	(0.0000, 0.00%)	(0.0943, 2.06%)	(0.1457, 3.19%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0600, 1.31%)	(0.1718, 3.76%)	(0.1565, 3.43%)	(0.2854, 6.25%)
		12CYS	84	5.61	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2060, 3.67%)	(0.0264, 0.47%)	(0.0698, 1.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1671, 2.98%)	(0.2728, 4.87%)
		12SER	84	5.34	(0.0000, 0.00%)	(0.1362, 2.55%)	(0.1669, 3.13%)	(0.1527, 2.86%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2020, 3.79%)	(0.2382, 4.46%)	(0.3902, 7.31%)
		12VAL	84	4.13	(0.0874, 2.11%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1677, 4.06%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0869, 2.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2711, 6.56%)	(0.3359, 8.12%)
		13ASP	84	5.22	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2161, 4.14%)	(0.2712, 5.20%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1930, 3.70%)	(0.2275, 4.36%)	(0.4279, 8.20%)
	LOD	12ALA	119	6.33	(0.0000, 0.00%)	(0.0410, 0.65%)	(0.1207, 1.91%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0247, 0.39%)	(0.2640, 4.17%)	(0.2936, 4.64%)
		12ARG	120	5.42	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1797, 3.31%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1872, 3.45%)	(0.2590, 4.78%)
		12ASP	120	4.66	(0.1183, 2.54%)	(0.0646, 1.38%)	(0.2121, 4.55%)	(0.0261, 0.56%)	(0.0217, 0.46%)	(0.0440, 0.94%)	(0.1455, 3.12%)	(0.2862, 6.14%)
		12CYS	120	6.54	(0.0000, 0.00%)	(0.0132, 0.20%)	(0.1775, 2.72%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1621, 2.48%)	(0.1708, 2.61%)	(0.4202, 6.43%)	(0.4981, 7.62%)
		12SER	120	6.28	(0.0000, 0.00%)	(0.0824, 1.31%)	(0.2271, 3.62%)	(0.0775, 1.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2383, 3.80%)	(0.3164, 5.04%)	(0.4570, 7.28%)
		12VAL	120	5.05	(0.0315, 0.62%)	(0.1648, 3.26%)	(0.0955, 1.89%)	(0.0703, 1.39%)	(0.0320, 0.63%)	(0.0795, 1.57%)	(0.2120, 4.20%)	(0.2965, 5.87%)
		13ASP	118	6.17	(0.0000, 0.00%)	(0.1673, 2.71%)	(0.1987, 3.22%)	(0.2332, 3.78%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0843, 1.37%)	(0.3075, 4.99%)	(0.4488, 7.28%)

\* SD, %CV

表格接下頁

Analysis variable	Sample level	Assay	# of observations	Mean	Bet. site*	Bet. Day*	Bet. Run N*	Bet. Rgq*	Bet. Kit lot*	Bet. Operator*	Residual	Total
Green C <sub>t</sub>	2xLOD	12ALA	84	32.1 3	(0.1578, 0.49%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2509, 0.78%)	(0.0745, 0.23%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1249, 0.39%)	(0.1362, 0.42%)	(0.3390, 1.06%)
		12ARG	84	31.6 1	(0.0882, 0.26%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2430, 0.77%)	(0.1339, 0.42%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2604, 0.82%)	(0.3828, 1.21%)
		12ASP	84	31.2 4	(0.1655, 0.53%)	(0.0391, 0.13%)	(0.2178, 0.70%)	(0.0600, 0.19%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2052, 0.66%)	(0.1426, 0.46%)	(0.3542, 1.13%)
		12CYS	84	32.1 5	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2836, 0.88%)	(0.0852, 0.26%)	(0.0940, 0.29%)	(0.1658, 0.52%)	(0.1318, 0.41%)	(0.3636, 1.13%)
		12SER	84	32.1 4	(0.1457, 0.45%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2659, 0.83%)	(0.1807, 0.56%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2715, 0.84%)	(0.1783, 0.55%)	(0.4554, 1.42%)
		12VAL	84	30.6 9	(0.0646, 0.21%)	(0.0480, 0.16%)	(0.2124, 0.69%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1031, 0.34%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2000, 0.65%)	(0.3143, 1.02%)
		13ASP	84	32.1 2	(0.2111, 0.66%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3218, 1.00%)	(0.2966, 0.92%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1743, 0.54%)	(0.1980, 0.62%)	(0.5184, 1.61%)
	LOD	12ALA	119	32.9 3	(0.0000, 0.00%)	(0.1524, 0.46%)	(0.1821, 0.55%)	(0.1048, 0.32%)	(0.0757, 0.23%)	(0.1007, 0.31%)	(0.2526, 0.77%)	(0.3721, 1.13%)
		12ARG	120	31.9 8	(0.0000, 0.00%)	(0.0743, 0.23%)	(0.1936, 0.61%)	(0.1262, 0.39%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1332, 0.42%)	(0.1619, 0.51%)	(0.3096, 0.97%)
		12ASP	120	31.0 6	(0.1880, 0.61%)	(0.1184, 0.38%)	(0.1681, 0.54%)	(0.1033, 0.33%)	(0.1171, 0.38%)	(0.1481, 0.48%)	(0.1333, 0.43%)	(0.3511, 1.13%)
		12CYS	120	33.1 9	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2513, 0.76%)	(0.0776, 0.23%)	(0.2128, 0.64%)	(0.1427, 0.43%)	(0.2712, 0.82%)	(0.4401, 1.33%)
		12SER	120	33.1 3	(0.2194, 0.66%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2433, 0.73%)	(0.1263, 0.38%)	(0.1470, 0.44%)	(0.1973, 0.60%)	(0.2052, 0.62%)	(0.4437, 1.34%)
		12VAL	120	31.6 5	(0.0000, 0.00%)	(0.1254, 0.40%)	(0.1645, 0.52%)	(0.1307, 0.41%)	(0.1271, 0.40%)	(0.0976, 0.31%)	(0.1792, 0.57%)	(0.3159, 1.00%)
		13ASP	118	33.0 8	(0.0000, 0.00%)	(0.1789, 0.54%)	(0.1661, 0.50%)	(0.3569, 1.08%)	(0.0649, 0.20%)	(0.1565, 0.47%)	(0.2588, 0.78%)	(0.4894, 1.48%)

\* SD, %CV

表格接下頁

Analysis variable	Sample level	Assay	# of observations	Mean	Bet. site*	Bet. Day*	Bet. Run N*	Bet. Rgq*	Bet. Kllol*	Bet. Operator*	Residual	Total
Yellow C <sub>1</sub>	2xLOD	12ALA	84	<b>33.2</b> 5	(0.0706, 0.21%)	(0.0399, 0.12%)	(0.1314, 0.40%)	(0.1303, 0.39%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1124, 0.34%)	(0.1913, 0.58%)	(0.2883, 0.87%)
		12ARG	84	<b>33.0</b> 7	(0.0000, 0.00%)	(0.1406, 0.43%)	(0.1353, 0.41%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2024, 0.61%)	(0.1262, 0.38%)	(0.2831, 0.86%)	(0.4016, 1.21%)
		12ASP	84	<b>32.9</b> 8	(0.0000, 0.00%)	(0.0480, 0.15%)	(0.1706, 0.52%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0797, 0.24%)	(0.1795, 0.54%)	(0.2616, 0.79%)
		12CYS	84	<b>33.2</b> 0	(0.0000, 0.00%)	(0.0976, 0.29%)	(0.1781, 0.54%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1454, 0.44%)	(0.1723, 0.52%)	(0.2939, 0.89%)
		12SER	84	<b>32.9</b> 1	(0.0000, 0.00%)	(0.1101, 0.33%)	(0.0549, 0.17%)	(0.0669, 0.20%)	(0.0677, 0.21%)	(0.1186, 0.36%)	(0.2274, 0.69%)	(0.2916, 0.89%)
		12VAL	84	<b>33.1</b> 7	(0.0688, 0.21%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1896, 0.57%)	(0.0937, 0.28%)	(0.1140, 0.34%)	(0.1311, 0.40%)	(0.2605, 0.79%)	(0.3768, 1.14%)
		13ASP	84	<b>33.1</b> 0	(0.0000, 0.00%)	(0.0482, 0.15%)	(0.2035, 0.61%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0466, 0.14%)	(0.1460, 0.44%)	(0.1688, 0.51%)	(0.3019, 0.91%)
	LOD	12ALA	119	<b>33.3</b> 3	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2108, 0.63%)	(0.0820, 0.25%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1443, 0.43%)	(0.2253, 0.68%)	(0.3411, 1.02%)
		12ARG	120	<b>33.1</b> 5	(0.1092, 0.33%)	(0.0537, 0.16%)	(0.1605, 0.48%)	(0.0507, 0.15%)	(0.2157, 0.65%)	(0.1276, 0.39%)	(0.2180, 0.66%)	(0.3749, 1.13%)
		12ASP	120	<b>32.9</b> 6	(0.0000, 0.00%)	(0.0832, 0.25%)	(0.2022, 0.61%)	(0.0864, 0.26%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1117, 0.34%)	(0.2223, 0.67%)	(0.3343, 1.01%)
		12CYS	120	<b>33.2</b> 6	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2232, 0.67%)	(0.1691, 0.51%)	(0.0789, 0.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2097, 0.63%)	(0.3516, 1.06%)
		12SER	120	<b>33.0</b> 1	(0.1573, 0.48%)	(0.0716, 0.22%)	(0.2134, 0.65%)	(0.0951, 0.29%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0784, 0.24%)	(0.1689, 0.51%)	(0.3263, 0.99%)
		12VAL	120	<b>33.2</b> 5	(0.1519, 0.46%)	(0.1960, 0.59%)	(0.1272, 0.38%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1298, 0.39%)	(0.0553, 0.17%)	(0.2162, 0.65%)	(0.3487, 1.05%)
		13ASP	118	<b>33.1</b> 6	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1768, 0.53%)	(0.0998, 0.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1973, 0.59%)	(0.2802, 0.84%)

\* SD, %CV

表格接下頁

Analysis variable	Sample level	Assay	# of observations	Mean	Bet. site*	Bet. Day*	Bet. Run N*	Bet. Rgq*	Bet. Kit lot*	Bet. Operator*	Residual	Total
Yellow Cr	WT	12ALA	84	33.4 4	(0.1257, 0.38%)	(0.0961, 0.29%)	(0.1845, 0.55%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2083, 0.62%)	(0.3104, 0.93%)
		12ARG	84	33.3 7	(0.1191, 0.36%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1869, 0.56%)	(0.1321, 0.40%)	(0.2529, 0.76%)	(0.1205, 0.36%)	(0.2132, 0.64%)	(0.4217, 1.26%)
		12ASP	84	33.1 6	(0.0574, 0.17%)	(0.0738, 0.22%)	(0.2162, 0.65%)	(0.0563, 0.17%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1844, 0.56%)	(0.2997, 0.90%)
		12CYS	84	33.4 2	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1964, 0.59%)	(0.0720, 0.22%)	(0.1311, 0.39%)	(0.0262, 0.08%)	(0.2258, 0.68%)	(0.3287, 0.98%)
		12SER	84	33.2 0	(0.0812, 0.24%)	(0.1331, 0.40%)	(0.1734, 0.52%)	(0.0329, 0.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2009, 0.61%)	(0.1923, 0.58%)	(0.3535, 1.06%)
		12VAL	84	33.4 1	(0.0000, 0.00%)	(0.0695, 0.21%)	(0.2046, 0.61%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1708, 0.51%)	(0.1437, 0.43%)	(0.2339, 0.70%)	(0.3799, 1.14%)
		13ASP	84	33.4 6	(0.0000, 0.00%)	(0.0613, 0.18%)	(0.1802, 0.54%)	(0.0744, 0.22%)	(0.0073, 0.02%)	(0.0969, 0.29%)	(0.1790, 0.53%)	(0.2816, 0.84%)

