

---

Únor 2017

# Průvodce rychlým spuštěním modulu plug-in BRAF Pyro<sup>®</sup>

Pro instalaci a používání s přístroji PyroMark<sup>®</sup>  
Q24 a softwarem PyroMark Q24 verze 2.0

# O modulu plug-in BRAF Pyro

Balíček modulu plug-in BRAF Pyro obsahuje:

- *průvodce rychlým spuštěním modulu plug-in BRAF Pyro,*
- dva instalační soubory,
- referenční zprávu pro ověření funkce modulu plug-in BRAF Pyro.

**Poznámka:** Modul plug-in BRAF Pyro je určen jen pro použití v kombinaci s vyhrazenými sadami BRAF Pyro indikovanými pro aplikace popsané v příslušných příručkách k sadám BRAF Pyro.

## Instalace modulu plug-in BRAF Pyro

**Důležité:** Modul plug-in BRAF Pyro musí být instalován na **přístrojích PyroMark Q24 se softwarem PyroMark Q24 verze 2.0.**

1. Zavřete software PyroMark Q24 2.0, pokud je otevřený.
2. Otevřete instalační soubor \*.zip a extrahujte soubory.
3. Dvojitě klikněte na soubor setup.exe.
4. Postupujte podle pokynů, které se zobrazí v dialogových oknech.
5. Spustěte software PyroMark Q24 2.0. Zpráva modulu plug-in BRAF Pyro se nyní objeví pod položkou „AQ Add On Reports/BRAF“ (Přidat AQ zprávu/BRAF) v nabídce „Reports“ (Zprávy) v režimu AQ.
6. Ověřte funkčnost modulu plug-in (viz část „Ověření funkčnosti modulu plug-in“ dále).

# Ověření funkčnosti modulu plug-in BRAF Pyro

**Důležité:** Ověření je třeba provést při každé instalaci nebo upgradu nového softwaru v počítači.

Následující kroky popisují způsob ověření, že software správně funguje a nebyl ovlivněn žádnými změnami v počítači.

1. V prohlížeči klávesových zkratk otevřete cyklus „BRAf Example“ (Příklad BRAf) ve složce „Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/BRAF“ (Klávesové zkratky/Soubory příkladů/Cykly PyroMark/BRAF).
2. Proveďte analýzu „BRAf“ pro všechny jamky, jak je popsána v části „Analýza cyklu v systému PyroMark Q24“ dále.
3. Výsledky porovnejte s referenční zprávou. Jsou-li výsledky totožné, je potvrzena správná funkce modulu plug-in BRAf.

## Analýza cyklu v systému PyroMark Q24

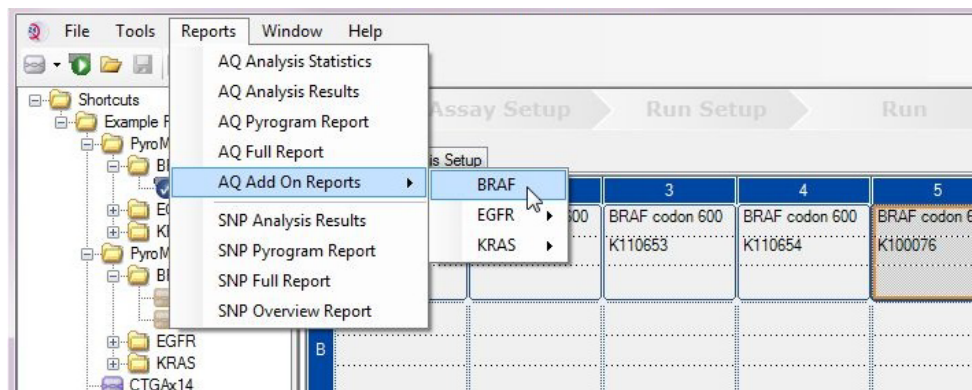
**Důležité:** V modulu plug-in bude uvedena mutace (tabulka 1), která nejlépe odpovídá pozorovanému pyrogramu.

**Důležité:** Některé konkrétní mutace v kodonu 600 a také kodony 469–469 nemusí být přesně rozlišeny při hladinách mutace nižších než 10 %.

Následující kroky popisují analýzu mutace dokončeného cyklu BRAf pomocí modulu plug-in BRAf Pyro.

