NOMBRE DEL PRODUCTO

Nombre del producto: Kit de detección de mutaciones PNAClamp ™

Nombre de la marca: PNAClamp ™ BCR-ABL Mutation Detection Kit

USO PREVISTO

El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ BCR-ABL es una prueba de diagnóstico in vitro destinada a la detección de la mutación somática en el oncogén BCR-ABL y proporcionará una evaluación cualitativa del estado de la mutación. El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ BCR-ABL debe ser utilizado por profesionales de laboratorio capacitados, en un entorno de laboratorio, utilizando (por ejemplo) ADN extraído de muestras de sangre.

El kit es para uso diagnóstico in vitro.

Lea atentamente las instrucciones antes de su uso.

El PNAClamp™ Kit de detección de mutaciones BCR-ABL es un dispositivo de diagnóstico con la marca CE de acuerdo con la Directiva de dispositivos médicos de diagnóstico in vitro 98/79 / EC de la Unión Europea.

Tabla 1. Mutación de BCR-ABL detectada por este kit

No.	Reactivo	Exón	Cambio de aminoácidos	Cambio de nucleótidos	Cosmic No.
1	Mezcla BCR-ABL PNA	6	p.T315I	c.944 C> T	12560

* Los números cósmicos se han tomado del "Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer". **(http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic)**

PAGSPRINCIPIO Y DESCRIPCIóN GENERAL

El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ BCR-ABL se basa en la tecnología de sujeción por PCR en tiempo real mediada por péptidos nucleicos (PNA). El PNA es un análogo de ADN sintético en el que la cadena principal del fosfodiéster se reemplaza por una repetición similar a un péptido formada por unidades de (2-aminoetil) -glicina.

La sujeción por PCR en tiempo real mediada por PNA se basa en las dos propiedades únicas siguientes de las sondas de PNA. En primer lugar, el PNA se hibridará con su secuencia diana de ADN complementaria solo si la secuencia coincide completamente. Dado que los dúplex de PNA / ADN son termodinámicamente más estables que los correspondientes dúplex de ADN-ADN, incluso con un solo emparejamiento incorrecto, el PNA no se unirá a la hebra de ADN complementaria, a diferencia del ADN. En segundo lugar, los oligómeros de PNA no son reconocidos por las ADN polimerasas y no se utilizarán como cebadores en la subsecuencia de PCR en tiempo real. En cambio, sirve como una abrazadera select iva de secuencia que evita la amplificación durante la PCR posterior.

Cuando hay una mutación en el gen diana y, por lo tanto, hay un desajuste, el dúplex de ADN / PNA se desestabiliza, lo que permite el alargamiento de la cadena de un oligómero de ADN unido que sirve como cebador de PCR. El resultado es la reacción positiva en la PCR en tiempo real de las muestras que albergan el alelo mutante, mientras que se suprime la amplificación del gen de tipo salvaje.

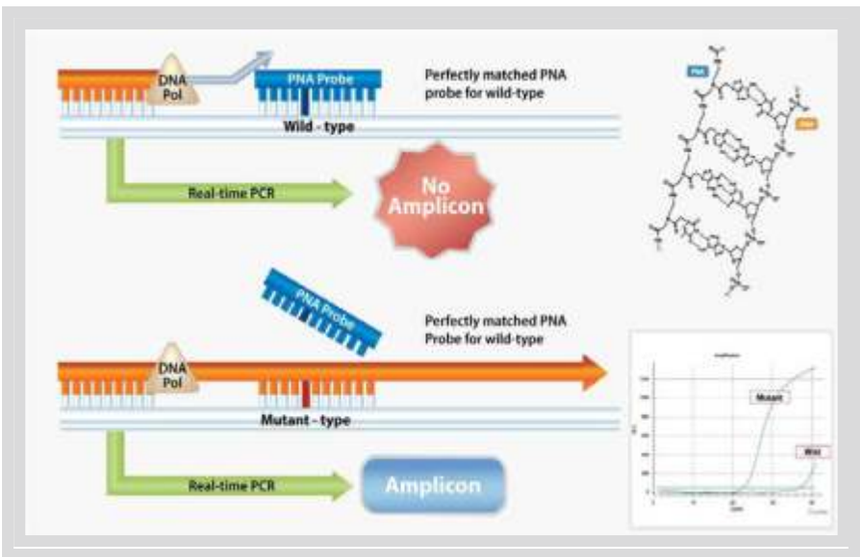


Figura 1. Principio del Kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ BCR-ABL

