

体外診断用医薬品

BRAF遺伝子変異検出キット

MEBGEN™ BRAF キット

[全般的な注意]

- 本品は体外診断用です。それ以外の目的で使用しないでください。
- 本品は、生体由来組織中のBRAF遺伝子エクソン15（コドン600）における変異を検出する試薬です。本品の判定対象外の変異を有する場合、正しく判定されない可能性があります。また、結果に基づく治療方針の決定は、医薬品の添付文書や適正使用ガイド等の最新の情報を参照し、他の関連する検査結果や臨床症状などと合わせて担当医師が総合的に判断してください。
- 添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。また、使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。測定に使用するための器具・装置は適正に整備されたものを使用してください。本品はLuminex®100/200™システム（以下、Luminexシステム）の専用試薬ですので、測定にはLuminexシステムを使用してください。記載された方法及び目的以外での使用については、Index値の信頼性を保証いたしません。
- マスターミックス、ビーズミックス、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄用緩衝液（10倍濃縮品）、SA-PE希釈液及びSA-PEには、0.05%のアジ化ナトリウムが含まれています。目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
- 試薬の使用時には、保護眼鏡と使い捨て手袋（パウダーフリー）を着用し、試薬が目、皮膚、粘膜に触れないように注意してください。もし、このようなことが起きた場合には、大量の水で十分に洗い流してください。また必要があれば医師の手当てなどを受けてください。こぼした場合は、水で希釈してから拭き取ってください。
- 野生型コントロールDNA（10倍濃縮品）は、HBs抗原、HCV抗体及びHIV抗体が陰性であることを確認した血液に由来するDNAですが、これらのウイルス及び他のウイルスの混入を完全に否定できる試験方法ではないため、検体同様、感染の可能性があるものとして注意して取り扱ってください。

[形状・構造等（キットの構成）]

構成試薬	48回包装	
	容量	数量
①マスターミックス BR600-F、BR600-R、dATP、dCTP、dGTP、dUTP、dTTP	1 mL	1
②ビーズミックス BR_1_PC、BR_2_V600Ea、BR_3_V600Eaa、BR_4_V600K	0.25 mL	1
③ハイブリダイゼーション緩衝液	*5 mL	*1
④洗浄用緩衝液（10倍濃縮品）	25 mL	1
⑤SA-PE希釈液	5 mL	1

⑥SA-PE フィコエリスリン標識ストレプトアビジン	25 µL	1
⑦Taq DNAポリメラーゼ Taq DNAポリメラーゼ	7 µL	1
⑧ウラシルDNAグリコシラーゼ	7 µL	1
⑨野生型コントロールDNA（10倍濃縮品）	10 µL	1

①、⑦、⑧、⑨は－15～－35℃保存品。

②～⑥は2～8℃保存品。

②、⑥は遮光保存品。

[使用目的]

がん組織から抽出したDNA中のBRAF遺伝子変異（V600E又はV600K）の検出（ダブラフェニブメシル酸塩及びトラメチニブ ジメチルスルホキシド付加物の併用療法、又はエンコラフェニブ及びビニメチニブの併用療法の悪性黒色腫患者への適応判定の補助）

[測定原理]

本品はPCR-rSSO（polymerase chain reaction-reverse sequence specific oligonucleotide）法に基づいてBRAF遺伝子の変異を検出する試薬です。

測定試料から抽出したDNAを検体として、ビオチン標識プライマーを含むマスターミックスとTaq DNAポリメラーゼによって、BRAF遺伝子をPCR増幅させます。続いて、PCR増幅産物とビーズミックスを反応させ、ビーズミックスに含まれる蛍光ビーズ上のプローブとPCR増幅産物をハイブリダイズさせます。ビーズミックスには、遺伝子変異を検出するプローブを固相したビーズ（BRAF遺伝子変異検出ビーズ）が含まれています。ビーズを洗浄した後、蛍光標識タンパク質であるSA-PE（フィコエリスリン標識ストレプトアビジン）とビーズ・PCR増幅産物複合体を反応させ、PCR増幅産物を蛍光標識します。

Luminexシステムを用いてビーズとPEの蛍光を測定しBRAF遺伝子における変異の有無を判定します。

[操作上の注意]

