

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

NOMBRE DEL PRODUCTO

Nombre del producto: Kit de detección de mutaciones PNAClamp™

Nombre de la marca: PNAClamp™ EGFR Mutation Detection Kit (Ver.2)

USO PREVISTO

El kit de detección de mutaciones PNAClamp™ EGFR (Ver.2) es para detectar 40 mutaciones somáticas en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Tabla 1).

El equipo debe ser utilizado por profesionales de laboratorio capacitados dentro de un entorno de laboratorio utilizando, por ejemplo, ADN extraído de muestras de biopsias pulmonares y de tejido quirúrgico fijadas con formalina e incluidas en parafina.

El kit es para uso diagnóstico in vitro.

Lea atentamente las instrucciones antes de su uso.

El PNAClamp™ Kit de detección de mutaciones EGFR (versión 2) 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.

Está aprobado por MFDS para uso clínico en Corea.

PNAClamp EGFR
Mutation Detection Kit

Tabla 1. Mutaciones de EGFR detectadas por este kit

No.	Reactivo	Exón	Cambio de aminoácidos	Cambio de nucleótidos	Cosmic No.
1	Mezcla PNA G719X	18	p.G719A	c.2156G> C	6239
		18	p.G719S	c.2155G> A	6252
		18	p.G719C	c.2155G> T	6253
2	E19 del. Mezcla de PNA	19	p.E746_A750del	c.2235_2249 del 15	6223
		19	p.E746_T751> I	c.2235_2252>AAT	13551
		19	p.E746_T751del	c.2236_2253 del 18	12728
		19	p.E746_T751> A	c.2237_2251 del 15	12678
		19	p.E746_S752> A	c.2237_2254 del 18	12367
		19	p.E746_S752> V	c.2237_2255> T	12384
		19	p.E746_A750del	c.2236_2250 del 15	6225
		19	p.E746_S752>re	c.2238_2255 del 18	6220
		19	p.L747_A750> P	c.2238_2248> GC	12422
		19	p.L747_T751> Q	c.2238_2252> GCA	12419
		19	p.L747_E749del	c.2239_2247 del 9	6218
		19	p.L747_T751del	c.2239_2253 del 15	6254
		19	p.L747_S752del	c.2239_2256 del 18	6255
		19	p.L747_A750> P	c.2239_2248 TTAAGAGAAG> C	12382
		19	p.L747_P753> Q	c.2239_2258> CA	12387
		19	p.L747_T751> S	c.2240_2251 del 12	6210
		19	p.L747_P753> S	c.2240_2257 del 18	12370
		19	p.L747_T751del	c.2240_2254 del 15	12369
		19	p.L747_T751> P	c.2239_2251> C	12383
		19	p.E746_A750> IP	c.2235_2248> AATTC	13550
		19	p.E746_T751> V	c.2237_2252> T	12386
		19	p.E746_T751> IP	c.2235_2251> AATTC	13552
		19	p.E746_S752> I	c.2235_2255> AAT	12385
		19	p.E746_P753> VS	c.2237_2257> TCT	18427
		19	p.L747_T751del	c.2238_2252 del 15	23571
		19	p.L747_S752> Q	c.2239_2256> CAA	12403
3	Mezcla de T790M PNA	20	p.T790M	c.2369C> T	6240
4	S768I(V2) Mezcla de PNA	20	p.S768I	c.2303G> T	6241
5	Mezcla de PNA Ins.3dup E20	20	p.H773_V774insH	c.2319_2320 insCAC	12377
		20	p.P772_H773insTTP	c.2315_2316 insGACAACCCC	
		20	p.P772_H773insGNP	c.2315_2316 insGGGCAACCC	
		20	p.H773L	c.2318A> T	13005
		20	p.H773_V774insPH	c.2319_2320 insCCCCAC	12380
		20	p.V774_C775insHV	c.2321_2322 insCCACGT	18432
6	L858RMezcla de PNA	21	p.L858R	c.2573T> G	6224
		21	p.L858R	c.2573_2574TG> GT	12429
7	Mezcla PNA L861Q	21	p.L861Q	c.2582T> A	6213

* del: mutación de delección, ins: mutación de inserción
Los números cósmicos se toman del "Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer".
(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)

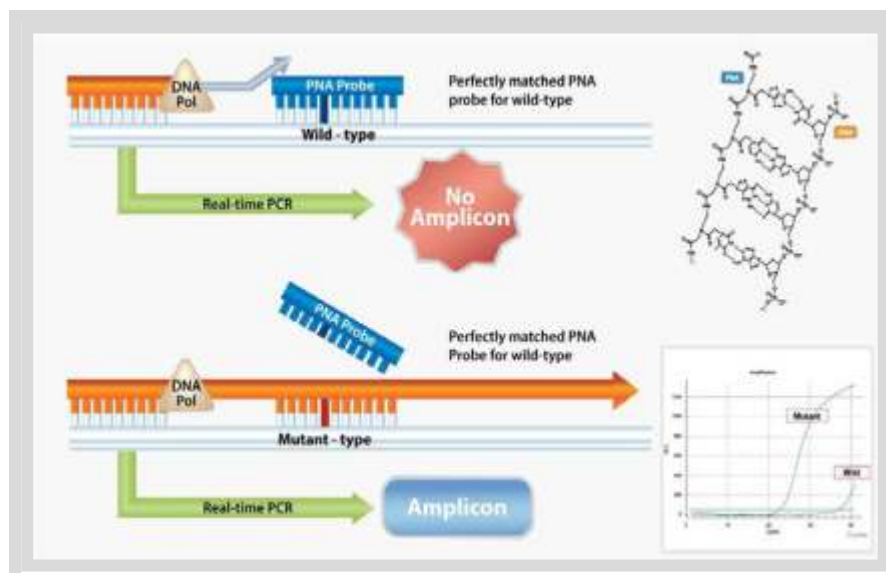
PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

