

ردیابی چندگانه بهینه جهش KRAS 7 با روش PCR کمی مخصوص برای ال و

Taqman

چکیده

تعیین وضعیت جهش یافته بودن یا نبودن KRAS در نمونه‌های توموری اهمیت بنیادینی در مدیریت بیماران مبتلا به سرطان ریه یا سرطان روده‌ی بزرگ دارد؛ چرا که این جهش‌ها مانع درمان با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال گیرنده‌های فاکتورهای رشد اپیدرمی (EGFR) می‌شوند. در این پژوهش، روش PCR کمی مخصوص برای ال چندگانه، سریع و ارزان‌قیمتی را گزارش می‌دهیم که می‌تواند هفت جهش اصلی و مرتبط با مسائل بالینی در KRAS را شناسایی و همزمان، ژن‌های KRAS جهش‌نیافته را در سلول‌های توموری و بافت‌های بیماران سرطان روده‌ی بزرگ تکثیر کند. نمونه‌های مثبت در تست‌های چندگانه تحت تحلیل‌های مخصوص برای ال قرار گرفتند تا جهش هر کدام به طور خاص بررسی شود. DNA مرجع سرطان‌های انسانی اعم از G12V, G12S, G12R, G12D, G12C, G12A و G13D اختصاصی بودن تست را با $\leq 1\%$ حساسیت ال‌های جهش‌یافته تأیید کردند. همچنین، کاربردی بودن تحلیل چندگانه‌ی جهش‌های KRAS با انجام آزمایش‌های جاسازی پارافین فیکس‌شده توسط فرمالین (FFPE) بر روی بیوپسی‌های سرطان روده‌ی بزرگ نشان داده شد. در نتیجه، تکثیر همزمان DNA جهش‌نیافته منجر به حذف داده‌های منفی کاذب از نمونه‌های تخریب‌شده می‌شود. همچنین، نتایج این روش مقرون‌به‌صرفه با نتایج حاصل از توالی‌یابی DNA در بافت‌های FFPE هم‌خوانی دارد، اما در حالتی که غلظت‌های DNA محدود هستند، حساسیت بالاتری دارد.

سرطان روده‌ی بزرگ سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان سراسر جهان است [۱]. کتاکسیمب 1 و پانیتومامب 2 آنتی‌بادی‌های مونوکلونالی هستند که در روش‌های بالینی برای درمان کارسینومای روده‌ی بزرگ، علیه گیرنده‌ی EGFR به کار می‌روند [۲]. جهش‌های سرطان‌زای KRAS مدت‌هاست که به عنوان مانع روش درمانی مذکور شناخته شده‌اند، چرا که منجر به تولید پروتئینی می‌شوند که همواره فعال است و به شکل مستقل از محرک، عملگردهای پایین‌دست EGFR، مانند آبشارهای RAF، MEK، و ERK را فعال می‌کند [۳].

۴، ۵. فعال‌سازی به وسیله‌ی فسفریلاسیون پروتئینی در چند تشکیل‌دهنده‌ی مسیرهای MAPK در نمونه‌های جهش‌یافته برای KRAS، ماندگارتر از دیگر گروه‌های توموری است. این فعال‌سازی‌های سرطان‌زا در نمونه‌های جهش‌یافته برای KRAS، در ۳۵ تا ۴۰ درصد از کارسینوماهای روده‌ی بزرگ دیده می‌شود و در بیشتر موارد، جهش در کدون ۱۲ (۸۰٪) و ۱۳ (۱۵٪) از اگزون ۲ رخ داده است [۶، ۷، ۸]. جهش در موقعیت‌های دیگر، برای مثال کدون ۶۱، ۱۱۷، ۱۴۶ و ۱۵۴ نیز دیده شده اما فراوانی بسیار کم‌تری (تنها حدود ۱٪) به خود اختصاص می‌دهد [۹، ۴].

آژانس پزشکی اروپا (EMA)، شبکه‌ی جامع ملی سرطان (NCCN)، انجمن سرطان‌شناسی بالینی آمریکا (ASCO) و اداره‌ی مواد غذایی و دارویی ایالات متحده‌ی آمریکا (FDA) توصیه می‌کنند که هدف قرار دادن EGFR به وسیله‌ی کتاکسیمب و پانیتومامب نیازمند این است که بیمار نسخه‌ی سالم و جهش‌نیافته‌ی KRAS را دارا باشد. بنابراین، غربال‌گری ساده و دقیق جهش‌های KRAS پیش از تیمار کردن با آنتی‌بادی علیه EGFR ضروری است [۲، ۱۰]. در موارد کمبود فراوانی DNA جهش‌یافته در مقایسه با طبیعی، تشخیص زودهنگام در بافت‌های در دسترس و موجود در کلینیک‌ها مشکل است. این امر نیاز به انجام تکنیک‌های مشکل، زمان‌بر و گران‌قیمتی برای ایزوله کردن سلول‌های توموری پیش از آنالیز مولکولی ایجاد می‌کند که برای آزمایش‌های پاتولوژیک رایج نامناسب است [۱۱]. از این رو، تشخیص و شناسایی الل‌های در اقلیت چالشی‌ست که به صحت و حساسیت تکنیک‌های مولکولی بستگی دارد و قادر است توانایی تشخیص جهش‌های کم‌یاب را پایین بیاورد.

تکنیک‌های مولکولی زیادی برای تشخیص جهش‌های KRAS ایجاد شده‌اند که هر کدام مزایا و مضرات متفاوت، هزینه‌های گوناگون و تفاوت‌های قابل توجهی در زمینه‌ی مدت آزمایش، اختصاصی بودن، حساسیت، توانایی تشخیص جهش‌های جدید، توانایی کوانتیده کردن ال‌های جهش‌یافته و تکرارپذیری نتایج دارند [۱۲، ۱۳، ۱۴]. در بین این روش‌ها، توالی‌یابی به روش سنگر کماکان استاندارد طلایی به شمار می‌رود؛ با این حال این روش حساسیت پایینی دارد و نیازمند بین ۱۰ تا ۳۰ درصد ال‌های KRAS جهش‌یافته از بین نمونه‌های طبیعی است [۱۲، ۱۵]. با توجه به این که PCR همه‌ی ال‌ها را با بازده برابر نسبت به غلظت‌های اولیه تکثیر می‌کند [۱۶]، روشی مطلوب برای کاش تکثیر ال‌های طبیعی است [۲، ۱۷]. PCR اختصاصی برای ال، که به عنوان سیستم تکثیری مقاوم در برابر جهش 3 یا ARMS نیز شناخته می‌شود، بر این اصل استوار است که تکثیر در حالتی که باز آلی انتهای 3' در پرایمر با توالی الگو اتصال برقرار می‌کند، بازده بالایی دارد؛ در حالی که چنانچه این اتصال برقرار نشود و یا اتصال اشتباه برقرار شود، بازده پایین‌تر است [۱۸، ۱۹]. اختلاط روش‌های PCR اختصاصی برای ال و PCR زمان واقعی 4 بر اساس کاوشگرهای Taq-Man ابزار مناسبی برای ردیابی جهش‌ها با حساسیت و مقدار بالا به دست می‌دهد. تست‌هایی بر این اساس جهت استفاده در محیط بالینی ایجاد شده‌اند (۲۰-۲۵) و چند کیت آزمایشگاهی برای کاربردهای بالینی در بازار موجود هستند؛ برای مثال، کیت KRAS RGQ PCR از تراسکرین 5 (کیاژن 6) و کیت KRAS Cobas (TaqMelt PCR). [۲۱، ۲۲، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰]

در این مطالعه، ما روشی سریع، مقرون‌به‌صرفه و چندگانه جهت غربالگری ال‌های برای جهش‌های رایج KRAS در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ موجود در بیوپسی‌های FFPE در بیماران با حساسیت بالا معرفی می‌کنیم. تست ما بر اساس PCR کمی چندگانه در یک لوله، با استفاده از هفت پرایمر مخصوصی برای ال می‌باشد که تنها به یک الگوی DNA جهش‌یافته متصل می‌شوند. نمونه‌هایی که با نتیجه‌ی مثبت از این آزمایش بیرون آمدند تحت آزمایش‌های بیشتری قرار گرفتند تا وجود جهش در ال خاص موردنظر در آن‌ها تأیید شود.

