NOMBRE DEL PRODUCTO

Nombre del producto: Kit de detección de mutaciones PNAClamp ™

Nombre de la marca: PNAClamp ™ KRAS Mutation Detection Kit (Ver.4)

USO PREVISTO

El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ KRAS (Ver.4) es una prueba de diagnóstico in vitro para detectar 40 mutaciones somáticas en el oncogén KRAS (Tabla 1). El kit 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 colorrectales incluidas en parafina fijadas con formalina y muestras de tejido quirúrgico.

El kit es para uso diagnóstico in vitro.

Lea atentamente las instrucciones antes de su uso.

El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ KRAS (Ver.4) 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.

Tabla 1. Mutaciones de KRAS detectadas por este kit

No.	Reactivo	Exón	Cambio de aminoácidos	Cambio de nucleótidos	Cosmic No.
1	Mezcla de PNA G12	2	p.G12S	c.34G> A	517
			p.G12R	c.34G> C	518
			p.G12C	c.34G> T	516
			p.G12D	c.35G> A	521
			p.G12A	c.35G> C	522
			p.G12V	c.35G> T	520
2	Mezcla de PNA G13		p.G13S	c.37G> A	528
			p.G13R	c.37G> C	529
			p.G13C	c.37G> T	527
			p.G13D	c.38G> A	532
			p.G13A	c.38G>C	533
			p.G13V	c.38G>T	534

PAGSPRINCIPIO Y DESCRIPCIóN GENERAL

El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ KRAS (Ver.4) 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.

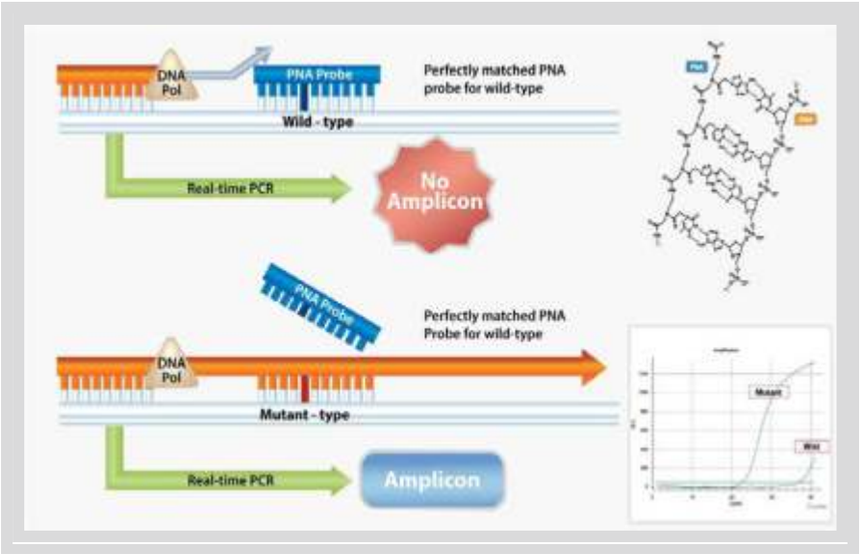


Figura 1. Principio del Kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ KRAS (Ver.4)

El kit puede detectar rápidamente la mutación de KRAS (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 2%.

INFORMACIóN DEL CONTACTO

El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ KRAS (Ver.4) debe mantenerse congelado a su llegada. Para cualquier pregunta que incluya soporte técnico o inquietudes, comuníquese con los distribuidores o el fabricante.

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

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™ KRAS Mutation Detection Kit (Ver.4) 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 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 realizado a temperatura ambiente. Sin embargo, la exposición de la premezcla KRAS PNA 2X a temperatura ambiente debe minimizarse para una amplificación óptima.

Disuelva los reactivos completamente y mézclelos completamente con vórtex.

los KRAS 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.

CONDICIóN DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ KRAS (Ver.4) 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 ™ KRAS (Ver.4) debe almacenarse inmediatamente después de recibirlo a -15℃ hasta -20℃. 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	100 µ	KRAS 1
2	Mezcla de PNA G12	G12 PNA y cebadores	100 µl	KRAS 2
3	Mezcla de PNA G13	G13 PNA y cebadores	100 µl	KRAS 3
4	Mezcla A59 PNA	A59 PNA y cebadores	100 µl	KRAS 4
5	Mezcla Q61 PNA	G60, Q61 PNA y cebadores	100 µl	KRAS 5
6	Mezcla de PNA K117	K117 PNA y cebadores	100 µl	KRAS 6
7	Mezcla A146 PNA	A146 PNA y cebadores	100 µl	KRAS 7
8	Premezcla KRAS PNA 2X	Premezcla de reacción de PCR	1250 µl / vial, 2 viales	**Premezcla KRAS 2X**
9	Control de sujeción	ADN de tipo salvaje	600 µl	**Control KRAS**

