
Februar 2016

Lynvejledning til KRAS Pyro[®] Plug-in

Til installation og anvendelse med PyroMark[®]
Q24-instrumenter og PyroMark Q24-
softwareversion 2.0

Om KRAS Pyro Plug-in

KRAS Pyro Plug-in-pakken indeholder følgende:

- *Lynvejledning til KRAS Pyro Plug-in*
- To installationsfiler
- Referencerapport for funktionsbekræftelse for KRAS Pyro Plug-in

Bemærk: KRAS Pyro Plug-in er beregnet til anvendelse udelukkende i kombination med dedikerede KRAS Pyro-kits og RAS Extension Pyro-kits, der er indiceret til brug som beskrevet i de respektive håndbøger til KRAS Pyro-kittet og RAS Extension Pyro-kittet.

Installation af KRAS Pyro Plug-in

Vigtigt: KRAS Pyro Plug-in skal installeres på **PyroMark Q24-instrumenter med PyroMark Q24-softwareversion 2.0.**

1. Luk PyroMark Q24-software 2.0, hvis den er åben.
2. Åbn *.zip-installationsfilen, og udpak filerne.
3. Dobbeltklik på setup.exe-filen.
4. Følg instruktionerne i de dialogbokse, der vises.
5. Start PyroMark Q24-software 2.0. KRAS Pyro Plug-in Report vises nu under "AQ Add On Reports/KRAS" (AQ-tilføjelsesrapporter/KRAS) i menuen "Reports" (Rapporter) i AQ-tilstand.
6. Bekræft pluginfunktionaliteten (se "Bekræftelse af funktionalitet for KRAS Pyro Plug-in herunder").

Bekræftelse af funktionalitet for KRAS Pyro Plug-in

Vigtigt: Bekræftelsen skal foretages, hver gang der installeres ny software eller foretages opgraderinger på computeren.

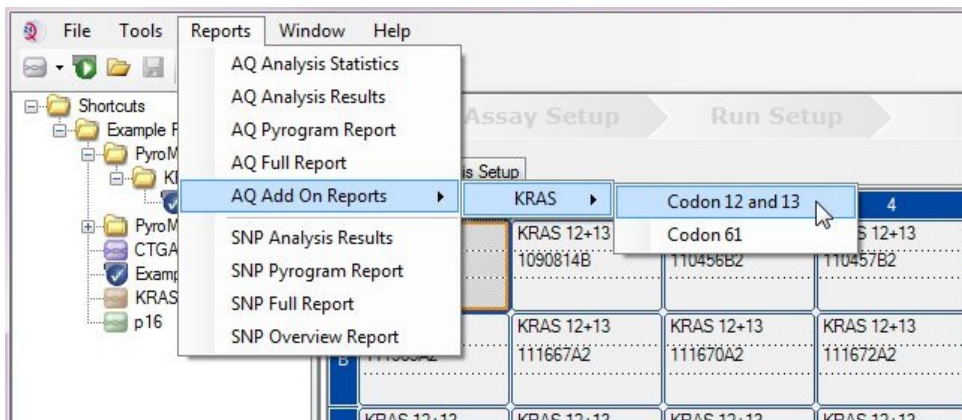
Følgende trin beskriver, hvordan det bekræftes, at softwaren fungerer korrekt og ikke er påvirket af ændringer på computeren.

1. Åbn kørslen af "KRAS Example" (KRAS-eksempel) under "Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/KRAS" (Genveje/Eksempelfiler/PyroMark-kørsler/KRAS) i genvejsbrowseren.
2. Foretag en analyse af "KRAS codon 12 and 13" (KRAS codon 12 og 13) for alle brønde som beskrevet i "Analyse af en PyroMark Q24-kørsel" herunder.
3. Sammenlign resultaterne med referencerapporten. Hvis resultaterne er identiske, bekræftes korrekt funktion af plugin'et.

Analyse af en PyroMark Q24-kørsel

Følgende trin beskriver mutationsanalysen for en afsluttet KRAS-kørsel ved hjælp af KRAS Pyro Plug-in.

1. Sæt USB-nøglen med den behandlede kørselsfil i USB-porten på computeren.
2. Flyt kørselsfilen fra USB-nøglen til den ønskede placering på computeren ved hjælp af Windows® Stifinder.
3. Åbn kørselsfilen i AQ-tilstand i PyroMark Q24-softwaren ved enten at vælge "Open" (Åbn) i menuen "File" (Filer) eller dobbeltklikke på filen (👉) i genvejsbrowseren.
4. Vælg "AQ Add On Reports/KRAS" og "Codon 12 and 13" (Codon 12 og 13) eller "Codon 61" i menuen "Reports" (Figur 1).