1. コンタミネーションの防止方法

本品はPCR増幅を伴うため、コンタミネーションに十分注意する必要があります。コンタミネーションは、主にエアロゾル、検体などで汚染されたピペットの使用が原因となりますので、検査区域の分割やピペットの専用化がコンタミネーションの防止に効果的です。更に、紫外線照射や0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 約1,000 ppm）などを用いて作業環境を清浄化することで、コンタミネーションの危険を最小限にすることができます。

本品はPCR増幅反応前にウラシルDNAグリコシラーゼ（UDG）を用いてウラシルを含むDNAを分解し（UDG反応）、PCR増幅産物のキャリアオーバーコンタミネー

ションによる偽陽性を防止します。しかし、検体由来のコンタミネーションは防止することができませんので、十分な注意が必要です。したがって、次の事項に従うことを推奨します。

- (1) 操作を行う場所は、エリア1、エリア2及びエリア3の3区域に分けてください。各エリア専用のピペットとチップなどの器具を用意し、他のエリアとの共用はしないでください。
- (2) エリア1では、PCR増幅に用いる試薬の調製と分注を行います。紫外線照射可能なクリーンベンチなどをエリア1として利用すると便利です。
- (3) エリア2では、測定試料からのDNA抽出と調製を行います。検体を扱うチップはフィルター付きのものを用いてください。
- (4) エリア3では、ハイブリダイゼーション反応及びSA-PE反応に用いる試薬の調製と分注、PCR増幅及び検出を行います。このエリアで使用する器具や保護衣及びPCR増幅産物は、他のエリアに持ち込まないでください。
- (5) 実験台、使用器具などが検体やPCR増幅産物で汚染された場合は、用時調製した0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液でよく拭き取ってください。ピペットなどの器具外部の汚染には、0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液による拭き取り、あるいは紫外線照射を行ってください。ピペットなどの内部が汚染された場合は、直ちに使用を中止してください。
- (6) 使い捨ての手袋はパウダーフリーの製品を使用してください。
手袋のパウダーは酵素反応を阻害する物質を含むものがあり、反応溶液中に混在すると判定結果に影響を及ぼす可能性があります。

2. 測定試料

がん組織のFFPE組織切片^{1), 2)}を測定試料とし、測定試料から抽出したDNAを検体として用います。DNA抽出には、遺伝子検査に適したDNA抽出試薬を用いてください。本品での測定にはDNA溶液を5 µL使用します。DNA濃度は、10~20 ng/µLを推奨します。

3. 検体の保管法

抽出したDNAは、DNaseなどのコンタミネーションを避け、-20℃以下で凍結して保管してください。

4. PCR増幅産物の取扱い

PCR増幅終了後にPCR増幅産物を一時保存する場合は、4℃で保存し、できるだけ速やかにハイブリダイゼーション反応に使用してください。4℃での保存は16時間以内としてください。室温で保管すると、わずかに残存しているUDG活性によってPCR増幅産物が分解される可能性があります。

PCR増幅産物を保存する場合は、必ず-20℃以下で凍結してください。凍結保存したPCR増幅産物を使用する場合は、できる限り短い時間で融解させ、十分に混和してから使用してください。

5. 妨害物質

以下について、本品の判定結果に影響がないことを確認しました。

- ・出血性組織（FFPE切片試料の溶解工程までにヘモグロビンを4 mg/mL及び2 mg/mL添加）
- ・脂肪組織（FFPE切片試料の溶解工程までにトリグリセリドを74 mmol/L及び37 mmol/L添加）
- ・メラニン（FFPE切片試料の溶解工程までにメラニンを0.2 µg/mL添加）
- ・メラニン（ヒトゲノムDNAにメラニンを1 ng/反応添加）

なお、メラニンは、FFPE切片試料の溶解工程までに2 µg/mL以上、若しくはヒトゲノムDNAに5 ng/反応以上添加した場合に、本品の判定結果に影響を与えることを確認しました。

6. 交差反応性

本品のプライマー及びプローブの配列を用いてBLAST検索を行い、交差反応の可能性を検討しました。その結果、プライマーが測定対象以外の配列を増幅する可能性やプローブが測定対象以外の配列を検出する可能性は極めて低いと判断しました。

