

февруари 2017

Ръководство за бърз старт на приставката RAS Extension Pyro[®]

За инсталиране и употреба с апарати
PyroMark[®] Q24 и софтуер PyroMark Q24
версия 2.0

Информация за приставката RAS Extension Pyro

Опаковката на приставката RAS Extension Pyro съдържа следното:

- *Ръководство за бърз старт на приставката RAS Extension Pyro*
- Два инсталационни файла
- Референтен отчет за проверка на функциите на приставката RAS Extension Pyro

Забележка: Приставката RAS Extension Pyro е предназначена за употреба само в комбинация със специализираните набори NRAS Pyro и RAS Extension Pyro, предназначени за приложенията, описани в съответните ръководства за набора NRAS Pyro и RAS Extension Pyro.

Инсталиране на приставката RAS Extension Pyro

Важно: Приставката RAS Extension Pyro трябва да се инсталира в **апарати PyroMark Q24** със софтуер **PyroMark Q24 версия 2.0**.

1. Затворете софтуера PyroMark Q24 2.0, ако е отворен.
2. Отворете инсталационния *.zip и извлечете файловете.
3. Щракнете двукратно върху файла setup.exe.
4. Следвайте инструкциите в диалоговите прозорци, които се показват.

5. Стартирайте софтуера PyroMark Q24 2.0. Сера отчетът за приставката RAS Extension Pyro се показва под „AQ Add On Reports/RAS Extension“ (AQ отчети за приставка/RAS Extension) в менюто „Reports“ (Отчети) на режима „AQ“.
6. Проверете функциите на приставката (вижте „Проверка на функциите на приставката RAS Extension Pyro“ по-долу).

Проверка на функциите на приставката RAS Extension Pyro

Важно: Проверката трябва да се извършва при всяко инсталиране или надстройкаване на нов софтуер в компютъра.

Следните стъпки описват как да проверите дали софтуерът работи правилно и не е повлиян от промени в компютъра.

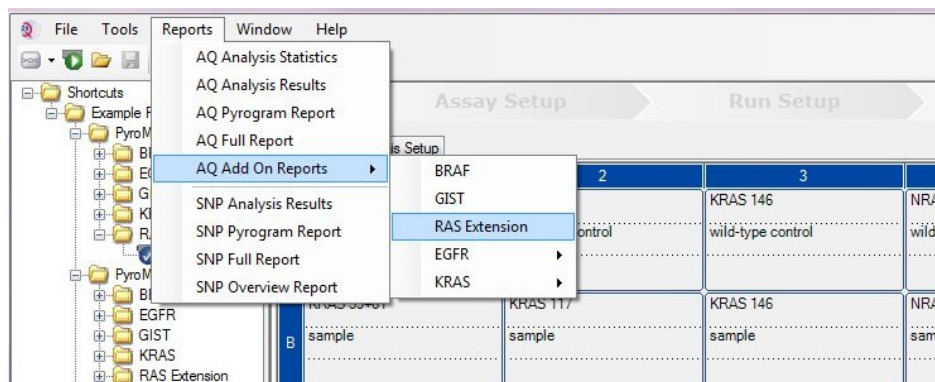
1. Отворете „RAS Extension Example“ цикъл с (Примерен цикъл с RAS Extension) в „Shortcuts/ Example Files/PyroMark Runs/RAS Extension“ (Преки пътища/ Примерни файлове/ Цикли с PyroMark/RAS Extension) в браузъра с преки пътища.
2. Извършете анализ „RAS Extension“ за всички ямки, както е описано в „Анализ на цикъл с PyroMark Q24“ по-долу.
3. Сравнете резултатите с референтния отчет. Ако резултатите са идентични, това означава, че приставката функционира правилно.

Анализ на цикъл с PyroMark Q24

Следните стъпки описват мутационния анализ на завършен цикъл с RAS Extension чрез приставката RAS Extension Pyro.

