USO PREVISTO

El PNAClamp™El kit de detección de mutaciones PIK3CA está diseñado para la detección de 15 mutaciones somáticas en el oncogén PIK3CA (Tabla 1). Puede detectar las mutaciones más prevalentes en genes PIK3CA conocidas hasta la fecha.

El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ PIK3CA debe ser utilizado por profesionales capacitados en un entorno de laboratorio, utilizando ADN derivado de muestras de ADN de plasma o extraído de tejido quirúrgico o tejido incrustado en parafina fijado con formalina.

No.	Reactivo	Exón	Cambio de aminoácidos	Cambio de nucleótidos	Cosmic No.
1	Mezcla de PNA E542	9	p.E542G	c.1625A> G	761
			p.E542V	c.1625A> T	762
			p.E542K	c.1624G> A	760
2	Mezcla de PNA E545 o Q546	9	p.E545K	c.1633G> A	763
			p.E545G	c.1634A> G	764
			p.E545D	c.1635G> T	765
			p.Q546E	c.1636C> G	6147
			p.Q546K	c.1636C> A	766
			p.Q546P	c.1637A> C	767
			p.Q546R	c.1637A> G	12459
			p.E545A	C. 1634 A> C	12458
3	Mezcla H1047 PNA	20	p.H1047Y	c.3139C> T	774
			p.H1047L	c.3140A> T	776
			p.H1047R	c.3140A> G	775
4	Mezcla C420 PNA	7	p.C420R	c.1258 T> C	267862

Tabla 1. Genes diana detectados por este kit* Los números cósmicos se han tomado del "Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer".
* Los números cósmicos se han tomado del "Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer". (http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic)

PRINCIPIO Y DESCRIPCIóN GENERAL

los El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ PIK3CA se basa en péptidos Tecnología de sujeción por PCR en tiempo real mediada por ácido nucleico (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 dúplex de ADN-ADN correspondientes, incluso con un solo desajuste, 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.
Cuandohay una mutación en el gen diana y, por lo tanto, hay un desajuste, el dúplex de ADN / PNA se desestabiliza, lo que permite la elongación de la cadena de un oligómero de ADN unido que sirve como cebador de PCR. El resultado es la reacción positiva en PCR en tiempo real de las muestras que albergan el alelo mutante, mientras se suprime la amplificación del gen de tipo salvaje.

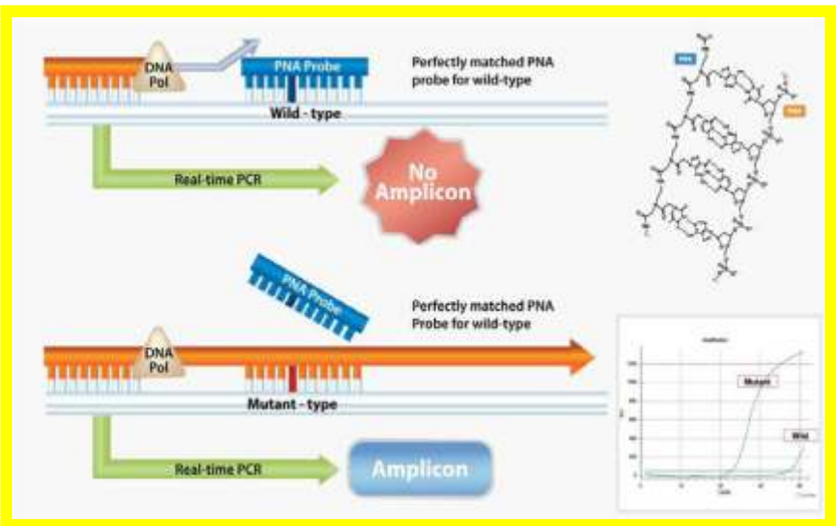


Figura 1. Principio del kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ PIK3CA

El kit puede detectar rápidamente (en 2 h) y con alta sensibilidad un gen PIK3CA mutado 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 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
- ✓ Pipetas (capacidad 10 µl, 20 µl y 200 µl)
- ✓ Puntas de pipeta con filtro
- ✓ Microcentrífuga de mesa
- ✓ Mezclador Vortex
- ✓ Guantes desechables, sin polvo

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	StepOnePlus
ABI	QuantStudio 5
Qiagen	Rotor-Gene Q
ABI	ABI 7900

Para otros instrumentos, puede ser necesaria una ligera optimización.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- ✓ **Lea atentamente las instrucciones y familiarícese con todos los componentes del kit antes de usarlo.**
- ✓ Todos los experimentos deben realizarse en condiciones estériles adecuadas con técnicas asépticas. Recomendó que los usuarios tuvieran pipetas dedicadas y puntas de pipeta con filtro separadas para agregar la plantilla de ADN y durante la preparación de reactivos.
- ✓ Utilice siempre guantes sin talco cuando manipule el kit.
- ✓ 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.
- ✓ Todos los procedimientos experimentales deben realizarse a temperatura ambiente. Sin embargo, la exposición de la premezcla PIK3CA PNA 2X a temperatura ambiente debe minimizarse para una amplificación óptima.
- ✓ Disuelva los reactivos completamente y mézclelos completamente con vórtex.
- ✓ los La solución de premezcla PIK3CA PNA 2X contiene un 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 centrifugarse débilmente antes de su uso.
- ✓ El uso de un volumen no recomendado para el reactivo no solo da como resultado una pérdida de rendimiento, sino que también aumenta la posibilidad de resultados falsos.
- ✓ 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 ™ PIK3CA debe almacenarse inmediatamente después de recibirlo a menos de -20 ° C. Cuando almacenado en las condiciones de almacenamiento recomendadas en el paquete, el kit es estable hasta la fecha de vencimiento etiquetada.

Después de abrir el kit, los reactivos se pueden almacenar en su embalaje original epor deba jo de -20 ° C. durante 90 días o hasta la fecha de vencimiento, lo que ocurra primero.

CONTENIDO DEL KIT

◆ Se pueden analizar un total de 25 muestras con un kit.