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

PROCEDIMIENTOS

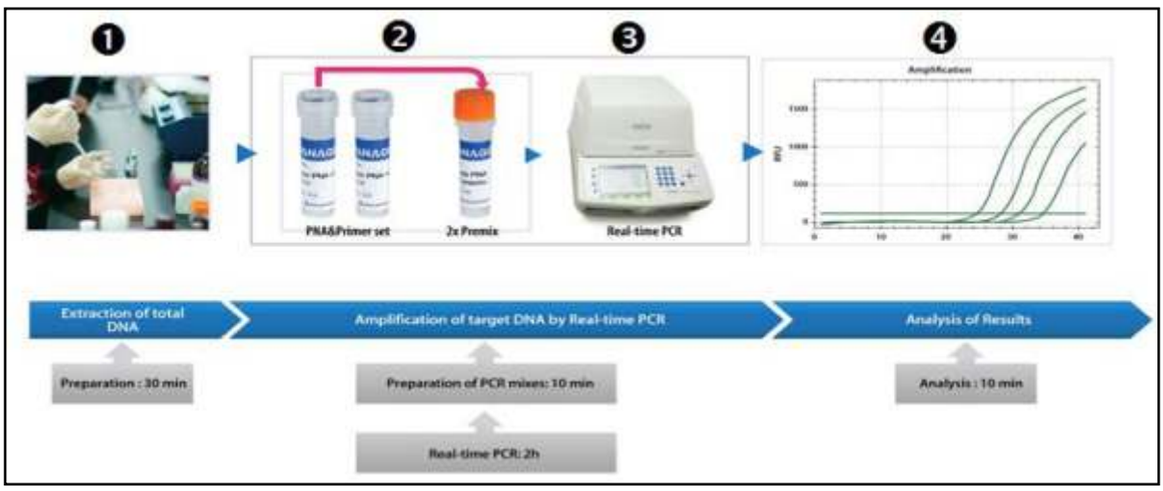


Figura 2. Flujo de trabajo del Kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ KRAS (Ver.4)

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

1) Preparar 7Tubos de PCR para analizar un conjunto de muestras de ADN. Etiquételos como S1, S2, S3, S4, S5, S6 y S7. Prepare otro juego de7 tubos para Control de sujeción (salvaje-tipo de ADN) y etiqueta ellos como C1 ~ C7.
2) UNAdd 10 µl de KRAS PNA 2X Premix (# 8 del kit) a cada tubo.
3) Para cada tubo de PCR, agregue 3 µl de correspondiente Mezcla de PNA de# 1 ~ 7 del kit. Por ejemplo, los tubos S1 y C1 tendrán # 1 No Mezcla de PNA, S2 y C2 los tubos tendrán #2 G12Mezcla de PNA y así sucesivamente.
4) por S1 ~S7 Tubos de PCR, agregar 7 µl de preparado Muestra de ADN (10ng total) a cada tubo para producir 20 µl volumen final.
5) Para C1 ~ C7 Tubos de PCR, añadir 7 µl de Sujeción control (#9 del kit).
6) Si tiene más de una muestra de ADN para analizar, prepare un juego de control de lámparas para todo el experimentar. 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 a 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 ~ C7) 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)	$23 \leq X \leq 27$

Ensayo	Rango aceptable de ΔCt-1 *
② Mezcla de PNA G12 (C2)	<2
③ Mezcla de PNA G13 (C3)	<2
④ Mezcla A59 PNA (C4)	<2
⑤ Mezcla Q61 PNA (C5)	<2
⑥ Mezcla de PNA K117 (C6)	<2
⑦ Mezcla A146 PNA (C7)	<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 ~ S7).

i. Valor Ct de la mezcla sin PNA (S1) debe ser 23 ~ 34.

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	23< Connecticut <30	La amplificación y la cantidad de muestra de ADN son óptimas.
Aceptable	30≤ Ct <34	La tunaEl gen rget se amplificó con baja eficiencia. Para másconfiable Como resultado, se sugiere que se repita la reacción de PCR con una mayor cantidad de ADN.
Inválido	Connecticut ≤ 23	La posibilidad de falsos positivos es alta. Repita la reacción de PCR con una menor cantidad de ADN.
	34≤ 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 Ct (S2, S3, S4, S5, S6, S7) o Control de sujeción Ct]

Tabla 6. El valor de Ct estándar

Instrumentos	Ct estándar					
	Mezcla de PNA G12	Mezcla de PNA G13	Mezcla A59 PNA	Mezcla Q61 PNA	K117 PMezcla NA	Mezcla A146 PNA
Bio-Rad CFX96	36	35	34,5	34	35	34,5
Roche LC480	36	35	34,5	34	35	34,5
ABI 7900	36	35	34	34,5	34,5	34
ABI 7500	36	35	34	34,5	34,5	34
ABI StepOnePlus	36	35	34	34,5	34,5	34
Rotor-Gene Q	36	34,5	34	34,5	34,5	34
QuantStudio 5	36,5	35,5	35	35	35,5	35

(3) C calcular ΔCt-2 [Valor Ct de muestra restado por el valor Ct de No PNA mezcla].

** ΔCt-2 = [Muestra Ct (S2, S3, S4, S5, S6, S7)] - [Non PNA mix Ct (S1)]

Evaluar

(4) el resultado para cada mezcla de KRAS PNA junto con los valores de ΔCt-1 y Δ Ct-2 como se indica en la Tabla 7.

Cuadro 7. Evaluación del resultado

ΔCt-1	ΔCt-2	Evaluación
2≤ Δ Ct-1 Connecticut-2 ≤9	Δ	Mutante
	9<ΔConnecticut-2 niño	W
0 <ΔCt-1 <2 Connecticut-2 ≤4	Δ	Mutante
	4 <ΔConnecticut-2	Salvaje
ΔCt-1 ≤0	Todo el valor	Salvaje

(5) Evalúe el resultado junto con el resultado para cada mezcla de KRAS PNA como se indica en la Tabla 8.

