
Februar 2017

RAS Extension Pyro[®] Plug-in Kurzanleitung

Zur Installation und Verwendung mit PyroMark[®]
Q24 Geräten und der PyroMark Q24 Software
Version 2.0

Über das RAS Extension Pyro Plug-in

Inhalt des RAS Extension Pyro Plug-in-Pakets:

- *RAS Extension Pyro Plug-in Kurzanleitung*
- Zwei Installationsdateien
- Referenzbericht zur Überprüfung der Funktionalität des RAS Extension Pyro Plug-ins

Hinweis: Das RAS Extension Pyro Plug-in ist nur für die Verwendung in Kombination mit den jeweiligen NRAS Pyro-Kits und den RAS Extension Pyro Kits für die in den Handbüchern des jeweiligen NRAS Pyro-Kits und RAS Extension Pyro Kits beschriebenen Anwendungen bestimmt.

Installation des RAS Extension Pyro Plug-ins

Wichtig: Das RAS Extension Pyro Plug-in muss auf **PyroMark Q24 Geräten** mit **der PyroMark Q24 Software Version 2.0 installiert werden.**

1. Schließen Sie die PyroMark Q24 Software 2.0, falls sie geöffnet ist.
2. Öffnen Sie den *.zip-Installationsordner und entpacken Sie die Dateien.
3. Doppelklicken Sie auf die Datei setup.exe.
4. Folgen Sie den Anweisungen in den angezeigten Dialogfeldern.
5. Starten Sie die PyroMark Q24 Software 2.0. Nun wird im Menü „Reports“ (Berichte) im AQ-Modus unter „AQ Add On Reports/RAS Extension“ (AQ-Zusatzberichte/RAS Extension) der RAS Extension Pyro Plug-in Report geöffnet.
6. Überprüfen Sie die Funktionalität des Plug-ins (siehe „Überprüfung der Funktionalität des RAS Extension Pyro Plug-ins“ unten).

Überprüfung der Funktionalität des RAS Extension Pyro Plug-ins

Wichtig: Die Überprüfung sollte bei jeder Neuinstallation und bei jedem Upgrade der Software auf dem Computer durchgeführt werden.

Die folgenden Schritte beschreiben, wie überprüft werden kann, dass die Software einwandfrei arbeitet und nicht durch Veränderungen auf dem Computer beeinträchtigt ist.

1. Öffnen Sie in der Navigationsansicht unter „Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/RAS Extension“ (Shortcuts/Dateien/PyroMark Läufe/Ras Extension) den „RAS Extension Example“ (RAS Extension-Beispiel)-Lauf.
2. Führen Sie für alle Vertiefungen entsprechend der unten in „Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ angegebenen Beschreibung eine „RAS Extension“-Analyse durch.
3. Vergleichen Sie die Ergebnisse mit dem Referenzbericht. Sind die Ergebnisse identisch, ist die einwandfreie Funktion des Plug-ins bestätigt.

Analyse eines PyroMark Q24 Laufs

Die folgenden Schritte beschreiben die Mutationsanalyse eines abgeschlossenen RAS Extension-Laufs mit dem RAS Extension Pyro Plug-in.

1. Stecken Sie den USB-Stick, auf dem die Laufdatei gespeichert ist, in den USB-Anschluss des Computers.
2. Verschieben Sie die Laufdatei über den Windows® Explorer vom USB-Stick zum gewünschten Speicherort auf dem Computer.

- Öffnen Sie die Laufdatei im AQ-Modus der PyroMark Q24 Software, indem Sie entweder im Menü „File“ (Datei) die Option „Open“ (Öffnen) auswählen oder in der Navigationsansicht auf die Datei doppelklicken (☑).
- Wählen Sie im Menü „Reports“ die Option „AQ Add On Reports/RAS Extension“ aus (Abbildung 1).

Hinweis: Mutationen in KRAS-Codon 61 müssen mit einem separaten KRAS Pyro Plug-in analysiert werden, indem im Menü „Reports“ die Option „AQ Add On Reports/KRAS“ ausgewählt wird (Abbildung 1).

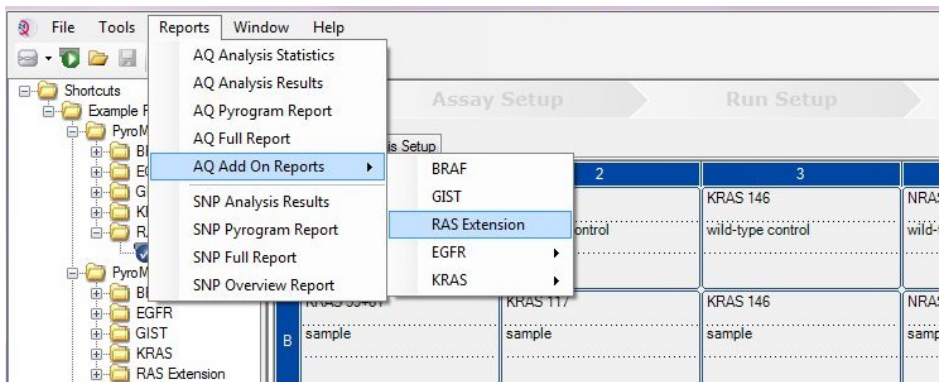


Abbildung 1. Mutationsanalyse eines abgeschlossenen RAS Extension-Laufs mit dem RAS Extension Pyro Plug-in.

