
Febbraio 2016

Plug-in KRAS Pyro[®]

Guida rapida

Per l'installazione e l'utilizzo con strumenti
PyroMark[®] Q24 e software PyroMark Q24
versione 2.0

Informazioni sul plug-in KRAS Pyro

Il pacchetto del plug-in KRAS Pyro include:

- *Plug-in KRAS Pyro Guida rapida*
- due file di installazione
- report di riferimento per la verifica della funzionalità del plug-in KRAS Pyro

Nota: Il plug-in KRAS Pyro è destinato esclusivamente all'utilizzo in combinazione con i kit KRAS Pyro e i kit RAS Extension Pyro dedicati adatti per le applicazioni descritte nei rispettivi manuali dei kit KRAS Pyro e RAS Extension Pyro.

Installazione del plug-in KRAS Pyro

Importante: Il plug-in KRAS Pyro deve essere installato su strumenti **PyroMark Q24 con software PyroMark Q24 versione 2.0**.

1. Se è aperto, chiudere il software PyroMark Q24 2.0.
2. Aprire il file di installazione *.zip ed estrarre i file.
3. Fare doppio clic sul file setup.exe.
4. Seguire le istruzioni delle finestre di dialogo.
5. Avviare il software PyroMark Q24 2.0. Nel menu "Reports" (Report) della modalità AQ, sotto "AQ Add On Reports/KRAS" (Report aggiuntivi AQ/KRAS), compare il report del plug-in KRAS Pyro.
6. Verificare la funzionalità del plug-in (vedere "Verifica della funzionalità del plug-in KRAS Pyro" nel seguito).

Verifica della funzionalità del plug-in KRAS Pyro

Importante: La verifica dovrebbe essere eseguita ogni volta che si effettua un aggiornamento o l'installazione di nuovo software sul computer.

La seguente procedura illustra come verificare che il software funzioni correttamente e non abbia subito alcun effetto a causa delle modifiche apportate al computer.

1. Aprire la seduta "KRAS Example" (Esempio KRAS) accessibile nel browser dei collegamenti sotto "Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/KRAS" (Collegamenti/File di esempio/sedute PyroMark/KRAS).
2. Eseguire un'analisi "KRAS codon 12 and 13" (Codone 12 e 13 del gene KRAS) per tutti i pozzetti come descritto in "Analisi di una seduta PyroMark Q24" nel seguito.
3. Confrontare i risultati con il report di riferimento. Se i risultati sono identici, il corretto funzionamento del plug-in è confermato.

Analisi di una seduta PyroMark Q24

La seguente procedura descrive l'analisi delle mutazioni di una seduta KRAS conclusa utilizzando il plug-in KRAS Pyro.

1. Nella porta USB del computer inserire la penna USB contenente il file del processo elaborato.
2. Utilizzando Windows® Explorer, spostare il file della seduta dalla penna USB alla posizione desiderata sul computer.
3. Aprire il file della seduta nella modalità AQ del software PyroMark Q24, selezionando "Open" (Apri) nel menu "File" oppure facendo doppio clic sul file (👉) nel browser dei collegamenti.

4. Selezionare "AQ Add On Reports/KRAS" e "Codon 12 and 13" (Codone 12 e 13) oppure "Codon 61" (Codone 61) da "Reports" nel menu (Figura 1).

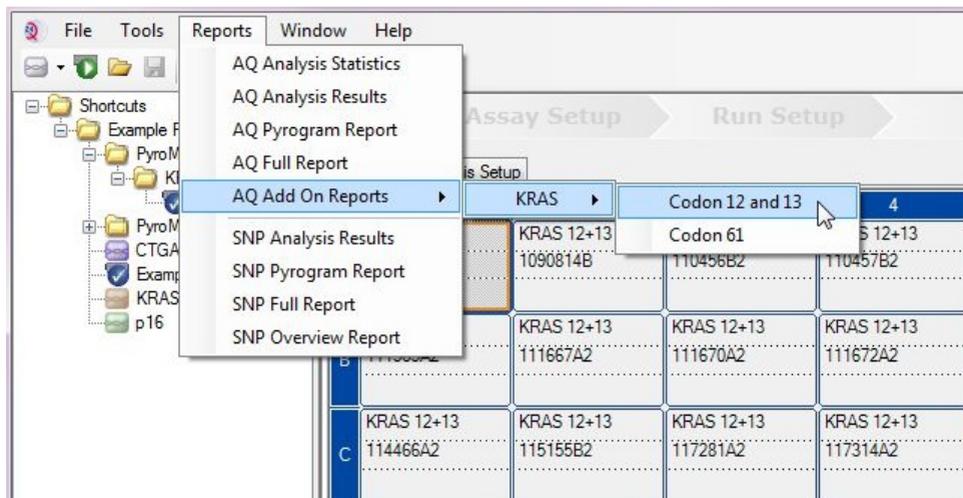


Figura 1. Analisi delle mutazioni di una seduta "KRAS codon 12 and 13" conclusa utilizzando il plug-in KRAS Pyro.