PAGSPRINCIPIO Y DESCRIPCIÓN GENERAL

El kit de detección de mutaciones PNAClamp™ EGFR (versión 2) 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 selectiva 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.



PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

Figura 1. Principio del Kit de detección de mutaciones PNAClamp™ EGFR (versión 2)

El kit puede detectar rápidamente la mutación de EGFR (en 2 h) con alta sensibilidad incluso con una pequeña cantidad de ADN (25 ~ 50 ng). El límite de detección del kit, cuando el gen mutado se mezcla con ADN 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	StepOnePlus
Qiagen	Rotor-Gene Q
ABI	QuantStudio 5

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

Para otros instrumentos, puede ser necesaria una pequeña optimización.

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 EGFR (Ver.2) es para uso diagnóstico in vitro.
- ✓ **UNA** Todos 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 preparación 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 realizadœa temperatura ambiente. Sin embargo, la exposición de la premezcla EGFR PNA 2X a temperatura ambiente debe minimizarse para una amplificación óptima.
- ✓ Disuelva los reactivos completamente y mézclelos completamente con vórtex.
- ✓ los EGFR La solución de premezcla 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.

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

CONDICIÓN DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit de detección de mutaciones PNAClamp™ EGFR (Ver.2) se envía en un paquete de hielo y aún debe estar congelado a su llegada. 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™ EGFR (versión 2) 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°C hasta -20°C

No.	Nombre del componente	Descripción	Volumen	Etiqueta de tapa
1	Mezcla sin PNA	Solo cebadores	100 µl	EGFR 1
2	Mezcla PNA G719X	G719X PNA y cebadores	100 µl	EGFR 2
3	E19 del. Mezcla de PNA	E19 del. PNA y cebadores	100 µl	EGFR 3
4	Mezcla de T790M PNA	T790M PNA y cebadores	100 µl	EGFR 4
5	Mezcla de S768I (V2) PNA	S768I PNA y cebadores	100 µl	EGFR 5
6	E20 Ins. 3 mezcla de PNA dúplex	E20 Ins. 3 dúplex PNA y cebadores	100 µl	EGFR 6
7	Mezcla PNA L858R	L858R PNA y cebadores	100 µl	EGFR 7
8	Mezcla PNA L861Q	L861Q PNA y cebadores	100 µl	EGFR 8
9	Premezcla EGFR PNA 2X	Premezcla de reacción de PCR	1.250 µl / vial, 2 viales	Premezcla EGFR 2X
10	Control de sujeción	ADN de tipo salvaje	600 µl	Control EGFR

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

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

PROCEDIMIENTOS

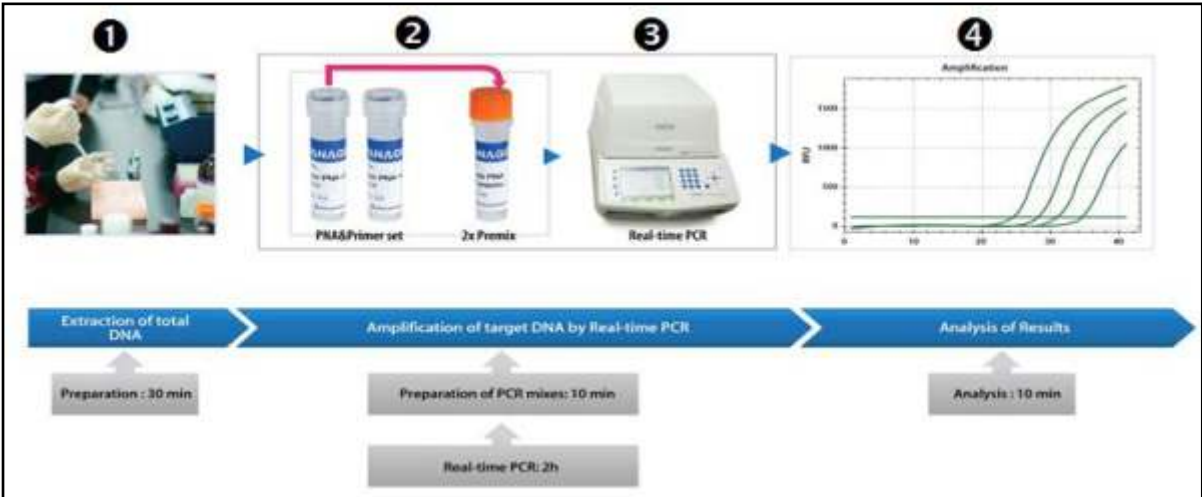


Figura 2. Flujo de trabajo del Kit de detección de mutaciones PNAClamp™ EGFR (versión 2)

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) Los tejidos incluidos en parafina o los tejidos de biopsia 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 a continuación.