amplification refractory mutation system³

Real-Time PCR⁴

Therascreen⁵

Qiagen⁶

مواد و روش‌ها

DNA مرجع و نمونه‌های بالینی

ما از DNA ژنومی مرجع استاندارد و دارای ژن طبیعی KRAS و همچنین DNA دارای هفت جهش نقطه‌ای در کدون ۱۲ و ۱۳ KRAS (G12D, G12A, G12R, G12C, G12S, G12V و G13D) استفاده کردیم. مرجع استانداردهای DNA ژن KRAS، هورایزن 7، واقع در کمبریج، CB26 9PL، بریتانیا بود. FFPE‌های مربوط به آدنوکارسینومای روده‌ی بزرگ از ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ گرفته و از طریق مرکز توالی‌یابی و آنالیز سنگر (CESAN) در انستیتوی پژوهش‌های علمی ونزوئلا⁸(IVIC) جمع‌آوری شد. این پژوهش توسط کمیته‌ی اخلاقی انستیتو تأیید شد و داده‌های مربوط به بافت‌های جمع‌آوری‌شده به شکل ناشناس تحلیل شدند.

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های FFPE

DNA از سلول‌های کشت‌داده‌شده به وسیله‌ی کیت کلروفورم-DNAzol و طبق توصیه‌ی شرکت تولیدکننده (اینویترورژن⁹) استخراج شد. DNA ژنومی از بافت‌های FFPE با استفاده از کیت QIAamp مخصوصی FFPE DNA تولید شرکت کیاژن طبق توصیه‌ی شرکت تولیدکننده استخراج شد. به طور خلاصه، تومورها از بلوک‌های پارافینی جدا، به قطعات ۱۰ میکرومتری تقسیم و در لوله‌های ۱.۵ میلی‌لیتری ذخیره شدند. پارافین به وسیله‌ی زایلن جدا شد و نمونه‌ها در دمای محیطی خشک شدند. مقادیر دقیق DNA به روش مقدارسنجی فلورومتريک توسط دستگاه فلورومتريک کوبیت¹⁰ 10 ورژن ۲.۰ (Q32866، اینویترورژن) سنجیده شد. نمونه‌های DNA در ۲۰- درجه ذخیره شدند.

ردیابی جهش به وسیله‌ی تست PCR کمی

جهش‌های موجود در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS (به شماره‌ی NG_007524) به وسیله‌ی PCR کمی با استفاده از پرایمرهای مخصوص برای ال (AsP) که برای هر یک از هفت جهش و همچنین ناحیه‌ی جهش‌نیافته طراحی شده بودند، مشخص شدند [۲۲] (به جدول ۱ موجود در بخش تکمیلی مقاله مراجعه شود). باز آلی انتهای ۳' برای هر پرایمر با توجه به جهشی که می‌بایست شناسایی می‌کرد طراحی شد. همچنین، یک ناچوری 11 مصنوعی در باز یکی مانده به آخر و یا باز پیش از آن القا شد تا اختصاصی بودن اتصال را افزایش دهد [۲۲]. واکنش‌های PCR در پلیت‌های ۴۸-چاهکی در سیستم PCR زمان واقعی اکو 12 متعلق به شرکت ایلومینا 13 انجام شدند. شرایط واکنش برای هر چاهک برابر بود با: ۰.۳۵ میکرومولاز پرایمر Forward، ۰.۳۵ میکرومولاز پرایمر Reverse، ۰.۵ میکرومولاز کاوشگر و ۳ میکرومولاز DNA الگو با غلظت‌های مختلف. واکنش‌ها با استفاده از مخلوط آماده‌ی ژنوتایپینگ 1XTaqMan (به شماره‌ی کاتالوگ ۴۳۷۱۳۵۵، شرکت اپلاید بیوسیستمز 14، فاستر سیتی 15، کالیفرنیا، ایالات متحده آمریکا) در حجم نهایی برابر با ۱۰ میکرولیتر انجام شد. بر خلاف یک پروتکل قدیمی Taqman که از دمای اولیه‌ی ۹۵ درجه برای واسرشتی DNA به مدت ۱۰ دقیقه، ۵۰ چرخه در ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ چرخه‌ی سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه استفاده کرده بود، واکنش PCR کمی ما از یک مرحله‌ی ده دقیقه‌ای در ۹۰ چرخه‌ی سانتیگراد پیش از شروع واکنش‌های اصلی استفاده می‌کرد، ۵۰ چرخه در ۹۵ چرخه‌ی سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۰ چرخه‌ی سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه داشت. همه‌ی نمونه‌ها در قالب سه تایی تکرار می‌شدند. در هر چرخه، حداقل یک کنترل منفی (بدون DNA) مورد استفاده قرار گرفت

تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال (Mult-AsP)

تست‌های چندگانه‌ی مخصوص برای ال بر اساس همین پروتکل اما با استفاده از همه‌ی هفت پرایمر مخصوص برای ال جهت شناسایی جهش KRAS، همان پرایمر Reverse و کاوشگر Taqman در یک لوله‌ی آزمایش انجام شدند. این واکنش‌های چندگانه حاوی ۰.۴ میکرومولار از هر پرایمر Forward، ۰.۵۵ میکرومولار از هر پرایمر Reverse، ۰.۵ میکرومولار کاوشگر و ۳۵ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو با شرایط PCR که در بالا ذکر شد بودند. برای هر الگو، مقدار Cq در PCR مرجع ثبت و برای هر واکنش چندگانه، ΔCq محاسبه شد (تفاوت‌ها در چرخه‌ها بین دو روش تست مخصوص برای ال و تست PCR مرجع، و همچنین تفاوت‌ها در چرخه‌ها بین دو روش تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال و تست PCR مرجع).

ژنوتایپینگ KRAS در نمونه‌های بالینی

ژنوتایپینگ KRAS در بافت‌های FFPE شامل امپلیکون 16های غیرجهش‌یافته‌ی مرجع (NM) و پرایمرهای چندگانه‌ی مخصوص برای ال در تست PCR کمی می‌شد. پروتکل سنجش نمونه‌های بالینی شامل یک تکثیر در مرحله‌ی اول برای امپلیکون‌های جهش‌نیافته‌ی مرجع و تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال می‌شد. هنگامی که نتیجه‌ی PCR کمی برای DNA جهش‌نیافته‌ی مرجع منفی می‌شد، نمونه دیگر مورد آنالیزهای بعدی قرار نمی‌گرفت. با این حال، اگر تکثیر چندگانه منفی و امپلیکون جهش‌نیافته مثبت می‌شد، نمونه منفی در نظر گرفته می‌شد. در مواردی که نمونه‌های بالینی برای تست چندگانه نتیجه‌ی مثبت به دست می‌دادند، بر روی آن‌ها هفت واکنش جداگانه PCR با پرایمرهای مربوط به KRAS جهش‌یافته انجام می‌شد تا جهش‌ها شناسایی شوند. همه‌ی نمونه‌ها در قالب‌های سه‌تایی آزمایش شدند

حساسیت تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال

برای تعیین پایین‌ترین دقت محدود‌دهی تشخیص در تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال، DNA جهش‌یافته‌ی KRAS با DNA طبیعی مخلوط شد. میزان DNA جهش‌یافته به مرور کم‌تر و کم‌تر شد تا به کسرهای ۰.۵٪، ۰.۲۵٪، ۰.۱۲۵٪، ۰.۰۶۲٪، ۰.۰۳۲٪ و ۰.۰۱۵٪ برسد. واکنش‌ها در قالب سه‌تایی و به همراه یک کنترل منفی انجام شدند.

