

Únor 2016

Průvodce rychlým spuštěním modulu plug-in KRAS Pyro[®]

Pro instalaci a používání s přístroji PyroMark[®]
Q24 a softwarem PyroMark Q24 verze 2.0

O modulu plug-in KRAS Pyro

Balíček modulu plug-in KRAS Pyro obsahuje:

- *průvodce rychlým spuštěním modulu plug-in KRAS Pyro,*
- dva instalační soubory,
- referenční zprávu pro ověření funkce modulu plug-in KRAS Pyro.

Poznámka: Modul plug-in KRAS Pyro je určen jen pro použití v kombinaci s vyhrazenými sadami KRAS Pyro a RAS Extension Pyro indikovanými pro aplikace popsané v příslušných příručkách k sadám KRAS Pyro a RAS Extension Pyro.

Instalace modulu plug-in KRAS Pyro

Důležité: Modul plug-in KRAS Pyro musí být instalován na **přístrojích PyroMark Q24 se softwarem PyroMark Q24 verze 2.0.**

1. Zavřete software PyroMark Q24 2.0, pokud je otevřený.
2. Otevřete instalační soubor *.zip a extrahujte soubory.
3. Dvojitě klikněte na soubor setup.exe.
4. Postupujte podle pokynů, které se zobrazí v dialogových oknech.
5. Spustíte software PyroMark Q24 2.0. Zpráva modulu plug-in KRAS Pyro se nyní objeví pod položkou „AQ Add On Reports/KRAS“ (Přidat AQ zprávu/KRAS) v nabídce „Reports“ (Zprávy) v režimu AQ.
6. Ověřte funkčnost modulu plug-in (viz část „Ověření funkčnosti modulu plug-in KRAS Pyro“ dále).

Ověření funkčnosti modulu plug-in KRAS Pyro

Důležité: Ověření je třeba provést při každé instalaci nebo upgradu nového softwaru v počítači.

Následující kroky popisují způsob ověření, že software správně funguje a nebyl ovlivněn žádnými změnami v počítači.

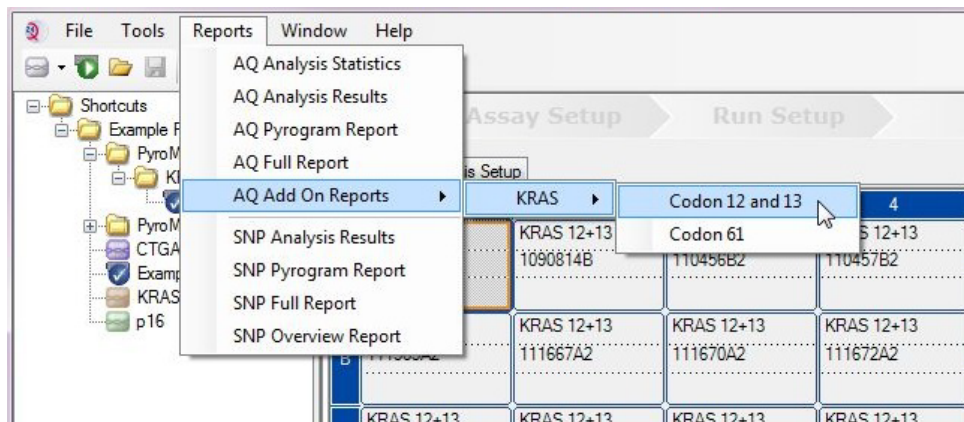
1. V prohlížeči klávesových zkratk otevřete cyklus „KRAS Example“ (Příklad KRAS) ve složce „Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/KRAS“ (Klávesové zkratky/Soubory příkladů/Cykly PyroMark/KRAS).
2. Proveďte analýzu „KRAS codon 12 and 13“ (Kodon 12 a 13 genu KRAS) pro všechny jamky, jak je popsána v části „Analýza cyklu v systému PyroMark Q24“ dále.
3. Výsledky porovnejte s referenční zprávou. Jsou-li výsledky totožné, je potvrzena správná funkce modulu plug-in.

Analýza cyklu v systému PyroMark Q24

Následující kroky popisují analýzu mutace dokončeného cyklu KRAS pomocí modulu plug-in KRAS Pyro.

1. Zasuňte USB jednotku obsahující vytvořený soubor cyklu do USB portu počítače.
2. Pomocí Průzkumníku Windows® přesuňte soubor cyklu z USB jednotky do požadovaného umístění v počítači.
3. Otevřete soubor cyklu v režimu AQ softwaru PyroMark Q24 buď zvolením možnosti „Open“ (Otevřít) v nabídce „File“ (Soubor) nebo dvojitým kliknutím na soubor (👉) v prohlížeči zkratk.