El kit puede detectar rápidamente la mutación T315I (en 2 h) con alta sensibilidad incluso con una pequeña cantidad de ADN (10 ng). El límite de detección del kit, cuando el gen mutado se mezcla con un fondo de tipo salvaje, es inferior al 1%.

INFORMACIóN DE SEGURIDAD

La hoja de datos de seguridad del material (MSDS) está disponible a pedido.

EQUIPOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS POR EL USUARIO

Reactivos y equipos para extracción de ADN
Tubos o placas de PCR sin ADNasa de 0,2 ml
Pipetas
Un instrumento de PCR en tiempo real equipado con un detector que permite la evaluación del tinte SYBR Green

Tabla 2. Lista de instrumentos de PCR en tiempo real compatibles

Empresa	Modelo
Bio-Rad	CFX 96
Roche	Ciclador de luz 480 II
ABI	ABI 7500
ABI	ABI 7900
ABI	ABI StepOnePlus
ABI	QuantStudio 5
Qiagen	Rotor-Gene Q

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PAGS Lea atentamente las instrucciones y familiarícese con todos los componentes del kit antes de usarlo.

PNAClamp™ El kit de detección de mutaciones BCR-ABL es para uso diagnóstico in vitro.

UNATodos los experimentos deben realizarse en condiciones estériles adecuadas con técnicas asépticas.

Esorecomendado que los usuarios dispongan de pipetas y puntas de pipeta con filtro dedicadas independientes para añadir la plantilla de ADN y durante la prep aración de los reactivos.

Utilice siempre guantes sin talco Cuando usted manejar el equipo.

Para evitar la congelación y descongelación repetidas, coloque alícuotas de todos los reactivos en volúmenes adecuados y almacénelos congelados hasta su uso. Descongele los volúmenes apropiados de reactivos antes de cada experimento.

Todo experimental procedimientos debería de ser realizada temperatura ambiente. Sin embargo, exponerBCR-ABL PNA 2X La premezcla a temperatura ambiente debe minimizarse para una amplificación óptima.

Disuelva los reactivos completamente y mézclelos completamente con vórtex.

La solución de premezcla BCR-ABL PNA 2X contiene colorante fluorescente y debe mantenerse en la oscuridad.

Si se extrajo ADN de un bloque de parafina, es posible que se requieran pasos de purificación adicionales.

Los tubos de PCR deben enclenque centrifugado antes de su uso.

Usando volumen no recomendado para reactivo no solo provoca una pérdida de rendimiento, sino que también aumenta la posibilidad de un resultado falso.

El uso de un volumen y una concentración no recomendados para la muestra de ADN objetivo no solo provoca una pérdida de rendimiento, sino que también aumenta el cambio de resultados falsos.

No intercambie ni mezcle diferentes lotes u otros productos de fabricación.

Al utilizar instrumentos, utilice únicamente los consumibles recomendados. De lo contrario, los instrumentos no se podrán utilizar o pueden aparecer resultados falsos.

Es posible que sea necesario realizar pruebas de validación adicionales por parte del usuario cuando se utilizan instrumentos no recomendados.

No reutilice los reactivos restantes después de que se complete la amplificación por PCR.

No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.

CONDICIóN DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ BCR-ABL se envía en un paquete de hielo y aún debe estar congelado al llegar. Si el kit no está congelado a la llegada, comuníquese con PANAGENE Inc. o con el distribuidor local.

