

Φεβρουάριος 2017

Οδηγός γρήγορης έναρξης BRAF Pyro[®] Plug-in

Για εγκατάσταση και χρήση με όργανα
PyroMark[®] Q24 και λογισμικό PyroMark Q24,
έκδοση 2.0

Σχετικά με το BRAF Pyro Plug-in

Το πακέτο BRAF Pyro Plug-in περιέχει τα εξής:

- *Οδηγός γρήγορης έναρξης BRAF Pyro Plug-In*
- Δύο αρχεία εγκατάστασης
- Αναφορά συσχέτισης για την επαλήθευση της λειτουργικότητας του BRAF Pyro Plug-in

Σημείωση: Το BRAF Pyro Plug-in προορίζεται για χρήση μόνο σε συνδυασμό με τα ειδικά kit BRAF Pyro, τα οποία ενδείκνυνται για τις εφαρμογές που περιγράφονται στα αντίστοιχα εγχειρίδια kit BRAF Pyro.

Εγκατάσταση του BRAF Pyro Plug-in

Σημαντικό: Το BRAF Pyro Plug-in πρέπει να εγκαθίσταται σε όργανα **PyroMark Q24** με λογισμικό **PyroMark Q24, έκδοση 2.0**.

1. Κλείστε το λογισμικό PyroMark Q24 2.0, εάν είναι ανοιχτό.
2. Ανοίξτε το αρχείο εγκατάστασης με την επέκταση *.zip και εξαγάγετε τα αρχεία.
3. Κάντε διπλό κλικ στο αρχείο setup.exe.
4. Ακολουθήστε τις οδηγίες στα παράθυρα διαλόγου που εμφανίζονται.
5. Εκκινήστε το λογισμικό PyroMark Q24 2.0. Η αναφορά BRAF Pyro Plug-in Report εμφανίζεται τώρα κάτω από το «AQ Add On Reports/BRAF» (Αναφορές προσθέτου AQ/BRAF) στο μενού «Reports» (Αναφορές) στον τρόπο λειτουργίας AQ.
6. Επαληθεύστε τη λειτουργικότητα του Plug-in (βλ. «Επαλήθευση της λειτουργικότητας του Plug-in» παρακάτω).

Επαλήθευση της λειτουργικότητας του BRAF Pyro Plug-in

Σημαντικό: Η επαλήθευση θα πρέπει να πραγματοποιείται κάθε φορά που εγκαθίσταται ή αναβαθμίζεται νέο λογισμικό στον υπολογιστή.

Τα ακόλουθα βήματα περιγράφουν τον τρόπο με τον οποίο μπορείτε να επαληθεύσετε ότι το λογισμικό λειτουργεί σωστά και ότι δεν έχει επηρεαστεί από τυχόν αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν στον υπολογιστή.

1. Ανοίξετε την εκτέλεση «BRAF Example» (Παράδειγμα BRAF) ακολουθώντας τη διαδρομή «Shortcuts/ Example Files/PyroMark Runs/BRAF» (Συντομεύσεις/Αρχεία παραδείγματος/Εκτελέσεις PyroMark/BRAF) στον φυλλομετρητή συντομεύσεων.
2. Διενεργήστε την ανάλυση «BRAF» για όλα τα βοθρία όπως περιγράφεται στην «Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24» παρακάτω.
3. Συγκρίνετε τα αποτελέσματα με την αναφορά συσχέτισης. Εάν τα αποτελέσματα είναι πανομοιότυπα, επιβεβαιώνεται η σωστή λειτουργία του BRAF Plug-in.

