
Febbraio 2017

Plug-in BRAF Pyro[®]

Guida rapida

Per l'installazione e l'utilizzo con strumenti
PyroMark[®] Q24 e software PyroMark Q24
versione 2.0

Informazioni sul plug-in BRAF Pyro

Il pacchetto del plug-in BRAF Pyro include:

- *Plug-in BRAF Pyro Guida rapida*
- due file di installazione
- report di riferimento per la verifica della funzionalità del plug-in BRAF Pyro

Nota: Il plug-in BRAF Pyro è destinato esclusivamente all'utilizzo in combinazione con i kit BRAF Pyro dedicati adatti per le applicazioni descritte nei rispettivi manuali dei kit BRAF Pyro.

Installazione del plug-in BRAF Pyro

Importante: Il plug-in BRAF Pyro deve essere installato su **strumenti PyroMark Q24 con software PyroMark Q24 versione 2.0.**

1. Se è aperto, chiudere il software PyroMark Q24 2.0.
2. Aprire il file di installazione *.zip ed estrarre i file.
3. Fare doppio clic sul file setup.exe.
4. Seguire le istruzioni delle finestre di dialogo.
5. Avviare il software PyroMark Q24 2.0. Nel menu "Reports" (Report) della modalità AQ, sotto "AQ Add On Reports/BRAF" (Report aggiuntivi AQ/BRAF), comparire il report del plug-in BRAF Pyro.
6. Verificare la funzionalità del plug-in (vedere "Verifica della funzionalità del plug-in" nel seguito).

Verifica della funzionalità del plug-in BRAF Pyro

Importante: La verifica dovrebbe essere eseguita ogni volta che si effettua un aggiornamento o l'installazione di nuovo software sul computer.

La seguente procedura illustra come verificare che il software funzioni correttamente e non abbia subito alcun effetto a causa delle modifiche apportate al computer.

1. Aprire la seduta "BRAF Example" (Esempio BRAF) accessibile nel browser dei collegamenti sotto "Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/BRAF" (Collegamenti/File di esempio/sedute PyroMark/BRAF).
2. Eseguire un'analisi "BRAF" per tutti i pozzetti come descritto in "Analisi di una seduta PyroMark Q24" nel seguito.
3. Confrontare i risultati con il report di riferimento. Se i risultati sono identici, il corretto funzionamento del plug-in BRAF è confermato.

Analisi di una seduta PyroMark Q24

Importante: il plug-in riporta la mutazione (Tabella 1) che meglio corrisponde al tracciato Pyrogram osservato.

Importante: alcune mutazioni rilevabili nel codone 600 come anche nei codoni 469-469 potrebbero non essere distinte in modo preciso a livelli mutazionali inferiori al 10%.

La seguente procedura descrive l'analisi delle mutazioni di una seduta BRAF conclusa utilizzando il plug-in BRAF Pyro.

1. Nella porta USB del computer inserire la penna USB contenente il file del processo elaborato.

- Utilizzando Windows® Explorer, spostare il file della seduta dalla penna USB alla posizione desiderata sul computer.
- Aprire il file della seduta nella modalità AQ del software PyroMark Q24, selezionando "Open" (Apri) nel menu "File" oppure facendo doppio clic sul file (👉) nel browser dei collegamenti.
- Selezionare "AQ Add On Reports/BRAF" da "Reports" nel menu (Figura 1).

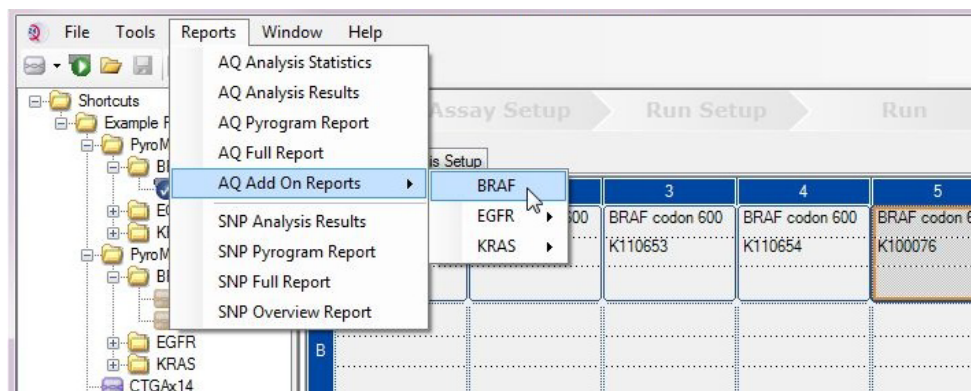


Figura 1. Analisi delle mutazioni di una seduta BRAF conclusa utilizzando il plug-in BRAF Pyro.