- Die Vertiefungen werden automatisch auf alle Mutationen analysiert, die in Tabelle 1 angegeben sind (außer KRAS Codon 61). Die Ergebnisse aller RAS Extension-Assays werden in einer Übersichtstabelle zusammengefasst (Abbildung 2); im Anschluss folgen die detaillierten Ergebnisse, wie z. B. Pyrograms® und Informationen zur Analysequalität.

Hinweis: Mutationen in KRAS Codon 61 müssen separat mit dem KRAS Pyro Plug-in analysiert werden.

Wichtig: Das RAS Extension Pyro Plug-in gibt die Mutation an (Tabelle 1), deren erwartetes Signal mit dem erfassten Pyrogram-Diagramm am besten übereinstimmt.

Tabelle 1. Mit dem RAS Extension Pyro Plug-in analysierte Mutationen

Nukleinsäuresubstitution	Aminosäure-substitution	LOB (Prozenteinheiten)	LOD (Prozenteinheiten)	COSMIC-ID* (V69)
KRAS-Codon 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0,5	3,5	546
176C>G	A59G	0,5	3,5	28518
KRAS-Codon 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1,0	4,0	19940
351A>T	K117N	3,6	7,1	28519
KRAS-Codon 146 (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
NRAS-Codon 12 (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
NRAS-Codon 13 (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
NRAS-Codon 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3,8	6,9	578
176C>G	A59G	0,0	3,0	-

NRAS-Codon 61 (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
NRAS-Codon 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1,4	4,4	–
351G>T	K117N	3,0	6,0	–
NRAS-Codon 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1,4	4,4	27174
436G>C	A146P	3,5	7,2	–
437C>T	A146V	4,8	7,8	–

* Aus dem „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“, der auf der Website des Sanger-Instituts unter www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic verfügbar ist.

† Niedrigster Mutationsgrad in einer Probe, der eine gemessene Häufigkeit \geq LOD ergibt.

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				⚠
C4	NRAS Codon 12 and 13	NTC	Failed Analysis				⚠
C5	NRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C6	NRAS Codon 61	NTC	Failed Analysis				⚠
C7	NRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠

Abbildung 2. Beispielergebnisse aus einer Analyse mit dem RAS Extension Pyro Plug-in.

Interpretation der Ergebnisse und Nachweis schwacher Mutationen

Wir empfehlen dringend, zu Vergleichszwecken und als Hintergrundkontrolle in jedem Lauf eine Wildtypprobe mitzuführen.

Wichtig: Die Qualitätsbewertung „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen) kann durch ein unerwartetes Peakmuster verursacht werden. Dies weist möglicherweise auf eine unerwartete Mutation hin, die bei Verwendung des Plug-in-Reports nicht analysiert wird. Solche Proben sollten unter Berücksichtigung, dass eventuell unerwartete Mutationen vorliegen, mit

der PyroMark Q24 Software manuell analysiert werden. Einzelheiten sind dem Handbuch des jeweiligen NRAS Pyro Kits oder RAS Extension Pyro Kits zu entnehmen.

Wichtig: Das Pyrogram-Diagramm sollte stets mit dem Histogramm verglichen werden. Dieses ist in den ausführlichen Ergebnissen des Plug-in-Reports gezeigt und kann durch Rechtsklick im Pyrogram-Diagramm-Fenster in der PyroMark Q24 Software angezeigt werden. Das Pyrogram-Diagramm sollte auf unerwartete Peaks geprüft werden. Wenn die gemessenen Peaks nicht mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen und nicht auf seltene oder unerwartete Mutationen zurückgeführt werden können, ist das Ergebnis nicht als Grundlage für die Bewertung des Mutationsstatus geeignet. Es wird empfohlen die Probe erneut zu analysieren.

Wichtig: Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wird (Häufigkeit im Bereich von LOD zu LOD + 3 Prozenteinheiten), sollten in Doppelbestimmung zusammen mit einer Probe mit unmethylierter Kontroll-DNA erneut analysiert werden. In diesem Fall wird ein Warnhinweis angezeigt. Die Probe sollte nur dann als positiv für die Mutation eingestuft werden, wenn beide Duplikate dasselbe Ergebnis ergeben wie die erste Analyse und sich von der normalen Kontrolle sichtbar unterscheiden. Anderenfalls ist die Probe als Wildtyp einzustufen.

Wichtig: Für eine Untersuchung von Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wurde, empfehlen wir, die Probe in der PyroMark Q24 Software zusätzlich manuell zu analysieren, z. B. zum Vergleich mit der Mutationshäufigkeit der Kontrollprobe (ausführliche Hinweise sind dem „Protokoll 6: Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ im Handbuch des jeweiligen RAS Extension Pyro Kits zu entnehmen). Eine gemessene Häufigkeit über der Leerwertgrenze (LOB) in der Kontrollprobe zeigt an, dass im entsprechenden Lauf ein ungewöhnlich hoher Hintergrund vorhanden ist, der die Allelquantifizierung insbesondere für schwache Mutationen beeinträchtigen kann. In diesem Fall sind die angegebenen schwachen Mutationen keine Basis zur Beurteilung des Mutationsstatus, und es wird empfohlen, die Proben mit einer potenziellen schwachen Mutation erneut zu analysieren.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch des jeweiligen QIAGEN®-Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN-Kits sind unter www.qiagen.com abrufbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden.

Markennamen: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN-Gruppe); Windows® (Microsoft Corporation).
1106191 02/2017 © QIAGEN, alle Rechte vorbehalten. PROM-8093-003

Bestellungen www.qiagen.com/contact | Technische Beratung support.qiagen.com | Internetseite www.qiagen.com