Tabla 3. Reactivos proporcionados en el Kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ PIK3CA

No.	Nombre del componente	Descripción	Volumen	Etiqueta de tapa
1	Mezcla sin PNA	Solo cebadores	130 µl	PIK3CA 1
2	Mezcla de PNA E542	E542 PNA y cebadores	130 µl	PIK3CA 2
3	Mezcla de E545 / Q546 PNA	E545 o Q546 PNA y cebadores	130 µl	PIK3CA 3
4	Mezcla H1047 PNA	H1047 PNA y cebadores	130 µl	PIK3CA 4
5	Mezcla C420 PNA	C420 PNA y cebadores	130 µl	PIK3CA 5
6	Premezcla PIK3CA PNA 2X	Premezcla de reacción de PCR	800 µl / vial, 2 viales	PIK3CA Premezcla 2X
7	Control de sujeción	ADN de tipo salvaje	500 µl	PIK3CA Controlar
8	Control positivo	ADN de tipo mutante	250 µl 2 viales	PIK3CA ordenador personal

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

PROCEDIMIENTOS

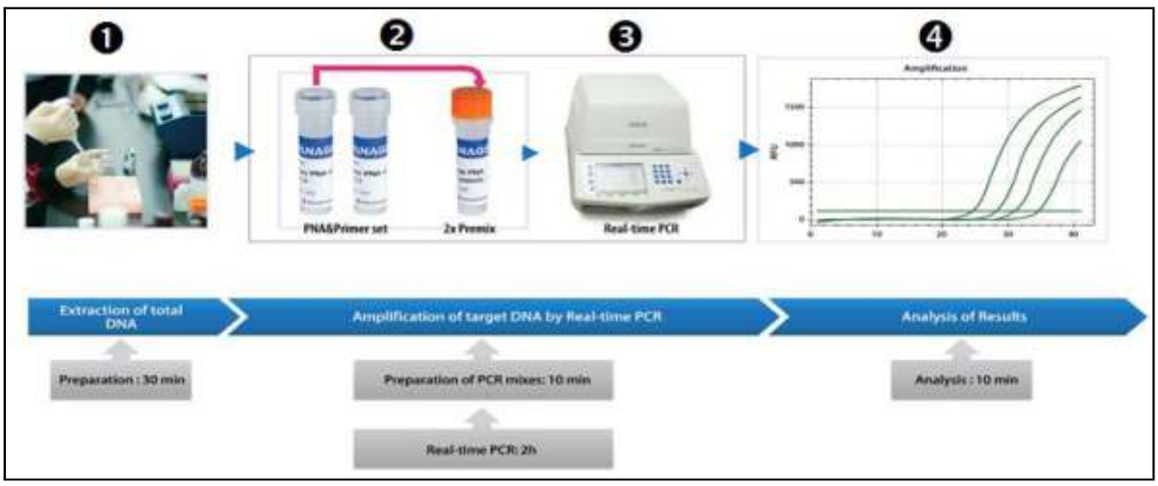


Figura 2. Flujo de trabajo del Kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ PIK3CA

1. Preparación y almacenamiento de muestras

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

1) Se pueden utilizar como muestras tejidos incluidos en parafina fijados con formalina (FFPE), tejidos frescos, tejidos de biopsia y plasma.

2) Transporte de la muestra: utilice la metodología patológica estándar para garantizar la calidad de la muestra.

3) Para la extracción de ADN, se recomienda utilizar los siguientes kits de extracción de ADN en la Tabla 4.

Tabla 4. La lista de kits de aislamiento de ADN recomendados

muestra	Modelo	Empresa	Numero de catalogo
Plasma	Kit de NA circulante QIAamp DSP	Qiagen	61504
	Kit de preparación de muestras cobas® cfDNA	Roche Diagnostics	07247737190
	Tubo de reactivo TANBead® OptiPure cfDNA	Taiwán Advanced Nanotech Inc.	71CS46
Tejido incluido en parafina fijado con formalina (FFPE)	Kit de preparación de plantillas de PCR de alta pureza	Roche Diagnostics	11796828001
	Kit de tejido QIAmp DNA FFPE	Qiagen	56404
	Mini kit QIAmp DNA	Qiagen	51304
	Kit de purificación de ADN Maxwell® 16 FFPE Plus LEV	Promega	AS1135

4) El ADN extraído se puede almacenar a 4℃ hasta por 24 horas, o almacenado a -20℃ por hasta largo plazo almacenamiento.

2. Preparación de la mezcla de PCR en tiempo real

Tabla 3. Preparar la mezcla de reacción por reacción

Componentes	Volumen
Premezcla PIK3CA PNA 2X (# 6)	10 µl
Cada mezcla de PNA (# 1 ~ # 5)	4 µl
ADN extraído (10 ng en total) o control de sujeción (n. ° 7), control positivo (n. ° 8)	6 µl
Volumen total	20 µl

1) Prepare 5 tubos de PCR para analizar un conjunto de muestras de ADN. Etiquételos como S1, S2, S3, S4 y S5. Prepare otro conjunto de 5 tubos para CC y PC y etiquételos como C1 ~ C5 y P1 ~ P5.
2) Suma 10 µl de PIK3CA PNA 2X Premix (n. ° 6 del kit) en cada tubo.
3) Para cada tubo de PCR, agregue 4µl de la correspondiente mezcla de PNA del n. ° 1 ~ 5 del kit. Por ejemplo, los tubos S1 y C1 tendrán la mezcla n. ° 1 sin PNA, los tubos S2 y C2 tendrán la n. ° 2E542 PNA mezclar y así sucesivamente.
4) Para tubos de PCR S1 ~ S5, agregue 6µl de muestra de ADN preparada (10 ng en total) a cada tubo para obtener 20 µl volumen final.
5) Para tubos de PCR C1 ~ C5 y P1 ~ P5, agregue 6 µl de CC y PC (# 7, # 8 del kit),
6) Si tiene más de una muestra de ADN para analizar, prepare un juego de CC y PC 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 14µl 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

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

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

* Configure la detección para leer SYBR Green a 72ºC.

