

## IDENTIFICAZIONE DELLE MUTAZIONI DEL CODONE 12 E 13 DELLA PROTEINA K-RAS REAL-TIME PCR AMPLI-set KRAS RT Cat. n. 1.428RT

Le mutazioni del gene K-ras sono state rilevate in circa il 30 % di tutti i tumori umani e hanno dimostrato di predire la risposta ad alcune terapie mirate. La maggior parte delle mutazioni a carico di K-ras responsabili della trasformazione maligna sono mutazioni puntiformi localizzate nel codone 12 (GGT-AGT; GGT-TGT; GGT-CGT; GGT-GAT; GGT-GTT; GGT-GCT) e con minor frequenza nei codoni 13 (GGC- GAC) e 61. Questi residui aminoacidici giocano un ruolo chiave nel legame al GTP e le suddette mutazioni puntiformi portano alla generazione della proteina oncogenica p21 Ras la quale resiste all'idrolisi del GTP ed è costitutivamente attiva. La strategia più comune per la rivelazione della mutazione di K-ras consiste nella rivelazione con sequenziamento di PCR convenzionale. Questo approccio ha una sensibilità del 10-30 % a seconda che si utilizzi pyrosequencing o metodo Sanger. Il kit permette l'individuazione delle mutazioni a carico del codone 12 e del codone 13 mediante PCR discriminazione allele-specifica e rivelazione in REAL-TIME PCR, grazie alla presenza di probe marcato con il fluorocromo FAM.

Il presente kit, utilizza la PCR discriminazione allelica, che consente una rilevazione sensibile dell'allele wild-type (normale) e mutato con rivelazione in Real Time PCR. La PCR Real-Time discriminazione allele, rispetto ad altri metodi (sequenziamento, RFLP etc), consente di individuare la mutazione anche quando è presente in una piccola percentuale di cellule (sensibilità 1-2% di cellule mutate; specificità 99%) e di identificare specificamente le mutazioni a carico del codone 12 (G12X) e del codone 13 (G13D), rispettivamente.

Il saggio utilizza anche un controllo interno di amplificazione per verificare la qualità e la quantità di DNA genomico di ciascun campione.

**Principio del metodo:** A) estrazione del DNA, B) Real-Time PCR.

**Applicabilità:** Su DNA genomico estratto e purificato da campioni di tessuto fresco/incluso in paraffina. fcdNA (DNA libero circolante)

**Numero di test:** 12x8

**Stabilità:** superiore a 12 mesi se correttamente conservato

### COMPONENTI DEL REAGENTE 1 DEL GENE KRAS DISCRIMINAZIONE ALLELICA

| TUBO | Nome Codice   | Sito di Rivelazione | Canale di Fluorescenza |
|------|---------------|---------------------|------------------------|
| A    | IR            | gene                | FAM                    |
| B    | Kras mutaz. 1 | c.34G>T p.G12C      | FAM e VIC/HEX          |
| C    | Kras mutaz. 2 | c.34G>A p.G12S      | FAM e VIC/HEX          |
| D    | Kras mutaz. 3 | c.34G>C p.G12R      | FAM e VIC/HEX          |
| E    | Kras mutaz. 4 | c.35G>T p.G12V      | FAM e VIC/HEX          |
| F    | Kras mutaz 5  | c.35G>A p.G12D      | FAM e VIC/HEX          |
| G    | Kras mutaz 6  | c.35G>C p.G12A      | FAM e VIC/HEX          |
| H    | Kras mutaz. 7 | c.38G>A p.G13D      | FAM e VIC/HEX          |

### CONTENUTO DEL KIT E SUA CONSERVAZIONE

| CONTENUTO                         | QUANT.                            | COMPONENTI  |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Reagente 1 KRAS<br>Codone 12 e 13 | 12 strips<br>x 8 tubi<br>da 17 µl | Il tubo A di ogni strips contiene specifici primers probe e dNTPmix<br>Per Referenza Interna, i tubi B-H contengono specifici primers, probe dNTPmix per le mutazioni KRAS gene specifico e controllo interno |
| Taq DNA Polimerase                | 1 tubo 40 µl                      | Polimerase  |
| KRAS Controllo Positivo           | 1 tubo 60 µl                      | KRAS gene mutato, allele per RI e frammento di Controllo Interno  |

#### Bibliografia:

Karapetis et al., *N Engl J Med.* 2008 Oct 23;359(17):1757-65.§2.  
D. Lambrechts, W. De Roock, et al.(2009) *Journal of Clinical Oncology*,  
ASCO Annual Meeting Proceedings. vol 27, n. 15S: 4020§3.  
De Roock W, et al., *L*  
*12) Int J Cancer:* 102, 623-628 (2002).