## 樣本處理差異性

該研究的目的是評估樣本處理差異性（特別是 DNA 萃取）對本產品的影響。該研究透過分析樣本處理差異性來對重複性和再現性研究進行補充，分析方法是在 3 個中心處理相同的臨床 FFPE 切片和 FFPE 細胞株切片，隨後用本產品進行檢測。

## CRC

從 10 個 FFPE CRC 樣本（3 個野生型及每種突變各 1 個）各切取三十個連續的 5 μm 切片。將每個切片隨機分配到其中 1 個檢測中心（共 3 個），每個中心收到每個 FFPE 樣本的 10 個切片（總共 100 個切片）。在檢測的 300 個 DNA 萃取物中，298 個樣本有效。3 個中心之間的 KRAS 突變檢出的一致性達到 99.33%。

按中心對突變型和野生型樣本的  $\Delta$ CT 平均值進行的比較顯示出非常接近的結果一致性。結果證明與本產品搭配的 DNA 萃取程序和樣本處理一致。

## NSCLC

該研究中使用了 13 個臨床 NSCLC 樣本（3 個 12ASP、3 個 12CYS、4 個 12VAL 和 3 個野生型）及 4 個 FFPE 細胞株樣本（12ALA、12ARG、12SER 和 13ASP）。這些樣本代表不同的採集方法：外科切除、FNA 和 CNB。細胞株用於代表臨床 NSCLC 組織不可用時的罕見突變。

然後將三批（每批 20 個）FFPE 切片隨機分配到 3 個中心。在 3 個中心各對每種突變和野生型的一批 20 個 FFPE 切片（10 對）進行 DNA 萃取。

使用 *本產品* 對 3 個檢測中心的所有樣本製備物進行檢測後，發現 7 個突變和野生型樣本均具有正確的突變檢出。7 個突變和野生型樣本的總體檢出率均為 100%，證明了使用 *本產品* 進行的 DNA 萃取和突變檢測的中心間一致性。

使用代表 12ALA、12ARG、12SER 和 13ASP 突變的臨床 FFPE NSCLC 樣本進行了額外的樣本處理研究，因為之前的研究使用了代表這些突變的細胞株樣本。這項額外的研究遵循與先前研究相同的研究設計。由三個獨立的測試地點萃取 12ALA、12ARG 和 13ASP 突變樣本以製備樣本，使用 KRAS 試劑盒測試時提供了正確的突變檢出。這些樣本的整體正確率是 100%。三個單獨的測試地點，12SER 突變的樣本製備提供了 28/30 的正確突變檢測率（正確檢出的百分比等於 93.33%）。結果證明了用於使用 *therascreen KRAS RGQ PCR* 試劑盒進行測試的 DNA 萃取程序和樣本處理工作流程的一致性。

## 樣本採集方法的等效性（僅 NSCLC）

該研究的目的是評估樣本採集方法是否會影響透過 *本產品* 對 NSCLC 樣本的突變檢出。該研究中評被 3 種樣本採集方法為切除術、FNA 和 CNB。

對於該研究，「與患者匹配的」CNB 和 FNA 樣本來源於外科切除的腫瘤樣本，以使相同的腫瘤能夠透過 3 種採集方法採集。使用 *本產品* 萃取和檢測每個樣本。

---

每個樣本均使用 KRAS 品管檢測進行萃取和檢測。產生有效結果的每個樣本（169 個切除樣本、169 個 CNB 樣本和 164 個 FNA 樣本）均使用所有 8 種 KRAS 檢測進行檢測。

主要分析基於跨採集類型檢測到的特定突變。整體一致率、陽性一致率和陰性一致率是以成對比較的雙邊 95% 信賴區間計算而得（表 28）。

表 28 樣本採集方法間之一致率

比較	一致率	頻率	百分比(%)	雙側 95% 信賴區間界 限下限	雙側 95% 信賴區間界 限上限
CNB Vs FNA with CNB as Reference	整體一致率	148/156	94.87	90.15	97.76
	陽性一致率	29/35	82.86	66.35	93.44
	陰性一致率	119/121	98.35	94.16	99.80
CNB Vs RES with CNB as Reference	整體一致率	153/161	95.03	90.44	97.83
	陽性一致率	31/37	83.78	67.99	93.81
	陰性一致率	122/124	98.39	94.30	99.80
FNA Vs CNB with FNA as Reference	整體一致率	148/156	94.87	90.15	97.76
	陽性一致率	29/32	90.63	74.98	98.02
	陰性一致率	119/124	95.97	90.84	98.68
FNA Vs RES with FNA as Reference	整體一致率	152/156	97.44	93.57	99.30
	陽性一致率	30/32	93.75	79.19	99.23
	陰性一致率	122/124	98.39	94.30	99.80
RES Vs. CNB with RES as Reference	整體一致率	153/161	95.03	90.44	97.83
	陽性一致率	31/34	91.18	76.32	98.14
	陰性一致率	122/127	96.06	91.05	98.71
RES Vs. FNA with RES as Reference	整體一致率	152/156	97.44	93.57	99.30
	陽性一致率	30/32	93.75	79.19	99.23
	陰性一致率	122/124	98.39	94.30	99.80



---

此外，還進行了 Passing-Bablok 和 Deming 回歸分析，比較了不同樣本採集方法之間的 CT 和  $\Delta$ CT 值。回歸分析表明，沒有證據表明 RES、CNB 和 FNA 樣本類型在 CT 或  $\Delta$ CT 方面存在任何固定或成比例的差異。亦進行了線性回歸分析以研究壞疽組織和腫瘤組織的百分比對相關  $\Delta$ CT 值的影響。壞疽和腫瘤百分比與  $\Delta$ CT 的回歸線的斜率表明，沒有證據顯示  $\Delta$ CT 值隨著百分比或壞疽或腫瘤組織值的增加而存在任何有意義的差異。

# 臨床性能

進行了臨床性能試驗，以證實本產品作為伴隨診斷測試的臨床有效性，輔助識別適合接受 sotorasib 治療的 NSCLC 患者。本研究的目的是評估由本產品確認的 G12C 突變狀態，是否能用來選擇可能受益於 sotorasib 治療的晚期 NSCLC 患者。臨床試驗 20170543 是一項已完成的開放性、多中心、第 1/2 期試驗，設計用於評估 sotorasib 對攜帶 KRAS G12C 突變之晚期實體腫瘤成人受試者的療效和安全性。本試驗 NSCLC 第 2 期部分主要分析的資料，已用於支持本產品作為伴隨診斷測試的臨床有效性。根據當地實驗室的評估結果，納入條件限制於患有 KRAS G12C 突變的 NSCLC 患者，並經中央實驗室使用本產品檢測確認。

本試驗 NSCLC 第 2 期部分的主要評估指標為評估腫瘤客觀反應率 (Objective Response Rate, ORR)，評估方法採用實體腫瘤治療反應評估標準 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST) 第 1.1 版，作為對 KRAS G12C 突變晚期腫瘤受試者使用 sotorasib 單一療法的判斷標準。

總計有 126 位 NSCLC 受試者，其中 123 位納入全分析資料集。根據盲性獨立中央審查 (Blinded Independent Centralized Review, BICR)，3 位受試者由於沒有  $\geq 1$  個可測量的病灶而從試驗中排除。KRAS G12C 突變 NSCLC 受試者接受電腦斷層掃描或核磁共振造影測量，並由 BICR 實驗室根據 RECIST 1.1 進行評估，主要評估指標 ORR (完全反應 + 部分反應) 為 37.4% (123 位受試者中有 46 位；95% CI：28.84, 46.58)；2 位受試者 (1.6%) 達到完全反應，44 位受試者 (35.8%) 達到部分反應。

# 參考資料

## 引用參考資料

1. Hilger , R.A. , et al. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25 , 511.
2. Bachireddy , P. , et al. (2005) Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* 11 , 4278.
3. Han , S.-W. et al. (2006) Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation , K-ras mutation , and AKT phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* 12 , 2538.
4. Pao , W. et al. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Medicine* 2 , 57.
5. Newton , C.R. et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17 , 2503.
6. Whitcombe , D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17 , 804.
7. Catalog of Somatic Mutations in Cancer: [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline. CLSI Document EP17-A*. Wayne , PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

## Useful references

- Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.
- Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.
- Bokemeyer, C. et al. (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).
- Chaff, J.E. et al. (2013) Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1084.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.
- De Roock, W. et al. (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* **19**, 508.
- Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.

- Dingemans , A.M. et al. (2013) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated , advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. Clin. Cancer Res. **3** , 743.
- Finocchiaro , G. et al. (2007) EGFR , HER2 , and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. J. Clin. Oncol. **25** , 4021.
- Jänne , P.A. et al. (2013) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised , multicentre , placebo-controlled , phase 2 study. Lancet Oncol. **1** , 38.
- Karapetis C. et al. (2008) KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27 , 2008.
- Khambata-Ford , S. et al. (2007) Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. J. Clin. Oncol. **25** , 3230.
- Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J. Clin. Oncol. **26** , 374.
- Lievre , A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res. **66** , 3992.
- Reckamp , K.L. et al. (2014) A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804) , an oral , irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor , in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. Cancer. 120 , 1145.
- Tejpar , S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC) , treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab

---

(q1w): The EVEREST experience (preliminary data). J. Clin. Oncol. **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).

- Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. Nucleic Acids Res. **28**, 3752.
- Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. J Clin Oncol. **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

# 疑難排解指南

本故障排除指南可能有助於解決可能出現的任何問題。如需技術幫助和更多信息，請訪問我們的技術支持中心，網址為 [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)（有關聯繫信息，請訪問 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)）。

## 說明與建議

---

### 無效結果

- |                                             |                                     |
|---------------------------------------------|-------------------------------------|
| a) 單個或多個試劑成分的儲存條件與「試劑儲存與處理」的說明不一致。          | 檢查試劑的儲存條件和保存期限（參見標籤），如有必要，使用新的試劑組。  |
| b) <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit 已過期。 | 檢查試劑的儲存條件和保存期限（參見試劑組標籤），必要時使用新的試劑組。 |

### NTC 樣本在 FAM 通道中顯示陽性結果。

- |               |                                                                   |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|
| PCR 準備期間發生污染。 | 使用新的試劑進行二重複 PCR。<br>如果可能，在加入待檢測樣本後直接蓋上 PCR 試管。<br>工作區和儀器務必定期清潔消毒。 |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|

## 由 *therascreen* KRAS Assay Package 軟體生成的標幟

29 列出了 *therascreen* KRAS Assay Package 軟體可能生成的標幟及其含義，以及要採取的措施。

**表 29：therascreen KRAS Assay Package 標幟及其含義，以及要採取的措施**

標幟	含義	採取的措施
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR 運轉無效 — 品管反應中的陽性品管組 FAM CT 超出範圍。	重複整個 PCR 運轉。
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR 運轉無效 — 陽性品管組（突變反應混合液）中的螢光資料無法判讀。	重複整個 PCR 運轉。
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR 運轉無效 — 陰性品管組的內部品管劑高於範圍。	重複整個 PCR 運轉。
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR 運轉無效 — 陰性品管組的內部品管劑低於範圍。	重複整個 PCR 運轉。
NTC_INVALID_CT	PCR 運轉無效 — 陰性品管組的 FAM 無效（小於極限）。	重複整個 PCR 運轉。
NTC_INVALID_DATA	PCR 運轉無效 — 陰性品管組的螢光資料無法判讀。	重複整個 PCR 運轉。
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	樣本無效 — 樣本品管中的螢光資料無法判讀。	設置新的 PCR 運轉以重複檢測相關樣本。
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	樣本無效 — 樣本品管中的 FAM C <sub>T</sub> 過低。	稀釋樣本以增加 C <sub>T</sub> 值。此稀釋應當根據以下假設進行計算：用試劑組中提供的水 1:1 稀釋將使 C <sub>T</sub> 增加 1.0；樣本稀釋後，設置新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。
SAMPLE_CTRL_FAIL	樣本無效 — 樣本品管反應中的 FAM C <sub>T</sub> 過高。	建立新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中萃取樣本 ( $\geq 4$ sections)。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，不應進行進一步的檢測。



表 30 列出針對 NSCLC 檢體，therascreen KRAS Assay Package 軟體可能生成的標幟及其含義，以及要採取的措施。

**表 30：針對 NSCLC 檢體 Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package 標幟及其含義，以及要採取的措施**

標幟	含意	採取的措施
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	內部品管劑 (HEX) C <sub>T</sub> 過高 (或無 C <sub>T</sub> )，FAM 通道突變陰性。	建立新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，並且不應進行進一步的檢測。
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	突變管無效 - C <sub>T</sub> HEX 對樣本太低 (內部品管)	建立新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，並且不應進行進一步的檢測。
SAMPLE_INVALID_DATA	突變管無效 — 內部品管劑中的螢光資料無法判讀。	建立新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，並且不應進行進一步的檢測。
MUTATION_EARLY_CT	突變試管無效 — 樣本 C <sub>T</sub> FAM 過低。	建立新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，並且不應進行進一步的檢測。
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	樣本的一個或多個突變為有效及陽性；同時，相同樣本的一個或多個突變無效 (警告，非錯誤)。	建立新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，並且不應進行進一步的檢測。

表 31 列出針對 CRC 檢體，therascreen KRAS Assay Package 軟體可能生成的標幟及其含義，以及要採取的措施。

**表 31：針對 CRC 檢體 Rotor-Gene Q therascreen KRAS Assay Package 標幟及其含義，以及要採取的措施**

標幟	含意	採取的措施
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	內部品管劑 (HEX) C <sub>T</sub> 過高 (或無 C <sub>T</sub> )，FAM 通道突變陰性。	如果樣本具有有效的狀態 — 無需採取措施。 如果樣本具有無效的狀態，則設置新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，並且不應進行進一步的檢測。
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	突變管無效 - C <sub>T</sub> HEX 對樣本太低 (內部品管)	如果樣本具有有效的狀態 — 無需採取措施。 如果樣本具有無效的狀態，則設置新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，並且不應進行進一步的檢測。
SAMPLE_INVALID_DATA	突變管無效 — 內部品管劑中的螢光資料無法判讀。	如果樣本具有有效的狀態 — 無需採取措施。 如果樣本具有無效的狀態，則設置新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，並且不應進行進一步的檢測。
MUTATION_EARLY_CT	突變試管無效 — 樣本 C <sub>T</sub> FAM 過低。	如果樣本具有有效的狀態 — 無需採取措施。 如果樣本具有無效的狀態，則設置新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，並且不應進行進一步的檢測。
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	樣本的一個或多個突變為有效及陽性；同時，相同樣本的一個或多個突變無效 (警告，非錯誤)。	無。

# 符號

使用說明或包裝及標籤上，可能會出現以下符號：

## 符號

## 符號定義



<N>

含有足夠進行 <N> 次反應的試劑



保存期限



體外診斷醫療器材



產品編號



批號



材料編號（即，元件標籤）



內含物



數量

Rn

R 是表示使用說明的修訂版，而 n 是修訂版號



溫度限制



製造業者



參閱使用說明



警告/警示

---

## 聯絡資訊

有關技術協助和更多資訊，請瀏覽我們的技術支援中心（[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)）、撥打 00800-22-44-6000 或者聯絡 QIAGEN 技術服務部門或當地的經銷商（請參閱封底或瀏覽 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)）。

# 附錄 A：therascreen KRAS RGQ PCR Kit 手動操作程序

本部分包含關於在開放模式（即不使用 KRAS Assay Package 軟體）下將 *therascreen* KRAS RQG PCR Kit 與 RGQ 軟體版本 2.3 搭配使用的說明。

## 一般資訊

- 有關所需的材料，請參閱「需要但並未提供的材料」。
- 有關樣本製備和樣本佈局的完整說明，請參閱章節「操作程序：DNA 樣本評估」和「操作程序：KRAS 突變檢測」。

## 操作程序：建立溫度曲線

在開始前，為 KRAS 分析建立溫度曲線。樣本評估和突變評估的循環參數相同。

## 程序

循環參數顯示在表 32 中。

**表 32：循環參數**

循環	溫度	時間	資料擷取
1	95°C	15 分鐘	無
40	95°C	30 秒	無
	60°C	60 秒	綠色和黃色

1. 在連接到 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器的筆記型電腦，按兩下桌面的 Rotor-Gene Q 系列軟體 2.3 軟體圖示。在顯示的「New Run」（新運轉）視窗中選擇「Advanced」（進階）標籤。

2. 如需建立新模板，按一下「Empty Run」（空運轉），然後按一下「New」（新增）以進入「New Run Wizard」（新運轉精靈）。
3. 選擇「72-Well Rotor」（72 孔轉子）作為轉子類型。確認密封圈已連接，然後勾選「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊。按一下「Next」（下一步）（圖 21）。

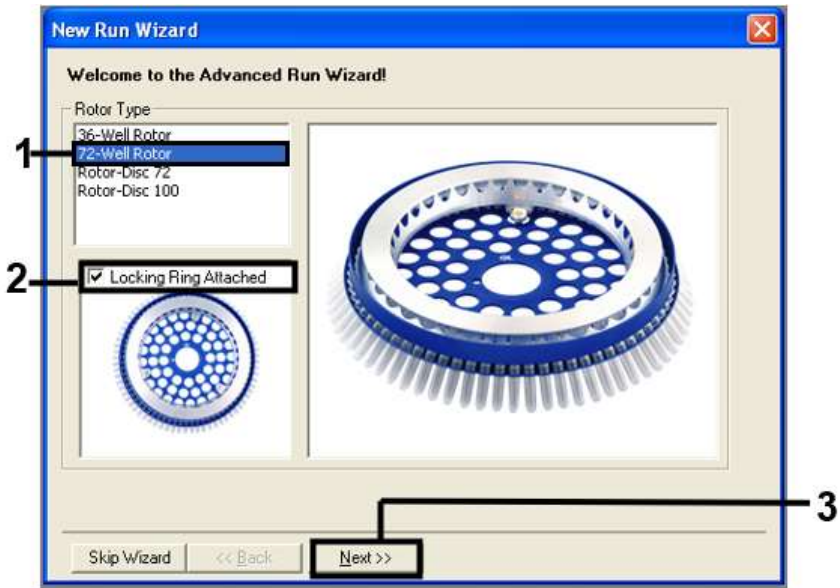


圖 21：「New Run Wizard」（新運行精靈）對話方塊。1 = 「Rotor type」（轉子類型）；2 = 「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊；3 = 「Next」（下一步）。

4. 輸入操作者的姓名。新增任何備註並在反應體積處輸入 25。確保「Sample Layout」（樣本佈局）欄位包含「1, 2, 3...」等值。按一下「Next」（下一步）（圖 22）。

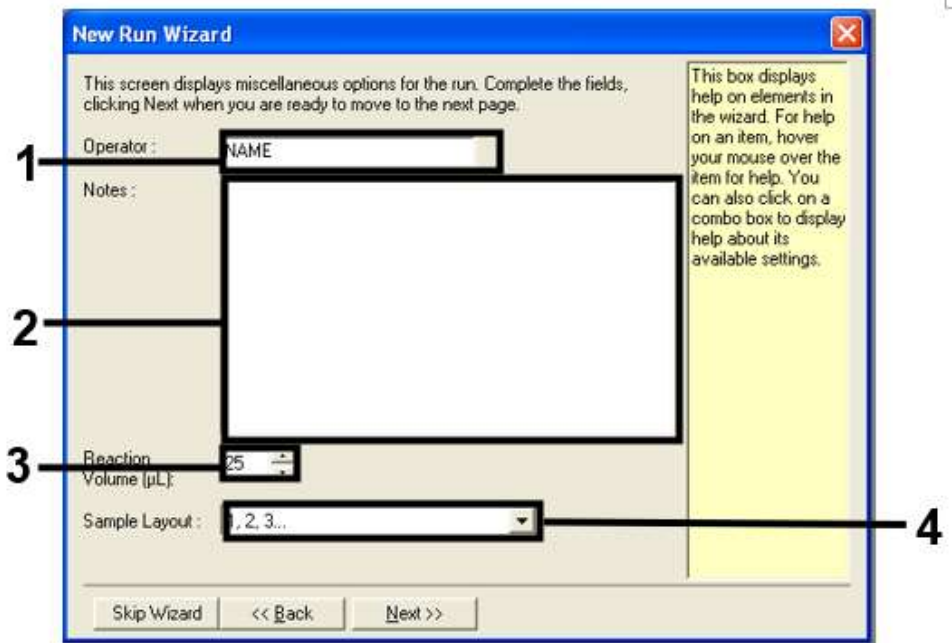


圖 22：輸入操作者的姓名和反應體積。1 = 「Operator」（操作者）對話方塊欄位；  
2 = 「Notes」（備註）對話方塊欄位；3 = 「Reaction Volume」（反應體積）欄位；  
4 = 「Sample Layout」（樣本佈局）；5 = 「Next」（下一步）。