Figur 1. Mutationsanalyse for en afsluttet KRAS codon 12 og 13-kørsel ved hjælp af KRAS Pyro Plug-in.

5. Brøndene analyseres automatisk for samtlige mutationer, der er angivet i Tabel 1. Resultaterne præsenteres i en oversigtstabel (Figur 2) efterfulgt af detaljerede resultater, som inkluderer Pyrogram[®] og analysekvalitet.

Vigtigt: KRAS Pyro Plug-in vil rapportere den mutation (Tabel 1), hvis forventede signal svarer bedst til det observerede pyrogram.


Tabel 1. Mutationer analyseres i KRAS Pyro Plug-in

Nukleinsyre-substitution	Aminosyre-substitution	LOB (procentenheder)	LOD (procentenheder)	COSMIC-id* (V72)
Codon 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
Codon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Codon 61 (CAA) som analyseret bagfra (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

* Fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, der er tilgængeligt online på Sanger Institutes websted på 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				

Figur 2. Oversigt over eksempelresultater fra en analyse af KRAS Pyro Plug-in.

Fortolkning af resultater og påvisning af mutationer med lavt niveau

Det anbefales på det kraftigste at medtage en vildtypeprøve i hver enkelt kørsel til sammenligning og kontrol af baggrundsniveauer.

Vigtigt: Hvis kvalitetsvurderingen ender med "Check" (Kontrollér) eller "Failed" (Ikke godkendt), kan det skyldes et uventet spidsmønster. Dette kan indikere en uventet mutation, der ikke analyseres i Plug-in Report. Sådanne prøver skal analyseres manuelt ved hjælp af

PyroMark Q24-softwaren med hensyntagen til, at de kan indeholde uventede mutationer. Se flere oplysninger i håndbogen til det relevante KRAS Pyro-kit eller RAS Extension Pyro-kit.

Vigtigt: Pyrogrammet skal altid sammenlignes med histogrammet, som vises i de detaljerede resultater af Plug-in Report og kan vises i PyroMark Q24-softwaren ved at højreklikke i pyrogramvinduet. Pyrogrammet skal undersøges for forekomsten af uventede spidser. I tilfælde af at de målte spidser ikke svarer til højden af søjlerne i histogrammet, og dette ikke kan forklares med sjældne eller uventede mutationer, kan resultatet ikke bruges som basis for en vurdering af mutationsstatus. Det anbefales at køre prøven igen.

Vigtigt: Prøver med en rapporteret potentiel lavniveaumutation (hyppighed i området fra LOD til LOD + 3 %-enheder) skal omkøres i duplikeret form sammen med en prøve med umethyleret kontrol-DNA. I dette tilfælde vises en advarsel. Prøven må kun betragtes som positiv for mutationen, hvis begge duplikater bekræfter resultatet af den originale analyse og er synligt forskellig fra den normale kontrol. I modsat fald skal prøven vurderes som vildtype.

Vigtigt: Med henblik på en nærmere undersøgelse af prøver med en rapporteret, potentiel lavniveaumutation anbefaler vi, at prøven yderligere analyseres manuelt i PyroMark Q24-softwaren, f.eks. for at sammenligne med kontrolprøvens mutationshyppighed (se protokol 6: Analyse af en PyroMark Q24-kørsel" i håndbogen til det relevante RAS Extension Pyro-kit). En målt hyppighed over LOB i kontrolprøven antyder et højere baggrundsniveau end normalt i den tilsvarende kørsel, hvilket kan påvirke allelekvantificering især i tilfælde af lave mutationsniveauer. I dette tilfælde er rapporterede potentielle lavniveaumutationer ikke basis for vurdering af mutationsstatus, og det anbefales at genkøre prøver med en potentiel lavniveaumutation.

Vedrørende opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle håndbog eller brugervejledning til QIAGEN®-kittet. Håndbøger og brugervejledninger til QIAGEN-kittet findes på www.qiagen.com eller kan rekvireres fra QIAGENS tekniske serviceafdeling eller den lokale leverandør.

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN Group); Windows® (Microsoft Corporation).
1106192 02/2017 © 2017 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes. PROM-8151-003

Bestilling www.qiagen.com/contact | Teknisk service support.qiagen.com | Websted www.qiagen.com