

Février 2017

Guide de démarrage rapide du plug-in RAS Extension Pyro[®]

Conçu pour être installé et utilisé avec les
instruments PyroMark[®] Q24 et le logiciel
PyroMark Q24 version 2.0

À propos du plug-in RAS Extension Pyro

Le paquet du plug-in RAS Extension Pyro contient les éléments suivants :

- *Guide de démarrage rapide du plug-in RAS Extension Pyro*
- Deux fichiers d'installation
- Rapport de référence pour la vérification de la fonctionnalité du plug-in RAS Extension Pyro

Remarque : le plug-in RAS Extension Pyro est destiné à être utilisé uniquement en combinaison avec les kits dédiés NRAS Pyro et RAS Extension Pyro indiqués pour les applications décrites dans les manuels respectifs du kit NRAS Pyro et du kit RAS Extension Pyro.

Installation du plug-in RAS Extension Pyro

Important : le plug-in RAS Extension Pyro doit être installé sur les **instruments PyroMark Q24** avec **le logiciel PyroMark Q24 version 2.0**.

1. Fermer le logiciel PyroMark Q24 2.0 s'il est en cours d'utilisation.
2. Ouvrir le fichier d'installation *.zip et extraire les fichiers.
3. Double-cliquer sur le fichier setup.exe.
4. Suivre les instructions indiquées dans les boîtes de dialogue qui apparaissent.
5. Démarrer le logiciel PyroMark Q24 2.0. RAS Extension Pyro Plug-in Report apparaît maintenant sous « AQ Add On Reports/RAS Extension » (rapports de l'option quantification des allèles/extension RAS) depuis le menu « Reports » (rapports) en mode AQ.
6. Vérifier la fonctionnalité du plug-in (consulter la section « Vérification de la fonctionnalité du plug-in RAS Extension Pyro » ci-dessous).

Vérification de la fonctionnalité du plug-in RAS

Extension Pyro

Important : cette vérification doit être effectuée chaque fois qu'un nouveau logiciel est installé ou mis à niveau sur l'ordinateur.

Les étapes suivantes décrivent comment vérifier que le logiciel fonctionne correctement et n'a pas été affecté par d'éventuelles modifications de l'ordinateur.

1. Ouvrir le test « RAS Extension Example » (exemple pour l'extension RAS) sous « Shortcuts/ Example Files/PyroMark Runs/RAS Extension » (raccourcis/fichiers d'exemples/tests PyroMark/extension RAS) dans le raccourci du navigateur.
2. Effectuer une analyse « RAS Extension » pour tous les puits comme expliqué dans « Analyse d'un test PyroMark Q24 » ci-dessous.
3. Comparer les résultats avec le rapport de référence. Si les résultats sont identiques, la fonctionnalité correcte du plug-in est confirmée.

Analyse d'un test PyroMark Q24

Les étapes suivantes décrivent l'analyse des mutations d'un test RAS Extension terminé à l'aide du plug-in RAS Extension.

1. Insérer la clé USB contenant le fichier de l'analyse effectuée dans le port USB de l'ordinateur.
2. Déplacer le fichier de l'analyse depuis la clé USB vers l'emplacement désiré de l'ordinateur à l'aide de Windows® Explorer.
3. Ouvrez le fichier d'analyse en mode quantification des allèles sur le logiciel PyroMark Q24 soit en sélectionnant « Open » (ouvrir) dans le menu « File » (fichier), soit en double-cliquant sur le fichier (📁) dans le raccourci du navigateur.

- Sélectionner « AQ Add On Reports/RAS Extension » depuis « Reports » dans le menu (figure 1).

Remarque : les mutations dans le codon 61 du gène KRAS doivent être analysées séparément à l'aide du plug-in KRAS Pyro en sélectionnant « AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61 » (rapports de l'option quantification des allèles/KRAS/codon 61) depuis « Reports » dans le menu (figure 1).

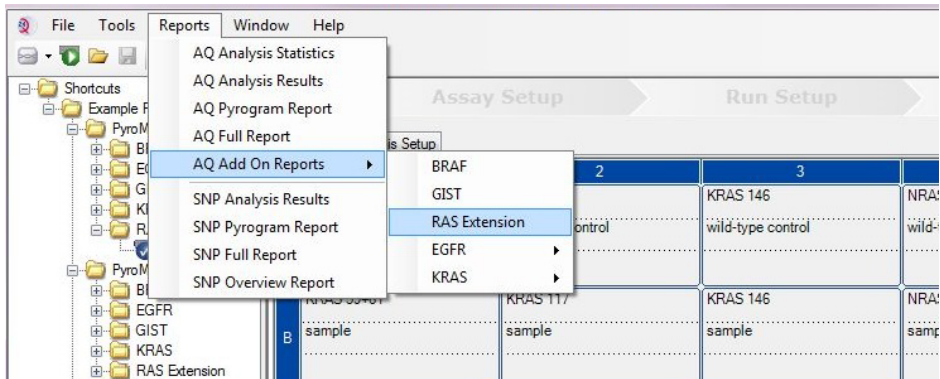


Figure 1. Analyse des mutations d'un test RAS Extension terminé à l'aide du plug-in RAS Extension Pyro.