4. Evaluación

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

A. Control de sujeción (control de ADN de tipo salvaje) / Control positivo (control de ADN de tipo mutante)

1) Los valores Ct del CC (tubo C1 ~ C5) y PC (tubo P1 ~ P5) 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. Los rangos aceptables de Ct de CC y PC

Ensayo	Rango de Ct aceptable
1 Mezcla sin PNA (C1 y P1)	21 <X <30

Ensayo	Rango aceptable de ΔCt-2 *	
	Control de sujeción	Control positivo
2 Mezcla de E542 PNA (C2 y P2)	7 <	≤7
③ Mezcla de E545X / Q546X PNA (C3 y P3)	6 <	≤6
④ Mezcla de H1047 PNA (C4 y P4)	8 <	≤8
⑤ C420R PNA Mix (C5 y P5)	8 <	≤8

* ΔCt-2 = [Ct de control de sujeción o Ct de control positivo] - [Ct de mezcla sin PNA]

B. muestras de ADN

1) Determinar Ct valores de cada muestra (S1 ~ S4).

i. El valor Ct de la mezcla sin PNA (S1) debe ser 21 <Ct <30

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.

Cuadro 5. La aceptabilidad de las muestras

Aceptabilidad	Valor Ct de la mezcla sin PNA (S1)	Descripciones y recomendaciones
óptimo	21 <Ct <25	La amplificación y la cantidad de muestra de ADN son óptimas.
Aceptable	25≤ Ct <30	El gen diana se amplificó con baja eficacia. Para obtener un resultado más confiable, se sugiere repetir la reacción de PCR con una mayor cantidad de ADN.
Inválido	Ct ≤ 21	La posibilidad de falsos positivos es alta. Repita la reacción de PCR con una menor cantidad de ADN.
	30≤ Ct	La amplificación falló. Verifique la cantidad y pureza del ADN. Es posible que se requiera una nueva preparación de ADN.

2) Calcular ΔCt-2 [Valor Ct de la muestra restado por el valor Ct de la mezcla sin PNA].

** ΔCt-2 = [Sample Ct (S2, S3, S4 o S5)] - [Non PNA mix Ct (S1)]

3) Evalúe el resultado junto con los valores de ΔCt-2 como se indica en la Tabla 7.

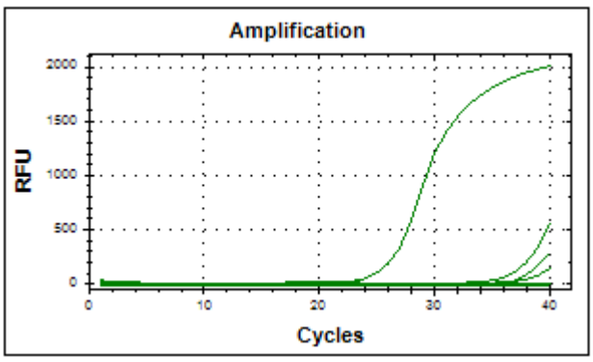
Tabla 7. Evaluación del resultado

Mezcla de PNA	ΔCt-2	Evaluación
Mezcla de E542 PNA	ΔCt-2≤7	Mutante
	7 <ΔCt-2	Salvaje
Mezcla de E545 / Q546 PNA	ΔCt-2≤6	Mutante
	6 <ΔCt-2	Salvaje
Mezcla PNA H1047	ΔCt-2≤8	Mutante
	8 <ΔCt-2	Salvaje
Mezcla C420 PNA	ΔCt-2≤8	Mutante
	8 <ΔCt-2	Salvaje

EJEMPLOS DE ANÁLISIS

1. Uso de Bio-Rad CFX96

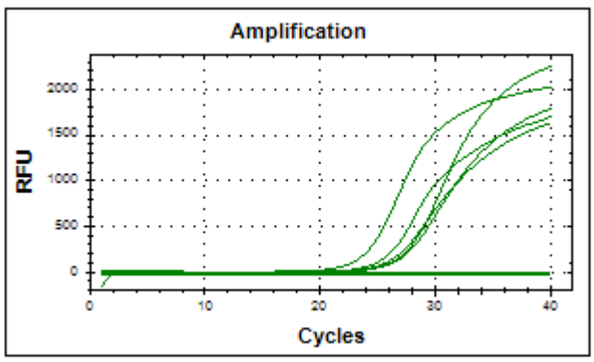
1) Perfil de control de sujeción



Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar Rango de CT	Resultado
1 No PNA (C1)	24,38	21 <X <30	Aceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	ΔCt-2	Aceptar Rango ΔCt-2	Resultado
2 Mezcla de PNA E542 (C2)	40,00	15,62	7 <	Aceptable
3 Mezcla PNA E545 o Q546 (C3)	37,67	13.29	6 <	Aceptable
4 Mezcla de H1047 PNA (C4)	38,35	13,98	8 <	Aceptable
5 Mezcla de C420 PNA (C5)	40,00	15,62	8 <	Aceptable

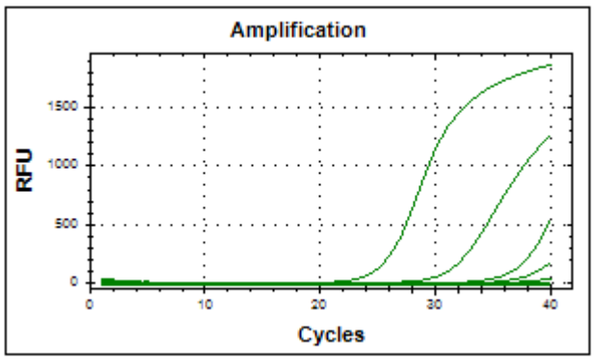
2) Perfil de control positivo

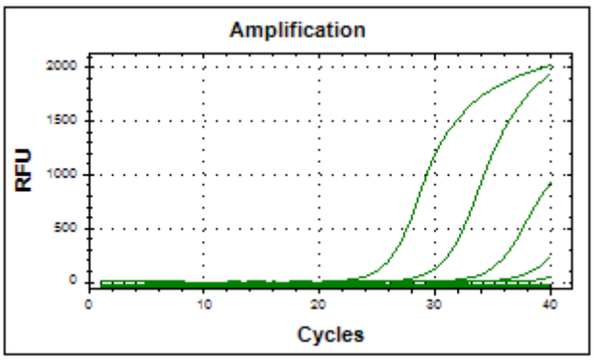


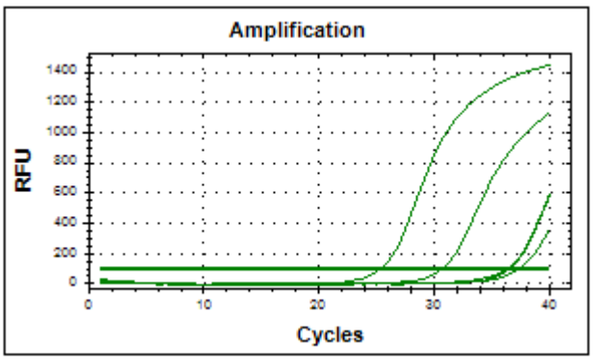
Ensayo	Control positivo Ct	Aceptar Rango de CT	Resultado
1 No PNA (C1)	22.36	21 <X <30	Aceptable