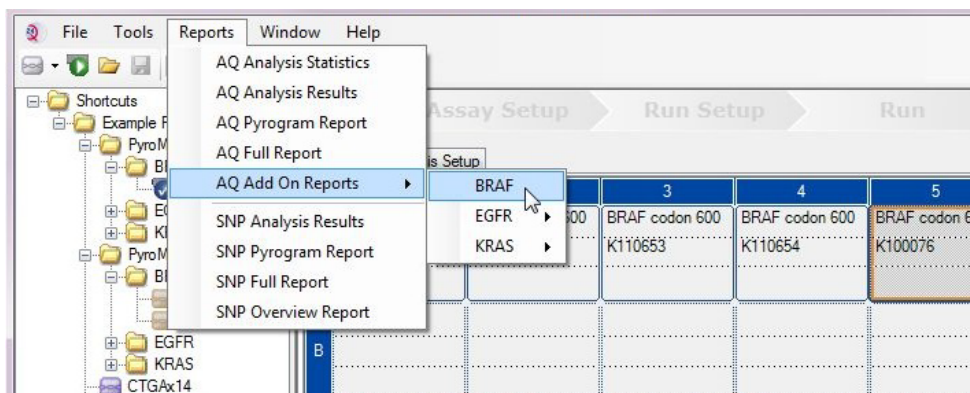
Ανάλυση εκτέλεσης στο PyroMark Q24

Σημαντικό: Το Plug-in αναφέρει τη μετάλλαξη (Πίνακας 1) η οποία αντιστοιχεί καλύτερα στο παρατηρούμενο διάγραμμα αλληλούχησης με πυροφωσφορικό.

Σημαντικό: Ορισμένες εξεταζόμενες μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 600, καθώς και στα κωδικόνια 469–469, ενδέχεται να μη διακρίνονται ακριβώς σε επίπεδα μετάλλαξης μικρότερα του 10%.

Στα ακόλουθα βήματα περιγράφεται η ανάλυση της μετάλλαξης από μια ολοκληρωμένη εκτέλεση «BRAF» με χρήση του BRAF Pyro Plug-in.

1. Εισαγάγετε στη θύρα USB του υπολογιστή το USB stick που περιέχει το αρχείο της διενεργηθείσας εκτέλεσης.
2. Μεταφέρετε το αρχείο εκτέλεσης από το USB stick στην επιθυμητή θέση στον υπολογιστή με τη βοήθεια της εφαρμογής Windows® Explorer.
3. Ανοίξετε το αρχείο εκτέλεσης στον τρόπο λειτουργίας AQ του λογισμικού PyroMark Q24 είτε επιλέγοντας «Open» (Άνοιγμα) στο μενού «File» (Αρχείο) είτε με διπλό κλικ στο αρχείο (📄) στον φυλλομετρητή συντομεύσεων.
4. Επιλέξτε «AQ Add On Reports/BRAF» από το «Reports» στο μενού (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Ανάλυση της μετάλλαξης από μια ολοκληρωμένη εκτέλεση «BRAF» με χρήση του BRAF Pyro Plug-in.

5. Τα βοηθία αναλύονται αυτόματα για όλες τις μεταλλάξεις που παρατίθενται στον Πίνακα 1. Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία τόσο του κωδικονίου 600 του BRAF όσο και των κωδικονίων 464–469 του BRAF παρουσιάζονται σε συνοπτικό πίνακα (Εικόνα 2), ακολουθούμενα από λεπτομερή αποτελέσματα, στα οποία περιλαμβάνονται τα Pyrogram® και η ποιότητα ανάλυσης.




Πίνακας 1. Μεταλλάξεις που αναλύονται από το BRAF Pyro Plug-in


Αντικατάσταση νουκλεϊκού οξέος	Αντικατάσταση αμινοξέος	LOB (% μονάδες)	LOD (% μονάδες)	COSMIC ID* (V70)
Κωδικόνιο 600 του BRAF				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	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
Κωδικόνια 464–469 του BRAF				
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

* Από τον κατάλογο σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) που είναι διαθέσιμος στο Διαδίκτυο, στην ιστοσελίδα του Ινστιτούτου Sanger www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

† Το χαμηλότερο επίπεδο μετάλλαξης σε ένα δείγμα που οδηγεί σε μέτρηση συχνότητας \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.

Εικόνα 2. Σύνοψη αποτελεσμάτων παραδείγματος από μια ανάλυση BRAF Pyro Plug-in.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και ανίχνευση μεταλλάξεων χαμηλού επιπέδου

Συνιστάται ιδιαίτερα να συμπεριλαμβάνεται δείγμα άγριου τύπου σε κάθε εκτέλεση για σκοπούς σύγκρισης και ως δείγμα ελέγχου των επιπέδων υποβάθρου.