Modelo	Empresa	Cnúmero de registro
Kit de preparación de plantillas de PCR de alta pureza	Roche Diagnóstico	11796828001
QIAunamp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen	56404
QIAunamp DNA Mini kit	Qiagen	51304
Kit de purificación de ADN Maxwell® 16 FFPE Plus LEV	Promega	AS1135

- 4) El ADN extraído se puede almacenar a 4°C por hasta 24 horas, o en- 20°C para almacenamiento a largo plazo.

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

2. Preparación de la mezcla de PCR en tiempo real

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

Componentes	Volumen
Premezcla EGFR PNA 2X (#9)	10 µl
Cada mezcla de PNA (# 1 ~ #8)	3 µl
ADN extraído (25 ~ 50 ng total) o control de sujeción (#10)	7 µl
Volumen total	20 µl

- 1) Prepare 8 tubos de PCR para analizar un conjunto de muestras de ADN. Etiquételos como S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 y S8. Prepare otro conjunto de 7 tubos para el control de sujeción (ADN de tipo salvaje) y etiquételos como C1 ~ C8.
- 2) Añada 10 µl de premezcla EGFR PNA 2X (nº 9 del kit) a cada tubo.
- 3) Para cada tubo de PCR, agregue 3 µl de la mezcla de PNA correspondiente del # 1 al 8 del kit. Por ejemplo, los tubos S1 y C1 tendrán una mezcla n.º 1 sin PNA, los tubos S2 y C2 tendrán una mezcla n.º 2 de G719X PNA, etc.
- 4) Para los tubos de PCR S1 ~ S8, agregue 7 µl de muestra de ADN preparada (25 ~ 50 ng en total) a cada tubo para obtener un volumen final de 20 µl.
- 5) Para tubos de PCR C1 ~ C8, agregue 7 µl de control de sujeción (n.º 10 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.

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

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 °C	5 minutos
CICLISMO DE CUATRO PASOS (40 CICLOS) **		
Desnaturalización	94 °C	30 segundos
Sujeción PNA	70 °C	20 segundos
Recocido	63 °C	30 segundos
Extensión*	72 °C	30 segundos

* Configure la detección para leer SYBR Green en 72 °C.

** 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 ~ C8) 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)	≤ 30

Ensayo	Rango aceptable de ΔCt-1 *
② Mezcla PNA G719X (C2)	<2
③ E19 del. Mezcla de PNA (C3)	<2
④ Mezcla de T790M PNA (C4)	<2
⑤ S768I (V2) mezcla PNA (C5)	<2
⑥ E20 Ins. 3 mezcla de PNA dúplex (C6)	<2
⑦ Mezcla PNA L858R (C7)	<2
⑧ L861Q Mezcla de PNA (C8)	<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.

PNAClamp EGFR
Mutation Detection Kit

2) Muestras de ADN

- (1) Determine los valores de Ct de cada muestra (S1 ~ S8).
- 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 Tabla 5.

Tunable 5. El aceptabilidad de las muestras

Aceptabilidad	Connecticut valor de la mezcla no PNA (S1)	Descripciones y recomendaciones
óptimo	22 <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 valores de Ct de muestra (o valor Ct de control de sujeción) de el estandar Valores de CT dado en la tabla 6. Si el Ct de muestrasse muestra como NA (no aplicable), luego establezca el valor Ct en 38 para cálculos adicionales.

* ΔCt-1 = [Estándar Connecticut] - [Muestra Connecticut (S2, S3, S4, S5, S6, S7 o S8) o control de sujeción Ct]

Tabla 6. El valor de Ct estándar

Instrumentos	Ct estándar						
	Mezcla PNA G719X	E19 del. Mezcla de PNA	Mezcla de T790M PNA	Mezcla de S768I (V2) PNA	E20 Ins. 3 dup PNASMezcla la NA	L858R Mezcla de PNA	Mezcla PNA L861Q
Bio-Rad CFX96	33,5	34	33	33	30	33	33
Roche LC480	33,5	34,5	33	33	30	33	33
ABI 7900	33,5	34,5	33	33	30	33	33
ABI 7500	33,5	34	33	33	30	33	33
ABI StepOnePlus	33,5	34,5	33	33	30	33	33
Rotor-Gene Q	33,5	34	33	33	30	33	33
QuantStudio 5	33,5	34,5	34	33	30	33,5	33

PNAClamp EGFR
Mutation Detection Kit

- (3) Ccalcular $\Delta Ct-2$ [Valor Ct de muestra restado por el valor Ct de No PNA mezcla].
- ** $\Delta Ct-2 = [\text{Samplio Connecticut (S2, S3, S4, S5, S6, S7 o S8)}] - [\text{Mezcla sin PNA Connecticut (S1)}]$
- (4) Evaluar el resultado junto con los valores de $\Delta Ct-1$ y $\Delta Ct-2$ como se indica en la Tabla 7.