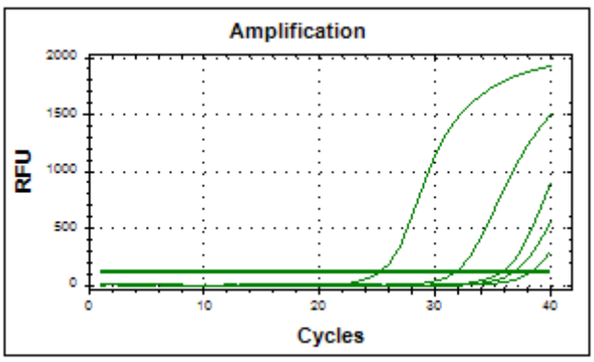
Ensayo	Control positivo Ct	ΔCt-2	Aceptar Rango ΔCt-2	Resultado
2 Mezcla de PNA E542 (C2)	25.01	2,65	≤7	Aceptable
3 Mezcla PNA E545 o Q546 (C3)	26.11	3,74	≤6	Aceptable
4 Mezcla de H1047 PNA (C4)	23,96	1,59	≤8	Aceptable
5 Mezcla de C420 PNA (C5)	25,86	3,50	≤8	Aceptable

2) Perfil de las muestras de ADN









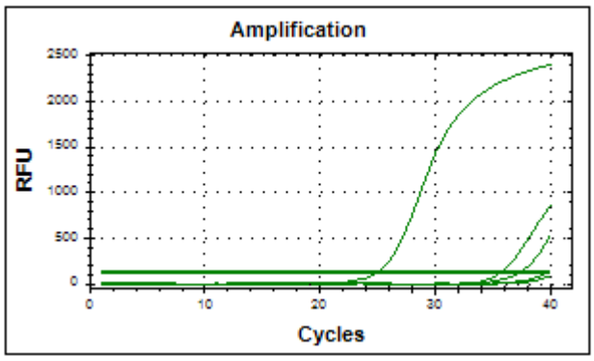


Tabla 8. Ejemplo de valores Ct de muestra

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1 (Ct)	Muestra 2 (Ct)	Muestra 3 (Ct)	Muestra 4 (Ct)	Muestra 5 (Ct)	* ΔCt-2
① Mezcla sin PNA (S1)	24.07	24,26	24.25	24,28	24,26	
② Mezcla de PNA E542 (S2)	30,57	40,00	38.30	40,00	40,00	②-①
③ Mezcla PNA E545 o Q546 (S3)	40,00	29,36	37.19	36,75	40,00	③-①
④ Mezcla de H1047 PNA (S4)	40,00	34,28	29,42	37,67	34,96	④-①
⑤ Mezcla C420 PNA (S5)	40,00	40,00	37.13	31.00	40,00	⑤-①

* ΔCt-2 = [Sample Ct] - [Non PNA mix Ct (S1)]

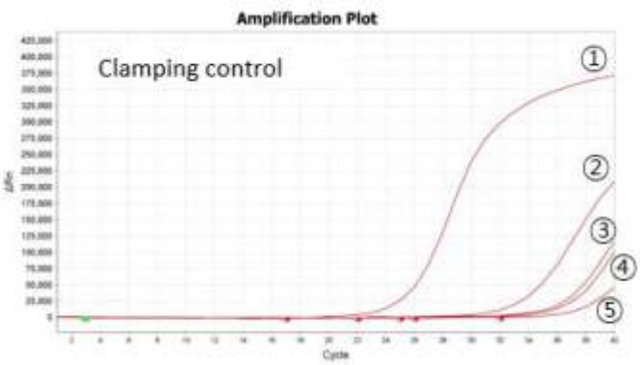
Cuadro 9. Análisis de datos

Ensayo / Muestra No.	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
	ΔCt-2	ΔCt-2	ΔCt-2	ΔCt-2	ΔCt-2
② Mezcla de PNA E542 (S2)	6,50	15,74	14.05	15,72	15,74
③ Mezcla PNA E545 o Q546 (S3)	15,93	5.11	12,94	12.47	15,74
④ Mezcla de H1047 PNA (S4)	15,93	10.02	5.17	13.39	10,70
⑤ Mezcla C420 PNA (S5)	15,93	15,74	12,88	6,72	15,74
Resultados	Mutante E542	Mutante E545 / Q546	Mutante H1047	Mutante C420	Salvaje

Los resultados de la Muestra1 ~ 5 deben estar en el rango dado en la Tabla 7, la muestra se considera mutada

2. Uso de ABI QuantStudio® 5

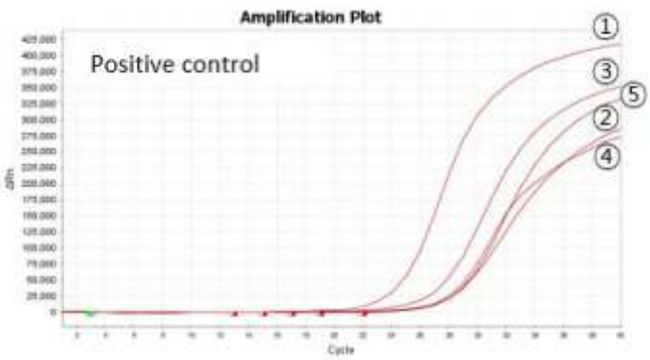
1) Perfil de control de sujeción



Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar Rango de CT	Resultado
1 No PNA (C1)	24	21 <X <30	Aceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	ΔCt-2	Aceptar Rango ΔCt-2	Resultado
2 Mezcla de PNA E542 (C2)	32,90	8,90	7 <	Aceptable
3 Mezcla PNA E545 o Q546 (C3)	37,40	13.40	6 <	Aceptable
4 Mezcla de H1047 PNA (C4)	36,50	12,50	8 <	Aceptable
5 Mezcla de C420 PNA (C5)	40,00	16.00	8 <	Aceptable

