All RAS基因檢測暨分析作業紀錄表

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 病患姓名 |  | 病歷號 |  | 分子病理號 |  |

1. 試劑耗材：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名稱 | 配製日期 | 效期 |
| All RAS Primers |  |  |

1. 組織切片、DNA萃取：依照「組織核酸萃取作業標準書SA02-005」進行作業，並填寫相關紀錄表單。
2. PCR作業：完成該步驟後請打勾。 操作人員: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 日期 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
   * 於-20℃冰箱中取出all RAS PCR primer working solution以及Taq DNA Polymerase 2X master mix red，置於冰盒上回溫。
   * 準備PCR tube，每一個檢體需準備6個PCR tube，並於管壁上標示分子病理號以及順序號碼1 – 6，其分別代表為:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | KRAS codon 12, 13 | 4 | NRAS codon 12, 13 |
| 2 | KRAS codon 59, 61 | 5 | NRAS codon 59, 61 |
| 3 | KRAS codon 117, 146 | 6 | NRAS codon 117, 146 |

* + 另外準備一管PCR tube，於管壁上標示”NC”以作為陰性控制對照組。
  + 依照下表計算與配製PCR作業所需的PCR mixture至各個PCR tube中：

|  |  |
| --- | --- |
| Components | Volume (μL) |
| RAS Primer F | 1 |
| RAS Primer R | 1 |
| Taq Master Mix | 12.5 |
| ddH2O | 9.5 |
| Total Volume | 24 |

* + 接著取1μL DNA sample 至各個PCR tube中，混合均勻，離心(spin down)。
  + 另外加入25μL ddH2O至NC管中，離心(spin down)。
  + 依照「ABI veriti 96 well thermal cycler 作業標準書FA01-009」開啟ABI veriti 96 well thermal cycler (編號:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_)電源；使用時間\_\_\_\_:\_\_\_\_，共\_\_\_\_時\_\_\_分鐘。
  + 選擇PCR程序名稱為「RAS」，確認PCR程序如下：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Step | | 溫度(℃) | 時間 | Cycle |
| Step 1 | Pre-denaturation | 95 | 5分 | 1 |
| Step 2 | Denaturation | 95 | 40秒 | 35 |
| Primer Annealing | 60 | 40秒 |
| Primer Annealing | 62 | 40秒 |
| Primer Annealing | 63 | 40秒 |
| Elongation | 72 | 40秒 |
| Step 3 | Extension | 72 | 5分 | 1 |
| Preservation | 10 | ∞ |

**----------請翻頁繼續操作----------**

All RAS基因檢測暨分析作業紀錄表

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 病患姓名 |  | 病歷號 |  | 分子病理號 |  |

* + 接著將檢體放置於ABI veriti 96 well thermal cycler中，確定蓋子蓋緊後，點選「Start」，開始PCR程序。

1. 核酸電泳作業：請依照「核酸膠體電泳作業標準書SA02-006」進行核酸電泳作業。
2. 定序作業：請依照「委外定序作業標準書AD03-002」將PCR產物委託明欣生物科技核酸實驗室進行定序。
3. 定序結果分析：請依照「DNA Variant Analysis Software作業標準書AD07-002」進行定序結果分析：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| KRAS codon 12, 13 | KRAS codon 59, 61 | KRAS codon 117, 146 |
| □ Negative  □ Mutation peak | □ Negative  □ Mutation peak | □ Negative  □ Mutation peak |
| NRAS codon 12, 13 | NRAS codon 59, 61 | NRAS codon 117, 146 |
| □ Negative  □ Mutation peak | □ Negative  □ Mutation peak | □ Negative  □ Mutation peak |

醫檢師：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_