نتایج

ژنوتایپینگ چندگانه‌ی مخصوص برای ال برای ژن KRAS

ما یک تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال طراحی کردیم که هدف آن غربالگری هفت جهش شایع برای KRAS در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ در سرطان کارسینومای روده‌ی بزرگ است و در این راستا از تست PCR کمی مخصوص برای ال استفاده کردیم (شکل ۱). مرحله‌ی اول شامل یک امپلیکون مرجع بدون جهش بود (واکنش کنترل) که همزمان با تست‌های چندگانه‌ی مخصوص برای ال انجام شد. پس از آن، یک تست تأییدی انجام دادیم که نتایجی تکرارپذیر و بدون اختلاط پرایمرهای مخصوص برای ال‌ها به دست می‌داد. شکل ۲ واکنش‌های تکثیری برای تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال و DNA هر یک از هفت جهش شایع در KRAS را نشان می‌دهد. مقادیر ΔCq در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. همچنین، پرایمرهای مخصوص برای ال تنها الگوهای دارای توالی خاص را تکثیر کردند، چرا که PCR کمی با استفاده از پرایمر مخصوص برای G12S، DNA مربوط به G12V را تکثیر نکرد (شکل ۳).

بررسی جهش ژنتیکی در KRAS با استفاده از نمونه‌های کارسینومای روده‌ی بزرگ

تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال که بر روی ۳۲ نمونه‌ی FFPE سرطان روده‌ی بزرگ انجام شد، در ۲۱ نمونه جهش شناسایی کرد. نمودارهای تکثیر در شکل ۴ نشان داده شده‌اند. واکنش‌ها در قالب سه‌گانه انجام شدند و انحراف‌های معیار منفی و مثبت برای مقادیر $t\Delta Cq$ در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. مقایسه‌ی تست‌های چندگانه‌ی مخصوص برای ال و توالی‌یابی سنگر در جدول ۲ ارائه شده است. در این مطالعه به وسیله‌ی PCR کمی، ما به این

نتیجه رسیدیم که ۲۲ از ۳۰ مورد که برای ژن KRAS بررسی شدند، محصولات قابل تکثیر PCR به دست دادند. ۶ مورد با استفاده از روش سنگر هیچ محصول قابل تکثیری به دست نداد، اما با استفاده از تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال، در KRAS جهش نشان داد. این ناهماهنگی بین تست چندگانه و روش سنگر، احتمالاً به دلیل بالا بودن کسر سلول‌های غیرتوموری و حساسیت بالاتر تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال است. در ۸ نمونه، هیچ محصول قابل تکثیری در پی روش سنگر و یا تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال به دست نیامد. ۷ نمونه از این نمونه‌ها، از درمان‌گاه‌های عمومی محلی گرفته شده و احتمالاً به دلیل پردازش نامناسب، متحمل تخریب و واسرشتی DNA شده بودند [۱۷]. این باور به این دلیل است که هیچ تکثیری در مورد این نمونه‌ها دیده نشد. در هر ۸ نمونه، نمونه‌های منفی سه بار با هر دو روش توالی‌یابی سنگر و تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال آزمایش شدند. نمونه‌های دیگر به دلیل عدم توانایی تکثیر امپلیکون جهش‌نیافته، تخریب‌شده انگاشته شدند.

حساسیت تست چندگانه‌ی PCR کمی برای KRAS

برای اندازه‌گیری حساسیت و اختصاصی بودن تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال، DNAهای استاندارد مرجع که دارای KRAS جهش‌یافته بودند رقیق شدند و با DNA مرجع مخلوط شدند. غلظت DNA جهش‌یافته به مرور کمتر و کمتر شد تا نسبت DNA جهش‌یافته به DNA سالم کمتر شود. ما می‌توانیم در تست چندگانه تا ۰.۱۵٪ (برابر با ۳۵ پیکوگرم) از DNA جهش‌یافته را تشخیص دهیم. مثال‌های نماینده‌ی تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال با استفاده از جهش G12S در DNA ژن KRAS در شکل ۱ بخش تکمیلی مقاله نشان داده شده‌اند. برای سنجش حساسیت تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال، جهش‌های KRAS در مخلوط DNA شامل DNA جهش‌یافته و طبیعی با کسرهای گوناگون (۰.۵٪، ۲.۵٪، ۱.۲۵٪، ۰.۶۲٪، ۰.۳۲٪ و ۰.۱۵٪) مقدارسنجی شدند. نتایج به گونه‌ای تکرارپذیر، خبر از وجود مقادیر مقایسه‌پذیر ال‌های جهش‌یافته‌ی KRAS در همه‌ی دفعات آزمایش دادند. میانگین انحراف معیار مثبت و منفی برای ΔCq که در جدول ۳ نشان داده شده‌اند به وضوح ردیابی

جهش‌های شایع KRAS را ممکن ساختند. با این حال، در غلظت‌های پایین‌تری DNA جهش‌یافته، تست چندگانه‌ی ما بیشتر G12S، G13D و G12C را ردیابی کرد.

بحث

با توجه به این که جهش‌های KRAS با مقاومت به روش‌های علیه EGFR (به وسیله‌ی کتاکسیمب و پانیتومامب) هم‌راستایی نشان می‌دهد، نیاز به تست‌های سریع، ارزان‌قیمت و پُر داده‌ی 17 حس می‌شود که جهش‌های KRAS را در نمونه‌های بالینی تشخیص دهند. روش‌های توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) 18 به شدت توصیه می‌شوند، اما استفاده از آن‌ها فراتر از توانایی مالی و تخصصی آزمایشگاه‌های بالینی معمولی است. با این که توالی‌یابی به روش سنگر استاندارد طلایی برای شناسایی جهش‌های DNA محسوب می‌شود، حساسیت پایین آن نیاز به درصدهای بالاتری از سلول‌های توموری (برای مثال، ۱۰ تا ۳۰٪) به دلیل اتصالات ضربدری DNA و یا تخریب DNA به وسیله‌ی فرمالین و یا میزان کم توالی هدف، ایجاد می‌کند [۲۷، ۲۸].

در جدول ۲، برخی نمونه‌های FFPE هم در تست چندگانه‌ی ما و هم در روش توالی‌یابی سنگر نتیجه‌ای به دست ندادند. بافت‌هایی که قادر به تکثیر DNA جهش‌نیافته‌ی کنترل نبودند، از درمان‌گاه‌های محلی گرفته شدند که امکانات و تخصصی محدود در زمینه‌ی پاتولوژی دارند. دیگران نشان داده‌اند که DNA استخراج‌شده از بافت‌های FFPE احتمالاً کیفیت پایینی دارد که می‌تواند منجر به اینجاد نتایج مثبت و منفی کاذب به دلیل عدم تثبیت و یا تثبیت بیش‌از حد بافت شود [۲۹]. این می‌تواند منجر به ایجاد نتایج منفی کاذب شود که پیامدهای ناخواسته‌ای برای درمان بیمار با استفاده از مهارکننده‌های گیرنده‌های تایروزین کینازی 19 دارد [۱۷]. برای حذف نتایج منفی کاذب، این گزارش از PCR کمی حساس چندگانه و مخصوص برای ال‌ جهت تشخیص جهش‌ها در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS هم‌زمان با تشخیص DNA‌های مرجع جهش‌نیافته در امپلکون‌های کنترل استفاده کرد [۲۲].