2) Perfil de control positivo



Ensayo	Control positivo Ct	Aceptar Rango de CT	Resultado
1 No PNA (C1)	23.00	21 <X <30	Aceptable

Ensayo	Control positivo Ct	ΔCt-2	Aceptar Rango ΔCt-2	Resultado
2 Mezcla de PNA E542 (C2)	27.20	4.20	≤7	Aceptable
3 Mezcla PNA E545 o Q546 (C3)	25,90	2,90	≤6	Aceptable
4 Mezcla de H1047 PNA (C4)	26,50	3,50	≤8	Aceptable
5 Mezcla de C420 PNA (C5)	27.40	4,40	≤8	Aceptable

2) Perfil de las muestras de ADN

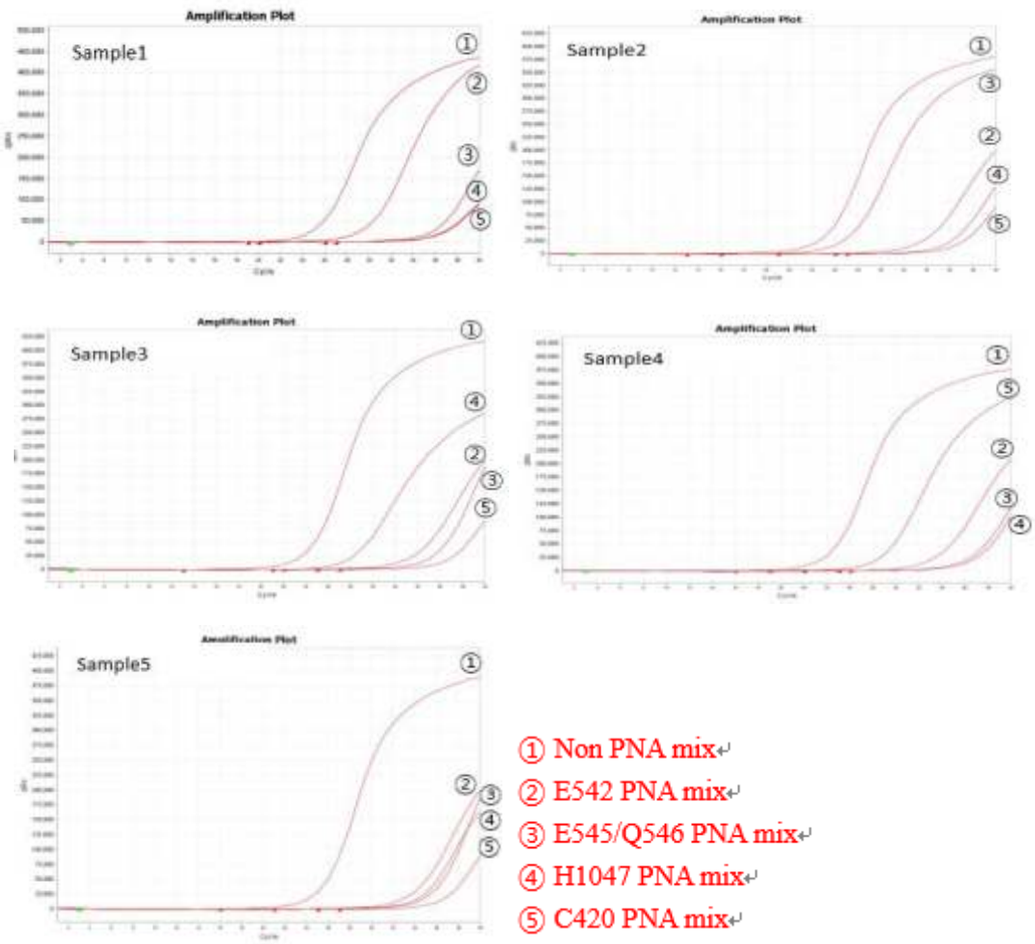


Tabla 8. Ejemplo de valores Ct de muestra

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1 (Ct)	Muestra 2 (Ct)	Muestra 3 (Ct)	Muestra 4 (Ct)	Muestra 5 (Ct)	* ΔCt-2
① Mezcla sin PNA (S1)	24.10	23,90	23.00	22,90	24.00	
② Mezcla de PNA E542 (S2)	28,90	33,20	33,20	32,90	33,20	②-①
③ Mezcla PNA E545 o Q546 (S3)	36,40	26.10	35,70	37,40	35,70	③-①
④ Mezcla de H1047 PNA (S4)	36,40	35,90	27.20	36,50	33,70	④-①
⑤ Mezcla C420 PNA (S5)	36,80	37.10	37.10	27,70	37.10	⑤-①

* ΔCt-2 = [Sample Ct] - [Non PNA mix Ct (S1)]

Cuadro 9. Análisis de datos

Ensayo / Muestra No.	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
	ΔCt-2	ΔCt-2	ΔCt-2	ΔCt-2	ΔCt-2
② Mezcla de PNA E542 (S2)	4,80	9.30	10,20	10.00	9,20
③ Mezcla PNA E545 o Q546 (S3)	12.30	2,20	12,70	14,50	11,70
④ Mezcla de H1047 PNA (S4)	12.30	12.00	4.20	13.60	9,70
⑤ Mezcla C420 PNA (S5)	12,70	13.20	14.10	4,80	13.10
Resultados	Mutante E542	Mutante E545 / Q546	Mutante H1047	Mutante C420	Salvaje

Los resultados de la Muestra1 ~ 5 deben estar en el rango dado en la Tabla 7, la muestra se considera mutada ().