7. その他

ハイブリダイゼーション工程において、油性ペンを用いてプレート上面に着色すると、ウェル内にインク成分が混入して非特異蛍光が生じる場合があります。その結果、偽陽性が生じたり、ピーズアドレスが誤って認識されることがありますので、油性ペンによるプレートの着色は避けてください。やむを得ず使用する場合は、ウェルから十分離れた場所に着色し、ウェル内やウェル縁に着色しないようにしてください。

【用法・用量（操作方法）】

注意：本品は、Luminexシステムの専用試薬です。Luminexシステムの操作方法に従って測定してください。

また、本検査は熟練を要するため、検体の調製及び操作法を十分に修得するまでは2重測定することをお薦めします。なお、エリア1~3については「操作上の注意」を参照してください。

1. 本品以外に必要な器具・器材・試薬

(1) DNA抽出

- 1) DNA抽出用試薬
- 2) DNA抽出に必要な器具・器材
- 3) 滅菌精製水又はDNA溶解液（1 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 mmol/L EDTA）

(2) PCR

- 1) クリーンベンチ（溶液調製用）
- 2) マイクロピペット、フィルター付きチップ
- 3) 増幅反応用PCRプレート
- 4) プレートシール
- 5) サーマルサイクラー（アプライドバイオシステムズ VRTi Dx（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）など）

(3) 検出

- 1) マイクロピペット（検体が多い場合、5 μ L、50 μ Lを量り取れるマルチチャンネルピペットがあると便利です）
- 2) ディスペンサートレイ
- 3) プレートシール
- 4) プレートミキサー又はボルテックスミキサー
- 5) Luminexシステム（一般的名称：遺伝子解析装置）
- 6) Luminexシステム測定用プレート
- 7) プレートカバー
- 8) サーマルサイクラー（アプライドバイオシステムズ VRTi Dx（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）など）
- 9) プレート遠心機（Plate Spin II（久保田商事株式会社）など）
- 10) 洗浄機（405プレートウォッシャー（BioTek社）など）
※洗浄機を使用する場合は、[問い合わせ先] にお問い合わせください。

(4) その他

- 1) 消耗品等は使用する機器のメーカーが推奨するものを使用してください。
- 2) 必要な器材・試薬の詳細については[問い合わせ先]にお問い合わせください。
- 3) 紫外線照射箱（コンタミネーション防止用）
- 4) 0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液（コンタミネーション防止用）

2. 試薬の調製法

本品の構成試薬のうち、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄用緩衝液（10倍濃縮品）及びSA-PE希釈液は室温（20～30℃）に戻してから使用してください。ハイブリダイゼーション緩衝液及び洗浄用緩衝液（10倍濃縮品）は析出する場合がありますので、使用前に完全に溶解していることを確認してください。

マスターミックス及び野生型コントロールDNAは、使用前に完全に融解していることを確認してください。

ビーズミックス中のビーズは沈殿するため、使用前によく混和してください。ビーズミックス、SA-PE及びこれらを用いて調製した試薬は光によって退色するため、試薬調製時以外は遮光してください。

- (1) 野生型コントロールDNA溶液の調製（エリア2で調製してください。）
野生型コントロールDNA（10倍濃縮品）を滅菌精製水等を用いて10倍に希釈します。チューブ1本あたり10 μ Lの溶液が入っていますので、90 μ Lの滅菌精製水等を加えて希釈してください。希釈後の溶液は冷蔵で保存し、6箇月以内に使用してください。
- (2) PCR溶液の調製 [用時調製]（エリア1で調製してください。）
1テストあたり、マスターミックス20 μ LにTaq DNAポリメラーゼ0.125 μ L及びウラシルDNAグリコシラーゼ0.125 μ Lを加えてよく混和します。調製後はすぐに使用してください。
- (3) ハイブリダイゼーション溶液の調製 [用時調製]（エリア3で調製してください。）
1テストあたり、ハイブリダイゼーション緩衝液40 μ L

にビーズミックス5 μ Lを加えてよく混和します。調製後はすぐに使用してください。

- (4) 洗浄液の調製 [用時調製]（エリア3で調製してください。）
洗浄用緩衝液を、精製水を用いて10倍に希釈します。
- (5) SA-PE溶液の調製 [用時調製]（エリア3で調製してください。）
1テストあたり、SA-PE希釈液50 μ LにSA-PE 0.5 μ Lを加えてよく混和します。調製後はすぐに使用してください。

