
Februari 2017

RAS Extension Pyro[®] Plug-in Snabbstartsguide

För installering och användning med PyroMark[®]
Q24-instrument och Pyromark Q24
programvaruversion 2.0

Om RAS Extension Pyro Plug-in

RAS Extension Pyro Plug-in paketet innehåller följande:

- *RAS Extension Pyro Plug-in Snabbstartsguide*
- Två installationsfiler
- Referensrapport för funktionsverifiering av RAS Extension Pyro Plug-in

Obs: RAS Extension Pyro Plug-in är endast avsett att användas endast i kombination med de NRAS Pyro-kit och RAS Extension Pyro-kit som är indikerade för de applikationer som beskrivs i NRAS Pyro- och RAS Extension Pyro-kittens respektive handböcker.

Installering av RAS Extension Pyro Plug-in

Viktigt: RAS Extension Pyro Plug-in måste installeras på **PyroMark Q24-instrument med PyroMark Q24 programvaruversion 2.0.**

1. Stäng programmet Pyromark Q24 2.0 om det är öppet.
2. Öppna *.zip-installationsfilen och extrahera filerna.
3. Dubbelklicka på filen setup.exe.
4. Följ instruktionerna i de dialogrutor som visas.
5. Starta programmet Pyromark Q24 2.0. RAS Extension Pyro Plug-in-rapporten syns nu under "AQ Add On Reports/RAS Extension" (AQ-tilläggsrapporter/RAS Extension) i menyn "Reports" (rapporter) i AQ-läge.
6. Verifiera Plug-in-funktion (se "Verifiera RAS Extension Pyro Plug-in-funktion" nedan").

Verifiera RAS Extension Pyro Plug-in-funktion

Viktigt: Verifieringen bör utföras varje gång ny programvara installeras eller uppgraderas på datorn.

Följande steg beskriver hur man verifierar att programvaran fungerar korrekt och inte har påverkats av några förändringar på datorn.

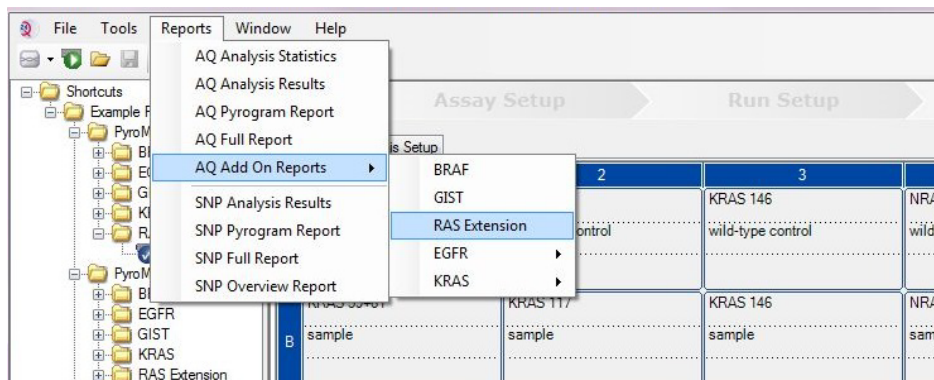
1. Öppna RAS Extension Example run (RAS Extension exempelkörning) under "Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/RAS Extension" (genvägar/exempelfiler/PyroMark-körningar/RAS Extension) i snabbmenyn.
2. Gör en "RAS Extension"-analys för alla brunnar såsom beskrivs i "Analysera en PyroMark Q24-körning" nedan.
3. Jämför resultaten med referensrapporten. Om resultaten är identiska är korrekt funktion av Plug-in-programmet bekräftad.

Analysera en PyroMark Q24-körning

Följande steg beskriver mutationsanalysen av en avslutad RAS Extension-körning med RAS Extension Pyro Plug-in.

1. Sätt i USB-minnet (med den behandlade körfilen) i datorns USB-port.
2. Flytta körfilen från USB-minnet till önskad plats på datorn med hjälp av Windows® Explorer (utforskaren).
3. Öppna körfilen i AQ-läget i programmet PyroMark Q24 genom att antingen välja "Open" (öppna) i menyn "File" (arkiv) eller genom att dubbelklicka på filen (📁) i snabbmenyn.
4. Välj "AQ Add On Reports/RAS Extension" i menyn "Reports" (figur 1).

Obs: Mutationer i KRAS-kodon 61 måste analyseras separata med KRAS Pyro Plug-in genom att välja "AQ Add On Reports/KRAS" (AQ-tilläggsrapporter/KRAS) i meny "Reports" (figur 1).



Figur 1. Mutationsanalys av en avslutad RAS Extension-körning med RAS Extension Pyro Plug-in.

5. Brunnarna analyseras automatiskt vad gäller alla mutationer som anges i tabell 1 (förutom KRAS kodon 61). Resultaten för alla RAS Extension-analyser visas i en översiktstabell (figur 2), följt av detaljerade resultat som innefattar Pyrogram® och analyskvalitet.

Obs: Mutationer i KRAS kodon 61 måste analyseras separat med KRAS Pyro Plug-in.