معمولاً، نتایج مثبت کاذب به واکنش‌های ضربدری (برای مثال، آلوده شدن نمونه‌ها) در مراحل تخلیص و یا پردازش FFPE مربوط هستند. با این حال، این مشکل در PCR مخصوص برای ال‌ال که بر اساس عملکرد ضعیف Taq در شرایطی که پرایمرها اتصال مناسبی ندارد تبیین شد، حذف می‌شود. با توجه به این که پلیمراز Taq در مراحل پایین‌تری در موارد اتصال ناجور با پرایمر آغاز به فعالیت می‌کند، پرایمرهای KRAS برای توالی‌های جهش‌یافته، گاهی به توالی‌های جهش‌نیافته متصل می‌شوند که این امر نتایج مثبت کاذب با مقادیر بالای Cq ایجاد می‌کند [۳۰]. بنابراین، در این مطالعات، نتایج PCR مخصوص برای ال‌ال، در تست‌های تأییدی ما، برای مقادیر Cq زیر ۴۴ مثبت در نظر گرفته شده‌اند. اگرچه یک تست مشابه یگانه گزارش شد [۲۲]، این رویکرد نیاز به هفت تست PCR مخصوص برای ال‌ال متفاوت داشت و منجر به مصرف DNA الگو و واکنشگرهای Taqman بیشتر پیش از ردیابی جهش می‌شد. بر خلاف این، تست چندگانه‌ی ما به شکل همزمان ه پرایمر جهش‌یافته و کاوشگر را در یک لوله‌ی آزمایش آنالیز می‌کند و مواد مورد نیاز جهت آزمایش را کاش می‌دهد که این امر در موارد استفاده از بافت‌های FFPE که در آن‌ها میزان DNA جهش‌یافته در مقایسه با DNA سالم کم است، اهمیت دارد [۲۲، ۳۱، ۳۲]. با این که اخیراً یک تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال‌ال با استفاده از روش استاندارد PCR نقطه‌ی پایانی و لکه‌گذاری ژل اسید نوکلئیک به وسیله‌ی رنگ سایبر سبز یک‌20 برای شناسایی جهش‌های KRAS در نمونه‌های بالینی به کار گرفته شد [۱۰]، این روش نیازمند دستکاری‌های پس از PCR است که همواره خطر آلوده شدن نمونه‌های آزمایشگاهی را بالا می‌برد، چرا که شامل یک روش PCR نقطه‌ی پایانی و پس از آن، جداسازی به وسیله‌ی الکتروفورز برای شناخت محصولات ۶۴ یا ۶۸ جفت‌بازی است که با جهش‌های G12S و G12V (به ترتیب) در ژن KRAS هم‌خوانی دارند. اگر چه این محصولات کوتاه ممکن است حقیقی باشند [۱۰]، در برخی نمونه‌ها ممکن است حاصل تکثیر محصولات جانبی PCR نقطه‌ی پایانی با وزن کم باشند، به ویژه که به وجود هیچ کاوشگر اختصاصی KRAS اشاره نشده است [۱۰]. همچنین، آنالیز الکتروفورزی رنگ سایبر سبز یک که استفاده شده است، منجر به محدودیت این روش در مطالعات پُر داده می‌شود. بر خلاف این، روش چندگانه‌ی مخصوص برای ال‌ال ما

نه تنها بالقوه می‌تواند نسخه‌های کمیاب DNA جهش‌یافته را ردیابی کند، بلکه استفاده از کاوشگرهای فلورسنت منجر به افزایش حساسیت، اختصاصی بودن و تکرارپذیری آزمایش می‌شود.

این تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال‌ال می‌تواند اجازه‌ی غربالگری سریع، ارزان‌قیمت و پُر داده‌ی جهش‌های شایع ژن KRAS را در یک مرحله، با استفاده از هفت پرایمر اختصاصی برای ال‌ها (G12C, G12R, G12A, G12D, G12S, G12V و G13D)، پرایمرهای شایع Reverse و کاوشگر TaqMan بدهد. بر خلاف گزارش‌هایی که از پلازمید DNA ژن KRAS استفاده کرده‌اند [۱۰، ۲۱] تا حساسیت تست را بسنجند، این تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال‌ال با استفاده از DNA انسانی مرجع که از نمونه‌های بالینی و یا سل‌لاین‌های سرطانی گرفته شده‌اند استاندارد شد و توانایی تشخیص چندگانه‌ی حداقل ۰.۱۵٪ DNA جهش‌یافته (تقریباً ۲۵ پیکوگرم، معادل ۵ کپی از DNA جهش‌یافته‌ی KRAS) را نشان داد. ردیابی اولیه‌ی جهش‌ها در این روش چندگانه، شناسایی اختصاصی هر جهش را با استفاده از تست‌های جداگانه‌ی مخصوص برای هر ال‌ال به دنبال دارد. کیت Cobas KRAS که به لحاظ تجاری قابل تهیه است حساسیتی کم‌تر از ۰.۵٪ برای تشخیص جهش‌های KRAS در کدون‌های ۱۳/۱۲ و کدون ۶۱ دارد. از طرف دیگر، تست PCR تراسکرین RGQ برای ژن KRAS بر اساس گزارش‌ها حساسیت ۱٪ برای تشخیص جهش‌ها در پلازمیدها و سل‌لاین‌ها از خود نشان می‌دهد و هفت جهش در کدون ۱۳/۱۲ شناسایی می‌کند [۳۳]. دیگران اشاره کرده‌اند که کیت PCR تراسکرین RGQ (کیاژن) یا Cobas KRAS (TaqMelt PCR) گران‌قیمت هستند و هزینه به ازای هر نمونه هم به نوع کیت مورد استفاده و هم به کشوری که کیت در آن فروخته می‌شود بستگی دارد. هزینه به ازای هر نمونه برای تست تراسکرین تا سال ۲۰۱۲ برابر بود با ۱۴۳ دلار آمریکا در ایالات متحده آمریکا و این هزینه کم‌تر نشده است. در استفاده از تست Cobas KRAS، هزینه به ازای هر نمونه برابر است با ۹۵ دلار آمریکا و علاوه بر این، تجهیزاتی به جز آن چه برای PCR زمان واقعی نیاز است نیز باید تهیه شود. هزینه‌ی بالا منجر به سختی استفاده از این کیت در فرایندهای بالینی معمولی با تعداد نمونه‌های زیاد می‌شود [۳۴]. دیگر محدودیت‌های مهم برای استفاده از این کیت‌ها، نیازمندی آن‌ها به غلظت‌های بالای ابتدایی DNA است. کیت Cobas KRAS نیازمند ۱۰۰ نانوگرم DNA و کیت تراسکرین

نیازمند بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانوگرم DNA ورودی است، در حالی که تست چندگانه‌ی ما نیازمند ۲۵ نانوگرم DNA در مجموع بود [۳۴]. همچنین، در کشورهای در حال توسعه، هزینه‌ی واردات این کیت‌های آزمایشی، تهیه و استفاده از آن‌ها را مشکل‌تر می‌کند.

معناداری

جهش‌های نابرابر KRAS ممکن است ارزش‌های پیش‌بینی‌کننده‌ی متفاوتی داشته باشند [۲۸، ۳۰]. با این که تست ما جهش‌هایی در KRAS موجود در اگزون ۲، کدون ۱۲ و ۱۳ با حساسیت کمتر یا برابر ۰.۱۵٪ شناسایی کرد، این تست چندگانه نسبت به شناسایی G12S، G13D و G12C در غلظت‌های پایین DNA جهش‌یافته، تورش داشت. شناسایی جهش G12C در کارسینومای ریه‌ی non-small (NSCL) اهمیت بسیار زیادی دارد، چرا که این جهش در سرطان مذکور بسیار شایع است و هم‌راستایی قابل‌توجهی با پیش‌بینی بیماری و مقاومت به روش‌های درمانی مهار تیروزین کینازی دارد [۳۵]. از طرف دیگر، جهش G13D ممکن است تأثیرات کم‌تر و خیمی پس از درمان با کتاکسیمب در سرطان روده‌ی بزرگ داشته باشد [۳۶، ۳۷]. بر خلاف این، بیمارانی که تومورهای سرطان روده‌ی بزرگ دارای جهش‌های KRAS در موقعیت‌های G12V یا G12A دارند، دارای کم‌ترین بقا بودند [۳۱، ۳۲، ۳۵]. در مجموع، تست ما می‌تواند برای شناسایی جهش‌های KRAS در سرطان روده‌ی بزرگ یا کارسینومای ریه‌ی non-small استفاده شود [۳۷، ۳۸، ۳۹].

اطلاعات تکمیلی

شکل یک در مطالب تکمیلی. حساسیت تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال PCR کمی. پنل A نمودارهای تکثیر تست چندگانه را نشان می‌دهد. درصد DNA جهش‌یافته‌ی G12S به DNA طبیعی در ۰.۵٪، ۰.۲۵٪، ۰.۶۲٪، ۰.۳۲٪ و ۰.۱۵٪ نیز نشان داده شده است. DNA طبیعی KRAS (هورایزن، HD135) به عنوان کنترل جهش‌نیافته انتخاب شد. پنل B مقادیر Cq هر واکنش را نشان می‌دهد. این امر پیشنهاد می‌کند که تست چندگانه‌ی ما حساسیت تشخیص ۳۵ پیکوگرم را در مقایسه با نمودارهای خاکستری‌رنگ کنترل دارد.