5. 按一下「New Run Wizard」（新運轉精靈）視窗（圖 23）中的「Edit Profile」（編輯曲線），並根據以下步驟中的資訊設定溫度曲線。

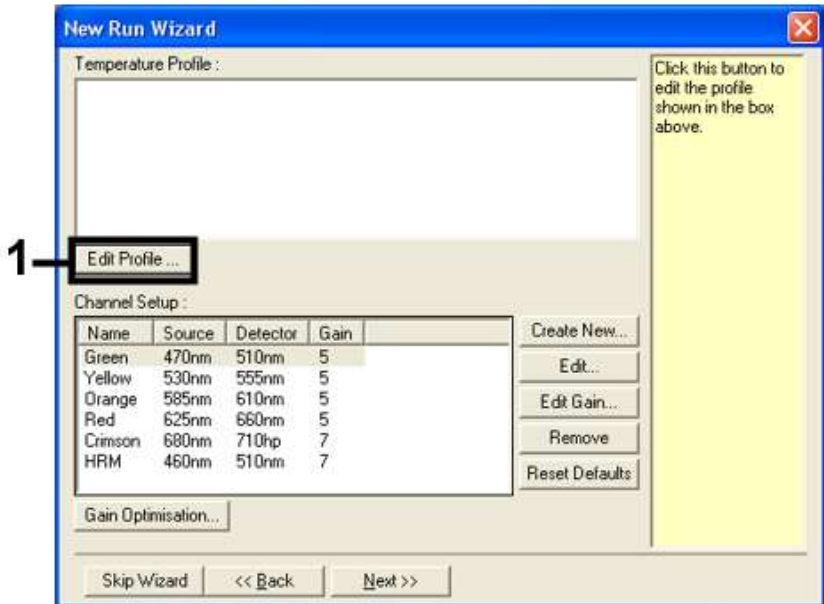


圖 23：編輯曲線。

- 按一下「Insert after」（之後插入），並選擇「New Hold at Temperature」（新保持保溫）（圖 24）。

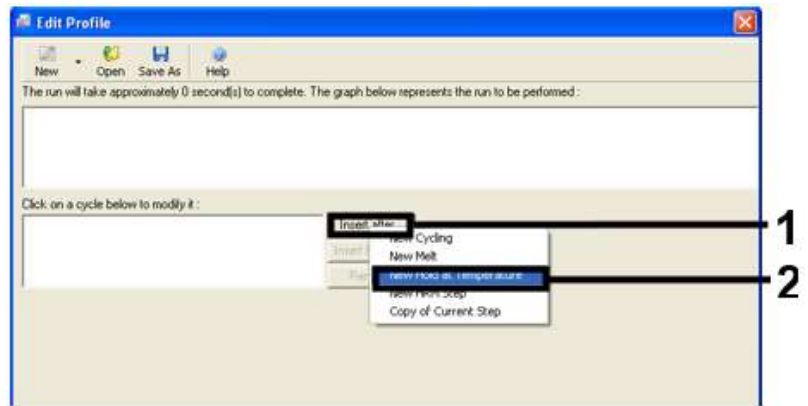


圖 24：插入初始反應步驟。1 = 「Insert after」（之後插入），2 = 「New Hold at Temperature」（新保持保溫）。



7. 將「Hold Temperature」(保持保溫)欄位的數值設定為 95°C,「Hold Time」(保持時間)欄位設定為「15 mins 0 secs」(15分0秒)。按一下「Insert After」(之後插入),然後選擇「New Cycling」(新循環)(圖 25)。

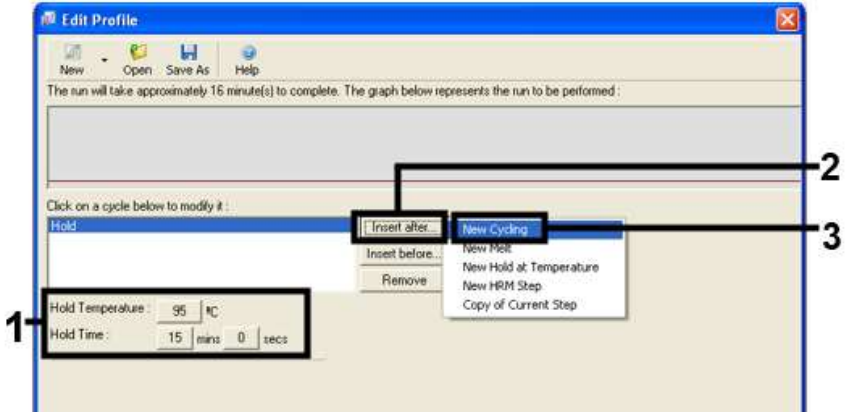


圖 25 : 95°C 初始反應步驟。1 = 「Hold Temperature and Hold Time」(保持保溫和保持時間)；2 = 「Insert after」(之後插入)；3 = 「New Cycling」(新循環)。

8. 將循環重複數設定為 40。選擇第一步並設定為「95°C for 30 secs」（95°C 保持 30 秒）（圖 26）。

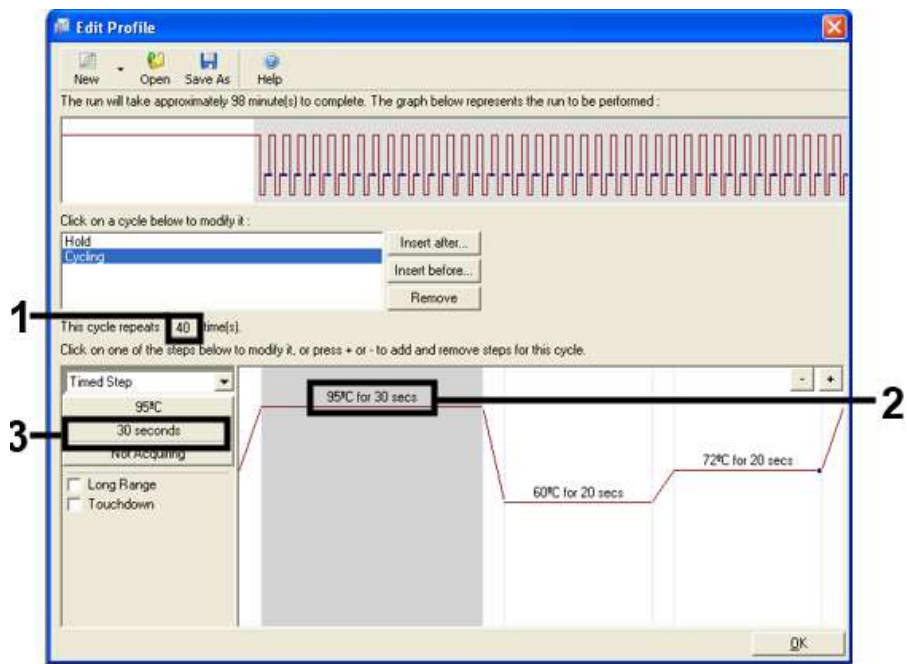


圖 26：95°C 循環步驟。1 = 「Cycle repeats」（循環重複數）方塊；2 = 第一步：溫度設定；3 = 第一步：時間設定。

9. 選擇第二步並設定為「60°C for 60 secs」（60°C 保持 60 秒）。本步過程中透過按一下「Not Acquiring」（不獲取）啟用資料擷取（圖 27）。

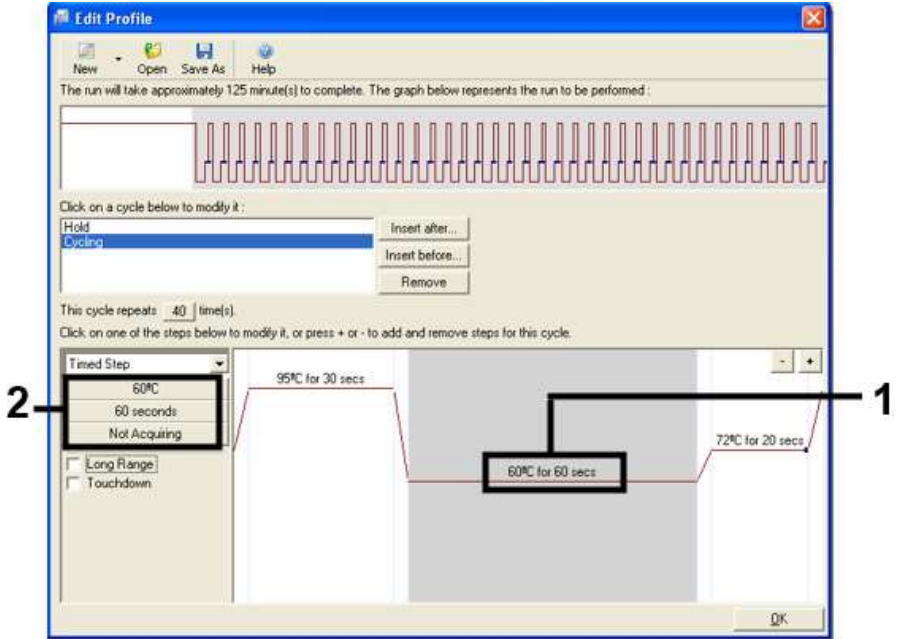


圖 27：60°C 循環步驟。1 = 第二步：溫度和時間設定；2 = 「Not Acquiring」（不獲取）。

10. 在「Available Channels」(可用通道)清單選擇 Green 和 Yellow，再按一下「>」將其移動至「Acquiring Channels」(採集通道)清單。按一下「OK」(確定)(圖 28)。