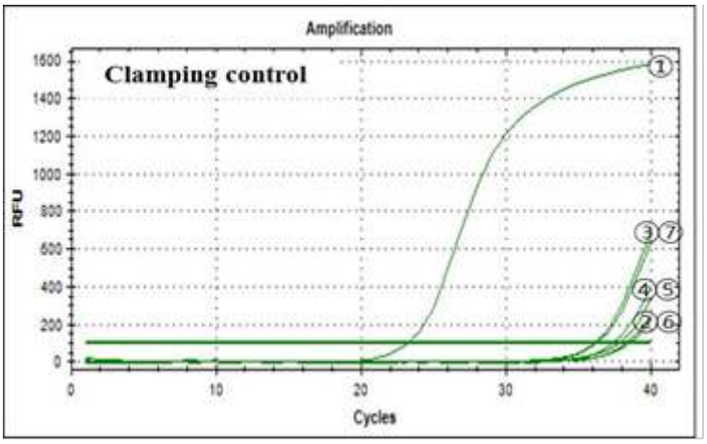
Mesa 8. Evaluación final del resultado

Mezcla de PNA G12 (S2)	Mezcla de PNA G13 (S3)	Mezcla A59 PNA (S4)	Mezcla Q61 PNA (S5)	Mezcla de PNA K117 (S6)	Mezcla A146 PNA (S7)	Resultados
Salvaje	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Salvaje
Mutante	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Mutante del codón 12
Salvaje	Mutante	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Mutante del codón 13
Salvaje	Salvaje	Mutante	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Codón59 mutante
Salvaje	Salvaje	Salvaje	Mutante	Salvaje	Salvaje	Mutante del codón 61
Salvaje	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Mutante	Salvaje	Codón117 mutante
Salvaje	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Mutante	Codón146 mutante
Mutante	Salvaje	Salvaje	Mutante	Salvaje	Salvaje	Codón12 y 61 mutante
Salvaje	Mutante	Salvaje	Salvaje	Salvaje	Mutante	Codón13 y 146 mutante

EJEMPLOS DE ANÁLISIS

1. Uso de Bio-Rad CFX96

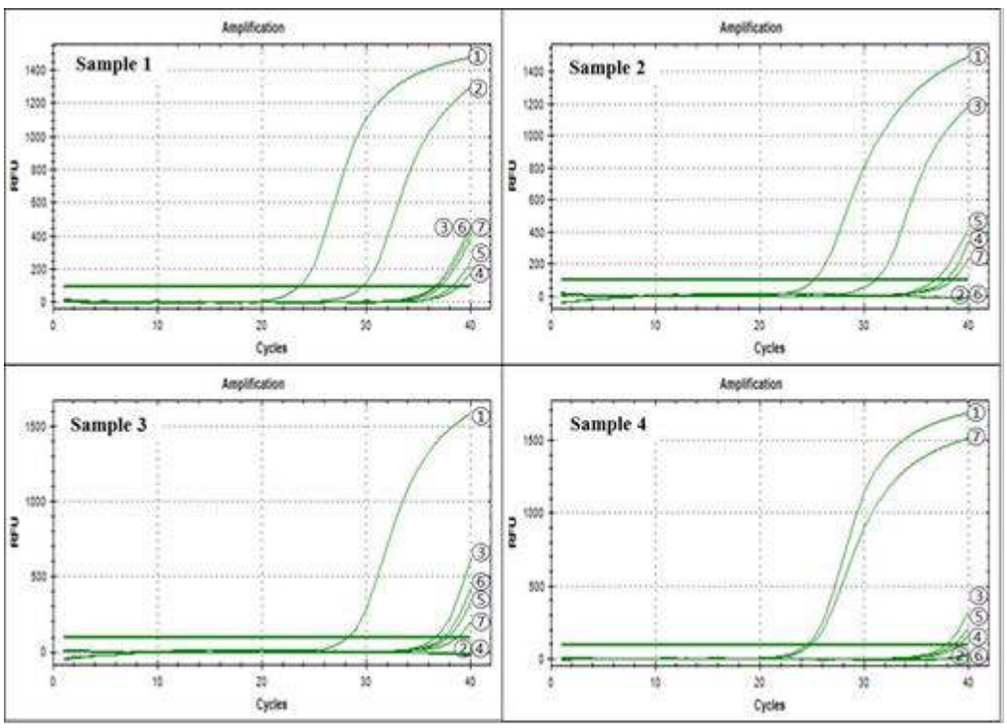
1) Perfil de control de sujeción



Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar rango	Resultado
① Mezcla sin PNA (C1)	23.20	23≤ X ≤ 27	Aceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	ΔCt-1	Aceptar Rango ΔCt-1	Resultado
② Mezcla de PNA G12 (C2)	38.27	-2,27	<2	Aceptable
③ Mezcla de PNA G13 (C3)	36.12	-1,12	<2	Aceptable
④ Mezcla A59 PNA (C4)	37,34	-2,84	<2	Aceptable
⑤ Mezcla Q61 PNA (C5)	37,76	-3,76	<2	Aceptable
⑥ Mezcla de PNA K117 (C6)	38,48	-3,48	<2	Aceptable
⑦ Mezcla A146 PNA (C7)	36,21	-1,71	<2	Aceptable