El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ BCR-ABL debe almacenarse inmediatamente después de recibirlo a -15°C hasta -20°C. Cuando se almacena en las condiciones de almacenamiento recomendadas en el paquete, el kit es estable hasta la fecha de vencimiento etiquetada.

Después de abrir el kit, la vida útil es de 3 meses.

CONTENIDO DEL KIT

Tienda en -15℃ hasta -20℃

No.	Nombre del componente	Descripción	Volumen	Etiqueta de tapa
1	Mezcla sin PNA	Solo cebadores	90 µl	BCR-ABL 1
2	BCR-ABL Mezcla de PNA	T315I PNA y cebadores	90 µl	BCR-ABL 2
3	BCR-ABL PNA 2X premezcla	PCR premezcla de reacción	600 µl	Premezcla BCR-ABL 2X
4	Control de sujeción	Salvaje-tipo de ADN	200 µl	Control BCR-ABL

* Cada kit contiene material suficiente para analizar 25 muestras de ADN para todas las mutaciones.

PROCEDIMIENTOS

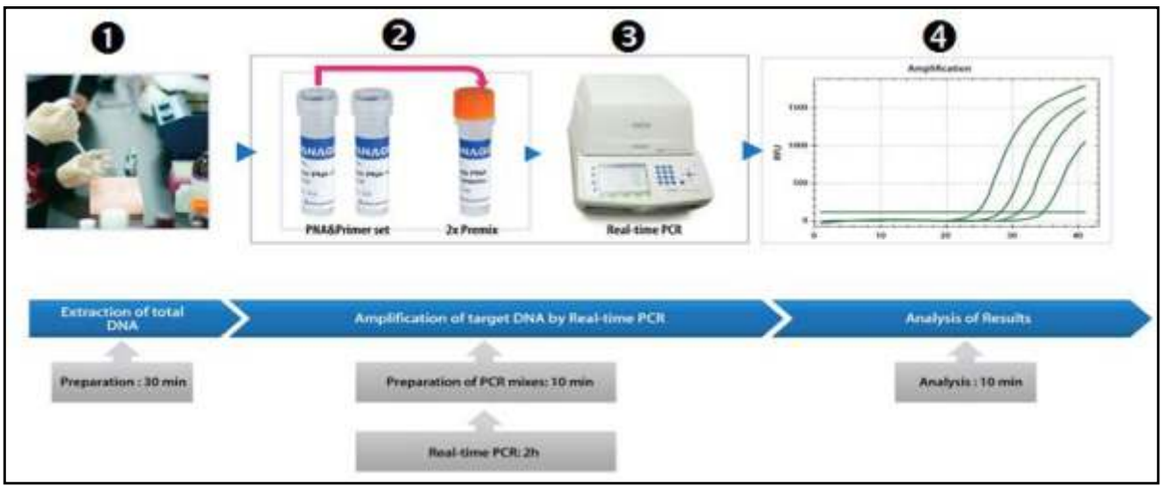


Figura 2. Flujo de trabajo del Kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ BCR-ABL

1. Preparación de ADN

Los reactivos de recolección de muestras y extracción de ADN no están incluidos en el kit, por lo que deben ser proporcionados por el usuario.

1) Las muestras de sangre se pueden utilizar como muestras.
2) Transporte de muestras: utilice la metodología patológica estándar para garantizar la calidad de las muestras.
3) Para la extracción de ADN, se recomienda el kit de preparación de plantillas de PCR de alta pureza (Roche Diagnostics, número de catálogo 11796828001).
4) El ADN extraído se puede almacenar a 4℃ por hasta 24 horas, o en- 20℃ para almacenamiento a largo plazo.

2. Preparación de la mezcla de PCR en tiempo real

Tabla 3. Preparar la mezcla de reacción según la reacción.