3. 検体の調製

本品は、[操作上の注意] 2. 測定試料の注意事項に留意して抽出したDNAを検体として用います。

DNAは遺伝子検査に適した方法で抽出してください。

抽出DNAは、滅菌精製水又はDNA溶解液で10～20 ng/ μ Lに調製します。コンタミネーション防止のため、検体の調製はエリア2で行ってください。

4. 操作法

注意：本品はPCR増幅を伴うため、検体やPCR増幅産物のコンタミネーションに注意してください。

- (1) 増幅反応用PCRプレートの各ウェルにPCR溶液20 μ Lを分注します。この操作はエリア1で行います。
- (2) 各ウェルに野生型コントロールDNA溶液又は検体5 μ Lを加え、蓋をしてよく混和し、軽い遠心などで溶液をプレートの底に集めます。この操作はエリア2で行います。
- (3) 次の条件でPCR増幅を行います。以降の操作はエリア3で行います。
(例示：アプライドバイオシステムズ VRTi Dx[®]の場合)
※ [9700Max] モードは使用しないでください。
Hold 40℃ 5分
Hold 95℃ 2分
Cycle 94℃ 20秒、64℃ 30秒（10サイクル）
Cycle 90℃ 20秒、62℃ 30秒、72℃ 30秒（45サイクル）
Hold 72℃ 1分
Hold 95℃ 10分
増幅後は、次の操作まで4℃で冷蔵（Hold 4℃ forever）します。16時間以内に次の操作を開始してください。
- (4) 新たに準備したLuminexシステム測定用プレートの各ウェルにハイブリダイゼーション溶液45 μ Lを分注します。
- (5) ハイブリダイゼーション溶液分注後の各ウェルにPCR増幅産物5 μ Lを加え、ピペッティングなどでよく混和し、プレートシールなどで蓋をします。
- (6) プレートカバーでプレートと蓋を密着させ、次の条件でハイブリダイゼーション反応を行います。
(例示：アプライドバイオシステムズ VRTi Dx[®]の場合)
※ [9700Max] モードは使用しないでください。
Hold 95℃ 2分
Hold 56℃ 30分
ハイブリダイゼーション反応終了後は、速やかに次の操作に移ってください。サーマルサイクラーのプログラムは、Hold 56℃ 30分の後に、Hold 20℃ forever[®]を設定してください。[®]foreverの段階は放置可能という意味ではありません。

- (7) 溶液が飛び散らないように注意して蓋を外し、洗浄操作を行います。

【洗浄機による洗浄】

ハイブリダイゼーション反応後のプレートを洗浄機にセットし、指定のプログラムによって洗浄操作を行います。

※洗浄機を使用する場合は、[問い合わせ先]にお問い合わせください。

【手法による洗浄】

各ウェルに洗浄液50 μLを加えます。プレート遠心機を用いて2,000×gで1分間又は1,000×gで5分間遠心した後、各ウェルの上清を除去します。この一連の操作を2回行います。

- (8) 各ウェルにSA-PE溶液50 μLを加え、ピペッティングなどで混和し、プレートシールなどで蓋をします。プレートカバーでプレートと蓋を密着させ、次の条件でSA-PE反応を行います。

(例示：アプライドバイオシステムズ VRTi Dx[®]の場合)
※ [9700Max] モードは使用しないでください。

Hold 52℃ 15分

反応させた後は、速やかに次の操作に移ってください。サーマルサイクラーのプログラムは、Hold 52℃ 15分の後に、Hold 37℃ forever^{*}を設定してください。^{*}foreverの段階は放置可能という意味ではありません。

- (9) Luminexシステムにセットし、測定します。

【測定結果の判定法】

判定は、以下のように行います。

1. PCビーズ測定値の確認

陽性コントロールビーズ (PCビーズ：BR_1_PC) は増幅を確認するためのビーズです。PCビーズの測定値がカットオフ値以上であることを確認します。

PCビーズ (BR_1_PC) のカットオフ値は3,000です。

2. Index値算出

1. が満たされている場合に、BRAF遺伝子変異の判定が可能となります。「測定検体」のBRAF遺伝子変異検出ビーズ (変異検出ビーズ) 測定値及び「野生型コントロールDNA溶液」の変異検出ビーズ測定値を用いて、次の計算式によってIndex値を算出します。