جدول یک در مطالب تکمیلی. پرایمرها و کاوشگرها. کاوشگر برای KRAS با FAM در انتهای ۵' و MGB در انتهای ۳' نشان‌دار شدند. اتصالات ناجور مصنوعی با حروف کوچک نشان داده شده‌اند [۲۲].

قدردانی‌ها

از مراکزی که بافت‌های FFPE را بر اساس قوانین بیانیه‌ی هلسینکی و با اجازه‌ی کمیته‌ی اخلاق IVIC، توسط الیزابت مندونکا²¹ در مرکز توالی‌یابی UEGF در اختیار ما قرار دادند متشکریم. همچنین از کمک‌های خانندرو کورنخو²² در طراحی‌های گرافیکی متشکریم.

همکاری نویسندگان

ایده‌پردازی: MR

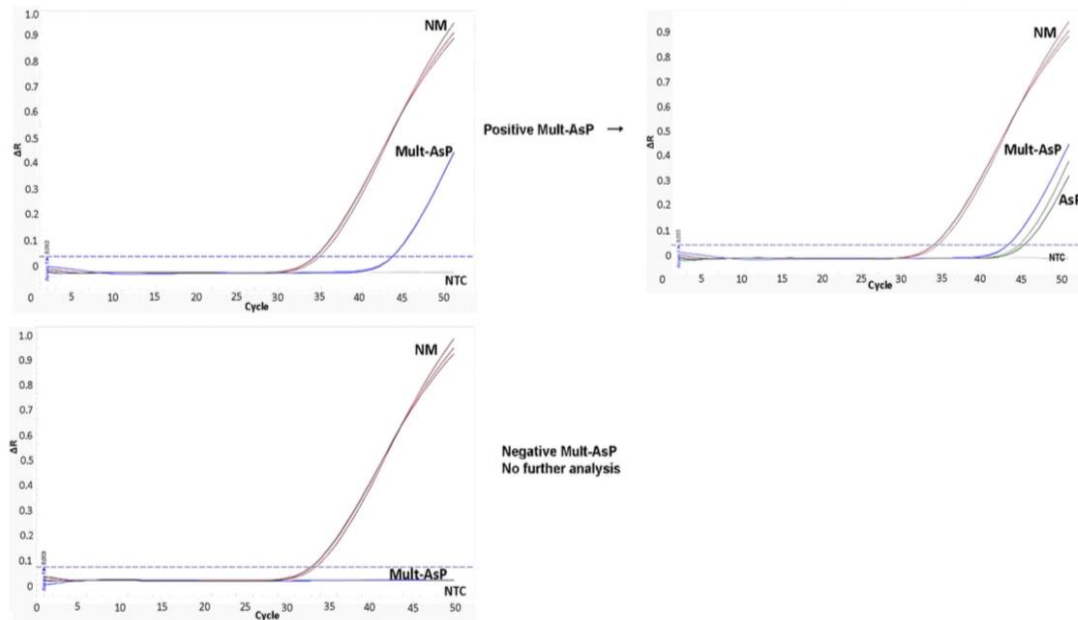
نشان دادن داده‌ها: AO MR

تحلیل صوری: AO MR

فراهم کردن هزینه‌ها: MR

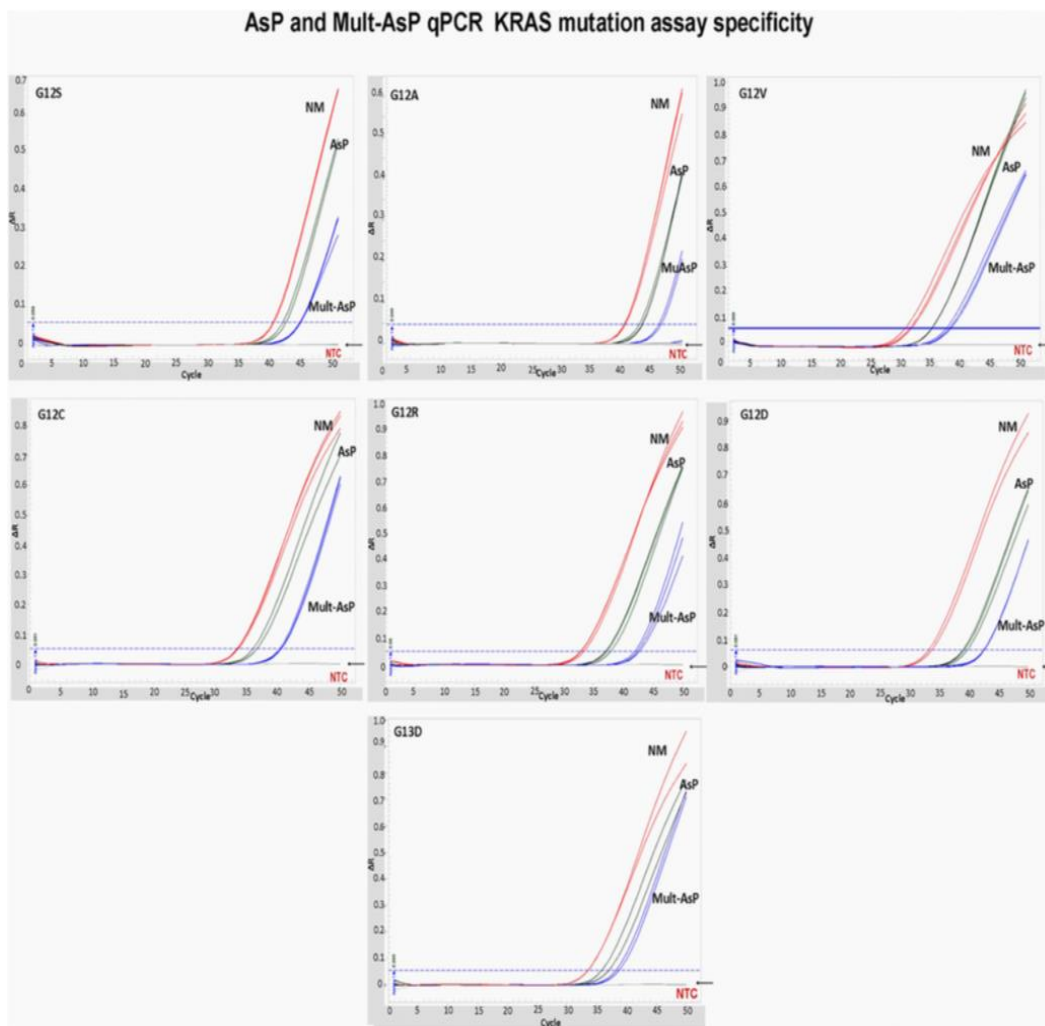
1st q PCR:
 Non mutated KRAS reference amplicon (NM) is run in parallel with single tube Multiplex Allele specific (Multi-AsP) including 7 mutant-specific primer pairs

2nd PCR:
 7 individual q PCR reactions with allele-specific primer pairs (AsP) (G12A, G12R, G12S, G12V, G12D, G12C, G13D)



شکل ۱. طراحی PCR کمی چندگانه برای ژنوتایپینگ KRAS. در مرحله‌ی نخست، PCR انجام شد تا

امپلیکون‌های مرجع KRAS که جهش نیافته بودند تکثیر شوند و همزمان تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال انجام شد که در آن هر دو امپلیکون تکثیر شده بودند. نمونه‌ها به عنوان مثبت تفسیر شدند و هفت پرایمر مخصوص برای ال برای شناسایی هر جهش طراحی شدند. اگر هیچ امپلیکونی در تست چندگانه تکثیر نشوند اما در واکنش مرجع جهش نیافته تکثیر شود، نمونه به عنوان منفی یا طبیعی تفسیر می‌شود.



