

---

Februari 2017

# BRAF Pyro<sup>®</sup> Plug-in Snabbstartsguide

För installering och användning med PyroMark<sup>®</sup>  
Q24-instrument och Pyromark Q24  
programvaruversion 2.0

# Om BRAF Pyro Plug-in

BRAF Pyro Plug-in paketet innehåller följande:

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

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

## Installering av BRAF Pyro Plug-in

**Viktigt:** BRAF 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. BRAF Pyro Plug-in-rapporten syns nu under "AQ Add On Reports/BRAF" (AQ-tilläggsrapporter/BRAF) i menyn "Reports" (rapporter) i AQ-läge.
6. Verifiera Plug-in-funktion (se "Verifiera Plug-in-funktion" nedan").

# Verifiera BRAF 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 BRAF Example run (BRAF exempelkörning) under "Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/BRAF" (genvägar/exempelfiler/PyroMark-körningar/BRAF) i snabbmenyn.
2. Gör en "BRAF"-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 BRAF Plug-in bekräftad.

## Analysera en PyroMark Q24-körning

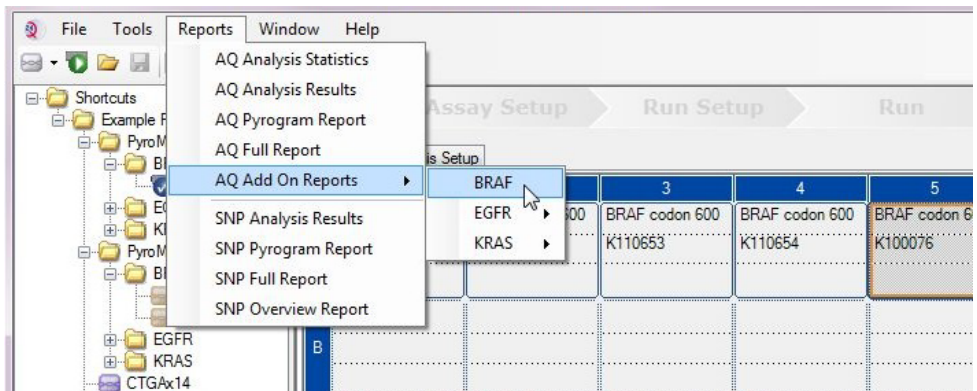
**Viktigt:** Plug-in-programmet kommer att rapportera den mutation (tabell 1) som stämmer bäst överens med det observerade pyrogrammet.

**Viktigt:** Vissa mutationer i kodon 600 samt kodon 469-469 kommer eventuellt inte särskiljas exakt vid mutationsnivåer under 10 %.

Följande steg beskriver mutationsanalysen av en avslutad BRAF-körning med BRAF 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/BRAF" i menyn "Reports" (figur 1).



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

5. Brunnarna analyseras automatiskt vad gäller alla mutationer som anges i tabell 1. Resultaten av analysen för både BRAF-kodon 600 och BRAF-kodon 464–469 visas i en översiktstabell (figur 2), följt av detaljerade resultat som innefattar Pyrogram® och analyskvalitet.

Tabell 1. Mutationer som analyserats av BRAF Pyro Plug-in

Nukleinsyra-substitution	Aminosyra-substitution	LOB (%-enheter)	LOD (%-enheter)	COSMIC ID* (V70)
<b>BRAF kodon 600</b>				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) <sup>†</sup>	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) <sup>†</sup>	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
<b>BRAF kodon 464–469</b>				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

\* Från Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (katalog över somatiska mutationer i cancer) som finns tillgänglig på Sanger Institutes hemsida på adressen [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://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	Codon 600	WT control	No mutation detected				
A2	Codon 600	K110652	Potential low level mutation	4.8	1799T>A	V600E	⚠
A3	Codon 600	K110653	No mutation detected				
A4	Codon 600	K110654	Mutation	34.6	1798_1799GT>AG	V600R	
A5	Codon 600	K100076	Mutation	26.4	1798_1799GT>AA	V600K	
A6	Codon 600	K110282	No mutation detected				
A8	Codon 600	NTC	Failed Analysis				⚠
C1	Codons 464 to 469	WT control	No mutation detected				
C2	Codons 464 to 469	K110652	No mutation detected				
C3	Codons 464 to 469	K110653	Mutation	29.0	1406G>T	G469V	
C4	Codons 464 to 469	K110654	No mutation detected				
C5	Codons 464 to 469	K100076	No mutation detected				
C6	Codons 464 to 469	K110282	Mutation	27.8	1391G>A	G464E	
C8	Codons 464 to 469	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

Figur 2. Exempel på en resultatsammanfattning från en BRAF 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 BRAF Pyro Kit-handbok.

**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 jämföras med mutationsfrekvensen i kontrollprovet (se motsvarande protokoll för mer information). 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](http://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).  
1106188 02/2017 © 2017 QIAGEN, med ensamrätt. PROM-8090-003.

Beställning [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Teknisk support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webbplats [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)