$$\text{Index値} = A - B \times \frac{C}{D}$$

A：測定検体の変異検出ビーズ測定値

B：野生型コントロールDNA溶液の変異検出ビーズ測定値

C：測定検体のPCビーズ測定値

D：野生型コントロールDNA溶液のPCビーズ測定値

3. 各増幅領域の判定

2. で算出されたIndex値について、各変異検出ビーズに設定されたカットオフ値を用いて変異検出ビーズの陽陰

性を判定し、BRAF遺伝子変異の陽陰性を判定します。

BRAF変異検出ビーズ (BR_2_V600Ea) のカットオフ値は400です。

BRAF変異検出ビーズ (BR_3_V600Eaa) のカットオフ値は1,300です。

BRAF変異検出ビーズ (BR_4_V600K) のカットオフ値は900です。

PCビーズがカットオフ値以上かつBRAF遺伝子変異検出ビーズが1つ以上陽性の場合、BRAF遺伝子変異陽性としします。

PCビーズがカットオフ値以上かつBRAF遺伝子変異検出ビーズが全て陰性の場合、BRAF遺伝子変異陰性としします。

PCビーズがカットオフ値未満の場合、判定保留としします。

判定の補助として、解析ソフトウェア「Luminex[®]解析ソフトウェア UniMAGTM v2」を使用することで、迅速に判定結果を得ることも可能です。対応可能な解析ソフトウェアのバージョンについては、[問い合わせ先]にお問い合わせください。

【判定上の注意】

1. 腫瘍細胞の割合が低い組織を用いると、BRAF遺伝子変異を有する腫瘍細胞が存在した場合でも変異陰性と判定されることがあります。
2. Luminexシステムでの測定が正常に終了していることを確認してから判定してください。Sample emptyなどのエラー表示がある場合、正しい判定結果を得られない可能性があります。
3. 本品の判定対象外の変異を有する場合、正しく判定されない可能性があります。
4. 野生型コントロールDNAが検体等により汚染された場合、判定に影響を及ぼす可能性があります。
5. 判定保留とは、当該検体を用いて測定した場合に判定結果が得られなかったことを示します。
本添付文書の [全般的な注意]、[操作上の注意] 及び [測定結果の判定法]「判定上の注意」を十分に確認し、必要に応じて再検査を行ってください。
6. メラニン色素含有量が多い検体の場合、メラニン色素が反応を阻害し、判定結果が得られないことがあります。そのような場合は、推奨濃度範囲内で検体を希釈する、PCR阻害物質除去キットOneStep PCR Inhibitor Removal Kits (ザイモリサーチ社) を用いて検体を精製するなどによって、判定結果を得られることがあります。

【臨床的意義】

悪性黒色腫 (メラノーマ) は、メラノサイトが癌化した腫瘍です。本邦における罹病率は年間10万人あたり1.12人と報告されており³⁾、皮膚癌の中では基底細胞癌、有棘細胞癌に次ぐ頻度で発生します。

悪性黒色腫では様々な遺伝子異常が報告されていますが、BRAF遺伝子変異が最も多く、白人では患者全体の40～60%、日本人では約30%と報告されています³⁾。また、日本人患者におけるBRAF遺伝子変異の94%がV600E変異、6%がV600K変異と言われています⁴⁾。

BRAF遺伝子変異を有する悪性黒色腫の場合、BRAF阻害薬による治療を選択することが可能です。BRAF阻害薬単剤療法では、半年から1年程度で治療抵抗性になることが知られているため、BRAF阻害薬にMEK阻害薬を併用する治療法（エンコラフェニブ及びビニメチニブ、又はダブラフェニブ及びトラメチニブ）が推奨されています。そのため、悪性黒色腫では、BRAF遺伝子変異の有無に応じて治療方法を選択する必要がある、治療方針の決定前にBRAF遺伝子変異検査を実施することが重要です。

本品は、PCR-rSSO法を用いてBRAF遺伝子変異を検出する体外診断用医薬品であり、悪性黒色腫患者におけるBRAF阻害薬+MEK阻害薬併用療法（エンコラフェニブ及びビニメチニブ、又はダブラフェニブ及びトラメチニブ）の適応判定の補助として有用です。