Cuadro 7. Evaluación del resultado

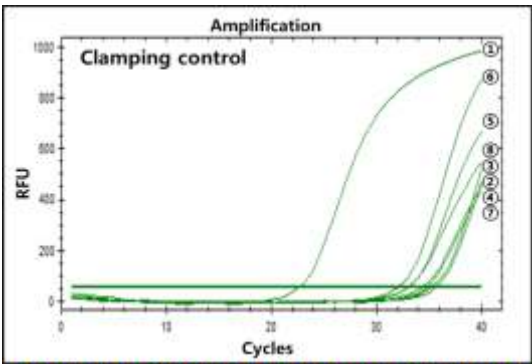
$\Delta Ct-1$	$\Delta Ct-2$	Evaluación
$2 \leq \Delta Ct-1$	$\Delta Connecticut-2 \leq 8$	Mutante
	$8 < \Delta Connecticut-2$	Salvaje
$0 < \Delta Ct-1 < 2$	$\Delta Connecticut-2 \leq 3$	Mutante
	$3 < \Delta Connecticut-2$	Salvaje
$\Delta Ct-1 \leq 0$	Todo el valor	Salvaje

PNAClamp EGFR
Mutation Detection Kit

EJEMPLOS DE ANÁLISIS

1. Uso de Bio-Rad CFX96

1) Perfil de control de sujeción

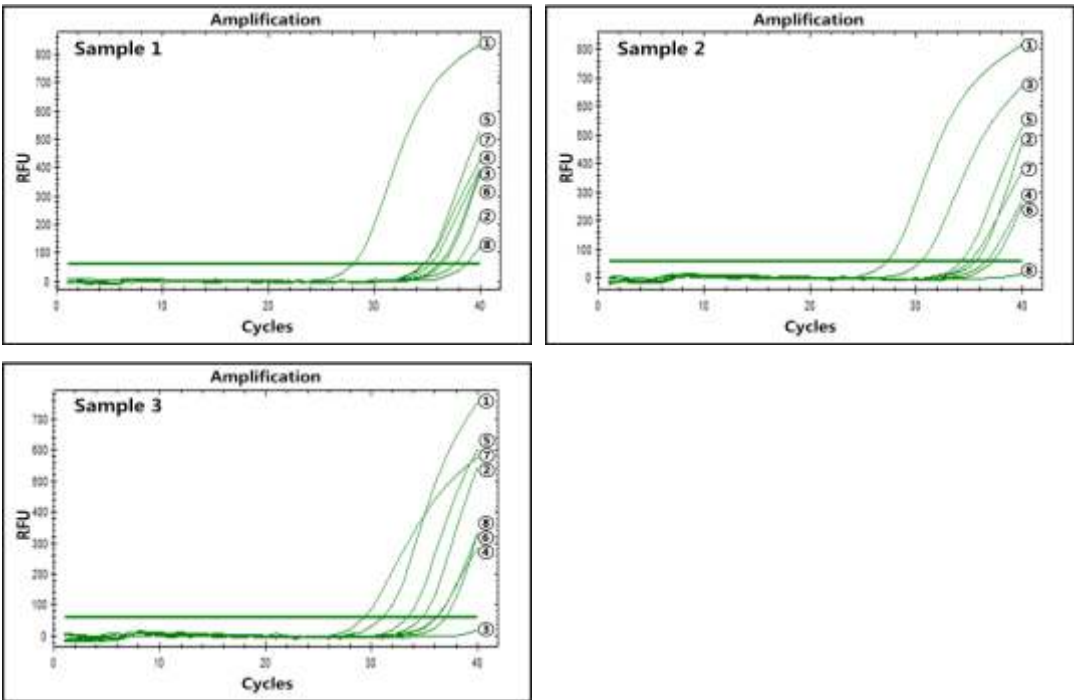


Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar rango	Resultado
① Mezcla sin PNA (C1)	22.47	≤ 30	Aceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	ΔCt-1	Aceptar Rango ΔCt-1	Resultado
② G719X (C2)	35,48	-1,98	<2	Aceptable
③ E19 del. (C3)	35.03	-1,03	<2	Aceptable
④ T790M (C4)	34,66	-1,66	<2	Aceptable
⑤ S768I(V2)(C5)	32,86	0,14	<2	Aceptable
⑥ E20 Ins. 3 dup (C6)	31,88	-1,88	<2	Aceptable
⑦ L858R (C7)	34,21	-1,21	<2	Aceptable
⑧ L861Q (C8)	32,86	0,14	<2	Aceptable

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

2) Perfil de muestras



- ① Mezcla sin PNA
- ② Mezcla PNA G719X
- ③ E19 del. Mezcla de PNA
- ④ T790M Mezcla de PNA
- ⑤ S768I (V2) Mezcla de PNA
- ⑥ E20 Ins. 3 dupMezcla de PNA
- ⑦ Mezcla PNA L858R
- ⑧ Mezcla PNA L861Q

Mesa 8. Ejemplo de samplios valores de Ct

Ensayo	Muestra No.	Muestra 1 Ct	Muestra 2 Ct	Muestra 3 Ct	Ct estándar	** ΔCt-2	* ΔCt-1
①No PNA (S1)		27,71	27.06	30,75			
②G719X (S2)		37,29	35,37	34,46	33,5 (⑨)	② - ①	⑨ - ②
③E19 del. (S3)		35,79	30.22	38,00	34 (⑩)	③ - ①	⑩ - ③
④T790M (S4)		35.03	36,34	35,81	33 (⑪)	④ - ①	⑪ - ④
⑤S768I(V2) (S5)		34,33	34.07	33,10	33 (⑫)	⑤ - ①	⑫ - ⑤
⑥E20 Ins. 3 dup (S6)		36.09	37.05	36,78	30 (⑬)	⑥ - ①	⑬ - ⑥
⑦L858R (S7)		34,42	34,86	28,95	33 (⑭)	⑦ - ①	⑭ - ⑦
⑧L861Q (S8)		38,37	38,00	35,76	33 (⑮)	⑧ - ①	⑮- ⑧