4. Z nabídky „Reports“ vyberte položku „AQ Add On Reports/KRAS“ a pak „Codon 12 and 13“ (Kodon 12 a 13) nebo „Codon 61“ (Kodon 61) (obrázek 1).



Obrázek 1. Analýza mutace dokončeného cyklu kodonu 12 a 13 genu KRAS pomocí modulu plug-in KRAS Pyro

5. V jamkách automaticky proběhne analýza všech mutací uvedených v tabulce 1. Výsledky se zobrazí v přehledné tabulce (obrázek 2) a následují i podrobné výsledky, které zahrnují grafy Pyrograms® (Pyrogramy) a kvalitu analýzy.

Důležité: V modulu plug-in KRAS Pyro bude uvedena mutace (tabulka 1), jejíž předpokládaný signál nejlépe odpovídá pozorovanému pyrogramu.


Tabulka 1. Mutace analyzované modulem plug-in KRAS Pyro

Substituce nukleové kyseliny	Substituce aminokyseliny	LOB (% jednotek)	LOD (% jednotek)	COSMIC ID* (V72)
Kodon 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
Kodon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Kodon 61 (CAA), při analýze ve zpětném směru (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

* Podle Katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) dostupného online na stránkách ústavu Sanger Institute 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				

Obrázek 2. Příklad přehledu výsledků analýzy modulu plug-in KRAS Pyro

Interpretace výsledků a detekce mutací s nízkou úrovní výskytu

Je důrazně doporučeno, aby každý cyklus zahrnoval i vzorek divokého typu pro srovnání a jako kontrolu úrovní v pozadí.

Důležité: Hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo) může být vyvoláno neočekávaným uspořádáním píků. Tento jev může poukazovat na přítomnost neočekávané mutace, která není součástí analýzy dané ve zprávě v modulu plug-in. Takové vzorky by se měly analyzovat manuálně pomocí softwaru PyroMark Q24 a s ohledem na možnost přítomnosti neočekávaných mutací. Bližší informace viz příslušná příručka k sadě KRAS Pyro nebo RAS Extension Pyro.

Důležité: Pyrogram je nutné vždy porovnat s histogramem, který se zobrazí v podrobných výsledcích ve zprávě v modulu plug-in a lze jej zobrazit v softwaru PyroMark Q24 kliknutím pravým tlačítkem myši na okno „Pyrogram“. Pyrogram je nutné zkontrolovat, zda se v něm nevyskytují neočekávané píky. Pokud naměřené píky výškově neodpovídají sloupcům histogramu a tento jev nelze vysvětlit vzácnými nebo neočekávanými mutacemi, není podle výsledku možné posoudit stav mutací. Doporučuje se provést novou analýzu vzorku.

Důležité: Vzorky s hlášenou potenciální mutací s nízkou úrovní výskytu (frekvence v rozmezí LOD až LOD + 3 % jednotek) je třeba analyzovat duplicitně se vzorkem s nemetylovanou kontrolní DNA. V takovém případě se zobrazí upozornění. Vzorek by měl být pokládán za pozitivní na výskyt mutace, jen pokud oba duplikáty potvrdí výsledek původní analýzy a budou zjevně odlišné od normální kontroly. V opačném případě by měl být vzorek posouzen jako divoký typ.

Důležité: K podrobnějšímu prozkoumání vzorků s hlášenou potenciální mutací s nízkou úrovní výskytu doporučujeme provést další analýzu vzorku ručně v softwaru PyroMark Q24, např. pro porovnání s frekvencí této mutace v kontrolním vzorku (podrobné pokyny viz „Protokol 6: „Analýza cyklu v systému PyroMark Q24“ v příslušné příručce k sadě RAS Extension Pyro). Změřená frekvence převyšující LOB v kontrolním vzorku indikuje v odpovídajícím cyklu vyšší než běžnou hladinu pozadí, což může ovlivnit kvantifikaci alel zvláště u mutací s nízkou hladinou. V tomto případě podle hlášených potenciálních mutací s nízkou úrovní výskytu nelze posoudit stav mutací a doporučuje se provést novou analýzu vzorků s potenciální mutací s nízkou úrovní výskytu.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu QIAGEN® nebo v příručce uživatele. Příručky a uživatelské návody sady QIAGEN jsou k dispozici na stránkách www.qiagen.com, nebo si je lze vyžádat u Technických služeb QIAGEN nebo svého lokálního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN Group); Windows® (Microsoft Corporation).
1106192 02/2017 © 2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena. PROM-8151-003

Objednávky www.qiagen.com/contact | Technická podpora support.qiagen.com | Webová stránka www.qiagen.com