2) Perfil de muestras



① Mezcla sin PNA ② G12 Mezcla de PNA ③ G13 Mezcla de PNA ④ Mezcla A59 PNA
⑤ Q61 PNA mezcla ⑥ Mezcla K117 PNA ⑦ Mezcla A146 PNA

Mesa 9. Ejemplo de samplios valores de Ct

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1 Ct	Muestra 2 Ct	Muestra 3 Ct	Muestra 4 Ct	Ct estándar	** ΔCt-2	* ΔCt-1
① Mezcla sin PNA (S1)	23,62	27.17	28,24	24,51			
② G12 Mezcla de PNA (S2)	29,71	38,00	38,00	38,00	36(⑧)	②- ①	⑧- ②
③ G13 Mezcla de PNA (S3)	36,62	31.12	36,62	37,92	35(⑨)	③- ①	⑨- ③
④ A59 Mezcla de PNA (S4)	38.27	37,76	38,00	39.15	34,5 (⑩)	④- ①	⑩- ④
⑤ Q61 Mezcla de PNA (S5)	39.01	36,85	37,87	38,55	34 (⑪)	⑤- ①	⑪- ⑤
⑥ K117 Mezcla de PNA (S6)	36,85	38,00	37,41	38,00	35 (⑫)	⑥- ①	⑫- ⑥
⑦ A146 Mezcla de PNA (S7)	37.20	38,42	38,77	24,96	34,5 (⑬)	⑦- ①	⑬- ⑦

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

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

Mesa 10. Análisis de los datos

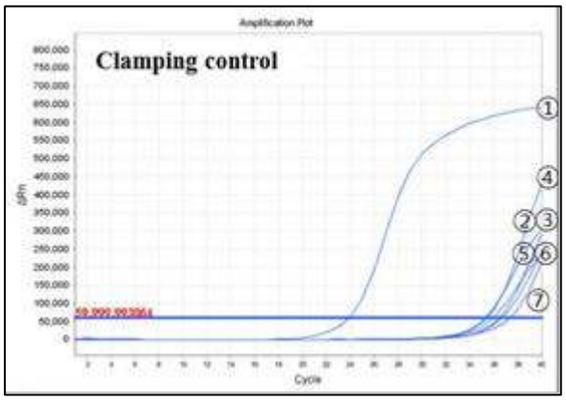
Muestra No. / Ensayo	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1
② G12 Mezcla de PNA (S2)	6.09	6.29	10,83	-2,00	9,76	-2,00	13.49	-2,00
③ G13 Mezcla de PNA (S3)	13.00	-1,62	3,95	3,88	8,38	-1,62	13.41	-2,92
④ Mezcla A59 PNA (S4)	14,65	-3,77	10,59	-3,26	9,76	-3,50	14,64	-4,65
⑤ Mezcla de Q61 PNA (S5)	15.39	-5.01	9,68	-2,85	9,63	-3,87	14.04	-4,55
⑥ Mezcla de PNA K117 (S6)	13.23	-1,85	10,83	-3,00	9.17	-2,41	13.49	-3,00
⑦ Mezcla A146 PNA (S7)	13.58	-2,70	11.25	-3,92	10,53	-4,27	0,45	9.54
Resultados	Codón 12 mutante		Codón 13 mutante		Salvaje		Codón 146 mutante	

1. Cuando ΔCt-1 es igual o mayor que 2 ( ).
   ① Δ Ct-2 es mayor que 9, se considera que la muestra es silvestre.
   ② Δ Ct-2 es igual o menor que 9( ), se evalúa que la muestra está mutada.