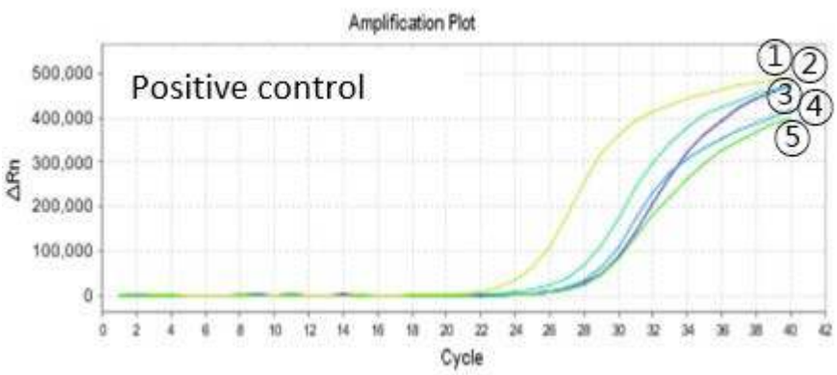
3. Uso de ABI 7500 Fast / StepOnePlus

1) Perfil de control de sujeción

Ensayo	Control de sujeción Ct	Aceptar Rango de CT	Resultado
1 No PNA (C1)	24,60	21 <X <30	Aceptable

Ensayo	Control de sujeción Ct	ΔCt-2	Aceptar Rango ΔCt-2	Resultado
2 Mezcla de PNA E542 (C2)	35,70	11.10	7 <	Aceptable
3 Mezcla PNA E545 o Q546 (C3)	40,00	15.40	6 <	Aceptable
4 Mezcla de H1047 PNA (C4)	35,20	10.60	8 <	Aceptable
5 Mezcla de C420 PNA (C5)	40,00	15.40	8 <	Aceptable

2) Perfil de control positivo



Ensayo	Control positivo Ct	Aceptar Rango de CT	Resultado
1 No PNA (C1)	23,60	21 <X <30	Aceptable

Ensayo	Control positivo Ct	ΔCt-2	Aceptar Rango ΔCt-2	Resultado
2 Mezcla de PNA E542 (C2)	27,70	4.10	≤7	Aceptable
3 Mezcla PNA E545 o Q546 (C3)	26.20	2,60	≤6	Aceptable
4 Mezcla de H1047 PNA (C4)	27.30	3,70	≤8	Aceptable
5 Mezcla de C420 PNA (C5)	28,20	4.60	≤8	Aceptable

2) Perfil de las muestras de ADN

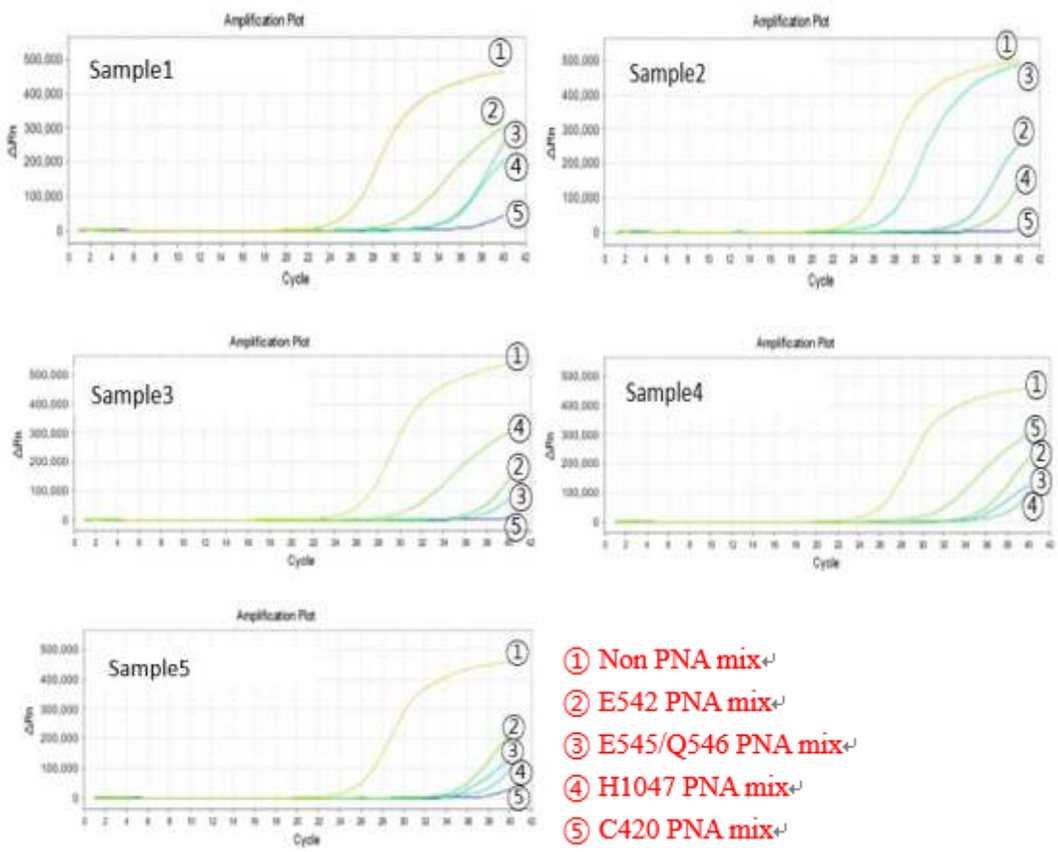


Tabla 8. Ejemplo de valores Ct de muestra

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1 (Ct)	Muestra 2 (Ct)	Muestra 3 (Ct)	Muestra 4 (Ct)	Muestra 5 (Ct)	* ΔCt-2
① Mezcla sin PNA (S1)	24.40	23.30	25.10	24,60	24.30	
② Mezcla de PNA E542 (S2)	30.30	40,00	40,00	35,20	36,10	②-①
③ Mezcla PNA E545 o Q546 (S3)	35,60	26.40	40,00	40,00	40,00	③-①
④ Mezcla de H1047 PNA (S4)	34,50	33,80	30.30	34,90	35.12	④-①
⑤ Mezcla C420 PNA (S5)	40,00	40,00	40,00	30,80	40,00	⑤-①

* ΔCt-2 = [Sample Ct] - [Non PNA mix Ct (S1)]

Cuadro 9. Análisis de datos

Muestra No. / Ensayo	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
	ΔCt-2	ΔCt-2	ΔCt-2	ΔCt-2	ΔCt-2
② Mezcla de PNA E542 (S2)	5,90	16,70	14,90	10.60	11.80
③ Mezcla PNA E545 o Q546 (S3)	11.20	3.10	14,90	15.40	15,70
④ Mezcla de H1047 PNA (S4)	10.10	10,50	5,20	10.30	10,82
⑤ Mezcla C420 PNA (S5)	15,60	16,70	14,90	6,20	15,70
Resultados	Mutante E542	Mutante E545 / Q546	Mutante H1047	Mutante C420	Salvaje

Los resultados de la Muestra1 ~ 5 deben estar en el rango dado en la Tabla 7, la muestra se considera mutada.

