
Februar 2017

Hurtigveiledning for BRAF Pyro[®] Plug-in

Til installasjon og bruk med PyroMark[®] Q24-
instrumenter og PyroMark Q24-programvaren,
versjon 2.0

Om BRAF Pyro Plug-in

BRAF Pyro Plug-in-pakken inneholder:

- *Hurtigveiledning for BRAF Pyro Plug-In*
- To installasjonsfiler
- Referanserapport for verifisering av BRAF Pyro Plug-in-funksjonen

Merk: BRAF Pyro Plug-in skal kun brukes i kombinasjon med dedikerte BRAF Pyro-sett indisert for applikasjoner som er beskrevet i den tilhørende håndboken for BRAF Pyro Kit.

Installasjon av BRAF Pyro Plug-in

Viktig: BRAF Pyro Plug-in må være installert på **PyroMark Q24-instrumentene med PyroMark Q24-programvaren, versjon 2.0.**

1. Lukk PyroMark Q24-programvare 2.0 hvis den er åpen.
2. Åpne *.zip-installasjonsfilen, og pakk ut filene.
3. Dobbeltklikk på setup.exe-filen.
4. Følg instruksjonene i dialogboksene som vises.
5. Start PyroMark Q24-programvare 2.0. BRAF Pyro Plug-in-rapporten vises nå under "AQ Add On Reports/BRAF" (AQ legge til rapporter / BRAF) fra menyen "Reports" (Rapporter) i AQ-modus.
6. Verifiser Plug-in-funksjonen (se "Verifisering av Plug-in-funksjonen" nedenfor).

Verifisering av BRAF Pyro Plug-in-funksjonen

Viktig: Verifiseringen skal utføres hver gang ny programvare blir installert eller oppgradert på datamaskinen.

Følgende trinn beskriver hvordan du kan bekrefte at programvaren fungerer som den skal og ikke er påvirket av eventuelle endringer i datamaskinen.

1. Åpne "BRAF Example"-kjøringen (BRAF-eksempel) under "Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/BRAF" (Snarveier/Eksempelfiler/PyroMark-kjøringer/BRAF) i nettleserens snarveifunksjon.
2. Utfør en "BRAF"-analyse for alle brønner som er beskrevet i "Analyse av en PyroMark Q24-kjøring" nedenfor.
3. Sammenlign resultatene med referanserapporten. Hvis resultatene er identiske, blir riktig funksjon for BRAF Plug-in bekreftet.

Analyse av en PyroMark Q24-serie

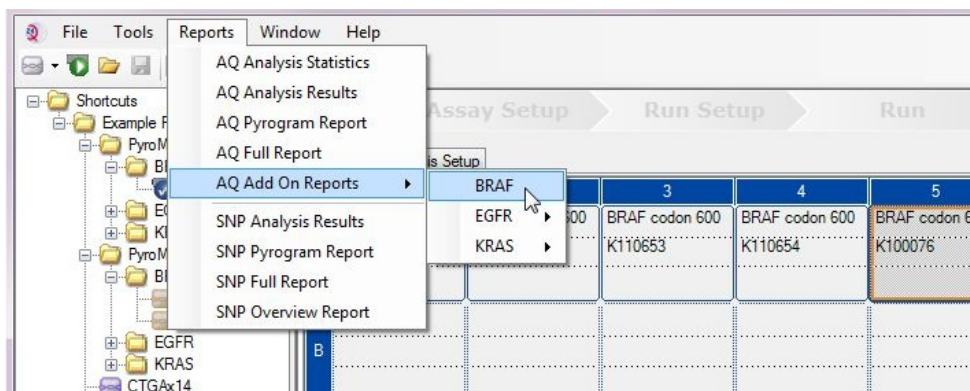
Viktig: Plug-in-enheten vil rapportere den mutasjonen (tabell 1) som passer best til observert Pyrogram.

Viktig: Noen berørte mutasjoner i kodon 600 samt kodon 469–469 vil kanskje ikke kunne skilles fra hverandre nøyaktig ved mutasjonsnivåer under 10 %.

Følgende trinn beskriver mutasjonsanalysen av en ferdig BRAF-kjøring med BRAF Pyro Plug-in.

1. Sett USB-enheten (som inneholder den behandlede seriefilen) inn i datamaskinens USB-port.

2. Overfør seriefilen fra USB-enheten til ønsket plassering på datamaskinen ved hjelp av Windows® Utforsker.
3. Åpne seriefilen i AQ-modus i PyroMark Q24-programvaren ved å velge "Open" (Åpne) i menyen "File" (Fil) eller ved å dobbeltklikke på filen (☑) i snarveifunksjonen.
4. Velg "AQ Add On Reports/BRAF" fra "Reports" i menyen (figur 1).