5. I pozzetti vengono analizzati automaticamente per rilevare tutte le mutazioni riportate nella Tabella 1. I risultati vengono presentati in una tabella riassuntiva (Figura 2), seguita dai risultati dettagliati che includono i tracciati Pyrogram® e la qualità dell'analisi.

Importante: il plug-in KRAS Pyro riporta la mutazione (Tabella 1) il cui segnale atteso meglio corrisponde al tracciato Pyrogram osservato.

Tabella 1. Mutazioni analizzate mediante il plug-in KRAS Pyro

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	LOB (unità %)	LOD (unità %)	ID COSMIC* (V72)
Codone 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	4,9	8	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Codone 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Codone 61 (CAA), con dosaggio di orientamento inverso (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

* Fonte: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, disponibile online presso il Sanger Institute all'indirizzo Web www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Summary

NOTE: Only the mutation with the highest frequency is reported.

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	106506B1	Mutation	28.8	GGT>AGT	G12S	
A2	1090814B	Wildtype				
A3	110456B2	Potential low level mutation	2.3	GGT>AGT	G12S	
A4	110457B2	Wildtype				
A5	110462A2	Wildtype				
A6	110486A2	Mutation	24.9	GGT>GCT	G12A	
A7	111207A2	Mutation	31.6	GGT>GTT	G12V	
A8	111555A2	Mutation	39.7	GGT>GAT	G12D	
B1	111565A2	Mutation	37.5	GGT>GAT	G12D	
B2	111667A2	Mutation	26.7	GGT>GTT	G12V	
B3	111670A2	Wildtype				
B4	111672A2	Mutation	21.1	GGT>GTT	G12V	
B5	112307A2	Wildtype				
B6	113070A2	Wildtype				
B7	113188A1	Mutation	55.1	GGT>TGT	G12C	
B8	113200A1	Wildtype				
C1	114466A2	Wildtype				

Figura 2. Esempio di tabella riassuntiva dei risultati di un'analisi mediante plug-in KRAS Pyro.

Interpretazione dei risultati e rilevazione delle mutazioni di basso livello

Si raccomanda vivamente di includere un campione wild-type in ogni seduta a scopo di confronto e come controllo dei livelli di fondo.

Importante: Uno schema inatteso di picchi può determinare una valutazione di qualità "Check" (Controllare) o "Failed" (Non superato). Ciò può indicare una mutazione inattesa che non viene analizzata dal report del plug-in. I campioni interessati da questo fenomeno

devono essere analizzati manualmente utilizzando il software PyroMark Q24 e tenendo conto della possibile presenza di mutazioni inattese. Per i dettagli, consultare il manuale del kit KRAS Pyro o del kit RAS Extension Pyro come appropriato.

Importante: Il tracciato Pyrogram deve sempre essere confrontato con l'istogramma riportato nella sezione dei risultati dettagliati del report del plug-in e può essere visualizzato nel software PyroMark Q24 facendo clic con il tasto destro del mouse nella finestra Pyrogram. Il tracciato Pyrogram deve essere esaminato per valutare la presenza di eventuali picchi imprevisti. Nel caso in cui i picchi misurati non corrispondano all'altezza delle barre dell'istogramma e ciò non possa essere spiegato con mutazioni rare o inattese, non sarà possibile utilizzare il risultato come base per la valutazione dello stato mutazionale. È consigliabile analizzare nuovamente il campione.

Importante: I campioni per i quali è riportata la possibile presenza di una mutazione di basso livello (frequenza compresa tra LOD e LOD + 3 unità percentuali) devono essere nuovamente processati in duplicato con un campione di DNA di controllo non metilato. In tal caso viene generata un'avvertenza. Il campione deve essere considerato positivo per la mutazione soltanto se entrambi i duplicati confermano il risultato dell'analisi generale e sono visibilmente differenti dal campione di controllo normale. In caso contrario, il campione deve essere considerato wild-type.

Importante: Per un esame più accurato dei campioni i cui risultati segnalano una potenziale mutazione di basso livello, è consigliabile eseguire un'ulteriore analisi manuale del campione mediante il software PyroMark Q24, ad esempio un confronto con la frequenza mutazionale del campione di controllo (per informazioni dettagliate, vedere "Protocollo 6: analisi di una seduta PyroMark Q24" nell'appropriato manuale del kit RAS Extension Pyro). Se nel campione di controllo viene misurata una frequenza superiore al valore LOB, ciò indica che nella seduta corrispondente è presente un livello di fondo più alto del normale che potrebbe influenzare la quantificazione allelica, in particolare per i livelli mutazionali bassi. In questo caso, i risultati che segnalano la possibile presenza di mutazioni di basso livello non costituiscono una base per la valutazione dello stato mutazionale ed è consigliabile processare nuovamente i campioni con possibili mutazioni di basso livello.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN®. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN (QIAGEN Technical Services) o al proprio distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (gruppo QIAGEN); Windows® (Microsoft Corporation).
1106192 02/2017 © 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati. PROM-8151-003

Ordini www.qiagen.com/contact | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com