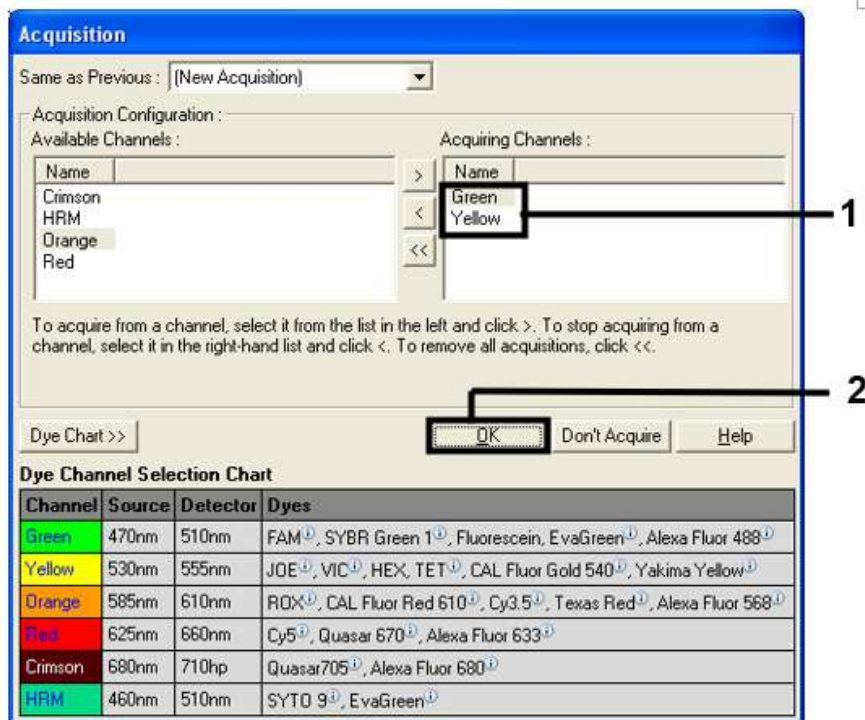


圖 28：在 60°C 循環步驟採集。

11. 選擇第三步並按一下 - 刪除。按一下「OK」(確定)(圖 29)。

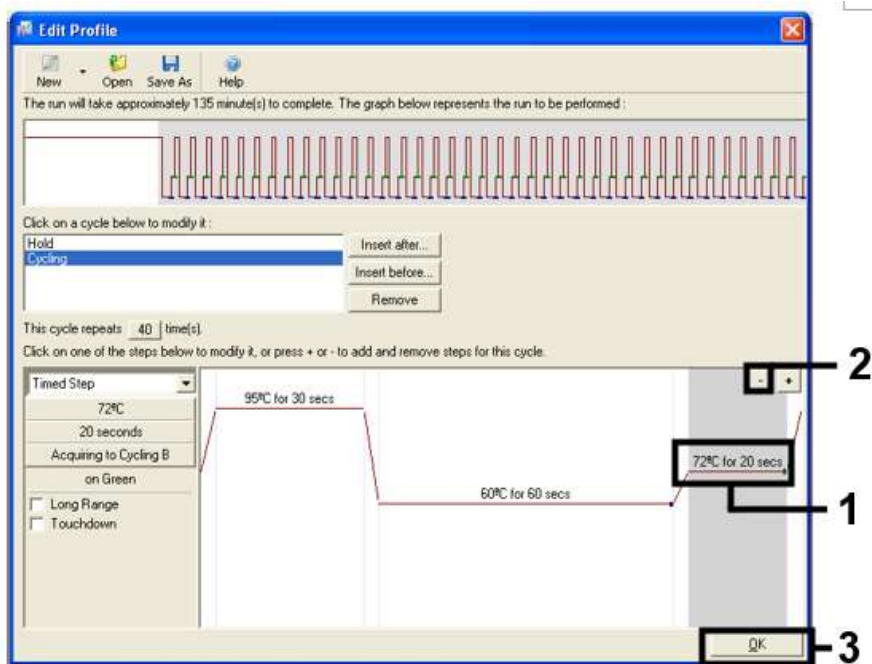


圖 29：取消延伸步驟。

12. 在下一個視窗中，按一下「Gain Optimization」（增益最佳化）（圖 30）。

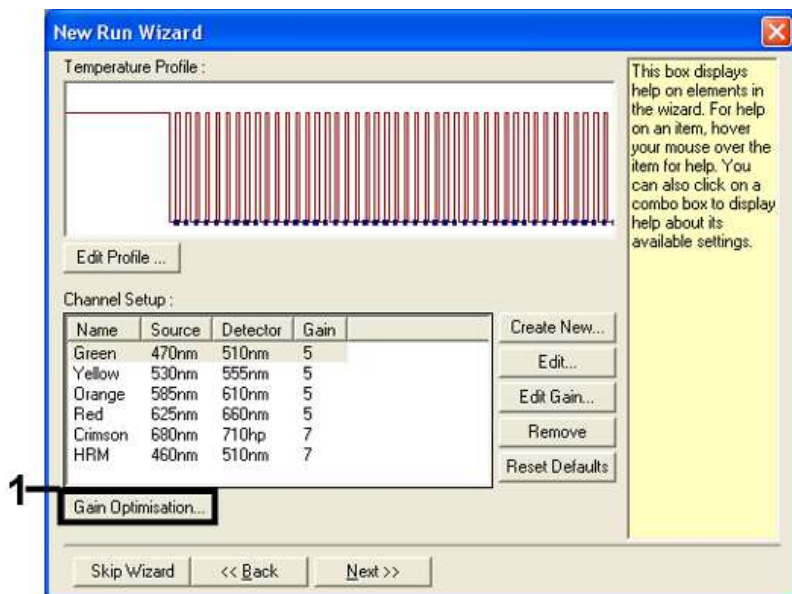


圖 30：「Gain Optimization」（增益最佳化）。

13. 按一下「Optimize Acquiring」（最佳化採集）。隨即顯示每個通道的通道設定。按一下「OK」（確定）以接受這些預設值。（圖 31）。

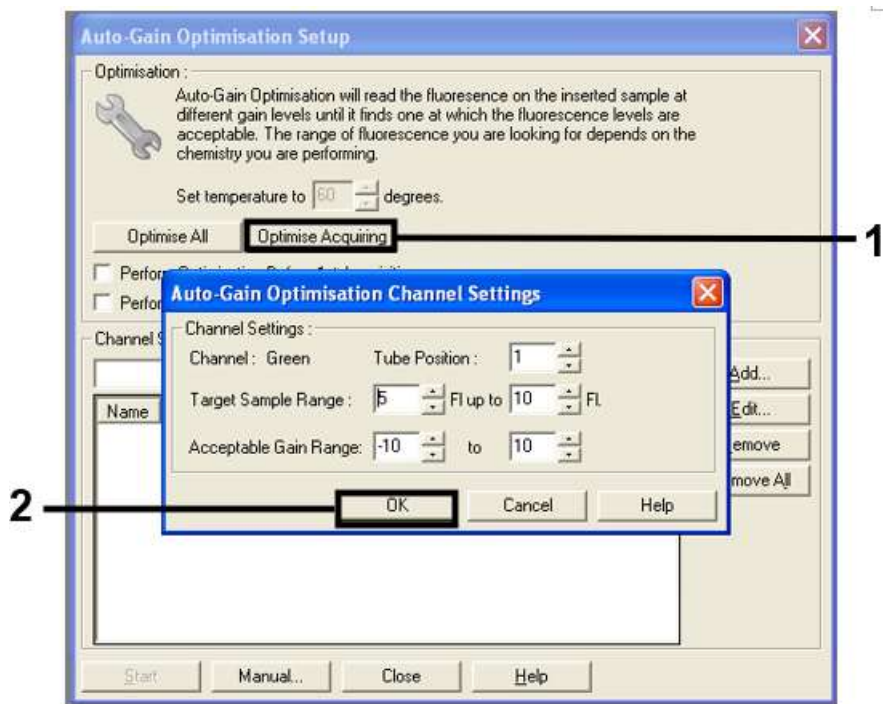


圖 31：綠色通道的「Auto-gain Optimisation」（自動增益最佳化）。

14. 勾選「Perform Optimization before 1st Acquisition」（在第一次採集前執行最佳化）方塊，然後按一下「Close」（關閉）返回至精靈（圖 32）。

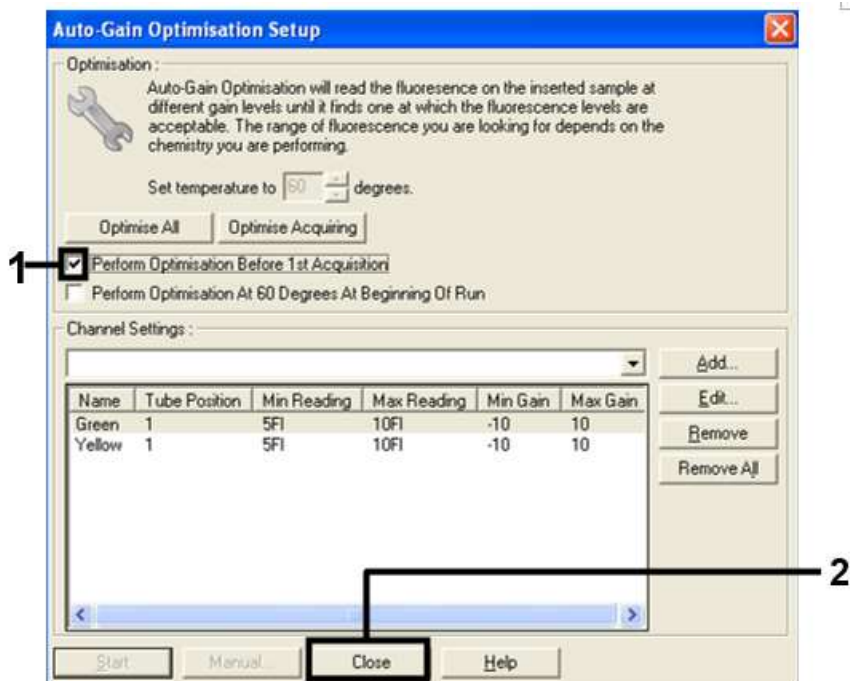


圖 32：選擇綠色和黃色通道。

15. 按一下「Next」（下一步）。然後按一下「Save」（儲存）將模板儲存在適當的位置。

### 操作程序：樣本評估（手動）

本操作程序用於評估樣本中的全部可擴增 DNA，應在 KRAS 突變分析之前執行。

- 根據「操作程序：DNA 樣本評估」的說明製備樣本。
- 根據「操作程序：therascreen KRAS PCR RGQ 設定」的說明，在 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器上建立 PCR 運轉。
- 運轉完成之後，根據「樣本評估資料分析」一節的說明分析資料。



## 操作程序：KRAS 突變檢測（人工）

通過樣本評估的樣本可用於檢測 KRAS 突變。

- 根據「操作程序：KRAS 突變檢測」的說明製備樣本。
- 根據「操作程序：therascreen KRAS PCR RGQ 設定」的說明，在 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 上建立 PCR 運轉。
- 運轉完成之後，根據「KRAS 突變檢測分析」一節的說明分析資料。

## 操作程序：therascreen KRAS PCR RGQ 設定

1. 開啟 Rotor-Gene Q 系列軟體 2.3 和建立的相應溫度曲線。
2. 根據「操作程序：建立溫度曲線」建立溫度曲線。
3. 確保選擇正確的轉子，然後勾選「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊。按一下「Next」（下一步）（圖 33）。

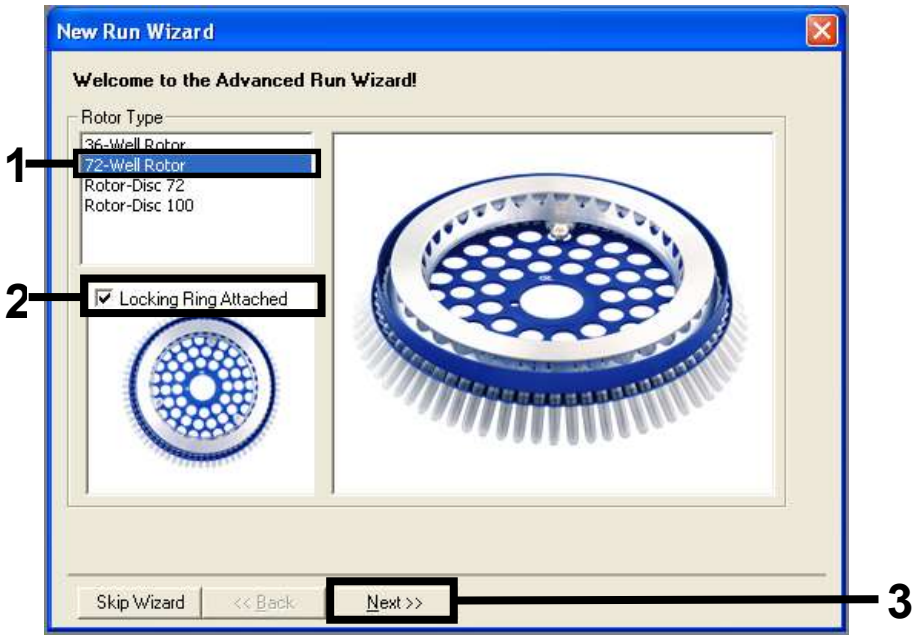


圖 33：「New Run Wizard」（新運轉精靈）對話方塊和歡迎螢幕。1 = 「Rotor type」（轉子類型）；2 = 「Locking Ring Attached」（密封圈已連接）方塊；3 = 「Next」（下一步）。

4. 輸入操作者的姓名。新增任何備註，確認「Reaction Volume」（反應體積）已設定為 25，且「Sample Layout」（樣本佈局）欄位方塊包含「1, 2, 3...」等值。按一下「Next」（下一步）（圖 34）。