CONTROL DE CALIDAD

Cada lote del kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ PIK3CA se prueba con especificaciones predeterminadas para garantizar una calidad constante del producto de acuerdo con el sistema de gestión de calidad certificado ISO 9001 e ISO 13485 de PANAGENE.

PRUEBA DE RENDIMIENTO

1. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se determinó probando las líneas celulares mutantes PIK3CA estándar con el kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ PIK3CA.

El ADN extraído se mide como 10 ng. Cada 10 ng de ADN se diluyó para tener 100, 50, 10, 4, 2, 1 y 0,5% de diferente proporción de mutantes. Se realizaron ocho pruebas con estas 7 condiciones de ADN para 3 lotes diferentes del kit.

Los resultados mostraron que se detectó a una concentración de línea celular de ADN mutante del 1-10%.

Exón	Mutación	Panel	Cambio de nucleótidos	ID CóSMICO	LOD (%)
9	E542X	E542K	c.1624G> A	760	1%
		E542G	c.1625A> G	761	1%
		E542V	c.1625A> T	762	2%
	E545X o Q546X	E545A	c.1634A> C	12458	4%
		E545K	c.1633G> A	763	4%
		E545G	c.1634A> G	764	4%
		E545D	c.1635G> T	765	2%
		Q546E	c.1636C> G	6147	4%
		Q546K	c.1636C> A	766	10%
		Q546P	c.1637A> C	767	4%
		Q546R	c.1637A> G	12459	4%
20	H1047X	H1047Y	c.3139C> T	774	1%
		H1047L	c.3140A> T	776	1%
		H1047R	c.3140A> G	775	1%
7	C420R	C420R	c.1258T> C	757	2%

2. Especificidad analítica

La especificidad analítica se determinó probando la línea de células silvestres sin ADN mutante. Se realizaron tres pruebas en tres lotes del kitutilizando ADN (10 ng) extraído de la línea celular de tipo salvaje (A549). Las tres pruebas mostraron ubicaciones de tipo salvaje. Las pruebas de 10 ng de ADN de las líneas celulares E542K, E542G, E542V, E545A, E545K, E545G, E545D,

Q546E, Q546K, Q546P, Q546R, H1047Y, H1047L, H1047R, C420R mutadas mostraron ubicaciones de tipo salvaje, excepto para cada mutante ubicación sin reactividad cruzada.

3. Reproducibilidad

Se realizaron experimentos para evaluar la reproducibilidad de mezclar cada fragmento de dsDNA de tipo mutante PIK3CA con ADN genómico humano de tipo salvaje PIK3CA al 4, 2 y 0% de diferente proporción de mutantes, para dos lotes, entre dos operadores, durante cinco días. El kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ PIK3CA tenía una tasa de llamadas correcta del 100%. Todos los resultados mostraron poca variación, con CV (%) <10%.

ADJUNTO ARCHIVO

1. Método de cálculo del valor Ct para el kit de detección de mutaciones PNAClamp ™ PIK3CA

1) Recopilación y suavizado de datos

Recopile el número de ciclo de la fase de amplificación (etapa III de la condición de PCR) y los datos (por cada canal fluorescente y por cada pocillo) medidos en cada ciclo de la siguiente manera, y repita el suavizado de datos dos veces.

[Recopilación de datos]
El número de ciclo en el n-ésimo paso de medición de la fase de amplificación (un número entero positivo con n = 1 N, un número entero positivo con n = 1 N) se llama Ciclo (n) (n = un número entero positivo con n = 1 N),
y el valor de la señal fluorescente en el enésimo paso de medición de la fase de amplificación se llama Flu (n),

[Suavizado de datos]
Para el Flu (n) anterior, se realiza el siguiente procedimiento para cada suavizado de datos.

i) $n = 1$ o N,
Gripe (n) = Gripe (n)

ii) $2 \leq n \leq N-1$,
Gripe (n) = (Gripe (n-1) + Gripe (n) + Gripe (n + 1)) / 3

2) Calcular la primera curva diferencial y suavizar

Calcule la primera curva diferencial usando los datos de ciclo (n) y flujo (n) en 1) y repita el suavizado de datos dos veces.

[Calcular la primera curva diferencial]
Los datos de la primera curva diferencial calculados a partir del ciclo (n) (n es un número entero positivo de 1 a N) se llama CycleDev1 (n) (n es un número entero positivo de 1 a N),
y los datos del primer circuito diferencial calculados a partir de Flu (n) (n es un número entero positivo de 1 a 1 N) es un número entero positivo de los datos del primer circuito diferencial de 1 a 1 N (N),

i) $1 \leq n \leq N-1$,
CycleDev1 (n) = (Ciclo (n) + Ciclo (n + 1)) / 2
FluDev1 (n) = Gripe (n + 1) - Gripe (n)

[Suavizado de datos]
Para el FluDev1 (n) anterior, se realiza el siguiente procedimiento en cada suavizado de datos.

i) $n = 1$ o $N-1$,
FluDev1 (n) = FluDev1 (n)

ii) $2 \leq n \leq N-2$,

FluDev1 (n) = (FluDev1 (n-1) + FluDev1 (n) + FluDev1 (n + 1)) / 3

3) Calcular la segunda curva diferencial y suavizar

Calcule la segunda curva diferencial usando los datos CycleDev1 (n) y FluDev1 (n) en 2) y repita el suavizado de datos cuatro veces.