- Les puits seront automatiquement analysés afin de détecter toutes les mutations indiquées dans le tableau 1 (à l'exception du codon 61 du gène KRAS). Les résultats de tous les tests RAS Extension seront présentés dans un tableau récapitulatif (figure 2), suivi des résultats détaillés, qui incluent les Pyrograms® (pyrogrammes) et la qualité de l'analyse.

Remarque : les mutations dans le codon 61 du gène KRAS doivent être analysées séparément avec le plug-in KRAS Pyro.

Important : le plug-in RAS Extension Pyro rapportera la mutation (tableau 1) dont les signaux attendus correspondent le mieux au pyrogramme observé.

Tableau 1. Mutations analysées par le plug-in RAS Extension Pyro

Substitution d'acide nucléique	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V69)
Codon 59 du KRAS (GCA)				
175G>A	A59T	0,5	3,5	546
176C>G	A59G	0,5	3,5	28518
Codon 117 du KRAS (AAA)				
351A>C	K117N	1,0	4,0	19940
351A>T	K117N	3,6	7,1	28519
Codon 146 du 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
Codon 12 du 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
Codon 13 du 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
Codon 59 du NRAS (GCT)				
175G>A	A59T	3,8	6,9	578
176C>G	A59G	0,0	3,0	-
Codon 61 du 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
Codon 117 du NRAS (AAG)				
351G>C	K117N	1,4	4,4	-
351G>T	K117N	3,0	6,0	-
Codon 146 du NRAS (GCC)				
436G>A	A146T	1,4	4,4	27174
436G>C	A146P	3,5	7,2	-
437C>T	A146V	4,8	7,8	-

* Catalogue des mutations somatiques associées au cancer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), disponible en ligne sur le site du Sanger Institute à l'adresse www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

† Niveau de mutation le plus bas pour un échantillon donnant lieu à une fréquence mesurée \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				⚠

Figure 2. Résumé des résultats de l'exemple d'une analyse du plug-in RAS Extension Pyro.

Interprétation des résultats et détection des mutations de faible niveau

Il est fortement recommandé d'inclure un échantillon de type sauvage dans chaque analyse à des fins de comparaison et en tant que contrôle pour le bruit de fond.

Important : une évaluation de la qualité marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec) peut être provoquée par un modèle de pics inattendu. Cela peut indiquer une mutation inattendue qui n'est pas analysée par le Plug-in Report. Ces échantillons doivent être analysés

manuellement à l'aide du logiciel PyroMark Q24 en prenant en compte le fait qu'ils puissent contenir des mutations inattendues. Consulter le manuel approprié des kits NRAS Pyro ou RAS Extension Pyro pour plus d'informations.

Important : le pyrogramme doit toujours être comparé à l'histogramme, qui figure dans les résultats détaillés du Plug-in Report et peut être affiché dans le logiciel PyroMark Q24 en cliquant avec le bouton droit dans la fenêtre Pyrogram. La présence de pics inattendus dans les pyrogrammes doit être vérifiée. Si les pics mesurés ne concordent pas avec la hauteur des barres d'histogramme et qu'une mutation rare ou inattendue ne permet pas d'expliquer ce phénomène, le résultat ne doit pas être utilisé pour déterminer l'état mutationnel. Il est recommandé de réanalyser l'échantillon.

Important : les échantillons pour lesquels une mutation de faible niveau potentielle a été rapportée (fréquence comprise dans la plage allant de la LoD à la LoD + 3 unités %) doivent être réanalysés en duplicats avec un échantillon contenant de l'ADN de contrôle non méthylé. Un avertissement sera émis dans ce cas. L'échantillon doit uniquement être considéré comme positif pour la mutation si les deux duplicats confirment le résultat de l'analyse originale et sont manifestement différents du contrôle normal. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être considéré comme de type sauvage.

Important : pour un examen plus approfondi des échantillons pour lesquels une mutation de faible niveau potentielle est rapportée, nous recommandons d'analyser également l'échantillon manuellement dans le logiciel PyroMark Q24, par exemple pour comparaison avec la fréquence mutationnelle dans l'échantillon de contrôle (consulter la section « Protocole 6 : analyse d'un test PyroMark Q24 » dans le manuel approprié du kit RAS Extension Pyro pour plus d'informations). Une fréquence mesurée supérieure à la LoB dans l'échantillon de contrôle indique un bruit de fond supérieur à la normale lors de l'analyse concernée, susceptible d'influer sur la quantification des allèles, en particulier pour les faibles niveaux mutationnels. Dans ce cas, les mutations de faible niveau potentielles rapportées ne permettent pas d'évaluer l'état mutationnel et il est recommandé de réanalyser les échantillons avec une mutation de faible niveau potentielle.

Pour obtenir une information actualisée sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques des produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN® approprié. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Marques déposées : QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (groupe QIAGEN) ; Windows® (Microsoft Corporation).
1106191 02/2017 © QIAGEN, tous droits réservés. PROM-8093-003

Pour commander www.qiagen.com/contact | Support technique support.qiagen.com | Site Web www.qiagen.com