
Februar 2017

BRAF Pyro[®] Plug-in Kurzanleitung

Zur Installation und Verwendung mit PyroMark[®]
Q24 Geräten und der PyroMark Q24 Software
Version 2.0

Über das BRAF Pyro Plug-in

Inhalt des BRAF Pyro Plug-in-Pakets:

- *BRAF Pyro Plug-in Kurzanleitung*
- Zwei Installationsdateien
- Referenzbericht zur Überprüfung der Funktionalität des BRAF Pyro Plug-ins

Hinweis: Das BRAF Pyro Plug-in ist nur für die Verwendung in Kombination mit den jeweiligen BRAF Pyro-Kits für die in den Handbüchern des jeweiligen BRAF Pyro Kits beschriebenen Anwendungen bestimmt.

Installation des BRAF Pyro Plug-ins

Wichtig: Das BRAF Pyro Plug-in muss auf **PyroMark Q24 Geräten mit der PyroMark Q24 Software Version 2.0** installiert werden.

1. Schließen Sie die PyroMark Q24 Software 2.0, falls sie geöffnet ist.
2. Öffnen Sie den *.zip-Installationsordner und entpacken Sie die Dateien.
3. Doppelklicken Sie auf die Datei setup.exe.
4. Folgen Sie den Anweisungen in den angezeigten Dialogfeldern.
5. Starten Sie die PyroMark Q24 Software 2.0. Nun wird im Menü „Reports“ (Berichte) im AQ-Modus unter „AQ Add On Reports/BRAF“ (AQ-Zusatzberichte/BRAF) der BRAF Pyro Plug-in Report geöffnet.
6. Überprüfen Sie die Funktionalität des Plug-ins (siehe „Überprüfung der Funktionalität des Plug-ins“ unten).

Überprüfung der Funktionalität des BRAF Pyro Plug-ins

Wichtig: Die Überprüfung sollte bei jeder Neuinstallation und bei jedem Upgrade der Software auf dem Computer durchgeführt werden.

Die folgenden Schritte beschreiben, wie überprüft werden kann, dass die Software einwandfrei arbeitet und nicht durch Veränderungen auf dem Computer beeinträchtigt ist.

1. Öffnen Sie in der Navigationsansicht unter „Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/BRAF“ (Shortcuts/Beispieldateien/PyroMark Läufe/BRAF) den „BRAF Example“ (BRAF-Beispiel)-Lauf.
2. Führen Sie für alle Vertiefungen entsprechend der unten in „Analyse eines PyroMark Q24 Laufs“ angegebenen Beschreibung eine „BRAF“-Analyse durch.
3. Vergleichen Sie die Ergebnisse mit dem Referenzbericht. Sind die Ergebnisse identisch, ist die einwandfreie Funktion des BRAF Plug-ins bestätigt.

Analyse eines PyroMark Q24 Laufs

Wichtig: Das Plug-in gibt die Mutation an (Tabelle 1), die mit dem erfassten Pyrogramm am besten übereinstimmt.

Wichtig: Einige der untersuchten Mutationen in Codon 600 und in den Codons 469–469 können bei einem Mutationsgrad unter 10 % u. U. nicht genau unterschieden werden.

Die folgenden Schritte beschreiben die Mutationsanalyse eines abgeschlossenen BRAF-Laufs mit dem BRAF Pyro Plug-in.

1. Stecken Sie den USB-Stick, auf dem die Laufdatei gespeichert ist, in den USB-Anschluss des Computers.
2. Verschieben Sie die Laufdatei über den Windows® Explorer vom USB-Stick zum gewünschten Speicherort auf dem Computer.
3. Öffnen Sie die Laufdatei im AQ-Modus der PyroMark Q24 Software, indem Sie entweder im Menü „File“ (Datei) die Option „Open“ (Öffnen) auswählen oder in der Navigationsansicht auf die Datei doppelklicken (✓).
4. Wählen Sie im Menü „Reports“ die Option „AQ Add On Reports/BRAF“ aus (Abbildung 1).

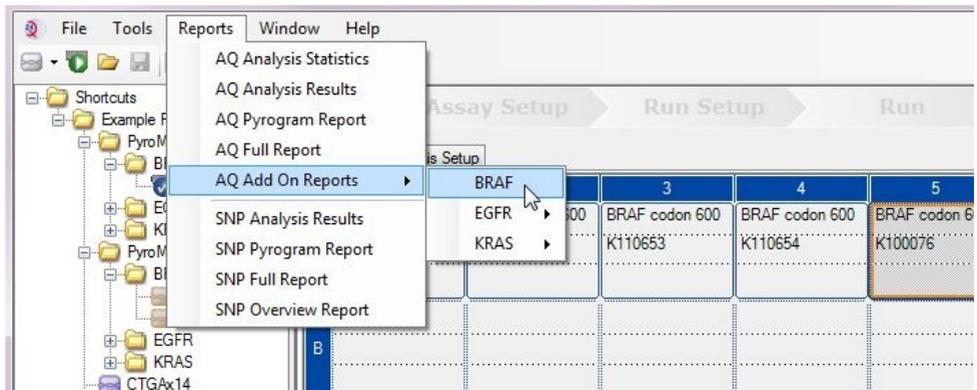


Abbildung 1. Mutationsanalyse eines abgeschlossenen BRAF-Laufs mit dem BRAF Pyro Plug-in.