Componentes	Volumen
BCR-ABL PNA 2X Premezcla (#3)	10 µl
Cada mezcla de PNA (# 1 ~ # 2)	3 µl
ADN extraído (10 ng en total) o control de sujeción (#4)	7 µl
Volumen total	20 µl

1) Prepare 2 tubos de PCR para analizar un conjunto de muestras de ADN. Etiquételos como S1 y S2. Prepare otro conjunto de 2 tubos para el control de sujeción (ADN de tipo salvaje) y etiquételos como C1 y C2.
2) Añada 10 µl de premezcla BCR-ABL PNA 2X (nº 3 del kit) a cada tubo.
3) Para cada tubo de PCR, agregue 3 µl de la mezcla de PNA correspondiente del # 1 ~ 2 del kit. Por ejemplo, los tubos S1 y C1 tendrán la mezcla n. ° 1 sin PNA n. ° 1, los tubos S2 y C2 tendrán la mezcla n. ° 2 de BCR-ABL PNA n. ° 2.
4) Para los tubos de PCR S1 ~ S2, agregue 7 µl de muestra de ADN preparada (10 ng en total) a cada tubo para obtener un volumen final de 20 µl.
5) Para los tubos de PCR C1 ~ C2, agregue 7 µl de control de sujeción (nº 4 del kit).
6) Si tiene más de una muestra de ADN para analizar, prepare un conjunto de controles de sujeción para todo el experimento. En tal caso, se recomienda preparar una mezcla maestra que contenga 2X Premix y cada mezcla de PNA para todas las muestras y alícuotas de 13 µl en cada tubo de PCR.
7) Cuando todos los reactivos estén cargados, cierre / selle firmemente el tubo de PCR o la placa de 96 pocillos. De lo contrario, los reactivos restantes pueden evaporarse.

3. Reacción de PCR en tiempo real

Realice una PCR en tiempo real utilizando las condiciones de ciclo que se describen a continuación

UN CICLO		
Pre-desnaturalización	94℃	5 minutos
CICLISMO DE CUATRO PASOS (40 CICLOS)		
Desnaturalización	94℃	30 segundos
Sujeción PNA	70℃	20 segundos
Recocido	63℃	30 segundos
Extensión*	72℃	30 segundos

* Configure la detección para leer SYBR Green en 72℃.
** Si usa Light Cycler 480 II, configure 45 ciclos para un ciclo de cuatro pasos.

4. Evaluación

*** Consulte la guía del usuario del instrumento especializado de Panagene para conocer el método de análisis detallado.**

1) Control de sujeción (control de ADN de tipo salvaje)

(1) Determine el valor Ct de cada reacción de PCR. El número de ciclo en el que se detecta una señal por encima de la fluorescencia de fondo se denomina umbral de ciclo (Ct).

(2) Los valores de Ct del control de sujeción (tubo C1 ~ C2) deben caer en el rango indicado en la Tabla 4. El ensayo debe repetirse si los valores no están en el rango recomendado.

Tabla 4. Lo aceptable Rango de CTs de control de sujeción

Ensayo	Rango de Ct aceptable
① Mezcla sin PNA (C1)	$22 \leq X \leq 27$

Ensayo	Rango aceptable de ΔCt-1 *
② Mezcla BCR-ABL PNA (C2)	<2

* ΔCt-1 = [Ct estándar] - [Ct de muestra o Ct de control de sujeción], los valores de Ct estándar se indican en la Tabla 6 a continuación.

2) Muestras de ADN

(1) Determine los valores de Ct de cada muestra (S1 y S2).

i. Valor Ct de la mezcla sin PNA (S1) debe ser 22 ~ 35.

ii. El valor Ct de la mezcla sin PNA (S1) puede servir como control interno para indicar la pureza y la concentración de ADN. Por lo tanto, la validez de la prueba puede decidirse por el valor Ct de la mezcla sin PNA (S1) como se muestra en la Tabla5.