2. Cuando △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.

2. Uso de Roche ABI 7500

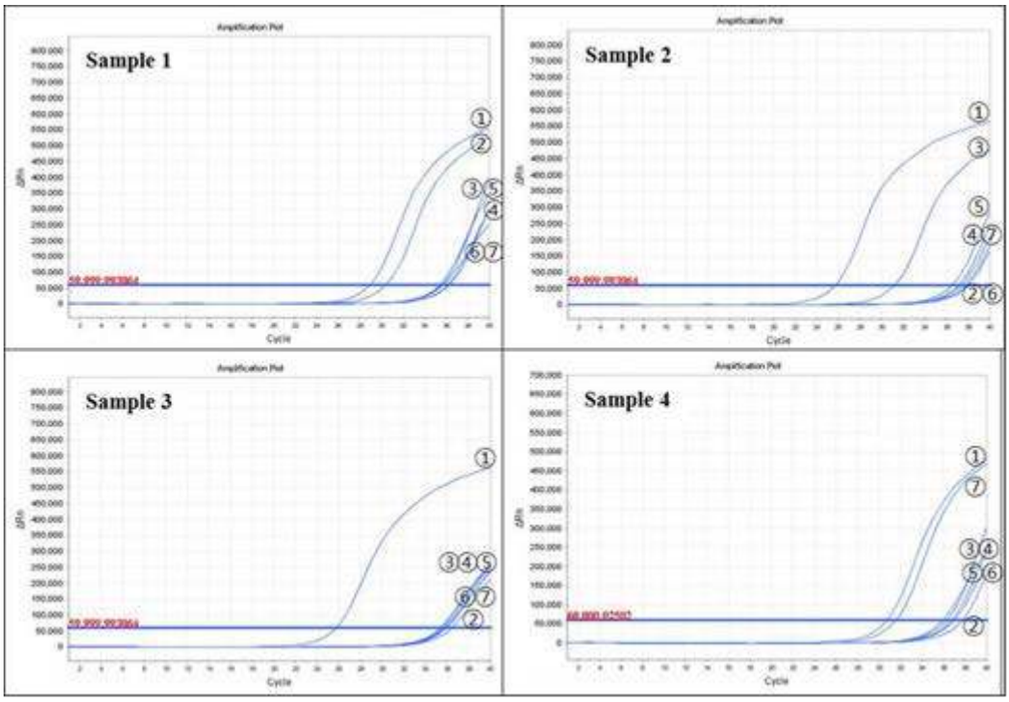
1) Perfil de control de sujeción



Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar rango	Resultado
① No PNA mezclar (C1)	23,91	23≤ X ≤ 27	Aceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	ΔCt-1	Aceptar Rango ΔCt-1	Resultado
① Mezcla de PNA G12 (C2)	36,50	-0,50	<2	Aceptable
② Mezcla de PNA G13 (C3)	36,75	-1,75	<2	Aceptable
③ Mezcla A59 PNA (C4)	35,29	-1,29	<2	Aceptable
④ Mezcla Q61 PNA (C5)	35,95	-1,45	<2	Aceptable
⑤ Mezcla de PNA K117 (C6)	35,50	-1,00	<2	Aceptable
⑥ Mezcla A146 PNA (C7)	37,41	-3,41	<2	Aceptable

2) Perfil de muestras



① Mezcla sin PNA ② G12 Mezcla de PNA ③ G13 Mezcla de PNA ④ Mezcla A59 PNA
⑤ Q61 PNA mezcla ⑥ Mezcla K117 PNA ⑦ Mezcla A146 PNA

Mesa 11. Ejemplo de samplios valores de Ct

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1 Ct	Muestra 2 Ct	Muestra 3 Ct	Muestra 4 Ct	Ct estándar	** ΔCt-2	* ΔCt-1
① Mezcla sin PNA (S1)	28,98	25,71	25,77	30,79			
② Mezcla de PNA G12 (S2)	30.45	38.04	36,42	37,82	36 (⑧)	②- ①	⑧- ②
③ Mezcla de PNA G13 (S3)	35,39	31.20	35.30	35,95	35 (⑨)	③- ①	⑨- ③
④ Mezcla A59 PNA (S4)	35,71	37,14	35,52	36,33	34 (⑩)	④-①	⑩- ④
⑤ Mezcla de Q61 PNA (S5)	35,63	36,55	35,71	36,76	34,5 (⑪)	⑤-①	⑪- ⑤
⑥ Mezcla de PNA K117 (S6)	36,14	37,82	35,95	36,94	34,5 (⑫)	⑥-①	⑫- ⑥
⑦ Mezcla A146 PNA (S7)	36,31	37,43	35,95	31.59	34 (⑬)	⑦-①	⑬- ⑦

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

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

Mesa 12. Análisis de los datos

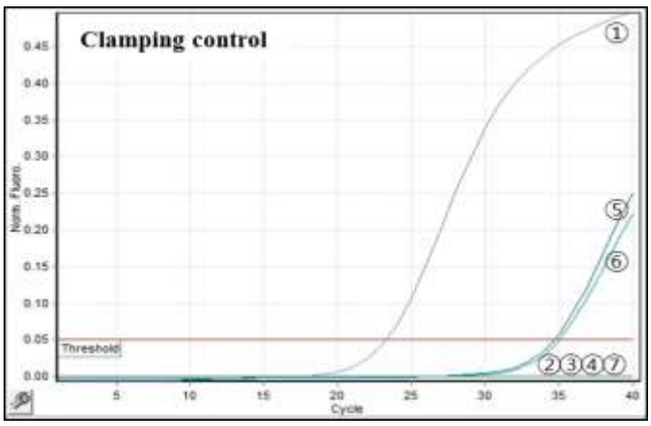
Muestra No. / Ensayo	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1
② Mezcla de PNA G12 (S2)	1,47	5.55	12.33	-2.04	10,65	-0,42	7.03	-1,82
③ Mezcla de PNA G13 (S3)	6.41	-0,39	5.49	3,80	9.53	-0,30	5.16	-0,95
④ Mezcla A59 PNA (S4)	6,73	-1,71	11.43	-3,14	9,75	-1,52	5.54	-2,33
⑤ Mezcla de Q61 PNA (S5)	6,65	-1,13	10,84	-2.05	9,94	-1,21	5,97	-2,26
⑥ Mezcla de PNA K117 (S6)	7.16	-1,64	12.11	-3,32	10.18	-1,45	6.15	-2,44
⑦ Mezcla A146 PNA (S7)	7.33	-2,31	11,72	-3,43	10.18	-1,95	0,80	2,41
Resultados	Codon 12 mutante		Codon 13 mutante		Salvaje		Codón 146 mutante	

1. Cuando ΔCt-1 es igual o mayor que 2 ( ).
   ① Δ Ct-2 es mayor que 9, la muestra se considera salvaje.
   ② Δ Ct-2 es igual o menor que 9( ), se evalúa que la muestra está mutada.