【性能】

1. 性能試験には以下の管理検体を用いました。

- 管理検体1：BRAF遺伝子変異陽性検体（BR_2_V600Ea 陽性）
管理検体2：BRAF遺伝子変異陽性検体（BR_3_V600Eaa 陽性）
管理検体3：BRAF遺伝子変異陽性検体（BR_4_V600K 陽性）
管理検体4～7：BRAF遺伝子V600E及びV600K変異陰性検体

(1) 感度試験

	BR_1_PC	BR_2_V600Ea	BR_3_V600Eaa	BR_4_V600K
管理検体1	≥3,000	≥400	<1,300	<900
管理検体2		<400	≥1,300	
管理検体3			<1,300	≥900
管理検体4				<900
管理検体5				
管理検体6				
管理検体7				

(2) 正確性試験

- 1) 管理検体1を用いて試験するとき、PCビーズ（BR_1_PC）及びBRAF変異検出ビーズ（BR_2_V600Ea）は陽性を示し、BRAF変異陽性と判定される。
2) 管理検体2を用いて試験するとき、PCビーズ（BR_1_PC）及びBRAF変異検出ビーズ（BR_3_V600Eaa）は陽性を示し、BRAF変異陽性と判定される。
3) 管理検体3を用いて試験するとき、PCビーズ（BR_1_PC）及びBRAF変異検出ビーズ（BR_4_V600K）は陽性を示し、BRAF変異陽性と判定される。
4) 管理検体4～7（BRAF遺伝子V600E及びV600K変異陰性）を用いて試験するとき、PCビーズ（BR_1_PC）は陽性、その他のビーズは陰性を示し、BRAF変異陰性と判定される。

(3) 同時再現性試験

- 1) 管理検体1から3を3回同時に測定するとき、全てBRAF変異陽性と判定される。
2) 管理検体4から7を3回同時に測定するとき、全てBRAF変異陰性と判定される。

2. 最小検出感度
375 コピー/反応（2本鎖DNAとして）

3. 較正用基準物質
自社調製品

4. 相関性試験成績
悪性黒色腫由来の検体を用いて、対照法（リアルタイムPCR法）との相関を確認した結果は次のとおりです。

<主要評価項目>

		対照法（リアルタイムPCR法）		
		陽性	陰性	合計
本品	陽性	131	0	131
	陰性	1	126	127
	判定保留	18	24	42
	合計	150	150	300

全体一致率85.7%（95%CI：81.2～89.4%）
陽性一致率87.3%（95%CI：80.9～92.2%）
陰性一致率84.0%（95%CI：77.1～89.5%）

対照法でBRAF遺伝子変異陽性、本品でBRAF遺伝子変異陰性となった1例は、TaqMan Mutation Detection Assaysによって変異の有無を確認したところ、BRAF遺伝子変異陽性でした。

対照法でBRAF遺伝子変異陽性又は陰性と判定され、本品で判定保留となった42例は、対照法（リアルタイムPCR法）で再測定をした結果、2例が判定保留、20例がBRAF遺伝子変異陽性、20例がBRAF遺伝子変異陰性でした。

これらを反映して再解析した結果は次のとおりです。なお、対照法（リアルタイムPCR法）で判定結果が得られなかった2例は除外しました。

<不一致解析1>

		対照法（リアルタイムPCR法）			
		陽性	陰性	判定保留	合計
本品	陽性	131	0	0	131
	陰性	1	126	0	127
	判定保留	20	20	2	42
	合計	152	146	2	300

全体一致率86.2%（95%CI：81.8～89.9%）
陽性一致率86.2%（95%CI：79.7～91.2%）
陰性一致率86.3%（95%CI：79.6～91.4%）

本品の結果が判定保留となった42例は、検体中の妨害物質（メラニン）の影響を受けた可能性が示唆されました。そのため、PCR阻害物質除去キット（OneStep PCR Inhibitor Removal Kits）を用いて精製した後、本品で再測定しました。再測定の結果を用いて再解析した結果は次のとおりです。なお、42例中1例は検体量が不足したため再測定を実施しませんでした。また、対照法（リアルタイムPCR法）で判定結果が得られなかった2例は除外しました。

<不一致解析2>

		対照法（リアルタイムPCR法）			
		陽性	陰性	判定保留	合計
本品	陽性	145	0	0	145
	陰性	7	144	2	153
	判定保留	0	2	0	2
	合計	152	146	2	300