Tunable 5. El aceptabilidad de las muestras

Aceptabilidad	Connecticut valor de la mezcla no PNA (S1)	Descripciones y recomendaciones
óptimo 2	2 <Connecticut <30	La amplificación y la cantidad de muestra de ADN son óptimas.
Aceptable	30≤ Ct <35	La tunaEl gen rget se amplificó con baja eficiencia. Para másconfiableComo resultado, se sugiere que se repita la reacción de PCR con una mayor cantidad de ADN.
Inválido	Connecticut ≤22	La posibilidad de falsos positivos es alta. Repita la reacción de PCR con una menor cantidad de ADN.
	35≤ Connecticut	La amplificación falló. Verifique la cantidad y pureza del ADN. Es posible que se requiera una nueva preparación de ADN.

(2) Calcule el ΔCt-1 valores restando el muestra de valores Ct (o valor Ct de control de sujeción) de el estandarValores Ct. Si el Ct de muestrasse muestra comoNA (no aplicable), luego establezca el valor Ct en 38 para cálculos adicionales.

* ΔCt-1 = [Estándar Connecticut] - [Muestra Connecticut (S2) o control de sujeción Ct]

Tabla 6. El valor de Ct estándar

Ct estándar	Instrumento						
	Bio-Rad CFX96	Roche LC480	ABI 7500	ABI 7900	ABI StepOne Plus	ABI Quant Estudio 5	Rotor-Gene Q
Mezcla BCR-ABL PNA	35	35,5	36	36	36	36	35,5

(3) C calcular ΔCt-2 [Valor Ct de muestra restado por el valor Ct de NoPNA mezcla].

** ΔCt-2 = [Samplio Connecticut (S2)] - [Mezcla sin PNA Connecticut (S1)]

(4) Evalúe el resultado junto con los valores deΔ Ct-1 y ΔCt-2 como se indica en la Tabla 7.

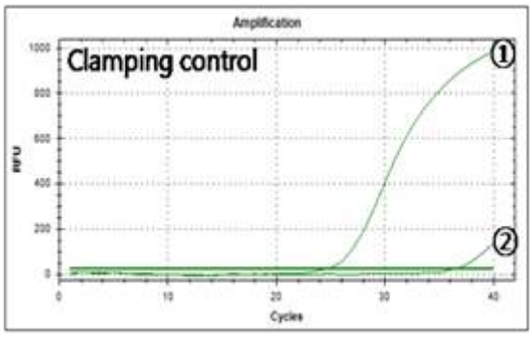
Cuadro 7. Evaluación del resultado

ΔCt-1	ΔCt-2	Evaluación
2≤ Δ Ct-1	Todo el valor	Mutante BCR-ABL T315I
0 <ΔCt-1 <2	ΔConnecticut-2 ≤4	Mutante BCR-ABL T315I
	4 <ΔConnecticut-2	Salvaje
ΔCt-1 ≤0	Todo el valor	Salvaje