- I pozzetti vengono analizzati automaticamente per rilevare tutte le mutazioni riportate nella Tabella 1. I risultati per le analisi del codone 600 del gene BRAF e dei codoni 464-469 del gene BRAF vengono riportati in una tabella riassuntiva (Figura 2), seguita dai risultati dettagliati che includono i tracciati Pyrogram® e la qualità dell'analisi.

Tabella 1. Mutazioni analizzate mediante il plug-in BRAF Pyro

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	LOB (unità %)	LOD (unità %)	ID COSMIC* (V70)
BRAF codone 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	V600E complessa	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 codoni 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

* Fonte: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catalogo delle mutazioni somatiche nel cancro), disponibile online presso il Sanger Institute all'indirizzo Web www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

† Livello di mutazione più basso che, in un campione, genera una frequenza misurata \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.

Figura 2. Esempio di tabella riassuntiva dei risultati di un'analisi mediante plug-in BRAF Pyro.

Interpretazione dei risultati e rilevazione delle mutazioni di basso livello

Si raccomanda vivamente di includere un campione wild-type in ogni seduta a scopo di confronto e come controllo dei livelli di fondo.

Importante: Uno schema inatteso di picchi può determinare una valutazione di qualità "Check" (Controllare) o "Failed" (Non superato). Ciò può indicare una mutazione inattesa che non viene analizzata dal report del plug-in. I campioni interessati da questo fenomeno devono essere analizzati manualmente utilizzando il software PyroMark Q24 e tenendo conto della possibile presenza di mutazioni inattese. Per i dettagli, consultare il manuale del kit BRAF Pyro appropriato.

Importante: Il tracciato Pyrogram deve sempre essere confrontato con l'istogramma riportato nella sezione dei risultati dettagliati del report del plug-in e può essere visualizzato nel software PyroMark Q24 facendo clic con il tasto destro del mouse nella finestra Pyrogram. Il tracciato Pyrogram deve essere esaminato per valutare la presenza di eventuali picchi imprevisti. Nel caso in cui i picchi misurati non corrispondano all'altezza delle barre dell'istogramma e ciò non possa essere spiegato con mutazioni rare o inattese, non sarà possibile utilizzare il risultato come base per la valutazione dello stato mutazionale. È consigliabile analizzare nuovamente il campione.

Importante: I campioni per i quali è riportata la possibile presenza di una mutazione di basso livello (frequenza compresa tra LOD e LOD + 3 unità percentuali) devono essere nuovamente processati in duplicato con un campione di DNA di controllo non metilato. In tal caso viene generata un'avvertenza. Il campione deve essere considerato positivo per la mutazione soltanto se entrambi i duplicati confermano il risultato dell'analisi generale e sono visibilmente differenti dal campione di controllo normale. In caso contrario, il campione deve essere considerato wild-type.

Importante: Per un esame più accurato dei campioni i cui risultati segnalano una potenziale mutazione di basso livello, è consigliabile eseguire un'ulteriore analisi manuale del campione mediante il software PyroMark Q24, ad esempio un confronto con la frequenza mutazionale del campione di controllo (per le istruzioni dettagliate, vedere il protocollo corrispondente). Se nel campione di controllo viene misurata una frequenza superiore al valore LOB, ciò indica che nella seduta corrispondente è presente un livello di fondo più alto del normale che potrebbe influenzare la quantificazione allelica, in particolare per i livelli mutazionali bassi. In questo caso, i risultati che segnalano la possibile presenza di mutazioni di basso livello non costituiscono una base per la valutazione dello stato mutazionale ed è consigliabile processare nuovamente i campioni con possibili mutazioni di basso livello.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN®. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN (QIAGEN Technical Services) o al proprio distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (gruppo QIAGEN); Windows® (Microsoft Corporation).
1106188 02/2017 © 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati. PROM-8090-003

Ordini www.qiagen.com/contact | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com