1. Поставете USB флашката, съдържаща обработения файл от цикъла, в USB порта на компютъра.
2. Преместете файла от цикъла от USB флашката на желаното местоположение в компютъра чрез Windows® Explorer.
3. Отворете файла от цикъла в режима AQ на софтуера PyroMark Q24, като изберете „Open“ (Отваряне) в менюто „File“ (Файл) или като щракнете двукратно върху файла (☑) в брауъра с преки пътища.
4. Изберете „AQ Add On Reports/RAS Extension“ от „Reports“ в менюто (фигура 1).

Забележка: Мутациите в кодон 61 на KRAS трябва да се анализират отделно с помощта на приставката KRAS Pyro, като изберете „AQ Add On Reports/KRAS“ от „Reports“ в менюто (фигура 1).



Фигура 1. Мутационен анализ на завършен цикъл с RAS Extension чрез приставката RAS Extension Pyro.

-
5. Ямките автоматично ще се анализират за всички мутации, изброени в таблица 1 (освен кодон 61 на KRAS). Резултатите от всички тестове на RAS Extension ще се представят в обобщена таблица (фигура 2), следвани от подробни резултати, включващи Pyrograms® (пирограма) и качеството на анализа.

Забележка: Мутациите в кодон 61 на KRAS трябва да се анализират отделно с помощта на приставката KRAS Pyro.

Важно: Приставката RAS Extension Pyro ще отчете мутацията (таблица 1), чийто очакван сигнал най-добре съответства на наблюдаваната Pyrogram.

Таблица 1. Мутации, анализирани от приставката RAS Extension Pyro

Заместване на нуклеинова киселина	Заместване на аминокиселина	LOB (% единици)	LOD (% единици)	COSMIC ID* (V69)
Кодон 59 на KRAS (GCA)				
175G>A	A59T	0,5	3,5	546
176C>G	A59G	0,5	3,5	28518
Кодон 117 на KRAS (AAA)				
351A>C	K117N	1,0	4,0	19940
351A>T	K117N	3,6	7,1	28519
Кодон 146 на KRAS (GCA)				
436G>A	A146T	2,7	6,6	19404
436G>C	A146P	1,8	4,8	19905
437C>T	A146V	2,1	5,1	19900
Кодон 12 на NRAS (GGT)				
34G>A	G12S	1,4	3,4	563
34G>T	G12C	0,6	2,5	562
34G>C	G12R	0,4	2,4	561
35G>A	G12D	1,8	3,8	564
35G>T	G12V	3,8	8,8	566
35G>C	G12A	0,5	2,5	565
Кодон 13 на NRAS (GGT)				
37G>A	G13S	1,2	3,2	571
37G>T	G13C	1,2	3,2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0,3	2,3	569
38G>A	G13D	0,8	2,8	573
38G>T	G13V	0,0	2 (5) [†]	574
38G>C	G13A	0,8	2,8	575
Кодон 59 на NRAS (GCT)				
175G>A	A59T	3,8	6,9	578
176C>G	A59G	0,0	3,0	–
Кодон 61 на NRAS (CAA)				

181C>A	Q61K	4,1	6,7	580
182A>G	Q61R	0,8	2,2	584
182A>T	Q61L	0,7	2,1	583
183A>T	Q61H	0,4	1,8	585
183A>C	Q61H	5,4	8,0	586
183A>G	Q61Q	2,1	5,8	587
Кодон 117 на NRAS (AAG)				
351G>C	K117N	1,4	4,4	–
351G>T	K117N	3,0	6,0	–
Кодон 146 на NRAS (GCC)				
436G>A	A146T	1,4	4,4	27174
436G>C	A146P	3,5	7,2	–
437C>T	A146V	4,8	7,8	–