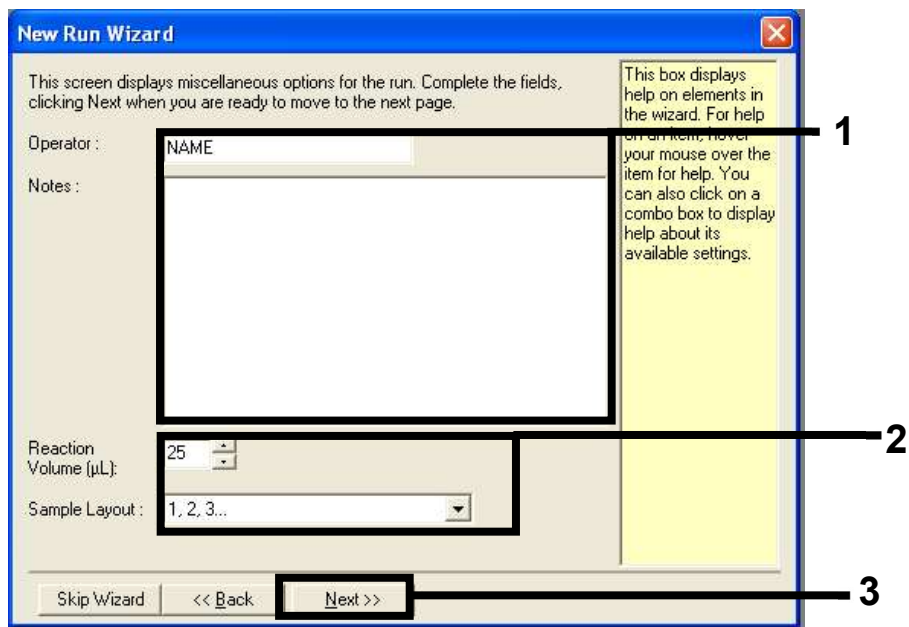


圖 34：「New Run Wizard」（新運行精靈）對話方塊。1 = 「Operator」（操作者）和「Notes」（註釋）欄位；2 = 「Reaction Volume」（反應體積）和「Sample Layout」（樣本佈局）欄位；3 = 「Next」（下一步）。

5. 在下一個視窗中保持所有數值不變。已根據「操作程序：建立溫度曲線」中的說明建立溫度曲線，無需進行編輯。按一下「Next」（下一步）（圖 35）。

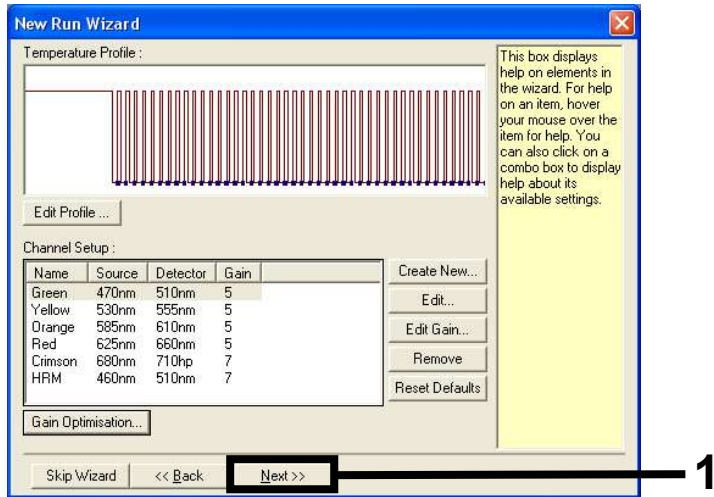


圖 35：「New Run Wizard」（新運轉精靈）對話方塊和溫度編輯螢幕。1 = 「Next」（下一步）。

6. 審查概要，然後按一下「Start Run」（開始運轉）以儲存實驗檔案並開始運轉（圖 36）。

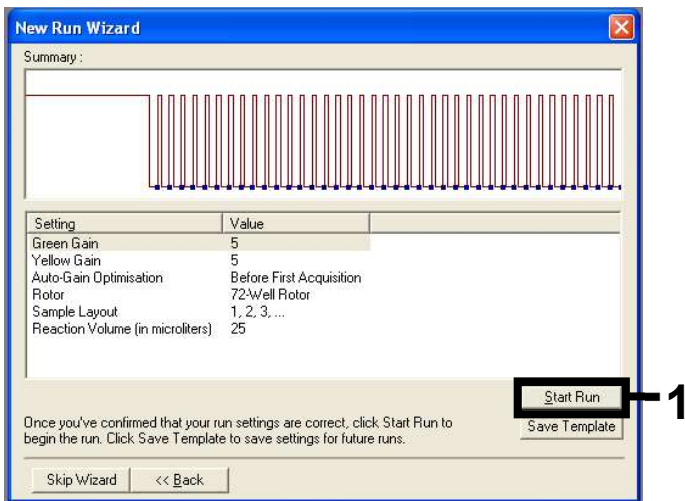


圖 36：「New Run Wizard」（新運行精靈）對話方塊。1 = 「Start Run」（開始運轉）。

**備註：**在運轉開始後，新的視窗將顯示，您可以現在輸入樣本名稱，或者按一下「Finish」（完成）並在運轉期間透過選擇「Sample」（樣本）按鈕進行輸入，或者在運轉完成之後輸入。

如果按一下「Finish and Lock Samples」（完成並鎖定樣本），即無法再編輯樣本名稱。在輸入樣本名稱時，應特別小心以確保正確的樣本檢測和分析。

**備註：**當命名樣本時，「Name」（名稱）欄中的空孔應留空。

7. 運轉完成之後，根據「樣本評估資料分析」或「KRAS 突變檢測分析」一節（視情況而定）分析資料。
8. 如果需要定量報告，在 Rotor-Gene Q 運轉檔案中按一下工具列上的「Reports」（報告）圖示。

## 結果判讀（手動）

在樣本評估運轉或突變分析運轉完成後，根據以下程序分析資料。

### 軟體分析設定

1. 使用 Rotor-Gene Q 系列軟體 2.3 開啟相應的檔案。
2. 如果在執行運轉之前尚未命名樣本，按一下「Edit Samples」（編輯樣本）。
3. 在「Name」（名稱）欄中插入樣本名稱。
4. 按一下「Analysis」（分析）。在分析頁面，按一下「Cycling A. Yellow」以查看 HEX 通道。
5. 按一下「Named On」（已命名）。  
**備註：**這可以確保空孔不會包含在分析中。
6. 選擇「Dynamic Tube」（動態試管）。
7. 選擇「Linear Scale」（線性標度）。
8. 按一下「Outlier Removal」（離群值去除）並為「NTC Threshold」（NTC 閾值）欄位輸入「10%」。
9. 將閾值設定為 0.05 並檢查 HEX CT 值。
10. 在分析頁面，按一下「Cycling A. Green」以查看 FAM 通道。
11. 驗證「Dynamic Tube」（動態試管）反白顯示。按一下「Linear Scale」（線性標度）。
12. 按一下「Outlier Removal」（離群值去除）並為「NTC Threshold」（NTC 閾值）欄位輸入「10%」。
13. 將閾值設定為 0.05 並檢查 FAM CT 值。

## 樣本評估資料分析

### 運轉對照分析

請參閱圖 37 的「Run control analysis」（運轉對照分析）流程圖。

- **陰性對照組：**為確保反應混合液沒有污染，綠色通道上無模板對照組不得產生低於 40 的  $C_T$  值。為確保模板設定正確，黃色通道上 NTC 顯示的擴增值必須在 31.91 – 35.16 範圍內。指定的值應在這些值範圍內並包含這些值。
- **陽性對照組：**在 8 種檢測中，綠色通道上 KRAS 陽性對照組 (Positive Control, PC) 產生的  $C_T$  值均必須在 23.5 – 29.5 範圍內。指定的值應在這些值範圍內並包含這些值。此範圍之外的值表明檢測設定出現問題，因此運轉失敗。

**備註：**如果這兩種運轉對照中的任一種失敗，則不得使用樣本資料。

如果兩種運轉對照均有效，綠色通道上每個樣本  $C_T$  值必須在 21.92 – 32.00 範圍內。如果樣本位於此範圍之外，則參考以下提供的指南。

### 樣本分析 — 對照檢測

- 樣本對照檢測  $C_T < 21.92$ ：對照  $C_T < 21.92$  的樣本必須進行稀釋，因為這代表經驗證檢測範圍的下限。為在低水平檢測每個突變，濃度過高的樣本必須經過稀釋以落在上述範圍內，依據是稀釋一半將使  $C_T$  增加 1。如果樣本接近 21.92，建議進行稀釋以確保從樣本檢測（KRAS 突變檢測）運轉獲得結果。應使用試劑組中提供的水（稀釋用無核酸酶水 [Dil.]）稀釋樣本。
- 樣本對照檢測  $C_T > 32$ ：建議重新萃取樣本，因為起始 DNA 模板不足將導致無法以檢測規定的臨界值檢測出所有突變。

## KRAS 突變檢測分析

### 運轉對照分析

請參閱「Run control analysis」（運轉對照分析）流程圖（圖 37）。

- **陰性對照組**：為確保反應混合液沒有污染，綠色通道上無模板對照不得產生低於 40 的  $C_T$  值。為確保模板設定正確，黃色通道上 NTC 顯示的擴增值必須在 31.91 - 35.16 範圍內。指定的值應在這些值範圍內並包含這些值。
- **陽性對照組**：在 8 種檢測中，綠色通道上 KRAS 陽性對照組 (Positive Control, PC) 產生的  $C_T$  值均必須在 23.5 - 29.5 範圍內。指定的值應在這些值範圍內並包含這些值。此範圍之外的值表明檢測設定出現問題，因此運轉失敗。

