

Februari 2017

Snelstartgids RAS Extension Pyro[®]- invoegtoepassing

Voor installatie en gebruik met PyroMark[®] Q24-
instrumenten en PyroMark Q24-software
versie 2.0

Over de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing

Het pakket van de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing bevat het volgende:

- *Snelstartgids RAS Extension Pyro-invoegtoepassing*
- Twee installatiebestanden
- Referentierapport voor functiecontrole van de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing

Opmerking: De RAS Extension Pyro-invoegtoepassing is uitsluitend bestemd voor gebruik in combinatie met de speciale NRAS Pyro-kits en RAS Extension Pyro-kits die worden aangeduid voor toepassingen beschreven in de desbetreffende handleidingen van de NRAS Pyro-kit en RAS Extension Pyro-kit.

Installatie van de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing

Belangrijk: De RAS Extension Pyro-invoegtoepassing moet worden geïnstalleerd op **PyroMark Q24-instrumenten** met **PyroMark Q24-software versie 2.0**.

1. Sluit de PyroMark Q24-software 2.0 af als deze geopend is.
2. Open het *.zip-installatiebestand en pak de bestanden uit.
3. Dubbelklik op het bestand setup.exe.
4. Volg de instructies in de dialoogvensters die worden weergegeven.
5. Start de PyroMark Q24-software 2.0. Het rapport van de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing wordt nu weergegeven onder "AQ Add On Reports/RAS Extension" (AQ aanvullende rapporten/RAS Extension) in het menu "Reports" (Rapporten) in de AQ-modus.
6. Controleer de werking van de invoegtoepassing (zie "Controle van de werking van de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing" hieronder).

Controle van de werking van de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing

Belangrijk: De controle moet elke keer plaatsvinden als er nieuwe software op de computer wordt geïnstalleerd of bijgewerkt.

In de volgende stappen wordt beschreven hoe moet worden gecontroleerd of de software correct werkt en deze niet is beïnvloed door eventuele wijzigingen van de computer.

1. Open de "RAS Extension Example"-run (RAS Extension-voorbeeldrun) onder "Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/RAS Extension" (Snelkoppelingen/Voorbeeldbestanden/PyroMark-runs/RAS Extension) in de snelkoppelingsbrowser.
2. Voer een "RAS Extension"-analyse uit voor alle wells, zoals beschreven in "Analyse van een PyroMark Q24-run" hieronder.
3. Vergelijk de resultaten met het referentierapport. Als de resultaten overeenkomen, is de juiste werking van de toepassing bevestigd.

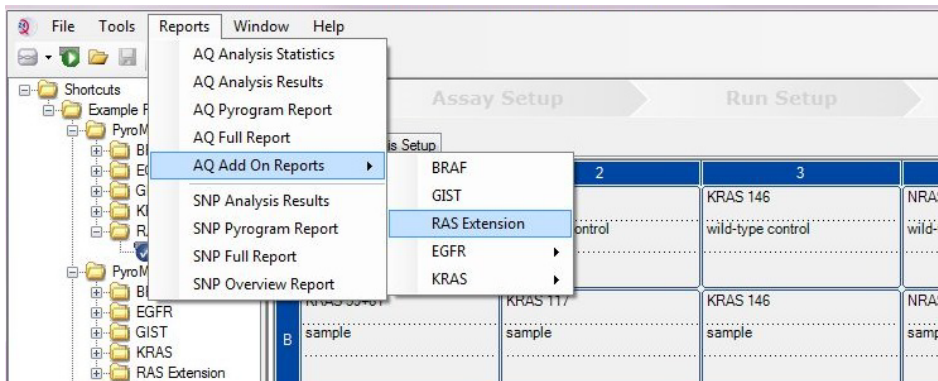
Analyse van een PyroMark Q24-run

In de volgende stappen wordt de mutatie-analyse van een voltooide RAS Extension-run met de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing beschreven.

1. Plaats de USB-stick met het verwerkte runbestand in de USB-poort van de computer.
2. Verplaats het runbestand met behulp van Windows® Verkenner van de USB-stick naar de gewenste locatie op de computer.

- Open het runbestand in de AQ-modus van de PyroMark Q24-software door "Open" (Openen) te selecteren in het menu "File" (Bestand) of door te dubbelklikken op het bestand (📁) in de snelkoppelingsbrowser.
- Selecteer "AQ Add On Reports/RAS Extension" onder "Reports" in het menu (afbeelding 1).

Opmerking: Mutaties in KRAS-codon 61 moeten afzonderlijk worden geanalyseerd met de KRAS Pyro-invoegtoepassing door "AQ Add On Reports/KRAS" (AQ aanvullende rapporten/KRAS) onder "Reports" in het menu te selecteren (afbeelding 1).