* От „Каталог на соматичните мутации при рак“ (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), достъпен онлайн в сайта на Института Сангер (Sanger Institute) на адрес www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Най-малкото ниво на мутация в проба, водещо до измерена честота \geq LOD.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	KRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A2	KRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A3	KRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
A4	NRAS Codon 12 and 13	wild-type control	No mutation detected				
A5	NRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A6	NRAS Codon 61	wild-type control	No mutation detected				
A7	NRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A8	NRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
B1	KRAS Codon 59	sample	Mutation	35,0	175G>A	A59T	
B2	KRAS Codon 117	sample	No mutation detected				
B3	KRAS Codon 146	sample	Mutation	29,6	437C>T	A146V	
B4	NRAS Codon 12 and 13	sample	No mutation detected				
B5	NRAS Codon 59	sample	Mutation	20,5	176C>G	A59G	
B6	NRAS Codon 61	sample	No mutation detected				
B7	NRAS Codon 117	sample	Potential low level mutation	5,0	351G>C	K117N	⚠
B8	NRAS Codon 146	sample	No mutation detected				
C1	KRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C2	KRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C3	KRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠

Фигура 2. Резюме на примерните резултати от анализа с приставката RAS Extension Pyro.

Интерпретиране на резултатите и откриване на мутации на ниско ниво

Силно препоръчително е във всеки цикъл да се включва проба от „див тип“ за сравнение и като контрола за фоновите нива.

Важно: Оценката на качеството „Check“ (Успешна) или „Failed“ (Неуспешна) може да се дължи на неочаквана структура на максимумите. Това може да указва неочаквана мутация, която не е анализирана в отчета на приставката. Такива проби трябва да се

анализират ръчно с помощта на софтуера PyroMark Q24, като се има предвид, че те могат да съдържат неочаквани мутации. За подробности вижте съответното ръководство за набора NRAS Pyro или RAS Extension Pyro.

Важно: Пирограмата трябва винаги да се сравнява с хистограмата, която е показана в подробните резултати от отчета на приставката и може да се извежда в софтуера PyroMark Q24 чрез щракване с десния бутон в прозореца на пирограмата. Пирограмата трябва да се изследва за поява на неочаквани максимуми. В случай че измерените максимуми не отговарят на височината на стълбовете в хистограмата и не могат да се обяснят с редки или неочаквани мутации, резултатът не може да се използва за определяне на мутационното състояние. Препоръчително е да тествате пробата повторно.

Важно: Пробите с отчетена потенциална мутация на ниско ниво (честота в диапазона от LOD до LOD + 3 % единици) трябва да се тестват повторно по двойки заедно с проба от неметилирана контролна ДНК. В този случай ще се покаже предупреждение. Пробата трябва да се счита положителна за съответната мутация само ако и двете двойки потвърдят резултата от първоначалния анализ и са видимо различни от нормалната контрола. В противен случай пробата трябва да се приеме за „див тип“.

Важно: За по-задълбочено изследване на пробите с отчетена потенциална мутация на ниско ниво препоръчваме допълнително да анализирате пробата в софтуера PyroMark Q24, напр. за сравнение с мутационната честота в контролната проба (за подробни инструкции вижте „Протокол 6: Анализ на цикъл с PyroMark Q24“ в съответното ръководство за набора RAS Extension Pyro). Измерена честота над LOB в контролната проба указва по-високо от обичайното ниво на фон в съответния цикъл, което може да повлияе върху количественото определяне на алела особено при мутации на ниско ниво. В такъв случай отчетените потенциални мутации на ниско ниво не могат да се използват за определяне на мутационното състояние и е препоръчително повторно да тествате пробите с потенциална мутация на ниско ниво.

За актуална информация относно лицензирането и конкретните за продуктите правни бележки вижте ръководството или наръчника за потребителя на набора QIAGEN®. Ръководствата и наръчниците за потребителя на набора QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за технически услуги на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

Търговски марки: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN Group); Windows® (Microsoft Corporation).
1106191 02/2017 © QIAGEN, всички права запазени. PROM-8093-003

Поръчване www.qiagen.com/contact | Техническа поддръжка support.qiagen.com | Уебсайт www.qiagen.com