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

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

PNAClamp EGFR
Mutation Detection Kit

Mesa 9. Análisis de los datos

Muestra No. Ensayo	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	$\Delta Ct-2$	$\Delta Ct-1$	$\Delta Ct-2$	$\Delta Ct-1$	$\Delta Ct-2$	$\Delta Ct-1$
② G719X (S2)	9.58	-3,79	8.31	-1,87	3,71	-0,96
③ E19 del. (S3)	8.08	-1,79	3,16	3,78	7.25	-4,00
④ T790M (S4)	7.32	-2,03	9.28	-3,34	5,06	-2,81
⑤ S768I(V2) (S5)	6.62	-1,33	7.01	-1,07	2,35	-0,10
⑥ E20 Ins. 3 dúplex (S6)	8,38	-6,09	9,99	-7,05	6.03	-6,78
⑦ L858R (S7)	6,71	-1,42	7.80	-1,86	-1,80	4.05
⑧ L861Q (S8)	10,66	-5,37	10,94	-5,00	5.01	-2,76
Resultados	Salvaje		Deleción E19		L858R	

1. Cuando $\Delta Ct-1$ es igual o mayor que 2 ().

① $\Delta Ct-2$ es mayor que 8, se considera que la muestra es silvestre.

② $\Delta Ct-2$ es igual o menor que 8(), se evalúa que la muestra está mutada.
2. Cuando $\Delta Connecticut-1$ es mayor que 0 y menor que 2 ().

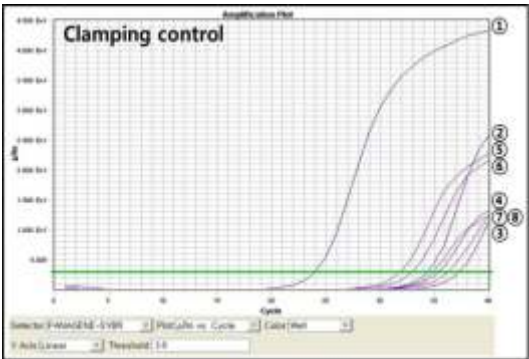
① $\Delta Ct-2$ es mayor que 3, se considera que la muestra es silvestre.

② $\Delta Ct-2$ es igual o menor que 3 (), se evalúa que la muestra está mutada.
- www.gentechbio.com · contacto@gentechbio.com
f gentechbio @gentechbio
- GENTECH
BIOSCIENCES