1. Zasuňte USB jednotku obsahující vytvořený soubor cyklu do USB portu počítače.

2. Pomocí Průzkumníku Windows® přesuňte soubor cyklu z USB jednotky do požadovaného umístění v počítači.
3. Otevřete soubor cyklu v režimu AQ softwaru PyroMark Q24 buď zvolením možnosti „Open“ (Otevřít) v nabídce „File“ (Soubor) nebo dvojitým kliknutím na soubor (✓) v prohlížeči zkratk.
4. V nabídce „Reports“ vyberte možnost „AQ Add On Reports/BRAF“ (obrázek 1).



**Obrázek 1. Analýza mutace dokončeného cyklu BRAF pomocí modulu plug-in BRAF Pyro**

5. V jamkách automaticky proběhne analýza všech mutací uvedených v tabulce 1. Výsledky analýzy kodonu 600 genu BRAF a kodonů 464–469 genu BRAF se zobrazí v přehledné tabulce (obrázek 2) a následují i podrobné výsledky, které zahrnují grafy Pyrograms® (Pyrogramy) a kvalitu analýzy.

Tabulka 1. Mutace analyzované modulem plug-in BRAF Pyro

Substituce nukleové kyseliny	Substituce aminokyseliny	LOB (% jednotek)	LOD (% jednotek)	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 kodony 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

\* Podle Katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) dostupného online na stránkách ústavu Sanger Institute [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

† Nejnižší úroveň mutace ve vzorku, která vede k naměření frekvence  $\geq$  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.

**Obrazek 2. Příklad přehledu výsledků analýzy modulu plug-in BRAF Pyro**

## Interpretace výsledků a detekce mutací s nízkou úrovní výskytu

Je důrazně doporučeno, aby každý cyklus zahrnoval i vzorek divokého typu pro srovnání a jako kontrolu úrovní v pozadí.

**Důležité:** Hodnocení kvality „Check“ (Ověřit) nebo „Failed“ (Selhalo) může být vyvoláno neočekávaným uspořádáním píků. Tento jev může poukazovat na přítomnost neočekávané mutace, která není součástí analýzy dané ve zprávě v modulu plug-in. Takové vzorky by se měly analyzovat manuálně pomocí softwaru PyroMark Q24 a s ohledem na možnost přítomnosti neočekávaných mutací. Bližší informace viz příslušná příručka k sadě BRAF Pyro.

**Důležité:** Pyrogram je nutné vždy porovnat s histogramem, který se zobrazí v podrobných výsledcích ve zprávě v modulu plug-in a lze jej zobrazit v softwaru PyroMark Q24 kliknutím pravým tlačítkem myši na okno „Pyrogram“. Pyrogram je nutné zkontrolovat, zda se v něm nevyskytují neočekávané píky. Pokud naměřené píky výškově neodpovídají sloupcům histogramu a tento jev nelze vysvětlit vzácnými nebo neočekávanými mutacemi, není podle výsledku možné posoudit stav mutací. Doporučuje se provést novou analýzu vzorku.

**Důležité:** Vzorky s hlášenou potenciální mutací s nízkou úrovní výskytu (frekvence v rozmezí LOD až LOD + 3 % jednotek) je třeba analyzovat duplicitně se vzorkem s nemetylovanou kontrolní DNA. V takovém případě se zobrazí upozornění. Vzorek by měl být pokládán za pozitivní na výskyt mutace, jen pokud oba duplikáty potvrdí výsledek původní analýzy a budou zjevně odlišné od normální kontroly. V opačném případě by měl být vzorek posouzen jako divoký typ.

**Důležité:** K podrobnějšímu prozkoumání vzorků s hlášenou potenciální mutací s nízkou úrovní výskytu doporučujeme provést další analýzu vzorku ručně v softwaru PyroMark Q24, např. pro porovnání s frekvencí této mutace v kontrolním vzorku (podrobné pokyny viz příslušný protokol). Změřená frekvence převyšující LOB v kontrolním vzorku indikuje v odpovídajícím cyklu vyšší než běžnou hladinu pozadí, což může ovlivnit kvantifikaci alel zvláště u mutací s nízkou hladinou. V tomto případě podle hlášených potenciálních mutací s nízkou úrovní výskytu nelze posoudit stav mutací a doporučuje se provést novou analýzu vzorků s potenciální mutací s nízkou úrovní výskytu.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu QIAGEN® nebo v příručce uživatele. Příručky a uživatelské návody sady QIAGEN jsou k dispozici na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), nebo si je lze vyžádat u Technických služeb QIAGEN nebo svého lokálního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN Group); Windows® (Microsoft Corporation).  
1106188 02/2017 © 2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena. PROM-8090-003

Objednávky [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Technická podpora [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webová stránka [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)