Σημαντικό: Τα αποτελέσματα ποιοτικής αξιολόγησης «Check» (Έλεγχος) ή «Failed» (Αποτυχία) μπορεί να οφείλονται σε μη αναμενόμενο μοτίβο κορυφών. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία μη αναμενόμενης μετάλλαξης, η οποία δεν αναλύεται από την αναφορά Plug-in Report. Τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αναλύονται μη αυτόματα χρησιμοποιώντας το λογισμικό PyroMark Q24 και λαμβάνοντας υπόψη ότι ενδέχεται να περιέχουν μη αναμενόμενες μεταλλάξεις. Βλ. το κατάλληλο εγχειρίδιο kit BRAF Pyro για λεπτομέρειες.

Σημαντικό: Το διάγραμμα αλληλούχησης με πυροφωσφορικό θα πρέπει πάντοτε να αντιπαραβάλλεται με το ιστόγραμμα, το οποίο φαίνεται στα λεπτομερή αποτελέσματα της αναφοράς Plug-in Report και μπορεί να εμφανιστεί στο λογισμικό PyroMark Q24 κάνοντας δεξί κλικ στο παράθυρο του διαγράμματος αλληλούχησης με πυροφωσφορικό. Το διάγραμμα αλληλούχησης με πυροφωσφορικό θα πρέπει να εξετάζεται για την εμφάνιση μη αναμενόμενων κορυφών. Εάν οι μετρηθείσες κορυφές δεν αντιστοιχούν με το ύψος των ράβδων του ιστογράμματος και δεν μπορούν να εξηγηθούν από σπάνιες ή μη αναμενόμενες μεταλλάξεις, τότε το αποτέλεσμα της ανάλυσης δεν αποτελεί βάση για να κριθεί η κατάσταση μετάλλαξης. Συνιστάται η επαναληπτική ανάλυση του δείγματος.

Σημαντικό: Τα δείγματα με αναφερόμενη πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου (συχνότητα εντός του εύρους των ορίων LOD έως LOD + 3 ποσοστιαίες μονάδες) θα πρέπει να υποβάλλονται σε επαναληπτική ανάλυση σε διπλά δείγματα μαζί με ένα δείγμα με μη μεθυλιωμένο DNA ελέγχου. Σε αυτήν την περίπτωση εμφανίζεται μια προειδοποίηση. Το δείγμα θα πρέπει να θεωρείται θετικό για τη μετάλλαξη μόνο εάν τα διπλά δείγματα επιβεβαιώνουν και τα δύο το αποτέλεσμα της αρχικής ανάλυσης και είναι εμφανώς διαφορετικές από το φυσιολογικό δείγμα ελέγχου. Διαφορετικά, το δείγμα θα πρέπει να θεωρηθεί ως άγριου τύπου.

Σημαντικό: Για τη λεπτομερέστερη εξέταση των δειγμάτων με αναφερόμενη πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου, συνιστούμε και τη μη αυτόματη ανάλυση του δείγματος στο λογισμικό PyroMark Q24, π.χ. για σύγκριση με τη συχνότητα μετάλλαξης στο δείγμα ελέγχου (βλ. το αντίστοιχο πρωτόκολλο για λεπτομερείς οδηγίες). Εάν μετρηθεί συχνότητα μεγαλύτερη από το LOB στο δείγμα ελέγχου, τότε το επίπεδο του υποβάθρου στην αντίστοιχη εκτέλεση είναι υψηλότερο από το συνηθισμένο και άρα ενδέχεται να επηρεαστεί η ποσοτική εκτίμηση των αλληλόμορφων, ιδίως για μεταλλάξεις χαμηλού επιπέδου. Σε αυτήν την περίπτωση, οι αναφερόμενες πιθανές μεταλλάξεις χαμηλού επιπέδου δεν αποτελούν βάση για να κριθεί η κατάσταση μετάλλαξης και συνιστάται η επαναληπτική ανάλυση των δειγμάτων με πιθανή μετάλλαξη χαμηλού επιπέδου.

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας και δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο του kit QIAGEN® ή εγχειρίδιο χρήστη. Τα εγχειρίδια των kit QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στον ιστότοπο www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το Τμήμα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN Group), Windows® (Microsoft Corporation), 1106188 02/2017 © 2017 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος. PROM-8090-003

Παραγγελίες www.qiagen.com/contact | Τεχνική υποστήριξη support.qiagen.com | Ιστότοπος www.qiagen.com