5. Die Vertiefungen werden automatisch auf alle Mutationen analysiert, die in Tabelle 1 angegeben sind. Die Ergebnisse der BRAF-Analysen von Codon 600 und der Codons 464–469 werden in einer Übersichtstabelle (Abbildung 2) dargestellt, an die sich ausführliche Ergebnisse samt Pyrograms® und Daten zur Analysequalität anschließen.

Tabelle 1. Mit dem BRAF Pyro Plug-in analysierte Mutationen

Nukleinsäuresubstitution	Aminosäure-substitution	LOB (Prozenteinheiten)	LOD (Prozenteinheiten)	COSMIC-ID* (V70)
BRAF-Codon 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-Codons 464 bis 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

* Aus dem „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“, der auf der Website des Sanger-Instituts unter www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/ verfügbar ist.

† Niedrigster Mutationsgrad in einer Probe, der eine gemessene Häufigkeit \geq LOD ergibt.

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.

Abbildung 2. Beispielergebnisse aus einer Analyse mit dem BRAF Pyro Plug-in.

Interpretation der Ergebnisse und Nachweis schwacher Mutationen

Wir empfehlen dringend, zu Vergleichszwecken und als Hintergrundkontrolle in jedem Lauf eine Wildtypprobe mitzuführen.

Wichtig: Die Qualitätsbewertung „Check“ (Überprüfen) oder „Failed“ (Fehlgeschlagen) kann durch ein unerwartetes Peakmuster verursacht werden. Dies weist möglicherweise auf eine unerwartete Mutation hin, die bei Verwendung des Plug-in-Reports nicht analysiert wird. Solche Proben sollten unter Berücksichtigung, dass eventuell unerwartete Mutationen vorliegen, mit der PyroMark Q24 Software manuell analysiert werden. Einzelheiten sind dem Handbuch des jeweiligen BRAF Pyro Kits zu entnehmen.

Wichtig: Das Pyrogram-Diagramm sollte stets mit dem Histogramm verglichen werden. Dieses ist in den ausführlichen Ergebnissen des Plug-in-Reports gezeigt und kann durch Rechtsklick im Pyrogram-Diagramm-Fenster in der PyroMark Q24 Software angezeigt werden. Das Pyrogram-Diagramm sollte auf unerwartete Peaks geprüft werden. Wenn die gemessenen Peaks nicht mit der Höhe der Histogrammbalken übereinstimmen und nicht auf seltene oder unerwartete Mutationen zurückgeführt werden können, ist das Ergebnis nicht als Grundlage für die Bewertung des Mutationsstatus geeignet. Es wird empfohlen die Probe erneut zu analysieren.

Wichtig: Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wird (Häufigkeit im Bereich von LOD zu LOD + 3 Prozenteinheiten), sollten in Doppelbestimmung zusammen mit einer Probe mit unmethylierter Kontroll-DNA erneut analysiert werden. In diesem Fall wird ein Warnhinweis angezeigt. Die Probe sollte nur dann als positiv für die Mutation eingestuft werden, wenn beide Duplikate dasselbe Ergebnis ergeben wie die erste Analyse und sich von der normalen Kontrolle sichtbar unterscheiden. Anderenfalls ist die Probe als Wildtyp einzustufen.

Wichtig: Für eine Untersuchung von Proben, für die eine potenzielle schwache Mutation angegeben wurde, empfehlen wir, die Probe in der PyroMark Q24 Software zusätzlich manuell zu analysieren, z. B. zum Vergleich mit der Mutationshäufigkeit der Kontrollprobe (ausführliche Hinweise sind dem entsprechenden Protokoll zu entnehmen). Eine gemessene Häufigkeit über der Leerwertgrenze (LOB) in der Kontrollprobe zeigt an, dass im entsprechenden Lauf ein ungewöhnlich hoher Hintergrund vorhanden ist, der die Allelquantifizierung insbesondere für schwache Mutationen beeinträchtigen kann. In diesem Fall sind die angegebenen schwachen Mutationen keine Basis zur Beurteilung des Mutationsstatus, und es wird empfohlen, die Proben mit einer potenziellen schwachen Mutation erneut zu analysieren.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch des jeweiligen QIAGEN®-Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN-Kits sind unter www.qiagen.com abrufbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden.

Markennamen: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (QIAGEN-Gruppe); Windows® (Microsoft Corporation).
1106188 02/2017 © 2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten. PROM-8090-003