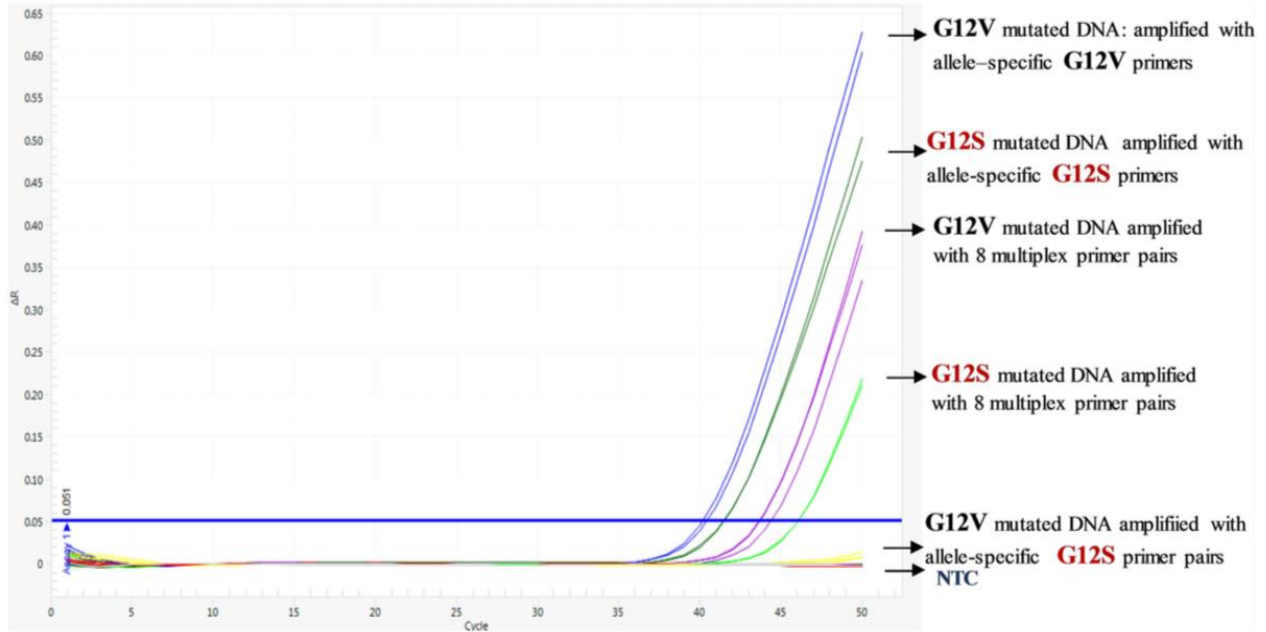
شکل ۲. تست‌های مخصوص برای ال‌ و چندگانه‌ی مخصوص برای ال برای شناسایی جهش‌های KRAS در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ در نمونه‌های مرجع. DNA ژنومی هفت نمونه‌ی استاندارد حاوی جهش‌های KRAS در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ برای تست‌های مخصوص برای ال و چندگانه‌ی مخصوص برای ال استفاده شدند. در همه‌ی موارد PCR کمی شامل واکنش کنترل (قرمز رنگ) می‌شد. هر DNA مرجع در PCR مخصوص برای ال و چندگانه‌ی مخصوص برای ال (خصوص سبز و آبی، به ترتیب) تکثیر شد. نمودارهای خاکستری نشان‌گر واکنش‌های کنترل هستند.

Table 1. ΔCq values of AsP and Multi-AsP qPCR assays.

Mutation	NM		AsP				Multi-AsP			
	\overline{Cq}	SD	\overline{Cq}	SD	$\overline{\Delta Cq}$	SD	\overline{Cq}	SD	$\overline{\Delta Cq}$	SD
G12A	40.27	0.09	43.05	0.29	2.78	0.29	46.23	0.23	5.96	0.16
G12S	39.61	0.13	41.38	0.35	1.77	0.35	44.00	0.07	4.39	0.10
G12R	33.01	0.31	37.37	0.45	4.37	0.45	42.32	0.38	9.32	0.34
G12C	33.36	0.09	36.29	0.42	2.93	0.42	40.34	0.15	6.98	0.12
G12V	30.37	0.52	34.26	0.04	3.89	0.04	37.11	0.39	6.74	0.45
G12D	33.38	0.32	39.38	0.38	6.10	0.38	42.61	0.05	9.23	0.18
G13D	33.64	0.15	36.47	0.82	2.83	0.82	39.04	0.98	5.40	0.74

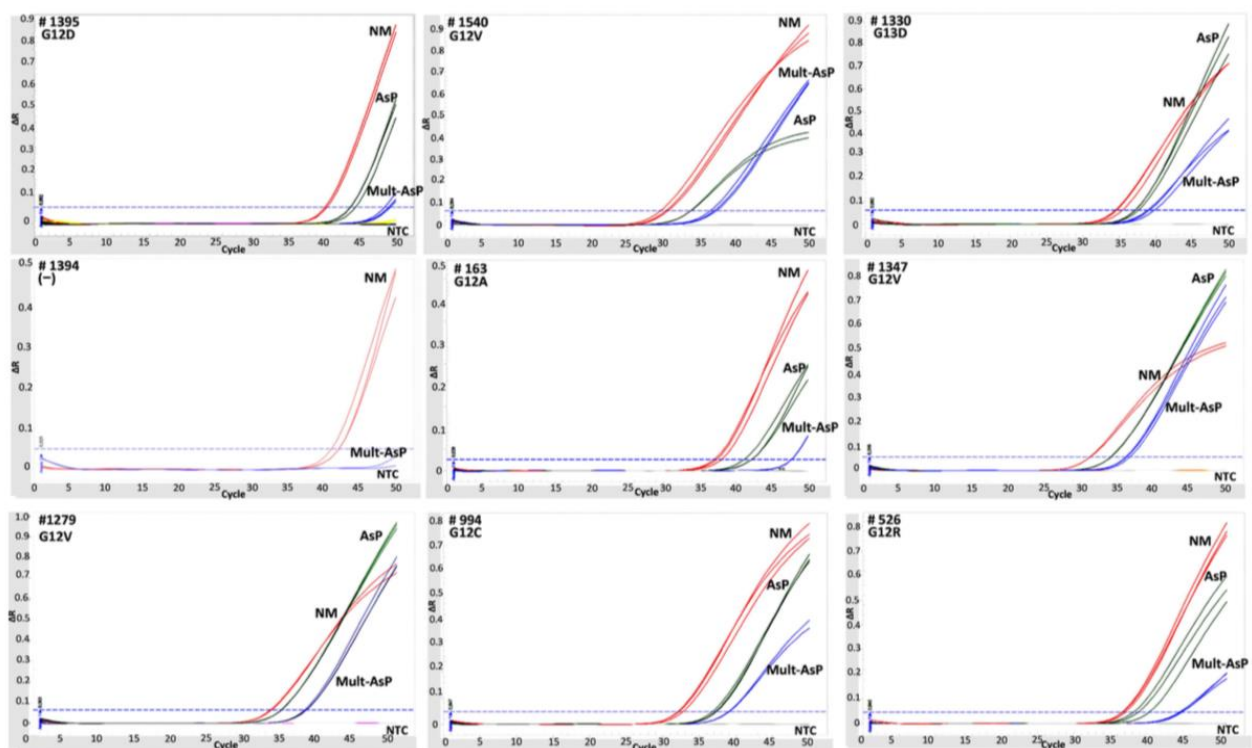
\overline{Cq} represents Cq mean and $\overline{\Delta Cq}$ represents ΔCq mean. No qPCR amplification was detected with the NTC (non-template controls)

جدول ۱



شکل ۳. پرایمرهای مخصوص برای الل تنها توالی‌های مخصوص را شناسایی و تکثیر می‌کنند.

