

Únor 2017

# Průvodce rychlým spuštěním modulu RAS Extension Pyro<sup>®</sup>

Pro instalaci a používání s přístroji PyroMark<sup>®</sup>  
Q24 a softwarem PyroMark Q24 verze 2.0

# O modulu plug-in RAS Extension Pyro

Balíček modulu plug-in RAS Extension Pyro obsahuje:

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

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

## Instalace modulu plug-in RAS Extension Pyro

**Důležité:** Modul plug-in RAS Extension 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 RAS Extension Pyro se nyní objeví pod položkou „AQ Add On Reports/RAS Extension“ (Přidat AQ zprávu/RAS Extension) v nabídce „Reports“ (Zprávy) v režimu AQ.
6. Ověřte funkčnost modulu plug-in (viz část „Ověření funkčnosti modulu plug-in RAS Extension Pyro“ dále).

---

# Ověření funkčnosti modulu plug-in RAS Extension 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 „RAS Extension Example“ (Příklad rozšíření RAS) ve složce „Shortcuts/ Example Files/PyroMark Runs/RAS Extension“ (Klávesové zkratky/Soubory příkladů/Cykly PyroMark/Rozšíření RAS).
2. Proveďte analýzu „RAS Extension“ 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.

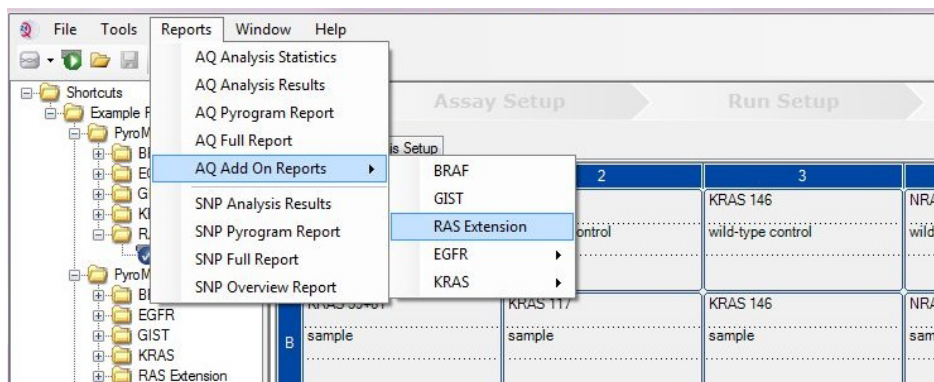
## Analýza cyklu v systému PyroMark Q24

Následující kroky popisují analýzu mutace dokončeného cyklu RAS Extension pomocí modulu plug-in RAS Extension 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.

- 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.
- V nabídce „Reports“ vyberte možnost „AQ Add On Reports/RAS Extension“ (obrázek 1).

**Poznámka:** Mutace v kodonu 61 genu KRAS musí být pomocí modulu plug-in KRAS Pyro analyzovány samostatně výběrem možnosti „AQ Add On Reports/KRAS“ (Přidat AQ zprávu/KRAS) z nabídky „Reports“ (obrázek 1).



**Obrázek 1.** Analýza mutace dokončeného cyklu RAS Extension pomocí modulu plug-in RAS Extension Pyro

- V jamkách automaticky proběhne analýza všech mutací uvedených v tabulce 1 (kromě kodonu 61 genu KRAS). Výsledky všech analýz RAS Extension se zobrazí v přehledné tabulce (obrázek 2) a následují i podrobné výsledky, které zahrnují grafy Pyrograms® (Pyrogramy) a kvalitu analýzy.

**Poznámka:** Mutace v kodonu 61 genu KRAS je nutné pomocí modulu plug-in KRAS Pyro analyzovat samostatně.

---

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

---

**Tabulka 1. Mutace analyzované modulem plug-in RAS Extension Pyro**

Substituce nukleové kyseliny	Substituce aminokyseliny	LOB (% jednotek)	LOD (% jednotek)	COSMIC ID* (V69)
<b>Kodon 59 genu KRAS (GCA)</b>				
175G>A	A59T	0,5	3,5	546
176C>G	A59G	0,5	3,5	28518
<b>Kodon 117 genu KRAS (AAA)</b>				
351A>C	K117N	1,0	4,0	19940
351A>T	K117N	3,6	7,1	28519
<b>Kodon 146 genu KRAS (GCA)</b>				
436G>A	A146T	2,7	6,6	19404
436G>C	A146P	1,8	4,8	19905
437C>T	A146V	2,1	5,1	19900
<b>Kodon 12 genu NRAS (GGT)</b>				
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
<b>Kodon 13 genu NRAS (GGT)</b>				
37G>A	G13S	1,2	3,2	571
37G>T	G13C	1,2	3,2 (4) <sup>†</sup>	570
37G>C	G13R	0,3	2,3	569
38G>A	G13D	0,8	2,8	573
38G>T	G13V	0,0	2 (5) <sup>†</sup>	574
38G>C	G13A	0,8	2,8	575
<b>Kodon 59 genu NRAS (GCT)</b>				
175G>A	A59T	3,8	6,9	578

176C>G	A59G	0,0	3,0	–
<b>Kodon 61 genu NRAS (CAA)</b>				
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
<b>Kodon 117 genu NRAS (AAG)</b>				
351G>C	K117N	1,4	4,4	–
351G>T	K117N	3,0	6,0	–
<b>Kodon 146 genu NRAS (GCC)</b>				
436G>A	A146T	1,4	4,4	27174
436G>C	A146P	3,5	7,2	–
437C>T	A146V	4,8	7,8	–

\* 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/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

† Nejnižší úroveň mutace ve vzorku, která vede k naměření frekvence  $\geq$  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				⚠

**Obrazek 2. Příklad přehledu výsledků analýzy modulu plug-in RAS Extension 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 NRAS 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](http://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).  
1106191 02/2017 © QIAGEN, všechna práva vyhrazena. PROM-8093-003

---

Objednávky [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Technická podpora [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webová stránka [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)