

Fevereiro 2016

Guia de instalação rápida do KRAS Pyro[®] Plug-in

Para instalação e utilização com instrumentos
PyroMark[®] Q24 e o software PyroMark Q24,
versão 2.0

Sobre o KRAS Pyro Plug-in

A embalagem do KRAS Pyro Plug-in contém o seguinte:

- *Guia de instalação rápida do KRAS Pyro Plug-in*
- Dois ficheiros de instalação
- Relatório de referência para verificação da funcionalidade do KRAS Pyro Plug-in

Nota: O KRAS Pyro Plug-in destina-se a ser utilizado apenas em conjunto com os kits KRAS Pyro e RAS Extension Pyro dedicados e indicados para as aplicações descritas nos respetivos manuais dos kits KRAS Pyro e RAS Extension Pyro.

Instalação do KRAS Pyro Plug-in

Importante: O KRAS Pyro Plug-in deve ser instalado em **instrumentos PyroMark Q24 com o software PyroMark Q24, versão 2.0.**

1. Feche o software PyroMark Q24 2.0 se estiver aberto.
2. Abra o ficheiro de instalação *.zip e extraia os ficheiros.
3. Clique duas vezes no ficheiro setup.exe.
4. Siga as instruções nas caixas de diálogo apresentadas.
5. Inicie o software PyroMark Q24 2.0. O KRAS Pyro Plug-in Report é agora apresentado em "AQ Add On Reports/KRAS" (Adição de AQ em relatórios/KRAS) no menu "Reports" (Relatórios) no modo AQ.
6. Verifique a funcionalidade do Plug-in (consulte "Verificação da funcionalidade do KRAS Pyro Plug-in" abaixo).

Verificação da funcionalidade do KRAS Pyro Plug-in

Importante: A verificação deve ser realizada sempre que um novo software é instalado ou atualizado no computador.

As etapas seguintes descrevem como verificar se o software está a funcionar corretamente e não foi afetado por quaisquer alterações ao computador.

1. Abra o ficheiro de execução de "KRAS Example" (KRAS de exemplo) em "Shortcuts/ Example Files/PyroMark Runs/KRAS" (Atalhos/Ficheiros de exemplo/Execuções PyroMark/KRAS) no browser de atalhos.
2. Realize uma análise de "KRAS codon 12 and 13" (Codões 12 e 13 de KRAS) para todos os poços, conforme descrito em "Análise de uma execução PyroMark Q24" abaixo.
3. Compare os resultados com o relatório de referência. Se os resultados forem idênticos, está confirmado que o Plug-in funciona corretamente.

Análise de uma execução PyroMark Q24

As etapas seguintes descrevem a análise de mutação de uma execução de KRAS concluída utilizando o KRAS Pyro Plug-in.

1. Conecte o dispositivo de armazenamento de dados USB, o qual contém o ficheiro da execução processada, na porta USB do computador.
2. Utilizando o Windows® Explorer, copie o ficheiro de execução do dispositivo de armazenamento de dados USB para a localização pretendida no computador.
3. Abra o ficheiro de execução no modo AQ do software PyroMark Q24, selecionando "Open" (Abrir) no menu "File" (Ficheiro) ou fazendo duplo clique no ficheiro (👉) no browser de atalhos.

4. Selecione "AQ Add On Reports/KRAS" e "Codon 12 and 13" (Codões 12 e 13) ou "Codon 61" (Codão 61) a partir de "Reports" no menu (Figura 1).