**備註**：如果這 2 種運轉對照中的任一種失敗，則不得使用樣本資料。

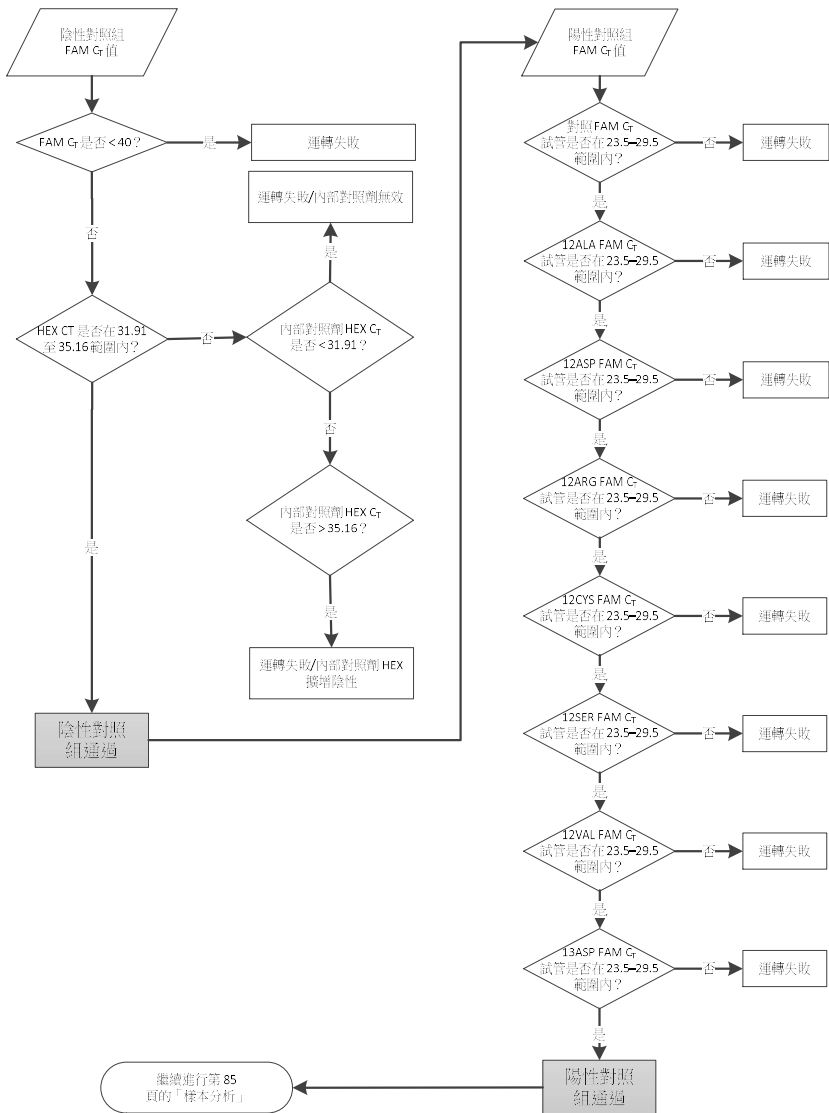


圖 37：運轉對照分析工作流程圖。



## 樣本分析

請參閱圖 38 的「Sample analysis」（樣本分析）流程圖。

### 樣本對照 FAM CT 值

如果對照檢測的兩種運轉對照均有效，綠色通道上每個樣本對照  $C_T$  值必須在 21.92 – 32.00 範圍內。

如果樣本位於此範圍之外，則參考以下提供的指南。

- **樣本對照檢測  $C_T < 21.92$** ：對照  $C_T < 21.92$  的樣本將超出突變檢測的負荷，必須進行稀釋。為在低水平檢測每個突變，濃度過高的樣本必須經過稀釋以落在上述範圍內，依據是稀釋一半將使  $C_T$  增加 1。應使用試劑組中提供的水（稀釋用無核酸酶水 [Dil.]）稀釋樣本。建立新的 PCR 運轉以重複檢測樣本。如果重複 PCR 運轉時無效，則從新的 FFPE 切片中提取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的提取物。如果無效，則重複此第二次提取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，不應進行進一步的檢測。
- **樣本對照檢測  $C_T > 32$** ：判讀時應謹慎，因為可能無法檢測到極低水平的突變。

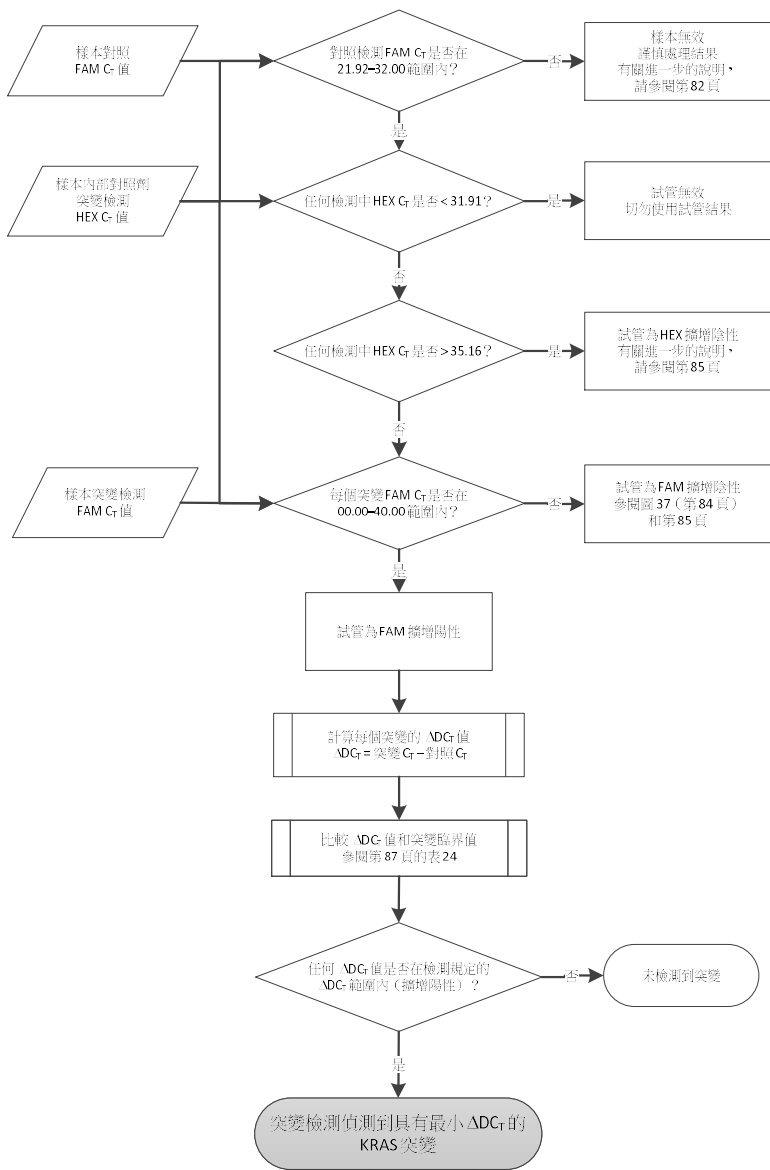


圖 38：樣本分析工作流程圖。

## 樣本內部對照劑突變檢測 HEX CT 值

請參閱圖 38 的「Sample analysis」（樣本分析）流程圖。

必須對每份樣本的所有孔進行分析。確認內部對照劑的每個孔均產生 HEX 信號。有 3 種可能的結果。

- 如果內部對照劑  $C_T$  位於規定的範圍 (31.91 – 35.16) 內，則為 HEX 擴增陽性。
- 如果內部對照劑  $C_T$  高於規定的範圍 (> 35.16)，則為 HEX 擴增陰性。設置新的 PCR 運轉以重複樣本檢測。如果重複 PCR 運轉無效，請從新鮮的 FFPE 切片 ( $\geq 4$  個切片) 中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新鮮萃取之樣本。如果無效，請重複第二次萃取。如果樣本在此運作後沒有給出有效結果，則樣本被認定為不確定的突變狀態，不應進行進一步的檢測。
- 如果內部對照劑  $C_T$  低於規定的範圍 (< 31.91)，則無效。對於 CRC 樣本，如果樣本（綠色通道）落在檢測可接受的工作範圍內，則無需採取任何措施。對於 NSCLC 樣本，設置新的 PCR 運轉以重複樣本。設置新的 PCR 運轉以重複樣本檢測。如果重複 PCR 運轉無效，請從新鮮的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新鮮萃取之樣本。如果無效，請重複第二次萃取。如果樣本在此運作後沒有給出有效結果，則樣本被認定為不確定的突變狀態，不應進行進一步的檢測。

## 樣本突變檢測 FAM CT 值

應對照表 33 中列出的值核對所有 7 份反應混合液的 FAM 值。

表 33：樣本突變反應可接受值 (FAM)\*

檢測	可接受 C <sub>T</sub> 範圍	ΔC <sub>T</sub> 範圍
12ALA	0.00 – 40.00	≤8.00
12ASP	0.00 – 40.00	≤6.60
12ARG	0.00 – 40.00	≤8.00
12CYS	0.00 – 40.00	≤8.00
12SER	0.00 – 40.00	≤8.00
12VAL	0.00 – 40.00	≤7.50
13ASP	0.00 – 40.00	≤7.50

\* 可接受值應在顯示的值範圍內並包括這些顯示的值。

- 如果 FAM C<sub>T</sub> 位於規定的範圍內，則為 FAM 擴增陽性。
- 如果 FAM C<sub>T</sub> 高於規定的範圍或者沒有擴增，則為 FAM 擴增陰性。

對於 FAM 擴增陽性的每個突變試管，按以下所示計算 ΔC<sub>T</sub> 值，確保突變和對照 C<sub>T</sub> 值來自同一樣本。

$$\Delta C_T = \text{突變 } C_T - \text{對照 } C_T$$

對於所述的檢測，比較樣本的 ΔC<sub>T</sub> 值與臨界值（表 33），確保每個檢測應用了正確的臨界值。

臨界值是指高於該值時陽性信號可能是由於野生型 DNA 上 ARMS 引子的背景信號所致。如果樣本的 ΔC<sub>T</sub> 值高於臨界值，則該樣本歸類為陰性或超出了試劑組的檢測極限。

對於每個樣本，每次突變反應得出的狀態將為「檢測到突變」、「未檢測到突變」或「無效」，採用的標準如下所示：

## 檢測到突變

- FAM 擴增為陽性且  $\Delta C_T$  處於或低於臨界值。如果檢測到多個突變，則應當報告具有最小  $\Delta C_T$  值的突變。

## 未檢測到突變

- FAM 擴增為陽性且  $\Delta C_T$  高於臨界值。
- FAM 擴增為陰性且 HEX（內部對照劑）擴增為陽性。

## 無效

- HEX（內部對照劑）無效。
- FAM 擴增為陰性且 HEX 擴增為陰性。

對於 NSCLC 樣本，如果樣本在一個試管中 HEX 擴增呈陰性，但在另一試管中 FAM 擴增呈陽性，則設置新的 PCR 運轉以重複樣本。如果重複 PCR 運轉無效，請從新鮮的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新的萃取物。如果無效，則重複此第二次萃取。如果樣本在此次運轉後沒有產生有效的結果，則樣本具有不確定的突變狀態，並且不應進行進一步的檢測。

- 如果樣本在同一個試管中為 HEX 擴增陰性和 FAM 擴增陽性，則「檢測到突變」結果應被視為有效。設置新的 PCR 運轉以重複樣本檢測。如果重複 PCR 運轉無效，請從新鮮的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新鮮萃取之樣本。如果無效，請重複第二次萃取。如果樣本在此運作後沒有給出有效結果，則樣本被認定為不確定的突變狀態，不應進行進一步的檢測。
- 如果試管為 HEX（內部對照劑）無效，則不得使用該試管的結果。設置新的 PCR 運轉以重複樣本檢測。如果重複 PCR 運轉無效，請從新鮮的 FFPE 切片中萃取樣本。設置新的 PCR 運轉以檢測新鮮萃取之樣本。如果無效，請重複第二次萃取。如果樣本在此運作後沒有給出有效結果，則樣本被認定為不確定的突變狀態，不應進行進一步的檢測。

## 指定樣本突變狀態

對所有突變反應試管進行評估後，將確定樣本的突變狀態，如下所示：

- 檢測到突變：7 個突變反應中的一個或多個為陽性。如果檢測到多個突變，則應當報告具有最小  $\Delta C_T$  值的突變。
- 未檢測到突變：所有 7 個突變反應均為陰性。
- 無效：沒有突變反應為陽性，且一個或多個突變反應為無效。

**備註：** *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 用於檢測 DNA 樣本的 KRAS 基因中的突變。當樣本被識別為檢測到 KRAS 突變時，應當僅報告一個特異性突變。如果檢測到多個突變，則應當報告具有最小  $\Delta C_T$  值的突變。

某些交叉反應可能發生在突變反應之間。例如，如果觀察到高水平的 12ALA 突變，一些其他突變反應也可能產生陽性結果。這是因為 ARMS 引子檢測到彼此相似序列的其他突變。如果第二個突變檢測產生陽性結果，則可能是交叉反應。已經觀察到雙重突變型，但這些情況很罕見。

# 附錄 B：安裝 *therascreen* KRAS Assay Package 軟體

本產品用於與 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 和 72 孔轉子搭配使用。*therascreen* KRAS Assay Package 單獨以光碟（產品編號 9023675）提供。