2. Cuando △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.

3. Uso de Rotor-Gene Q

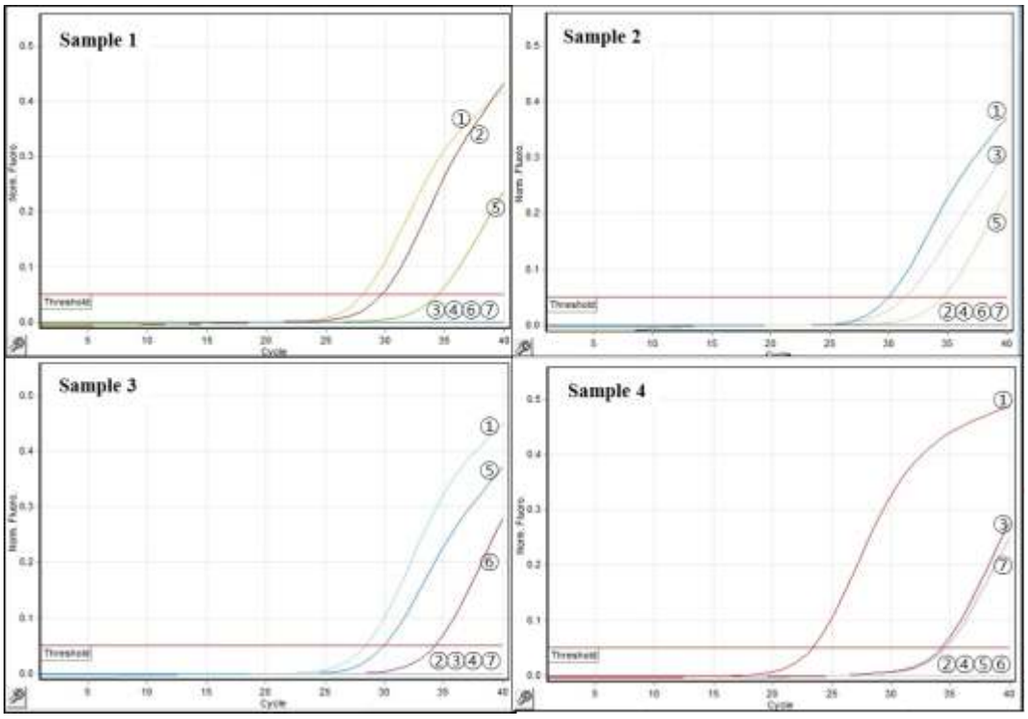
1) Perfil de control de sujeción



Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar rango	Resultado
① No PNA mezclar (C1)	23.29	23≤ X ≤ 27	Aceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	ΔCt-1	Aceptar Rango ΔCt-1	Resultado
① Mezcla de PNA G12 (C2)	38,00	-2,00	<2	Aceptable
② Mezcla de PNA G13 (C3)	38,00	-3,50	<2	Aceptable
③ Mezcla A59 PNA (C4)	38,00	-4,00	<2	Aceptable
④ Mezcla Q61 PNA (C5)	34,70	-0,20	<2	Aceptable
⑤ Mezcla de PNA K117 (C6)	35.02	-0,52	<2	Aceptable
⑥ Mezcla A146 PNA (C7)	38,00	-4,00	<2	Aceptable

2) Perfil de muestras



① Mezcla sin PNA ② G12 Mezcla de PNA ③ G13 Mezcla de PNA ④ Mezcla A59 PNA
⑤ Q61 PNA mezcla ⑥ Mezcla K117 PNA ⑦ Mezcla A146 PNA

Mesa 13. Ejemplo de samplios valores de Ct

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1 Ct	Muestra 2 Ct	Muestra 3 Ct	Muestra 4 Ct	Ct estándar	** ΔCt-2	* ΔCt-1
① Mezcla sin PNA (S1)	28.12	30,00	28,43	23.35			
② G12 Mezcla de PNA (S2)	29,74	38,00	38,00	38,00	36(⑧)	②- ①	⑧- ②
③ G13 Mezcla de PNA (S3)	38,00	31.41	38,00	34,29	34,5(⑨)	③- ①	⑨- ③
④ A59 Mezcla de PNA (S4)	38,00	38,00	38,00	38,00	34(⑩)	④- ①	⑩- ④
⑤ Q61 Mezcla de PNA (S5)	34,54	34,59	30,00	38,00	34,5(⑪)	⑤- ①	⑪- ⑤
⑥ K117 Mezcla de PNA (S6)	38,00	38,00	34,62	38,00	34,5(⑫)	⑥- ①	⑫- ⑥
⑦ A146 Mezcla de PNA (S7)	38,00	38,00	38,00	34,67	34(⑬)	⑦- ①	⑬- ⑦