全体一致率97.0%（95%CI：94.3～98.6%）

陽性一致率95.4%（95%CI：90.7～98.1%）

陰性一致率98.6%（95%CI：95.1～99.8%）

〔使用上又は取扱い上の注意〕

1. 取扱い上の注意

- (1) コンタミネーションを防止するために紫外線を照射する場合は、紫外線ランプを直視したり、照射したまま作業しないでください。
- (2) 試薬が目や口に入った場合には、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
- (3) 試薬及び検体を調製する際に、口でピペットを扱わないでください。
- (4) ハイブリダイゼーション緩衝液には特異臭があります。強く吸い込まないように注意して使用してください。

2. 使用上の注意

- (1) 外箱記載の使用期限を過ぎた試薬は、Index値の信頼性を保証できませんので、使用しないでください。
- (2) 異なる製品ロットの試薬を混合したり、組み合わせたりして使用しないでください。また、同一の製品ロットであっても試薬を注ぎ足すことはしないでください。
- (3) 開封後はなるべく早く使用し、保存する場合は蓋を閉めて指定の方法で保存してください。マスターミックスは-15～-35℃で保存できますが、凍結融解回数は6回以内としてください。Taq DNAポリメラーゼ及びウラシルDNAグリコシラーゼは室温に放置すると失活する可能性がありますので、使用後は-15～-35℃で保存してください。
- (4) 試薬の調製に使用する容器や器具は、清浄なものを使用してください。
- (5) ヒトゲノムDNAを含まないサンプルの結果については、Index値の信頼性を保証いたしません。

3. 廃棄上の注意

- (1) 検体は感染の可能性があるものとして注意して取り扱ってください。検査に使用した器具は、次のいずれかの方法で処理してください。
 - ・2%グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸漬する。
 - ・0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸漬する。
- 試薬及び器具などを廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法などの規定に従って処理してください。

- (2) マスターミックス、ビーズミックス、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄用緩衝液（10倍濃縮品）、SA-PE希釈液及びSA-PEには、0.05%のアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは、鉛管、銅管と反応して爆発性の金属アジドを生成することがありますので、これらの試薬を廃棄する際は大量の水と共に流してください。

〔貯蔵方法〕

構成試薬のうち

- ①マスターミックス
- ⑦Taq DNAポリメラーゼ
- ⑧ウラシルDNAグリコシラーゼ
- ⑨野生型コントロールDNA（10倍濃縮品）

は-15～-35℃で保存してください。

その他の試薬は凍結を避けて2～8℃で保存してください。

- ②ビーズミックス
- ⑥SA-PE

は遮光保存してください。

〔有効期間〕

12箇月（使用期限は外箱に記載されています。）

〔包装単位〕

製品コード	製品名	包装
GS-D0441	MEBGEN BRAF キット（冷凍品）	48回包装
GS-D0442	MEBGEN BRAF キット（冷蔵品）	48回包装

〔主要文献〕

- 1) 「遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル」日本臨床検査標準協議会
- 2) 「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」日本病理学会
- 3) 日本皮膚科学会、日本皮膚悪性腫瘍学会、皮膚悪性腫瘍ガイドライン第3版メラノーマ診療ガイドライン2019.
- 4) Sakaizawa, K. et al. J Dermatol Sci. 2015, vol. 80, p. 33-37.

〔問い合わせ先〕

株式会社医学生物学研究所 学術部
〒105-0012 東京都港区芝大門二丁目1番8号
住友不動産芝大門二丁目ビル
TEL：03-6854-3613 E-mail：kensa@mbi.co.jp

**〔製造販売元〕

株式会社医学生物学研究所
〒105-0012 東京都港区芝大門二丁目1番8号
住友不動産芝大門二丁目ビル
TEL：03-6684-6860 FAX：03-6854-3615

下記は株式会社医学生物学研究所の登録商標です。

「MEBGEN」（登録商標 第5350681号）

「UniMAG」（登録商標 第5521789号）

測定フローチャート MEBGEN™ BRAF キット

PCR溶液調製 ☆

PCR溶液
20 µL/well 分注

マスターミックス	20.0 µL/reaction
Taq DNAポリメラーゼ	0.125 µL/reaction
ウラシルDNAグリコシラーゼ	0.125 µL/reaction