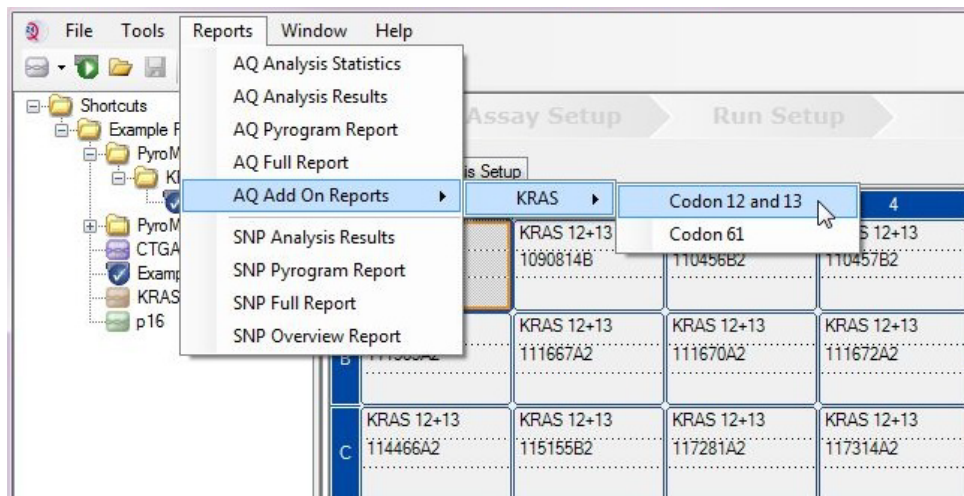


Figura 1. Análise de mutação de uma execução dos codões 12 e 13 de KRAS concluída utilizando o KRAS Pyro Plug-in.

5. Os poços serão analisados automaticamente em relação a todos os tipos de mutações listados na Tabela 1. Os resultados serão apresentados numa tabela de perspectiva geral (Figura 2), seguidos dos resultados detalhados que incluem Pyrograms® e a qualidade de análise.

Importante: O KRAS Pyro Plug-in reportará a mutação (Tabela 1) cujo sinal esperado melhor corresponde ao Pyrogram observado.

Tabela 1. Mutações analisadas pelo KRAS Pyro Plug-in

Substituição de ácido nucleico	Substituição de aminoácido	LOB (unidades de %)	LOD (unidades de %)	ID COSMIC* (V72)
Codão 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
Codão 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Codão 61 (CAA), conforme analisado na orientação inversa (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

* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de Mutações Somáticas no Cancro), disponível online no Instituto Sanger, em 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. Exemplo de resumo de resultados de uma análise utilizando o KRAS Pyro Plug-in.

Interpretação de resultados e detecção de mutações de baixo nível

Recomenda-se vivamente a inclusão de uma amostra de tipo selvagem em todas as execuções, para efeitos de comparação e como controlo dos níveis de fundo.

Importante: Uma avaliação de qualidade "Check" (Verificada) ou "Failed" (Falhada) pode ser causada por um padrão inesperado de picos. Isto pode indicar uma mutação inesperada, a qual não é analisada pelo Plug-in Report. Estas amostras devem ser

analisadas manualmente com o software PyroMark Q24 tendo em conta que podem conter mutações inesperadas. Consulte o manual do kit KRAS Pyro ou RAS Extension Pyro para obter mais detalhes.

Importante: O Pyrogram deve ser sempre comparado com o histograma, o qual é apresentado nos resultados detalhados do Plug-in Report e pode ser apresentado no software PyroMark Q24 clicando com o botão direito na janela do Pyrogram. O Pyrogram deve ser examinado em relação ao aparecimento de picos inesperados. Caso os picos medidos não correspondam às alturas das barras do histograma e não possam ser explicados por mutações raras ou inesperadas, o resultado não serve de base para uma decisão do estado de mutação. Recomenda-se uma nova execução da amostra.

Importante: As amostras com uma indicação de nível de mutação potencialmente baixo (frequência no intervalo de LOD a LOD + unidades de 3%) deverão ser novamente executadas em duplicado, juntamente com uma amostra com ADN de controlo não metilado. Será emitido um aviso neste caso. A mutação da amostra só deve ser considerada positiva se ambos os duplicados confirmarem o resultado da análise original e forem visivelmente diferentes do controlo normal. Caso contrário, a amostra deverá ser considerada de tipo selvagem.

Importante: Para um exame mais minucioso das amostras com um nível de mutação indicado como potencialmente baixo, recomenda-se que a amostra seja também analisada manualmente no software PyroMark Q24, por exemplo, para comparação com a frequência de mutação na amostra de controlo (consulte "Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24" no manual do kit RAS Extension Pyro para obter instruções detalhadas). Uma frequência medida acima do LOB na amostra de controlo indica um nível de fundo maior que o habitual na execução correspondente, o que poderá ter impacto na quantificação dos alelos, especialmente para níveis de mutação baixos. Neste caso, as mutações de nível potencialmente baixo reportadas não servem de base para uma decisão do estado de mutação e recomenda-se que as amostras sejam novamente executadas com uma mutação de nível potencialmente baixo.

Para informações atualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consultar o respetivo manual do kit QIAGEN® ou do utilizador. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos aos Serviços Técnicos ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (Grupo QIAGEN); Windows® (Microsoft Corporation).
1106192 02/2017 © 2017 QIAGEN, todos os direitos reservados. PROM-8151-003

Encomendas www.qiagen.com/contact | Assistência técnica support.qiagen.com | Website www.qiagen.com