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

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

Mesa 14. Análisis de los datos

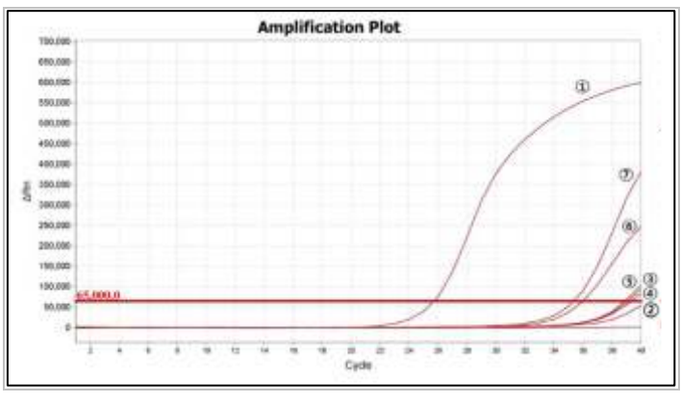
Muestra No. / Ensayo	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1
② G12 Mezcla de PNA (S2)	1,62	6.26	8.00	-2,00	9.57	-2,00	14,65	-2,00
③ G13 Mezcla de PNA (S3)	9,88	-3,50	1,41	3,09	9.57	-3,50	10,94	0,21
④ A59 Mezcla de PNA (S4)	9,88	-4,00	8.00	-4,00	9.57	-4,00	14,65	-4,00
⑤ Q61 Mezcla de PNA (S5)	6,42	-0,04	4.59	-0,09	1,57	4.50	14,65	-3,50
⑥ K117 Mezcla de PNA (S6)	9,88	-3,50	8.00	-3,50	6.19	-0,12	14,65	-3,50
⑦ A146 Mezcla de PNA (S7)	9,88	-4,00	8.00	-4,00	9.57	-4,00	11.32	-0,67
Resultados	Codón 12 mutante		Mutante del codón 13		Mutante del codón 61		Salvaje	

1. Cuando ΔCt-1 es igual o mayor que 2 (.
   ① Δ Ct-2 es mayor que 9, la muestra se considera salvaje.
   ② Δ Ct-2 es igual o menor que 9(, se evalúa que la muestra está mutada.

2. Cuando △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.

4. Uso de ABI QuantStudio 5

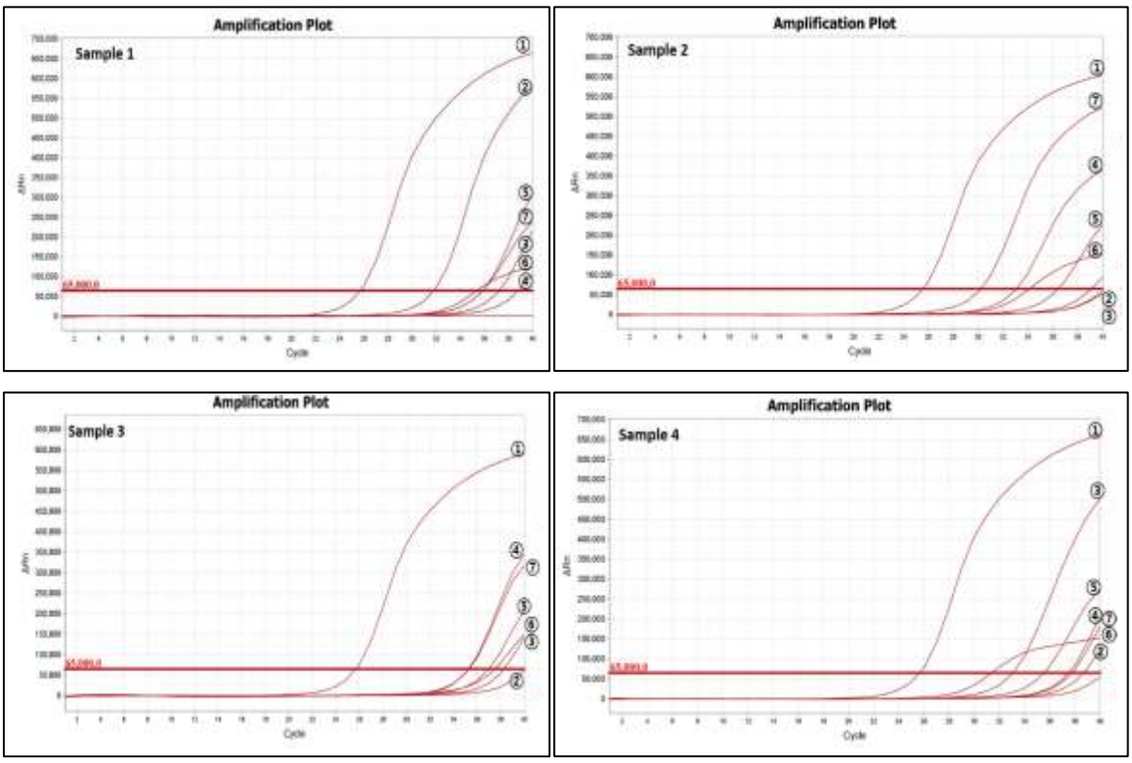
1) Perfil de control de sujeción



Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar rango	Resultado
① No PNA mezclar (C1)	25,72	23≤ X ≤ 27	Aceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	ΔCt-1	Aceptar Rango ΔCt-1	Resultado
② Mezcla de PNA G12 (C2)	38,00	-1,50	<2	Aceptable
③ Mezcla de PNA G13 (C3)	38,89	-3,39	<2	Aceptable
④ Mezcla A59 PNA (C4)	39.09	-4,09	<2	Aceptable
⑤ Mezcla Q61 PNA (C5)	35,98	-0,98	<2	Aceptable
⑥ Mezcla de PNA K117 (C6)	39,34	-3,84	<2	Aceptable
⑦ Mezcla A146 PNA (C7)	35,38	-0,38	<2	Aceptable