☆ 各数値は1反応あたりの必要量です。複数検体分の溶液を調製する際は、チップやチューブ等に残留する分を考慮して調製することをお勧めします。
マスターミックスは、使用前に完全に融解していることを確認してください。

<エリア1>

PCR増幅に用いる試薬の調製と分注

紫外線照射可能なクリーンベンチなどをご利用ください。
このエリア専用のピペットを用意し、
フィルター付きチップを使用してください。

検体

5 µL/well 添加

検体(抽出DNA)調製

10~20 ng/µL推奨

wtdna

(野生型コントロールDNA溶液)

5 µL/well 添加

wtdna(野生型コントロールDNA溶液)調製

野生型コントロールDNA

(10倍濃縮品) 10 µL

滅菌精製水

90 µL

<エリア2>

測定試料からのDNA抽出と調製

このエリア専用のピペットを用意し、
フィルター付きチップを使用してください。

PCR増幅

40℃, 5 min
↓
95℃, 2 min
↓
[94℃, 20 sec → 64℃, 30 sec] × 10 cycles
↓
[90℃, 20 sec → 62℃, 30 sec → 72℃, 30 sec] × 45 cycles
↓
72℃, 1 min
↓
95℃, 10 min
↓
4℃, forever ※

アプライドバイオシステムズ VRTi Dx
25 µL/reaction
[9700Max] モードは使用しないでください。



※ forever の段階は、放置可能という意味ではありませんのでご注意ください。

<エリア3>

検出反応に用いる試薬の調製と分注、
PCR増幅及び検出操作

このエリア専用のピペットをご用意ください。
このエリアで使用する器具や保護衣及び
PCR増幅産物は他のエリアに持ち込まないでください。
(コンタミネーションの原因になります)

ハイブリダイゼーション溶液

45 µL/well 分注

ハイブリダイゼーション溶液調製 ☆

ハイブリダイゼーション緩衝液
40 µL/reaction

ビーズミックス
5 µL/reaction

成分が析出する場合がありますので、
完全に溶解していることを確認し、室温
(20℃~30℃)に戻してから使用してください。

ビーズは沈殿するため、
使用前によく混和してください。
残りのビーズミックスは遮光して保存してください。

PCR増幅産物
5 µL/well 添加

ピペティングもしくはプレートミキサーで混和してください。

ハイブリダイゼーション反応

95℃, 2 min
↓
56℃, 30 min
↓
20℃, forever ※

アプライドバイオシステムズ VRTi Dx
50 µL/reaction
[9700Max] モードは使用しないでください。



ハイブリダイゼーション反応終了後、速やかに洗浄操作を行ってください。

用手法による洗浄操作の場合

洗浄液

50 µL/well 添加

遠心分離

2,000×g, 1 min

もしくは
1,000×g, 5 min

上清除去

洗浄液

50 µL/well 添加

遠心分離

2,000×g, 1 min

もしくは
1,000×g, 5 min

上清除去

SA-PE溶液

50 µL/well 添加

洗浄液調製 ☆

洗浄用緩衝液
(10倍濃縮品)
10 µL/reaction

滅菌精製水
90 µL/reaction

成分が析出する場合がありますので、完全に溶解していることを確認し、
室温(20℃~30℃)に戻してから使用してください。

ハイブリダイゼーション反応終了前に調製し遮光してください。

SA-PE溶液調製 ☆

SA-PE
0.5 µL/reaction

SA-PE 希釈液
50 µL/reaction

残りのSA-PEは遮光保存してください。

室温(20℃~30℃)に戻してから
使用してください。

SA-PE溶液添加後、ピペティングもしくはプレートミキサーで混和し、速やかにSA-PE反応を行ってください。

SA-PE反応

52℃, 15 min
↓
37℃, forever ※

アプライドバイオシステムズ VRTi Dx
50 µL/reaction
[9700Max] モードは使用しないでください。



Luminex®システムでの測定

結果の判定

Luminex®解析ソフトウェアUniMAG™ v2によって迅速な判定が可能です。

Luminex® システムの起動 スタートアップ

起動後4時間以上放置すると
レーザーが消え、ウォームアップに30分かかります。



スタートアップ終了確認 Batch 作成