PNAClamp EGFR
Mutation Detection Kit

2. Utilizando ABI 7900

1) Perfil de control de sujeción

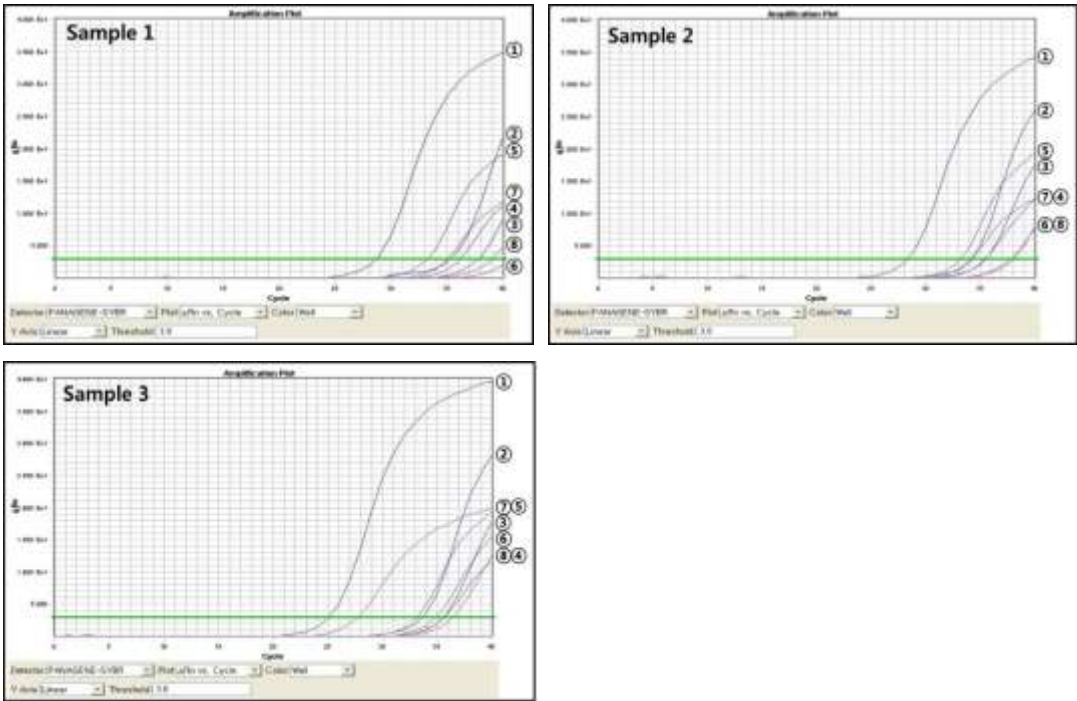


Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar rango	Resultado
① No PNA mezclar (C1)	24.00	≤ 30	Acceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	$\Delta Ct-1$	Aceptar Rango $\Delta Ct-1$	Resultado
② G719X (C2)	34,40	-0,90	<2	Acceptable
③ E19 del. (C3)	37.26	-2,76	<2	Acceptable
④ T790M (C4)	35,40	-2,40	<2	Acceptable
⑤ S768I(V2)(C5)	31,90	1,10	<2	Acceptable
⑥ E20 Ins. 3 dup (C6)	32,97	-2,97	<2	Acceptable
⑦ L858R (C7)	34,84	-1,84	<2	Acceptable
⑧ L861Q (C8)	36.22	-3,22	<2	Acceptable

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

2) Perfil de muestras



- ① Mezcla sin PNA
- ② Mezcla PNA G719X
- ③ E19 del. Mezcla de PNA
- ④ T790M Mezcla de PNA
- ⑤ S768I (V2) Mezcla de PNA
- ⑥ E20 Ins. 3 dupMezcla de PNA
- ⑦ Mezcla PNA L858R
- ⑧ Mezcla PNA L861Q

Mesa 10. Ejemplo de samplios valores de Ct

Ensayo \ Muestra No.	Muestra 1 Ct	Muestra 2 Ct	Muestra 3 Ct	Ct estándar	** ΔCt-2	* ΔCt-1
①No PNA (S1)	28,69	28,35	25.16			
②G719X (S2)	35,40	34,17	33,69	33,5 (⑨)	② - ①	⑨ - ②
③E19 del. (S3)	37,82	35,51	35,60	34,5 (⑩)	③ - ①	⑩ - ③
④T790M (S4)	36.12	35,45	35,68	33 (⑪)	④ - ①	⑪ - ④
⑤S768I(V2) (S5)	33.23	33,16	33,16	33 (⑫)	⑤ - ①	⑫ - ⑤
⑥E20 Ins. 3 dup (S6)	38,00	38.07	34,91	30 (⑬)	⑥ - ①	⑬ - ⑥
⑦L858R (S7)	35,00	34,19	27,75	33 (⑭)	⑦ - ①	⑭ - ⑦
⑧L861Q (S8)	39.06	37,82	36,45	33 (⑮)	⑧ - ①	⑮- ⑧

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

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

PNAClamp EGFR
Mutation Detection Kit

Mesa 11. Análisis de los datos

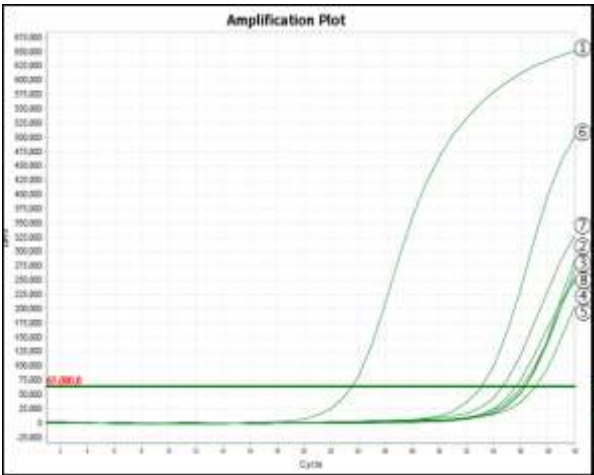
Muestra No. Ensayo	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	$\Delta\text{Ct-2}$	$\Delta\text{Ct-1}$	$\Delta\text{Ct-2}$	$\Delta\text{Ct-1}$	$\Delta\text{Ct-2}$	$\Delta\text{Ct-1}$
② G719X (S2)	6,71	-1,90	5.82	-0,67	8.53	-0,19
③ E19 del. (S3)	9.13	-3,32	7.16	-1.01	10.44	-1,10
④ T790M (S4)	7,43	-3,12	7.10	-2,45	10,52	-2,68
⑤ S768I(V2) (S5)	4.54	-0,23	4.81	-0,16	8.00	-0,16
⑥ E20 Ins. 3 dúplex (S6)	9.31	-8,00	9,72	-8,07	9,75	-4,91
⑦ L858R (S7)	6.31	-2,00	5.84	-1,19	2,59	5.25
⑧ L861Q (S8)	10,37	-6.06	9.47	-4,82	11,29	-3,45
Resultados	Salvaje		Salvaje		L858R	

1. Cuando $\Delta\text{Ct-1}$ es igual o mayor que 2 (). ■
- ① $\Delta\text{Ct-2}$ es mayor que 8, se considera que la muestra es silvestre.
 - ② $\Delta\text{Ct-2}$ es igual o menor que 8(), se evalúa que la muestra está mutada. ■
2. Cuando $\Delta\text{Connecticut-1}$ es mayor que 0 y menor que 2 (). ■
- ① $\Delta\text{Ct-2}$ es mayor que 3, se considera que la muestra es silvestre.
 - ② $\Delta\text{Ct-2}$ es igual o menor que 3 (), se evalúa que la muestra está mutada. ■

