

февруари 2016

Ръководство за бърз старт на приставката KRAS Pyro[®]

За инсталиране и употреба с апарати
PyroMark[®] Q24 и софтуер PyroMark Q24
версия 2.0

Информация за приставката KRAS Pyro

Опаковката на приставката KRAS Pyro съдържа следното:

- *Ръководство за бърз старт на приставката KRAS Pyro*
- Два инсталационни файла
- Референтен отчет за проверка на функциите на приставката KRAS Pyro

Забележка: Приставката KRAS Pyro е предназначена за употреба само в комбинация със специализираните набори KRAS Pyro и RAS Extension Pyro, предназначени за приложенията, описани в съответните ръководства за набора KRAS Pyro и RAS Extension Pyro.

Инсталиране на приставката KRAS Pyro

Важно: Приставката KRAS Pyro трябва да се инсталира в **апарати PyroMark Q24** със софтуер **PyroMark Q24 версия 2.0**.

1. Затворете софтуера PyroMark Q24 2.0, ако е отворен.
2. Отворете инсталационния *.zip и извлекете файловете.
3. Щракнете двукратно върху файла setup.exe.
4. Следвайте инструкциите в диалоговите прозорци, които се показват.
5. Стартирайте софтуера PyroMark Q24 2.0. Сега отчетът за приставката KRAS Pyro се показва под „AQ Add On Reports/KRAS“ (AQ отчети за приставка/KRAS) в менюто „Reports“ (Отчети) на режима „AQ“.
6. Проверете функциите на приставката (вижте „Проверка на функциите на приставката KRAS Pyro“ по-долу).

Проверка на функциите на приставката KRAS Pyro

Важно: Проверката трябва да се извършва при всяко инсталиране или надстройкаване на нов софтуер в компютъра.

Следните стъпки описват как да проверите дали софтуерът работи правилно и не е повлиян от промени в компютъра.

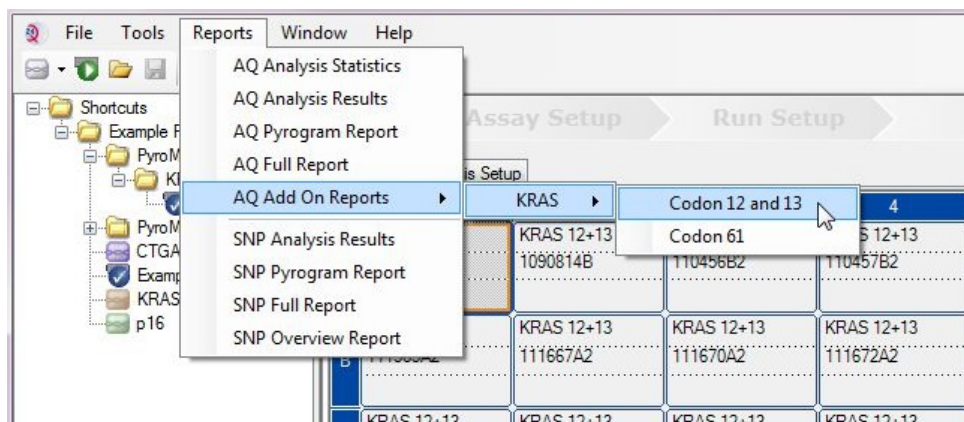
1. Отворете „KRAS Example“ цикъл с (Примерен цикъл с KRAS) в „Shortcuts/ Example Files/PyroMark Runs/KRAS“ (Преки пътища/ Примерни файлове/ Цикли с PyroMark/KRAS) в браузъра с преки пътища.
2. Извършете анализ „KRAS codon 12 and 13“ (Кодон 12 и 13 на KRAS) за всички ямки, както е описано в „Анализ на цикъл с PyroMark Q24“ по-долу.
3. Сравнете резултатите с референтния отчет. Ако резултатите са идентични, това означава, че приставката функционира правилно.

Анализ на цикъл с PyroMark Q24

Следните стъпки описват мутационния анализ на завършен цикъл с KRAS чрез приставката KRAS Pyro.

1. Поставете USB флашката, съдържаща обработения файл от цикъла, в USB порта на компютъра.
2. Преместете файла от цикъла от USB флашката на желаното местоположение в компютъра чрез Windows® Explorer.