EJEMPLOS DE ANÁLISIS

1. Uso de Bio-Rad CFX96

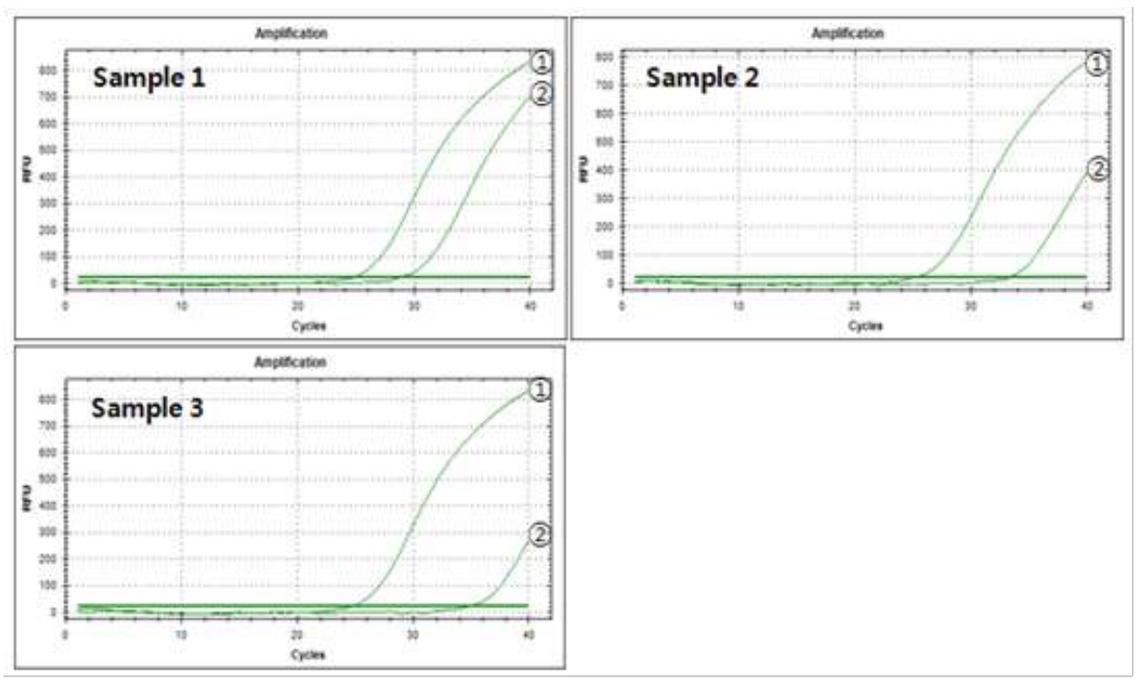
1) Perfil de Reprimición controlar



Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar rango	Resultado
① Mezcla sin PNA (C1)	24,21	22≤ X ≤ 27	Aceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	ΔCt-1	Aceptar Rango ΔCt-1	Resultado
② Mezcla BCR-ABL PNA (C2)	36,48	-1.48	<2	Aceptable

2) Perfil de muestras



① Mezcla sin PNA ② Mezcla BCR-ABL PNA

Mesa 8. Ejemplo de samplios valores de Ct

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1 Ct	Muestra 2 Ct	Muestra 3 Ct	Ct estándar	** ΔCt-2	* ΔCt-1
① Mezcla sin PNA (S1)	24,94	24,76	25.02			
② Mezcla BCR-ABL PNA (S2)	29,35	32,43	34,10	35 (③)	②-①	③-②

* ΔCt-1 = [Estándar Connecticut] - [Muestra Connecticut o control de sujeción Ct]

** ΔCt-2 = [Samplio Connecticut] -[Mezcla sin PNAConnecticut (S1)]

Mesa 9. Análisis de los datos

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1
② Mezcla BCR-ABL PNA (S2)	4.41	5,65	7,67	2,57	9.08	0,90
Resultados	T315Imutante		T315I mutante		Salvaje	

1. Cuando ΔCt-1 es igual o mayor que 2 (), se evalúa que la muestra está mutada.
2. Si △Connecticut-1 es mayor que 0 y menor que 2 (),

   ① Δ Ct-2 es mayor que 4, se considera que la muestra es silvestre.

   ② Δ Ct-2 es igual o menor que 4(), se considera que la muestra está mutada.

CONTROL DE CALIDAD

Cada lote de PNAClamp™ **Kit de detección de mutaciones BCR-ABL** se prueba con especificaciones predeterminadas para garantizar una calidad constante del producto de acuerdo con el sistema de gestión de calidad certificado ISO 9001 y 13485 de PANAGENE

PRUEBA DE RENDIMIENTO

1. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se determinó probando la línea celular mutante BCR-ABL estándar con el kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ BCR-ABL.

El ADN extraído se mide como 10 ng y 25 ng. Cada ADN de 10 ng y 25 ng se diluyó para tener 100, 10, 1 y 0% de diferentes proporciones de mutantes. Se realizaron tres pruebas con estas 4 condiciones de ADN para 3 lotes diferentes del kit.

Los resultados mostraron que se detectó una mutación del 1% para todos los casos, las concentraciones de la línea celular de ADN mutante.