*therascreen* KRAS Assay Package 軟體可從 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 上的相應 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 產品網頁下載。下載資訊可在「Supplementary Protocols」（補充操作程序）標籤下的「Product Resources」（產品資源）部分找到。此檢測套件軟體也可以光碟形式訂購。

此檢測套件軟體包括「*therascreen* KRAS CE QC Locked Template」（*therascreen* KRAS CE QC 鎖定模板）和「*therascreen* KRAS CE Locked Template」（*therascreen* KRAS CE 鎖定模板）。

**備註：***therascreen* KRAS Assay Package 軟體只能與相應的 Rotor-Gene Q 軟體版本 2.3 搭配使用，並且應當為 *therascreen* KRAS Assay Package 版本 3.0.3（QIAGEN，產品編號 9023675）。必須先安裝正確版本的 Rotor-Gene Q 軟體，然後再安裝 *therascreen* KRAS Assay Package 軟體。

## 程序（下載）

1. 從 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 上的相應 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 產品網頁中下載 *therascreen* KRAS RGQ Assay Package 軟體。
2. 按兩下檔案以開啟下載的 zip 檔，並解壓縮存檔中的檔案。
3. 按兩下 `therascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe` 開始安裝。

## 程序（光碟）

1. 訂購 QIAGEN 單獨提供的與所安裝 Rotor-Gene Q 軟體（見上文）相容的 theascreen KRAS RGQ Assay Package CE CD。  
版本 3.0.3。產品編號 9023675。
2. 在連接至 Rotor Gene Q MDx 5plex HRM 儀器的筆記型電腦上，將光碟插入光碟機。
3. 按兩下 theascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_3.0.3.exe 或 theascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_1.0.12.exe 開始安裝。  
安裝精靈將顯示。
4. 按一下「Next」（下一步）繼續（圖 39）。

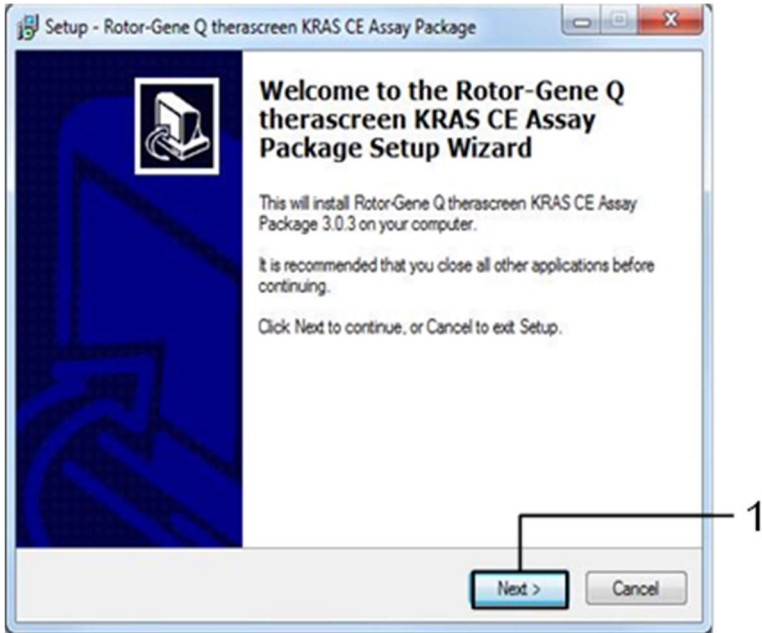


圖 39：「Setup」（安裝）對話方塊。1 = 「Next」（下一步）。



5. 閱讀「License Agreement」（授權協議）對話方塊中的授權協議，勾選「I accept the agreement」（我接受協議）方塊。按一下「Next」（下一步）繼續（圖 40）。

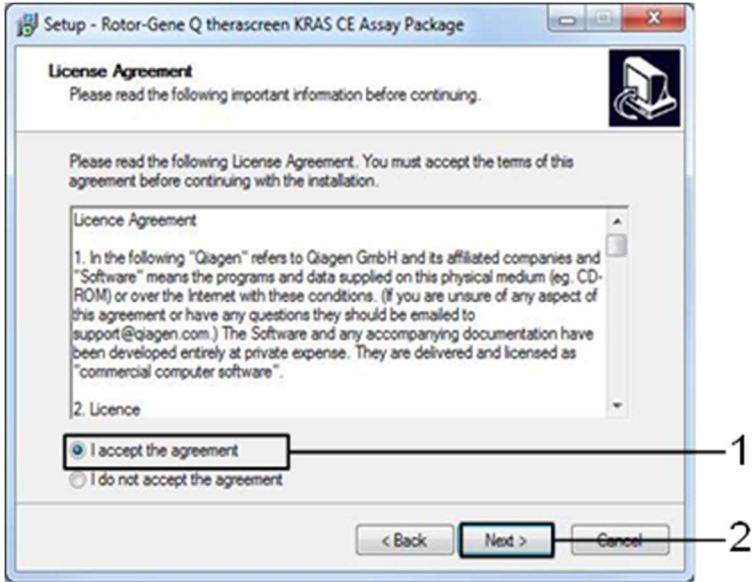


圖 40：「License Agreement」（授權協議）對話方塊。1 = 「I accept the agreement」（我接受協議）陳述，2 = 「Next」（下一步）。

模板安裝將自動開始。

6. 在最終的「Setup」（安裝）視窗按一下「Finish」（完成）退出安裝精靈。（圖 41）。

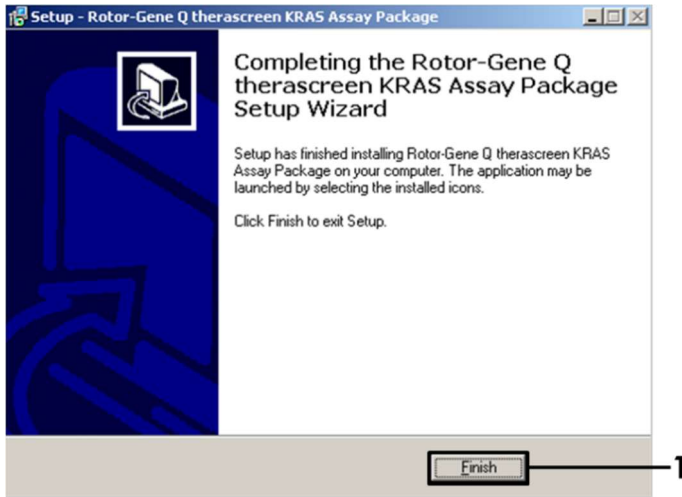


圖 41：完成精靈。

7. 重新啟動電腦。「thetascreen KRAS QC Locked Template」和「thetascreen KRAS Locked Template」的快速鍵將自動生成並會顯示在桌面上。

## 訂購資訊

產品	內容物	產品編號
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	24 次反應：1 個品管檢測、7 個突變檢測、陽性品管組、水、 <i>Taq</i> DNA 聚合酶	870081
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (version 3.1.1)	與 <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit 和帶 72-Well Rotor 的 QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 儀器搭配使用的軟體操作程序套裝	9023675
<b>Rotor-Gene Q 和配件</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Real-time PCR 系統和高解析度融化分析儀，具有 5 個通道（綠色、黃色、橙色、紅色、深紅色），外加 HRM 通道、筆記型電腦、軟體、配件，為期 1 年的零件保固及人工，不含安裝和培訓	9002032
Rotor-Gene Q MDx	Real-time PCR 系統和高解析度融化分析儀，具有 5 個通道（綠色、黃色、橙色、紅色和深紅色），外加 HRM 通道、筆記型電腦、軟體、配件，為期 1 年的零件維修保固以及人工、安裝和培訓	9002033
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	帶有 72 x 0.1 ml 試管的鋁塊，使用單通道微量滴管進行手動反應設定	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 個 4 連排管，以及用於 1000 次反應的蓋	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 個 4 連排管，以及用於 10,000 次反應的蓋	981106

產品	內容物	產品編號
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit — for purification of genomic DNA from paraffin-embedded tissues	QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50) 50 次 DNA 製備：QIAamp MinElute 小柱、蛋白酶 K、緩衝液和收集管 (2 ml)	60404

欲了解最新的許可資訊和產品特定的免責聲明，請參閱各 QIAGEN 試劑組使用手冊或使用者手冊。QIAGEN 試劑組使用手冊和使用者手冊可從 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 下載，或向 QIAGEN 技術服務部或您當地經銷商索取。

# 文件修訂歷程記錄

修訂	描述
R1, May 2021	Initial release for AU
R2, June 2022	<p>Adaption of instrument name from Rotor-Gene Q MDx to Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM to align with name on the instrument label</p> <p>Updated the Detection of KRAS mutations protocol to include additional step in preparing master mixes</p> <p>Corrected values in Frequency and 95% Confidence Interval columns in Table 9.</p> <p>Updated CRC overall agreement percentage from 96.4% to 96.82%</p> <p>Corrected values in LOD C<sub>95</sub> column in Table 14</p> <p>Corrected the thescreen KRAS Assay Package version to 3.0.3</p> <p>Updated this document all through-out regarding the availability for download of the assay package at <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a></p> <p>Revised catalog number of QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit</p> <p>Added a note throughout the document regarding actions related to flags for NSCLC indication updated to ensure correct functioning of the kit</p> <p>Added a note throughout the procedures in this document about correct reagent mixing</p> <p>Updated General precautions section</p> <p>Added a note for correct placement of Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrument</p> <p>Added a note regarding the use of dry scalpels</p> <p>Updated Protocol: DNA sample assessment to add additional important points before starting</p> <p>Updated Protocol: Detection of KRAS mutations section to add additional important points before starting and a note for NSCLC samples to interpret several flags as Invalid</p> <p>Updated Rotor-Gene Q thescreen KRAS Assay Package flags section to add tables to illustrate RGQ flags, their meanings, and recommended actions</p> <p>Updated Interpretation of Results regarding actions related to flags.</p> <p>Updated Troubleshooting Guide section to add tables to illustrate RGQ flags, their meanings, and recommended actions</p> <p>Updated Limitations section to add information about NSCLC samples</p> <p>Revised Performance Characteristics section to update data in tables</p> <p>Updated DNA input and linearity section</p> <p>Updated Repeatability and reproducibility section</p> <p>Updated Sample handling variability section</p> <p>Clinical Performance Section added</p> <p>Updated Sample assessment data analysis section to revise recommended solution for sample control assay CT of &gt;32</p> <p>Marking for European conformity added to Symbols section</p> <p>Updated Interpretation of Results (Manual) regarding actions related to flags.</p> <p>Updated the Protocol: Detection of KRAS mutations section to include steps on how to prepare the master mixes</p>

不適用於糞便樣本。

不適用於尿液樣本。

不適用於血液樣本中的細胞外核酸。

不適用於無細胞骨髓樣本。

不適用於唾液樣本。

購買本產品即在特定 ROCHE 專利下授予購買者僅將產品用於提供人類體外診斷服務的權利。除此特定的購買使用權之外，未授予任何非具體的專利或其他許可。

1124344 05-2021 HB-2901-001 © 2021 QIAGEN，保留所有權利。

製造業者名稱：QIAGEN GmbH

製造業者地址：QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germany

醫療器材商名稱：凱杰生物科技有限公司

醫療器材商地址：臺北市中正區羅斯福路2段100號5樓