Viktigt: RAS Extension Plug-in kommer att rapportera den mutation (tabell 1) vars förväntade signal stämmer bäst överens med det observerade pyrogrammet.

Tabell 1. Mutationer som analyserats av RAS Extension Pyro Plug-in

| Nukleinsyra-substitution | Aminosyra-substitution | LOB (%-enheter) | LOD (%-enheter) | COSMIC ID* (V69) |
|-----------------------------|------------------------|-----------------|----------------------|------------------|
| KRAS kodon 59 (GCA) | | | | |
| 175G>A | A59T | 0,5 | 3,5 | 546 |
| 176C>G | A59G | 0,5 | 3,5 | 28518 |
| KRAS kodon 117 (AAA) | | | | |
| 351A>C | K117N | 1,0 | 4,0 | 19940 |
| 351A>T | K117N | 3,6 | 7,1 | 28519 |
| KRAS kodon 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 kodon 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 kodon 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 kodon 59 (GCT) | | | | |
| 175G>A | A59T | 3,8 | 6,9 | 578 |
| 176C>G | A59G | 0,0 | 3,0 | - |

| Nukleinsyra-substitution | Aminosyra-substitution | LOB (%-enheter) | LOD (%-enheter) | COSMIC ID* (V69) |
|-----------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| NRAS kodon 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 kodon 117 (AAG) | | | | |
| 351G>C | K117N | 1,4 | 4,4 | - |
| 351G>T | K117N | 3,0 | 6,0 | - |
| NRAS kodon 146 (GCC) | | | | |
| 436G>A | A146T | 1,4 | 4,4 | 27174 |
| 436G>C | A146P | 3,5 | 7,2 | - |
| 437C>T | A146V | 4,8 | 7,8 | - |

* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (katalog över somatiska mutationer i cancer) som finns tillgänglig online på Sanger Institutes hemsida på adressen www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

† Lägsta mutationsfrekvens i ett prov som resulterade i en uppmätt frekvens \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 | | | | ⚠ |

Figur 2. Exempel på en resultatsammanfattning från en RAS Extension Pyro Plug-in-analys.

Tolkning av resultat och detektion av lågfrekventa mutationer

Vi rekommenderar att ett vildtyprov inkluderas i varje körning, för jämförelse och som kontroll för bakgrunds nivåer.

Viktigt: En kvalitetsbedömning med resultatet "Check" (kontrollera) eller "Failed" (misslyckad) kan orsakas av ett oväntat mönster av toppar. Detta kan indikera en oväntad mutation som inte analyseras av Plug-in-rapporten. Dessa prover bör analyseras manuellt med

programvaran PyroMark Q24 där hänsyn ska tas till att de kan innehålla oväntade mutationer. För mer information, se lämplig handbok för NRAS Pyro Kit eller RAS Extension Pyro Kit.

Viktigt: Pyrogrammet bör alltid jämföras med histogrammet, vilket visas i de detaljerade resultaten från Plug-in-rapporten och som även kan ses i programmet Pyromark Q24 genom att högerklicka i pyrogramfönstret. Pyrogrammet bör undersökas för att se om det innehåller oväntade toppar. Om de uppmätta topparna inte stämmer överens med höjden på histogramstaplarna och inte kan förklaras av sällsynta eller oväntade mutationer är resultatet inte en grund för bedömning av mutationsstatus. Vi rekommenderar att provet körs om.

Viktigt: Prover med en rapporterad potentiell lågfrekvent mutation (frekvensintervall från LOD till LOD 3 %-enheter) bör köras om i duplikat tillsammans med ett prov med ometylerat kontroll-DNA. En varning kommer att utfärdas i sådant fall. Provet bör endast anses vara positivt för mutationen om båda duplikaten bekräftar resultatet av den ursprungliga analysen och märkbart skiljer sig från normalkontrollen. Annars ska provet bedömas som vildtyp.

Viktigt: För närmre undersökning av prover med en rapporterad potentiell lågfrekvent mutation rekommenderar vi att provet även analysera manuellt i programmet PyroMark Q24, t.ex. för att jämföra med mutationsfrekvensen i kontrollprovet (för detaljerade instruktioner, se "Protokoll 6: Analysera en PyroMark Q24-körning" i lämplig handbok för RAS Extension Pyro Kit). En uppmätt frekvens som ligger över LOB i kontrollprovet indikerar en ovanligt hög bakgrunds nivå i motsvarande körning, vilket kan påverka allelkvantifiering, särskilt för lågfrekventa mutationer. I detta fall är rapporterade potentiella lågfrekventa mutationer inte en bedömningsgrund för mutationsstatus och det rekommenderas att man kör om prover med en potentiell lågfrekvent mutation.

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i handboken eller bruksanvisningen för respektive QIAGEN®-kit. Handböcker och bruksanvisningar för QIAGEN-kit finns tillgängliga på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN:s tekniska support eller från din lokala återförsäljare.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN-gruppen); Windows® (Microsoft Corporation).
1106191 02/2017 © QIAGEN, med ensamrätt. PROM-8093-003

Beställning www.qiagen.com/contact | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com