2. Especificidad analítica

La especificidad analítica se determinó probando las líneas de células silvestres sin ADN mutante. Se realizaron tres pruebas en tres lotes del kit utilizando ADN (10 ng y 25 ng) extraído de líneas celulares de tipo salvaje como A549 y HeLa. Las tres pruebas mostraron ubicaciones de tipo salvaje. Para la evaluación de la reactividad cruzada por ubicación mutante, las pruebas de ADN de la línea celular mutante BCR-ABL (10 ng) al 100, 10, 1 y 0% de diferentes proporciones de mutantes mostraron ubicaciones de tipo salvaje, excepto para cada mutante. ubicación, y no mostró reactividad cruzada.

3. Reproducibilidad

Se realizaron experimentos para evaluar la reproducibilidad de los ADN de la línea celular mutante BCR ABL estándar (10 ng) al 100, 10, 1 y 0% de diferentes proporciones de mutantes, para tres lotes, entre tres operadores y durante tres días. El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ BCR-ABL tenía una tasa de llamadas correcta del 100%. Todos los resultados mostraron poca variación, con CV ≤ 5%.

REFERENCIAS

1. Miething, C., S. Feihl, C. Mugler, R. Grundler, N. von Bubnoff, F. Lordick, C. Peschel y J. Duyster. 2006. Las mutaciones T315I e Y253H de Bcr-Abl no confieren una ventaja de crecimiento en ausencia de imatinib. Leucemia 20: 650–657.
2. Shah, NP, JM Nicoll, B. Nagar, ME Gorre, RL Paquette, J. Kuriyan y CL Sawyers. 2002. Varias mutaciones del dominio quinasa BCR-ABL confieren resistencia policlonal al inhibidor de tirosina quinasa imatinib (STI571) en la fase crónica y la leucemia mieloide crónica en crisis blástica. Cancer Cell 2: 117-125.
3. Al-Ali, HK, MC Heinrich, T. Lange, R. Krahl, M. Mueller, C. Muller, D.Niederwieser, BJ Druker y MW Deininger. 2004. Alta incidencia de mutaciones en el dominio quinasa BCR-ABL y ausencia de mutaciones de los bucles de activación de PDGFR y KIT en pacientes con CML con resistencia secundaria a imatinib. Hematol. J. 5: 55–60.
4. T. O'Hare, WC Shakespeare, X. Zhu, CA Eide, VM Rivera, F. Wang, et al. AP24534, un inhibidor de pan - BCR-ABL para la leucemia mieloide crónica, inhibe de forma potente el mutante T315I y supera la resistencia basada en mutaciones Cancer Cell, 16 (2009), págs. 401–412
5. WW Chan, SC Wise, MD Kaufman, YM Ahn, CL Ensinger, T. Haack, et al. Inhibición del control conformacional de la tirosina quinasa BCR-ABL1, incluido el mutante guardián T315I, por el inhibidor de control del interruptor DCC-2036 Cancer Cell, 19 (2011), págs. 556–568
6. T. Nguyen, Y. Dai, E. Attkisson, L. Kramer, N. Jordan, N. Nguyen y col. Los inhibidores de HDAC potencian la actividad del inhibidor de la quinasa BCR / ABL KW-2449 en células leucémicas BCR / ABL + sensibles o resistentes a imatinib in vitro e in vivo Clinical Cancer Research, 17 (2011), págs. 3219 –3232

EXPLICACIóN DE LOS SÍMBOLOS EN LA ETIQUETA

LOT	Código de lote		Usar antes de (AAAA.MM.DD)
	Fabricante	EC REP	Representante EC
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	REF	Numero de catalogo
	Limitación de temperatura	CE	Conformidad europea

CE

PANAGENE Inc.
54, Techno 10-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34027, Corea

EC REP **MT Promedt Consulting GmbH**
Altenhofstrasse 80, 66386 St. Ingbert, Alemania