Afbeelding 1. Mutatie-analyse van een voltooide RAS Extension-run met de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing.

- De wells worden automatisch geanalyseerd voor alle mutaties die staan vermeld in tabel 1 (met uitzondering van KRAS-codon 61). De resultaten voor alle RAS Extension-assays worden weergegeven in een overzichtstabel (afbeelding 2), gevolgd door gedetailleerde resultaten voor Pyrograms® en analysekwaliteit.

Opmerking: Mutaties in KRAS-codon 61 moeten afzonderlijk worden geanalyseerd met de KRAS Pyro-invoegtoepassing.

Belangrijk: De RAS Extension Pyro-invoegtoepassing vermeldt de mutatie (tabel 1) waarvan het verwachte signaal het beste overeenkomt met het waargenomen Pyrogram.

Tabel 1. Mutaties die worden geanalyseerd door de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing





| Substitutie nucleïnezuur | Substitutie aminozuur | LOB (% eenheden) | LOD (% eenheden) | 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 | – |

| Substitutie nucleïnezuur | Substitutie aminozuur | LOB (% eenheden) | LOD (% eenheden) | COSMIC ID* (V69) |
|-----------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 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 | – |

* Uit de Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, online beschikbaar bij het Sanger Institute op www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Laagste mutatie-niveau in een monster dat leidt tot een gemeten frequentie \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 | | | |  |

Afbeelding 2. Overzicht van voorbeeldresultaten van een analyse door de RAS Extension Pyro-invoegtoepassing.

Interpretatie van resultaten en detectie van low-level-mutaties

We raden sterk aan om ter vergelijking en ter controle van achtergrondkleuringsniveaus in elke run een wildtype monster op te nemen.

Belangrijk: Een kwaliteitsbeoordeling "Check" (Controle) of "Failed" (Mislukt) kan worden veroorzaakt door een onverwacht patroon van pieken. Dit kan duiden op een onverwachte mutatie die niet wordt geanalyseerd door het rapport van de invoegtoepassing. Deze

monsters moeten handmatig worden geanalyseerd met de PyroMark Q24-software, omdat ze onverwachte mutaties kunnen bevatten. Raadpleeg de desbetreffende handleiding van de NRAS Pyro-kit of RAS Extension Pyro-kit voor meer informatie.

Belangrijk: Het Pyrogram moet altijd worden vergeleken met het histogram, dat wordt getoond in de gedetailleerde resultaten van het rapport van de invoegtoepassing en kan worden weergegeven in de PyroMark Q24-software door rechts te klikken in het venster Pyrogram. Het Pyrogram moet worden onderzocht op de verschijning van onverwachte pieken. Als de gemeten pieken niet overeenkomen met de hoogte van de balken in het histogram en niet kunnen worden verklaard door zeldzame of onverwachte mutaties, is het resultaat geen basis voor een oordeel over de mutatiestatus. Het wordt aanbevolen om de run voor het monster opnieuw uit te voeren.

Belangrijk: Voor monsters met een gerapporteerde potentiële low-level mutatie (frequentie in het bereik van LOD tot LOD + 3% eenheden) moet de run opnieuw worden uitgevoerd samen met een monster met ongemethyleerde controle-DNA. In dit geval wordt een waarschuwing gegeven. Dit monster moet alleen positief worden geacht als beide dubbel uitgevoerde runs het resultaat van de oorspronkelijke analyse bevestigen en zichtbaar afwijken van de normale controle. Anders moet het monster worden beoordeeld als wildtype.

Belangrijk: Voor nader onderzoek van monsters met een gerapporteerde potentiële low-level mutatie, raden we aan om het monster aanvullend handmatig te analyseren in de PyroMark Q24-software, bijvoorbeeld voor een vergelijking met de mutatiefrequentie van het controlemonster (zie "Protocol 6: Analyse van een PyroMark Q24-run" in de desbetreffende handleiding van de RAS Extension Pyro-kit voor gedetailleerde instructies). Een gemeten frequentie boven LOB in het controlemonster duidt op een hoger niveau van de achtergrondkleuring dan gebruikelijk is in de desbetreffende run, wat van invloed kan zijn op allelkwantificering, vooral voor lage mutatieniveaus. In dit geval vormen gerapporteerde low-level mutaties geen basis voor een beoordeling van de mutatiestatus en raden we aan om de run te herhalen voor monsters met een potentiële low-level mutatie.

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de desbetreffende QIAGEN®-kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke leverancier.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN Group); Windows® (Microsoft Corporation).
1106191 02/2017 © QIAGEN, alle rechten voorbehouden. PROM-8093-003

Bestellen www.qiagen.com/contact | Technische ondersteuning support.qiagen.com | Website www.qiagen.com