[Calcular la segunda curva diferencial]
Datos de la segunda curva diferencial calculados a partir de CycleDev1 (n) (n es un número entero positivo de 1 a 1 N-1),
y los datos de la segunda curva diferencial calculados a partir de FluDev1 (n) (n es un número entero positivo de 1 a N-2).

i) $1 \leq n \leq N-2$,
CycleDev2 (n) = (CycleDev1 (n) + CycleDev1 (n + 1)) / 2
FluDev2 (n) = FluDev1 (n + 1) - FluDev1 (n)

[Suavizado de datos]
Para el FluDev2 (n) anterior, se realiza el siguiente procedimiento en cada suavizado de datos.

i) n = 1 o N-2,
FluDev2 (n) = FluDev2 (n)
ii) $2 \leq n \leq N-3$,
FluDev2 (n) = (FluDev2 (n-1) + FluDev2 (n) + FluDev2 (n + 1)) / 3

4) Calcular la tercera curva diferencial y suavizar

Calcule la tercera curva diferencial utilizando los datos CycleDev2 (n) y FluDev2 (n) en 3), y repita el suavizado de datos 10 veces.

[Calcular la tercera curva diferencial]
Los datos de la tercera curva diferencial calculados a partir de CycleDev2 (n) (n es un número entero positivo de 1 a N-2) se llama CycleDev3 (n) (n es un número entero positivo de 1 a N-3),
y los datos de la tercera curva diferencial calculados a partir de FluDev3 (n) (n es un número entero positivo de 1 a N-2),

i) $1 \leq n \leq N-3$,
CycleDev3 (n) = (CycleDev2 (n) + CycleDev2 (n + 1)) / 2
FluDev3 (n) = FluDev2 (n + 1) - FluDev2 (n)

[Suavizado de datos]

Para el FluDev3 (n) anterior, se realiza el siguiente procedimiento en cada suavizado de datos.

i) $n = 1$ o $N-3$,
FluDev3 (n) = FluDev3 (n)
ii) $2 \leq n \leq N-4$,
FluDev3 (n) = (FluDev3 (n-1) + FluDev3 (n) + FluDev3 (n + 1)) / 3

5) Análisis de pico y cálculo del valor Ct para la curva diferencial Calcular la tercera curva diferencial y suavizar

1 Los datos de la tercera curva diferencial calculados en 4) se trazarán en el plano xy (x, y) = (CycleDev3 (n), FluDev3 (n), n = un número entero positivo de 1 a N-3), y el valor x de contacto con y = 0 se calculará de la siguiente manera y se determinará como valores candidatos de Ct.

[Calcular los valores candidatos de Ct]

i) $2 \leq n \leq N-4$,
ii) C1 = CycleDev3 (n), C2 = CycleDev3 (n + 1), F1 = FluDev3 (n), F2 = FluDev3 (n + 1),

Si F1 × F2 <0, Ct valor candidato = C1 + (C2 - C1) ((| F1 | / (| F1 | + | F2 |))

2 Trazar los datos de la segunda curva diferencial calculados en 3) en el plano xy (x, y) = (CycleDev2 (n), un entero positivo de 1 a N-2 n), y se estima que un valor y para los valores candidatos de Ct sea x, y se estima el segundo valor pico para cada valor candidato de Ct.

[Calcule 2DPH de cada valor candidato de Ct]

i) $2 \leq n \leq N-4$,
Si el valor n de CycleDev2 (n) con un valor máximo menor que el candidato Ct es a, C1 = CycleDev2 (a-1), C2 = CycleDev2 (a), C3 = CycleDev2 (a + 1), C4 = CycleDev2 (a + 2), F1 = FluDev2 (a-1), F2 = FluDev2 (a), F3 = FluDev (a), F3 = FluDev (a) +4,

H1 = (F2 - F1) / (C2 - C1) × (Ct valor candidato) + ((F2 + F1) - (F2 - F1) / (C2 - C1) × (C2 + C1)) / 2
H2 = (F4 - F3) / (C4 - C3) × (Ct valor candidato) + ((F4 + F3) - (F4 - F3) / (C4 - C3) × (C4 + C3)) / 2
2DPH = (H1 + H2) / 2

3 El valor Ct candidato que cumple los criterios a continuación se determina como el valor Ct final.

[Criterios de confirmación del valor Ct final]
Se cumplirán los dos criterios siguientes.

i) Valor candidato de Ct para 2DPH mayor que el estándar de corte para cada agente
ii) i) Valor candidato de Ct que indica el valor de 2DPH más grande entre los valores candidatos de Ct que cumplen los criterios anteriores

REFERENCIAS

1. Kwon et al., Frecuencia de mutaciones de KRAS, BRAF y PIK3CA en cánceres colorrectales avanzados: comparación del pinzamiento de PCR mediado por ácido nucleico peptídico y secuenciación directa en tejido fijado con formalina e incluido en parafina. Pathol Res Pract 207 (12): 762-8, 2011.
2. Barbi S et al., El análisis de las mutaciones de PIK3CA en el carcinoma gástrico y el metanálisis de la literatura sugieren que la selectividad de exón es una característica del tipo de cáncer. J Exp Clin Cancer Res. 29:32 de 2010.
3. Di cosimo S et al., Mutaciones de fosfoinositido 3-quinasa en cáncer de mama: ¿una "buena" mutación activadora? Clin Cancer Res. 15; 15 (16), 5017-5019, 2009.
4. Ligresti G et al., Mutaciones de PIK3CA en tumores sólidos humanos: papel en la sensibilidad a diversos enfoques terapéuticos. Ciclo celular. 1; 8 (9): 1352-8, 2009.
5. Kalinsky K et al., La mutación PIK3CA se asocia con un mejor resultado en el cáncer de mama. Clin Cancer Res. 15; 15 (16): 5049-59, 2009.

EXPLICACIÓN DE SÍMBOLOS

IVD	*In vitro* Dispositivo médico de diagnóstico		Fabricante
LOT	Código de lote	Σ	Contiene suficiente para <n> pruebas
REF	Número de catalogo		Límite superior de temperatura de almacenamiento
EC REP	Representante europeo autorizado		Usar por
	Consultar instrucciones de uso	CE	Este producto cumple los requisitos de la Directiva Europea 98/79 EC para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

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