- Отворете файла от цикъла в режима AQ на софтуера PyroMark Q24, като изберете „Open“ (Отваряне) в менюто „File“ (Файл) или като щракнете двукратно върху файла (🖱️) в брауъра с преки пътища.
- Изберете „AQ Add On Reports/KRAS“ и „Codon 12 and 13“ (Кодон 12 и 13) или „Codon 61“ (Кодон 61) от „Reports“ в менюто (фигура 1).



Фигура 1. Мутационен анализ на завършен цикъл с кодон 12 и 13 на KRAS чрез приставката KRAS Pyro.

- Ямките автоматично ще се анализират за всички мутации, изброени в таблица 1. Резултатите ще се представят в обобщена таблица (фигура 2), следвани от подробни резултати, включващи Pyrograms® (пирограма) и качеството на анализа.

Важно: Приставката KRAS Pyro ще отчете мутацията (таблица 1), чийто очакван сигнал най-добре съответства на наблюдаваната Pyrogram.


Таблица 1. Мутации, анализирани от приставката KRAS Руго

Заместване на нуклеинова киселина	Заместване на аминокиселина	LOB (% единици)	LOD (% единици)	COSMIC ID* (V72)
Codon 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
Codon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Codon 61 (CAA), тестван в обратна ориентация (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

* От „Каталог на соматичните мутации при рак“ (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), достъпен онлайн в сайта на Института Сангер (Sanger Institute) на адрес 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				

Фигура 2. Резюме на примерните резултати от анализа с приставката KRAS Pyro.

Интерпретиране на резултатите и откриване на мутации на ниско ниво

Силно препоръчително е във всеки цикъл да се включва проба от „див тип“ за сравнение и като контрола за фоновите нива.

Важно: Оценката на качеството „Check“ (Успешна) или „Failed“ (Неуспешна) може да се дължи на неочаквана структура на максимумите. Това може да указва неочаквана мутация, която не е анализирана в отчета на приставката. Такива проби трябва да се анализират ръчно с помощта на софтуера PyroMark Q24, като се има предвид, че те могат да съдържат неочаквани мутации. За подробности вижте съответното ръководство за набора KRAS Pyro или RAS Extension Pyro.

Важно: Пирограмата трябва винаги да се сравнява с хистограмата, която е показана в подробните резултати от отчета на приставката и може да се извежда в софтуера PyroMark Q24 чрез щракване с десния бутон в прозореца на пирограмата. Пирограмата трябва да се изследва за поява на неочаквани максимуми. В случай че измерените максимуми не отговарят на височината на стълбовете в хистограмата и не могат да се обяснят с редки или неочаквани мутации, резултатът не може да се използва за определяне на мутационното състояние. Препоръчително е да тествате пробата повторно.

Важно: Пробите с отчетена потенциална мутация на ниско ниво (честота в диапазона от LOD до LOD + 3% единици) трябва да се тестват повторно по двойки заедно с проба от неметилирана контролна ДНК. В този случай ще се покаже предупреждение. Пробата трябва да се счита положителна за съответната мутация само ако и двете двойки потвърдят резултата от първоначалния анализ и са видимо различни от нормалната контрола. В противен случай пробата трябва да се приеме за „див тип“.

Важно: За по-задълбочено изследване на пробите с отчетена потенциална мутация на ниско ниво препоръчваме допълнително да анализирате пробата в софтуера PyroMark Q24, напр. за сравнение с мутационната честота в контролната проба (за подробни инструкции вижте „Протокол 6: Анализ на цикъл с PyroMark Q24“ в съответното ръководство за набора RAS Extension Pyro). Измерена честота над LOB в контролната проба указва по-високо от обичайното ниво на фон в съответния цикъл, което може да повлияе върху количественото определяне на алела особено при мутации на ниско ниво. В такъв случай отчетените потенциални мутации на ниско ниво не могат да се

използват за определяне на мутационното състояние и е препоръчително повторно да тестват пробите с потенциална мутация на ниско ниво.

За актуална информация относно лицензирането и конкретните за продуктите правни бележки вижте ръководството или наръчника за потребителя на набора QIAGEN®. Ръководствата и наръчниците за потребителя на набора QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за технически услуги на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

Търговски марки: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN Group); Windows® (Microsoft Corporation).
1106192 02/2017 © 2017 QIAGEN, всички права запазени. PROM-8151-003

Поръчване www.qiagen.com/contact | Техническа поддръжка support.qiagen.com | Уебсайт www.qiagen.com