Figur 1. Mutasjonsanalyse av en ferdig BRAF-kjøring med BRAF Pyro Plug-in.

5. Brønnene vil automatisk bli analysert for alle mutasjoner angitt i tabell 1. Resultatene for både BRAF-kodon 600- og BRAF-kodon 464–469-analysen vil bli presentert i en oversiktstabell (figur 2), etterfulgt av detaljerte resultater som omfatter Pyrograms® og analysekvalitet.

Tabell 1. Mutasjoner analysert av BRAF Pyro Plug-in

Nukleinsyre- substitusjon	Aminosyre- substitusjon	LOB (% enheter)	LOD (% enheter)	COSMIC ID* (V70)
BRAF-kodon 600				
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
BRAF-kodon 464–469				
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

* Fra "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer" (katalog over somatiske mutasjoner ved kreft), tilgjengelig fra Sanger Institute på www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Laveste mutasjonsnivå i en prøve som fører til en målt 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. Eksempel på et resultatsammendrag fra en BRAF Pyro Plug-in-analyse.

Tolkning av resultater og deteksjon av mutasjoner med lavt nivå

Det anbefales på det sterkeste å ta med en villtypeprøve i hver analyseserie for å kunne utføre en sammenligning og kontrollere bakgrunnsnivåer.

Viktig: Kvalitetsvurderinger som "Check" (Kontroller) eller "Failed" (Mislyktes) kan forårsakes med et uventet mønster av topper. Dette kan indikere en uventet mutasjon, noe som ikke analyseres av Plug-in-rapporten. Disse prøvene bør analyseres manuelt ved hjelp av PyroMark Q24-programvaren og vurderes med tanke på at de kan inneholde uventede mutasjoner. Se den aktuelle håndboken for BRAF Pyro Kit for mer informasjon.

Viktig: Pyrogram må alltid sammenlignes med histogrammet som vises for de detaljerte resultatene i Plug-in-rapporten, og som kan vises i PyroMark Q24-programvaren ved å høyreklikke i Pyrogram-vinduet. Pyrogram bør undersøkes for tilstedeværelse av uventede topper. Hvis de målte toppene ikke stemmer overens med høydene på histogramsøylen og ikke kan forklares av sjeldne eller uventede mutasjoner, danner ikke resultatet grunnlag for å bedømme mutasjonsstatus. Det er anbefalt å kjøre prøven på nytt.

Viktig: Prøver med en rapportert potensiell mutasjon med lavt nivå (frekvens i området fra LOD til LOD+ 3 % enheter) skal bare kjøres på nytt i duplikat sammen med en prøve med umetylert kontroll-DNA. En advarsel vil bli vist i slike tilfeller. Prøven skal kun regnes som positiv for mutasjonen hvis begge duplikater bekrefter resultatet av den opprinnelige analysen og er synlig forskjellig fra den normale kontrollen. Hvis ikke skal prøven anses som villtype.

Viktig: For en nærmere undersøkelse av prøver med en rapportert potensiell mutasjon med lavt nivå anbefaler vi i tillegg å analysere prøven manuelt i PyroMark Q24-programvaren, f.eks. for å sammenligne med kontrollprøvens mutasjonsfrekvens (se tilhørende protokoll for detaljerte instruksjoner). En målt frekvens over LOB i kontrollprøven indikerer et høyere bakgrunnsnivå enn vanlig i den tilhørende serien, som kan påvirke allelkvantifisering, særlig for lave mutasjonsnivåer. I dette tilfellet danner ikke rapporterte mulige lave mutasjonsnivåer et grunnlag for vurdering av mutasjonsstatus, og det anbefales å analysere prøver med en potensiell mutasjon med lavt nivå på nytt.

For oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, se den respektive håndboken eller brukerhåndboken for QIAGEN® Kit. Håndbøker og brukerhåndbøker for QIAGEN Kit er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan bestilles fra QIAGENs tekniske tjenester eller din lokale distributør.

Varemerker: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN Group); Windows® (Microsoft Corporation).
1106188 02/2017 © 2017 QIAGEN, med enerett. PROM-8090-003

Bestilling www.qiagen.com/contact | Teknisk støtte support.qiagen.com | Nettsted www.qiagen.com