2) Perfil de muestras



① Mezcla sin PNA ② G12 Mezcla de PNA ③ G13 Mezcla de PNA ④ Mezcla A59 PNA

⑤ Q61 PNA mezcla ⑥ Mezcla K117 PNA ⑦ Mezcla A146 PNA

Mesa 15. Ejemplo de samplios valores de Ct

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1 Ct	Muestra 2 Ct	Muestra 3 Ct	Muestra 4 Ct	Ct estándar	** ΔCt-2	* ΔCt-1
① Mezcla sin PNA (S1)	25,72	25.57	25,75	25,68			
② G12 Mezcla de PNA (S2)	31,83	38,00	38,00	38,65	36.5 (⑧)	②- ①	⑧- ②
③ G13 Mezcla de PNA (S3)	37.18	38,00	38,36	33.05	35,5(⑨)	③- ①	⑨- ③
④ A59 Mezcla de PNA (S4)	38,80	33.03	35.21	37,47	35(⑩)	④- ①	⑩- ④
⑤ Q61 Mezcla de PNA (S5)	35,87	36,41	36,27	35,52	35(⑪)	⑤- ①	⑪- ⑤
⑥ K117 Mezcla de PNA (S6)	35,40	34,13	37,37	31.37	35.5(⑫)	⑥- ①	⑫- ⑥
⑦ A146 Mezcla de PNA (S7)	35,87	30.21	35,44	37,73	35 (⑬)	⑦- ①	⑬- ⑦

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

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

Mesa dieciséis. Análisis de los datos

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1	ΔCt-2	ΔCt-1
② G12 Mezcla de PNA (S2)	6.11	4.67	12.25	-1,50	11,98	-1,32	12,97	-2,15
③ G13 Mezcla de PNA (S3)	11.46	-1,68	12,61	-2,86	11.30	-1,64	7.37	2,45
④ A59 Mezcla de PNA (S4)	13.08	-3,80	9.46	-0,21	12.16	-3,00	11,79	-2,47
⑤ Q61 Mezcla de PNA (S5)	10.15	-0,87	10,52	-1,27	10,72	-1,56	9,84	-0,52
⑥ K117 Mezcla de PNA (S6)	9,68	0,10	11,62	-1,87	10,83	-1,20	5,69	4.13
⑦ A146 Mezcla de PNA (S7)	10.15	-0,87	9,69	-0,44	5,05	4.11	12.05	-2,73
Resultados	Codón 12 mutante		Salvaje		Mutante del codón 146		Codón 13, 117 mutante	

1. Cuando Δ Ct-1 es igual o mayor que 2 (.

   ① Δ Ct-2 es mayor que 9, la muestra se considera salvaje.

   ② Δ Ct-2 es igual o menor que 9( ), se evalúa que la muestra está mutada.

2. Cuando △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 KRAS (Ver.4)** 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 analizando las muestras de mutantes KRAS estándar con el kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ KRAS (Ver.4). El ADN extraído se mide como 10 ng.

Las muestras se diluyeron para tener 5%, 2% y 1% de la diferente proporción 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 2% para 10 ng de ADN.

Además, se detectó una mutación del 1% en la mezcla de PNA G12, G13, A59, K117 y A146.

2. Especificidad analítica

La especificidad analítica se determinó probando las líneas de células silvestres sin ADN mutante. Se realizaron tres experimentos en tres lotes del kit utilizando ADN (10 ng) extraído de la línea celular HeLa de tipo salvaje. Las tres pruebas mostraron ubicaciones de tipo salvaje. Para la evaluación de la reactividad cruzada por ubicación mutante, las pruebas de seis tipos de ADN mutantes (10 ng) mostraron ubicaciones de tipo salvaje, excepto para cada ubicación mutante, y no mostraron reactividad cruzada.

3. Reproducibilidad

Se realizaron experimentos para evaluar la reproducibilidad de seis ADN estándar (10 ng) al 100, 5, 2, 1 y 0% de diferente proporción de mutantes, para tres lotes, entre tres operadores y durante tres días. El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ KRAS (Ver.4) tenía una tasa de llamadas correcta del 100%. Todos los resultados mostraron poca variación, con% CV <5%.

REFERENCIAS

1. Kwon et al., Frecuencia de mutaciones de KRAS, BRAF y PIK3CA en cánceres colorrectales avanzados: Comparación de PCR mediada por ácido nucleico peptídico y secuenciación directa en tejido fijado con formalina e incluido en parafina. Pathol Res Pract. 15 de diciembre de 2011; 207 (12): 762-8.
2. Jeong et al., Detección rápida y sensible de la mutación de KRAS mediante pinzamiento de PCR en tiempo real basado en ácido nucleico peptídico: una comparación con la secuenciación directa entre tejido fresco y tejido fijado con formalina e incluido en parafina de cáncer colorrectal. La Revista Coreana de Patología 2011; 45: 151-169
3. Kobunai et al., La frecuencia de detección de la mutación KRAS en el carcinoma de colon humano está influenciada por la sensibilidad de la metodología del ensayo: una comparación entre secuenciación directa y PCR en tiempo real. Biochem Biophys Res Commun. 23 de abril de 2010; 395 (1): 158- 62.
4. Chang et al., Detección rápida simultánea de mutaciones de K-RAS en cáncer colorrectal. BMC Cancer. 11 de junio de 2009; 9: 179.
5. Beau-Faller et al., Detección de mutaciones K-Ras en muestras tumorales de pacientes con no pequeños Cell cáncer de pulmón mediante pinzamiento por PCR mediado por PNA. Br J Cancer. 24 de marzo de 2009; 100 (6): 985-92.

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