KRAS mutation analysis in clinical FFPE samples of colorectal carcinoma



شکل ۴. آنالیز جهش‌های چندگانه‌ی KRAS در نمونه‌های FFPE سرطان روده‌ی بزرگ. DNA ژنومی از بافت‌های FFPE استخراج و برای تست‌های مخصوص برای ال و چندگانه‌ی مخصوص برای ال استفاده شد. در همه‌ی موارد، تست‌های PCR کمی شامل DNA جهش‌نیافته‌ی مرجع کنترل بود (خط قرمز). هر DNA تکثیر یافته در تست‌های چندگانه تکثیر شد (خط سبز برای تست مخصوص برای ال و خط آبی برای تست چندگانه‌ی مخصوص برای ال). نمودارهای خاکستری واکنش کنترل را نشان می‌دهند.

جدول ٢.

# FFPE	Age	Gender	Tumor Site	qPCR	AsP		Mult-AsP		Sanger sequencing
				Mutation	ΔCq	SD	ΔCq	SD	Mutation
1395	60	F	Metastatic	G12D	2.99	0.41	7.94	0.35	G12D
1330	45	F	Metastatic	G13D	2.40	0.24	4.37	0.12	G13D
1540	67	F	Primary	G12V	3.57	0.07	6.74	0.09	G12V
1777	55	F	Metastatic	G12C	0.86	1.18	3.08	1.10	Undetermined
1279	65	M	Primary	G12V	1.49	0.04	4.84	0.03	G12V
1347	40	F	Metastatic	G12V	2.86	0.04	5.17	0.20	G12V
163	61	F	Primary	G12A	4.40	0.59	10.26	0.02	G12A
994	59	M	Metastatic	G12C	4.78	0.27	6.71	0.10	G12C
526	44	F	Primary	G12R	2.30	1.10	7.88	0.20	G12R
299	50	F	Primary	G12R	3.06	0.80	7.75	1.2	G12R
1739	55	F	Metastatic	G12D	2.46	0.35	5.80	0.45	Undetermined
1778	64	F	Primary	G12D	2.88	0.09	5.86	0.95	Undetermined
1783	37	F	Primary	G12V	3.05	0.81	7.11	0.32	Undetermined
1461	80	F	Primary	G12R	16.02	0.08	13.37	0.40	G12R
1351	63	M	Primary	G12C	1.58	0.92	2.93	0.87	WT
1781	55	M	Metastatic	G13D	3.69	0.22	6.40	0.13	Undetermined
1780	64	M	Primary	G12V	2.67	0.40	5.41	0.78	Undetermined
1241	54	F	Primary	G12D	2.95	0.02	7.18	0.42	G12D
1237	68	M	Primary	G13D	3.03	0.01	5.02	0.30	G13D
1283	54	M	Primary	G12D	3.25	0.06	10.29	0.70	G12D
1584	62	F	Metastatic	G12A	3.85	0.50	9.17	0.67	WT
1350	69	M	Primary	G12C	1.38	0.34	3.52	0.47	G12C
1779	65	M	Metastatic	No amp by NM ref DNA					Undetermined
1667	76	F	Metastatic	No amp by NM ref DNA					Undetermined
1789	62	F	Primary	No amp by NM ref DNA					Undetermined
1675	68	M	Primary	No amp by NM ref DNA					Undetermined
1738	66	F	Primary	No amp by NM ref DNA					Undetermined
1396	73	F	Primary	No amp by NM ref DNA					Undetermined
1782	59	M	Primary	No amp by NM ref DNA					Undetermined
1740	69	M	Primary	No amp by NM ref DNA					Undetermined

جدول ٣.

Table 3. Sensitivity of the KRAS Multiplex qPCR assay.

Input DNA	G12S		G12V		G12R		G12A		G12C		G12D		G13D	
	ΔCq	SD	ΔCq	SD	ΔCq	SD	ΔCq	SD	ΔCq	SD	ΔCq	SD	ΔCq	SD
5% (1.12 ng)	3.62	0.27	5.68	0.37	4.74	0.32	4.08	0.72	3.59	0.30	5.89	0.31	2.54	0.14
2.5% (0.56 ng)	3.94	0.14	5.4	0.11	4.88	0.63	4.89	0.38	3.55	0.41	6.69	0.13	2.47	0.09
1.25% (0.28 ng)	3.99	0.17	5.07	0.17	5.14	0.28	5.13	0.51	4.6	0.73	7.20	0.64	2.84	0.38
0.62% (0.14 ng)	3.6	0.60	5.27	0.35	5.75	0.34	5.1	0.11	4.29	0.21	6.71	0.14	3.07	0.76
0.32% (70 pg)	3.09	0.22	8.08	0.74	6.23	0.43	4.91	0.2	3.97	0.61	7.72	0.60	3.51	0.64
0.15% (35 pg)	<u>3.54</u>	0.10	8.62	0.89	5.6	0.12	5.22	0.81	<u>4.04</u>	0.39	7.52	0.84	<u>3.65</u>	0.49

ΔCq represents ΔCq mean. Preferential detection of G12S, G12C, G13D mutations at lower KRAS levels is indicated by the underlined numbers, with no qPCR amplification evident in the respective NTC (non-template controls).

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2015; 65 (1):5–29. doi: [10.3322/caac.21254](https://doi.org/10.3322/caac.21254) PMID: [25559415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25559415/)
2. Huang Q, Wang G, Huang J-F, Zhang B, Fu W. High sensitive mutation analysis on KRAS2 gene using LNA/DNA chimeras as PCR amplification blockers of wild type alleles. *Molecular and Cellular Probes*. 2010; 24:376–380. doi: [10.1016/j.mcp.2010.07.010](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.07.010) PMID: [20732413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20732413/)
3. Roberts PJ, Stinchcombe TE. KRAS mutation: should we test for it, and does it matter?. *J Clin Oncol* 2013; 31(8):1112–21. doi: [10.1200/JCO.2012.43.0454](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.0454) PMID: [23401440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23401440/)
4. Macedo M.P., de Lima LG, Begnami MD, de Melo FM, Andrade LD, Lisboa BC, et al. KRAS insertions in colorectal cancer: what do we know about unusual KRAS mutations? *Exp Mol Pathol* 2014; 96:257–260. doi: [10.1016/j.yexmp.2014](https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014) PMID: [24594115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24594115/)
5. Han JH, Kim SH, Lee Y-S, Lee S-Y, Hwang J-A, Kima J, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing with conventional sequencing for predicting the responsiveness to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) therapy in never-smokers with lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2014; 85(2):161–7. doi: [10.1016/j.lungcan.2014.04.009](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.04.009) PMID: [24857785](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24857785/)
6. Plesec T.P., Hunt J.L. KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv. Anat. Pathol* 2009; 16: 196–203. doi: [10.1097/PAP.0b013e3181a9d4ed](https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181a9d4ed) PMID: [19546608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19546608/)
7. Borras E, San Lucas FA, Chang K, Zhou R, Masand G, Fowler J, et al. Genomic Landscape of Colorectal Mucosa and Adenomas. *Cancer Prev Res (Phila)* 2016; 9(6):417–27. doi: [10.1158/1940-6207.CAPR-16-0081](https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0081) PMID: [27221540](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27221540/)
8. Ostrow S, Simon E, Prinz E, Bick T, Shentzer T, Sima S. et al. Variation in KRAS driver substitution distributions between tumor types is determined by both mutation and natural selection. *Sci. Rep* 2016; 6:21927. doi: [10.1038/srep21927](https://doi.org/10.1038/srep21927) PMID: [26902163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26902163/)
9. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6(9):519–527. doi: [10.1038/nrclinonc.2009.111](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.111) PMID: [19636327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19636327/)
10. Seekhndod S, Thavarungkul P, Chaichanawongsaroj N. Validation of a multiplex allele specific polymerase chain reaction assay for detection of KRAS gene mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from colorectal cancer patients. *PloS One* 2016; 11(1): e0147672. doi: [10.1371/journal.pone.0147672](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147672) PMID: [26812617](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26812617/)
11. Milbury C, Li J, Liu P, Makrigiorgos M. Cold-PCR: improving the sensitivity of molecular diagnostics assays. 2011. *Expert Rev Mol Diagn* 2011; 11(2):159–69. doi: [10.1586/erm.10.115](https://doi.org/10.1586/erm.10.115) PMID: [21405967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21405967/)
12. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005; 7(3): 413–421. doi: [10.1016/S1525-1578\(10\)60571-5](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60571-5) PMID: [16049314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16049314/)
13. Whitehall V, Tran K, Umapathy A, Grieu F, Hewitt C, Evans TJ, et al. A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting. *J Mol Diagn* 2009; 11, 543–552. doi: [10.2353/jmoldx.2009.090057](https://doi.org/10.2353/jmoldx.2009.090057) PMID: [19815694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19815694/)
14. Weichert W, Schewe C, Lehmann A, Sers C, Denkert C, Budczies J, et al. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. *J Mol Diagn* 2010; 12, 35–42 doi: [10.2353/jmoldx.2010.090079](https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090079) PMID: [20007841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20007841/)
15. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn* 2010; 12(4): 425–432. doi: [10.2353/jmoldx.2010.090188](https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090188) PMID: [20431034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20431034/)
16. Amicarelli G, Shehi E, Makrigiorgos GM, Adlerstein D. FLAG assay as a novel method for real-time signal generation during PCR: application to detection and genotyping of KRAS codon 12 mutations. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(19):e131. doi: [10.1093/nar/gkm809](https://doi.org/10.1093/nar/gkm809) PMID: [17932053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17932053/)
17. Morandi L, de Biase D, Visani M, Cesari V, De Maglio G, Pizzolitto S, et al. Allele specific locked nucleic acid quantitative PCR (ASLNAqPCR): an accurate and cost effective assay to diagnose and quantify KRAS and BRAF mutation. *PloS One* 2012; 7(4):e36084. doi: [10.1371/journal.pone.0036084](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036084) PMID: [22558339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22558339/)
18. Gaudet M, Fara A, Beritognolo I, Sabatti M. Allele-specific PCR in SNP genotyping. *Methods Mol Biol* 2009; 578:415–424. doi: [10.1007/978-1-60327-411-1_26](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_26) PMID: [19768609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19768609/)