PNAClamp EGFR
Mutation Detection Kit

3. Uso de ABI QuantStudio 5

1) Perfil de control de sujeción

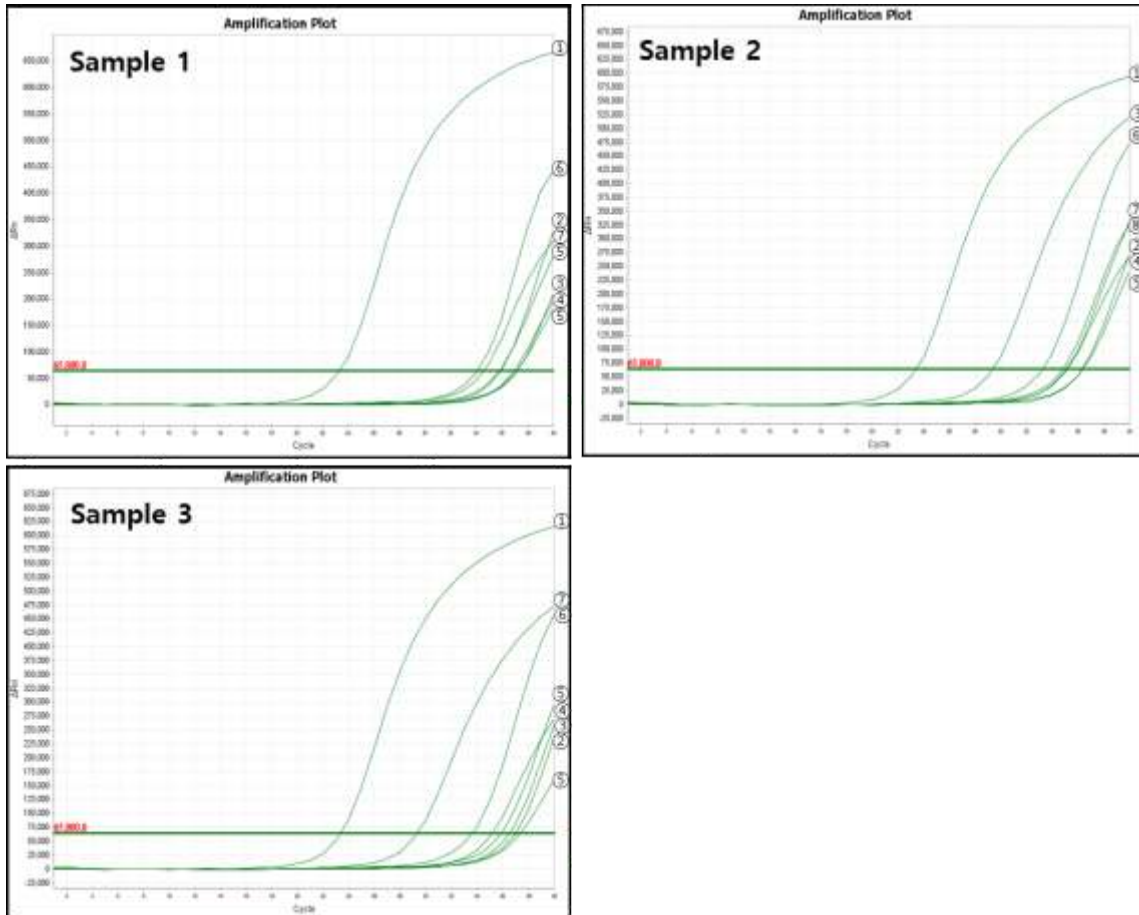


Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar rango	Resultado
① No PNA mezclar (C1)	23.42	≤ 30	Aceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	$\Delta Ct-1$	Aceptar Rango $\Delta Ct-1$	Resultado
② G719X (C2)	36.22	-2.72	< 2	Aceptable
③ E19 del. (C3)	36.23	-1.73	< 2	Aceptable
④ T790M (C4)	35.52	-1.52	< 2	Aceptable
⑤ S768I(V2)(C5)	37.00	-4.00	< 2	Aceptable
⑥ E20 Ins. 3 dup (C6)	32.99	-2.99	< 2	Aceptable
⑦ L858R (C7)	34.55	-1.05	< 2	Aceptable
⑧ L861Q (C8)	35.97	-2.97	< 2	Aceptable

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

2) Perfil de muestras



- ① Mezcla sin PNA
- ② Mezcla PNA G719X
- ③ E19 del. Mezcla de PNA
- ④ T790M Mezcla de PNA
- ⑤ Mezcla de S768I (V2) PNA
- ⑥ E20 Ins. 3 mezcla de PNA dúplex
- ⑦ Mezcla PNA L858R
- ⑧ Mezcla PNA L861Q

PNAClamp EGFR
Mutation Detection Kit

Mesa 12. Ejemplo de samplios valores de Ct

<div>Muestra No. Ensayo</div>	Muestra 1 Ct	Muestra 2 Ct	Muestra 3 Ct	Ct estándar	** ΔCt-2	* ΔCt-1
① No PNA (S1)	22.05	23.30	23.23			
② G719X (S2)	34,69	36,23	36,90	33,5 (⑨)	② - ①	⑨ - ②
③E19 del. (S3)	35,84	29.26	36,41	34,5 (⑩)	③ - ①	⑩ - ③
④T790M (S4)	35,66	35.03	35.03	34 (⑪)	④ - ①	⑪ - ④
⑤S768I(V2) (S5)	34,38	36,27	35,78	33 (⑫)	⑤ - ①	⑫ - ⑤
⑥E20 Ins. 3 dup (S6)	32,70	33.13	33,51	30 (⑬)	⑥ - ①	⑬ - ⑥
⑦L858R (S7)	33.19	34,71	29.18	33.5 (⑭)	⑦ - ①	⑭ - ⑦
⑧L861Q (S8)	35,68	35,97	37.20	33 (⑮)	⑧ - ①	⑮- ⑧

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

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

Mesa 13. Análisis de los datos

<div>Muestra No. Ensayo</div>	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1
② G719X (S2)	12,64	-1,19	12,92	-2,73	13,66	-3,40
③ E19 del. (S3)	13,79	-1,34	5,96	5.24	13.18	-1,91
④ T790M (S4)	13,61	-1,66	11,73	-1,03	11.80	-1,03
⑤ S768I(V2) (S5)	12.33	-1,38	12,97	-3,27	12.55	-2,78
⑥ E20 Ins. 3 dúplex (S6)	10,65	-2,70	9,83	-3,13	10.27	-3,51
⑦ L858R (S7)	11.14	0,31	11.40	-1,21	5,95	4.32
⑧ L861Q (S8)	13,63	-2,68	12,67	-2,97	13,96	-4,20
Resultados	Salvaje		Deleción E19		L858R	

1. Cuando ΔCt-1 es igual o mayor que 2 ().

① ΔCt-2 es mayor que 8, se considera que la muestra es silvestre.

② ΔCt-2 es igual o menor que 8(), se evalúa que la muestra está mutada.
2. Cuando ΔConnecticut-1 es mayor que 0 y menor que 2 ().

① ΔCt-2 es mayor que 3, se considera que la muestra es silvestre.

② ΔCt-2 es igual o menor que 3 (), se evalúa que la muestra está mutada.
- www.gentechbio.com · contacto@gentechbio.com
f gentechbio @gentechbio
- GENTECH
BIOSCIENCES

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

CONTROL DE CALIDAD

Cada lote de PNAClamp™ **Kit de detección de mutaciones EGFR (Ver.2)** 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 las líneas celulares mutantes EGFR estándar con el kit de detección de mutaciones PNAClamp™ EGFR (Ver.2).

El ADN extraído se mide como 25 ng y 50 ng. Cada ADN de 25 ng y 50 ng se diluyó para tener 100, 10 y 1% de diferentes proporciones de mutantes. Se realizaron tres pruebas con estas 3 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. Si la proporción de mutante a tipo salvaje es 100 veces mayor, se puede detectar una mutación del 1%. La detección varió de 10 a 10,000 copias, dependiendo de la ubicación del 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 (25, 50 y 100 ng) extraído de líneas celulares de tipo salvaje (células A549 y HeLa). Las tres pruebas mostraron ubicaciones de tipo salvaje. Las pruebas de 25 y 50 ng de ADN de las líneas celulares SW48, H1975 y PC9 mutadas mostraron ubicaciones de tipo salvaje, excepto para cada ubicación mutante sin reactividad cruzada.

3. Reproducibilidad

Se realizaron experimentos para evaluar la reproducibilidad de tres ADN de líneas celulares estándar, al 100, 10, 1 y 0% de diferente proporción de mutantes, para tres lotes, entre tres operadores, durante tres días. El kit de detección de mutaciones PNAClamp™ EGFR (versión 2) tenía una tasa de llamadas correcta del 100%. Todos los resultados mostraron poca variación, con% CV <5%.

PNAClamp EGFR Mutation Detection Kit

REFERENCIAS

1. Kim et al., Detección y comparación de péptidos mediados por ácidos nucleicos en tiempo real pinzamiento de reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación directa de genes para epidermis mutaciones del receptor del factor de crecimiento en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Cáncer de pulmón*. 75 (3): 321-325, 2012.









2. Han et al., Detección del estado de mutación de EGFR en muestras de adenocarcinoma de pulmón con diferentes proporciones de células tumorales mediante dos métodos de sensibilidad diferencial. *J Thorac Oncol*. 7 (2): 355-64, 2012.

3. Choi et al., Pinzamiento de PCR en tiempo real mediado por PNA para la detección de mutaciones de EGFR. *Toro. Korean Chem. Soc.* 31 (12): 3525-3529, 2010.


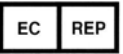
4. Lee et al., Pinzamiento por PCR mediado por PNA para la detección de mutaciones de EGFR en cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Tuberc Respir Dis*. 69: 271-278, 2010

5. Noro et al., Líneas de células de cáncer de pulmón sensibles a gefitinib (IRESSA) muestran fosforilación de Akt sin estimulación de ligando. *BMC Cancer* 6: 277, 2006.

EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS EN LA ETIQUETA

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



	PANAGENE Inc. 54, Techno 10-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34027, Corea		MT Promedt Consulting GmbH Altenhofstrasse 80, 66386 St. Ingbert, Alemania
---	---	---	--