19. Little S. 2001. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet* 2001; Chapter 9: Unit 9.8. doi: [10.1002/0471142905.hg0908s07](https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0908s07) PMID: [18428319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18428319/)
20. Wang J, Yang H, Shen Y, Wang S, Lin D, Ma L, et al. Direct sequencing is a reliable assay with good clinical applicability for KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Cancer Biomark* 2013; 13(2):89–97. doi: [10.3233/CBM-130334](https://doi.org/10.3233/CBM-130334) PMID: [23838137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23838137/)
21. Halait H, Demartin K, Shah S, Soviero S, Langland R, Cheng S, et al. Analytical performance of a real-time PCR-based assay for V600 mutations in the BRAF gene, used as the companion diagnostic test for the novel BRAF inhibitor vemurafenib in metastatic melanoma. *Diagn Mol Pathol* 2012; 21, 1–8. doi: [10.1097/PDM.0b013e31823b216f](https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e31823b216f) PMID: [22306669](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22306669/)
22. Lang A, Drexel H, Geller-Rhomberg S, Stark N, Winder T, Geiger K, et al. Optimized allele-specific real time PCR assays for the detection of common mutations in KRAS and BRAF. *J Mol Diagn* 2011; 13:23–28. doi: [10.1016/j.jmoldx.2010.11.007](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.007) PMID: [21227391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21227391/)
23. Szankasi P, Reading NS, Vaughn CP, Prchal JT, Bahler DW, Kelley TW. A quantitative allele-specific PCR test for the BRAF V600E mutation using a single heterozygous control plasmid for quantitation: a model for qPCR testing without standard curves. *J. Mol. Diagn* 2013; 15:248–254. doi: [10.1016/j.jmoldx.2012.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.11.005) PMID: [23313362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23313362/)
24. Zhang H, Zheng X, Ji T, Fu L, Bai D, Liao Y, et al. Comparative screening of K-ras mutations in colorectal cancer and lung cancer patients using a novel real-time PCR with ADx-K-ras kit and Sanger DNA sequencing. *Cell Biochem Biophys* 2012; 62(3): 415–420. doi: [10.1007/s12013-011-9318-x](https://doi.org/10.1007/s12013-011-9318-x) PMID: [22048888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22048888/)
25. Wang T, Liu J-H, Zhang J, Wang L, Chen C, Dai P. A multiplex allele-specific real-time PCR assay for screening of ESR1 mutations in metastatic breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2015; 98(2): 152–157. doi: [10.1016/j.yexmp.2015.03.004](https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.03.004) PMID: [25746663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25746663/)
26. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(8): 3992–3995. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-06-0191](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0191) PMID: [16618717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16618717/)
27. Desai AN, Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clin Genet* 2012; 81(6):503–10. doi: [10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x) PMID: [22375550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22375550/)
28. Naidoo J, Dylon A. KRAS mutant lung cancers in the era of targeted therapy. *Adv Exp Med Biol* 2016; 893:155–78. doi: [10.1007/978-3-319-24223-1_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_8) PMID: [26667343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26667343/)
29. Cong T, Xiang D. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18(37): 5171–5180.
30. Huang MM, Arnheim N, Goodman MF. Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20:4567–73. PMID: [1408758](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1408758/) PMCID: [PMC334186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC334186/)
31. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2009; 205: 858–862. doi: [10.1016/j.prp.2009.07.010](https://doi.org/10.1016/j.prp.2009.07.010) PMID: [19679400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19679400/)
32. Stintzing S, Stremtizer S, Sebio A, Lenz HJ. Predictive and prognostic markers in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): personalized medicine at work. *Hematol Oncol Clin North Am* 2015; 29: 43–60. doi: [10.1016/k.hoc.2014.09.009](https://doi.org/10.1016/k.hoc.2014.09.009) PMID: [25475572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25475572/)
33. Gonzalez de Castro D, Angulo B, Gomez B, Mair D, Martinez R, Suarez-Gauthier A, et al. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *B J Cancer* 2012; 107: 345–351. doi: [10.1038/bjc.2012.259](https://doi.org/10.1038/bjc.2012.259) PMID: [22713664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22713664/)
34. Domagała P, Hybiak J, Sulzyc-Bielicka V, Cybulski C, Ryś J, Domagała W. KRAS mutation testing in colorectal cancer as an example of the pathologist's role in personalized targeted therapy: a practical approach. *Pol. J Pathol.* 2012 Nov; 63(3): 145–64. doi: [10.5114/PJP.2012.31499](https://doi.org/10.5114/PJP.2012.31499) PMID: [23161231](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23161231/)
35. Fiala O, Pesek M, Finek J, Benesova L, Belsanova B, Minarik M. The dominant role of G12C over other KRAS mutation types in the negative prediction of efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Genetics* 2013; 206(1–2): 26–31. doi: [10.1016/j.cancergen.2012.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2012.12.003) PMID: [23313110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23313110/)
36. Chen CC, Er TK, Liu YY, Hwang JK, Barrio MJ, Rodrigo M, et al. Computational analysis of KRAS mutations: implications for different effects on the KRAS p.G12D and p.G13D mutations. *PLoS One* 2013; 8(2):e55793. doi: [10.1371/journal.pone.0055793](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055793) PMID: [23437064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23437064/)
37. Mao C, Huang YF, Yang ZY, Zheng DY, Chen JZ, Tang JL. KRAS p.G13D mutation and codon 12 mutations are not created equal in predicting clinical outcomes of cetuximab in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer* 2013; 119(4):714–21. doi: [10.1002/cncr.27804](https://doi.org/10.1002/cncr.27804) PMID: [22972628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22972628/)
38. Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ET, Winter A, Pickford IR, Birnie GD. Heterogeneity of mutant versus wild-type K-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol.* 1998; 185:130–8. doi: [10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199806\)185:2<130::AID-PATH85>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199806)185:2<130::AID-PATH85>3.0.CO;2-M) PMID: [9713338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9713338/)
39. Fiala O, Buchler T, Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Martin Matejka V, Holubec L, et al. G12V and G12A KRAS mutations are associated with poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *Tumor Biol.* 2016; 37(5):6823–30 doi: [10.1007/s13277-015-4523-7](https://doi.org/10.1007/s13277-015-4523-7) PMID: [26662311](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26662311/)