



Biomarcadores. Oncología. PI3K, Biomarcador disponible.

tecnolab
S.a.

 8 min.



Los biomarcadores oncológicos siguen ganando importancia en la actualidad, estos mejoran el diagnóstico, clasificación y tratamiento del cáncer. Se han reportado mutaciones somáticas de algunos biomarcadores en una variedad de tumores humanos, incluyendo cáncer de mama y cáncer colorrectal entre otros. En esta nota la Bioq. Mónica Rodríguez, Coordinadora de la División de Patología y Anticuerpos de Tecnolab, nos presenta un kit que acopla la tecnología ARMS (Amplification Refrectory Mutation System) y las sondas Scorpions. Este kit permite la detección, mediante un ensayo de Real Time PCR de 4 mutaciones somáticas. Este ensamble da origen a una técnica específica y de alta sensibilidad para detectar las mutaciones de los oncogenes en un background de DNA genómico, con resultados totalmente confiables.



Bioq. Mónica Rodríguez
Coordinadora División Patología y Anticuerpos



E-mail: mrodriguez@tecnolab.com.ar



Introducción

La ruta PI3K-AKT, es activada en una variedad de tumores, resultando en crecimiento y proliferación celular

Mutaciones somáticas en PI3K (Fosfatidil Inositol 3kinasa), han sido reportadas en una variedad de tumores humanos, incluyendo cáncer de mama y cáncer colorrectal entre otros.

Este kit permite la detección, mediante un ensayo de Real Time PCR de 4 mutaciones somáticas: H1047R, E542K, E545K y E545D en exón 9 y 20 del gen PIK3CA.

La detección de estas cuatro mutaciones es posible en un background de DNA genómico wild type mediante un ensayo de real time PCR, basado en la combinación de dos tecnologías ARMS (Amplification Refrectory Mutation System) y Scorpions.

Este método es altamente selectivo, produce suficientes copias de DNA, detecta 1 % de mutante en un background de DNA wild type.

La presencia de estas mutaciones puede influir en las terapias dirigidas y el pronóstico.

La detección de estas mutaciones empleando este kit de investigación ayudará a los investigadores a determinar estas correlaciones.

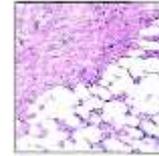
Flujo de Trabajo

A partir de una muestra de biopsia del tumor, posteriormente a la extracción del ácido nucleico se lleva a cabo una amplificación con tecnología ARMS, la cual discrimina entre el DNA wild type y el mutado, amplificando selectivamente la secuencia target. Esto es posible ya que los

primers ARMS están diseñados complementariamente al DNA conteniendo la mutación.



Step 1: Tumour biopsy and sample preparation



Step 2: Extract DNA



Step 3: ARMS: Selectively amplifies target



Step 4: Scorpions: Fluorescence indicates presence of mutation



De esta forma, al terminar la reacción de PCR, las únicas secuencias que se han amplificado han sido las secuencias mutadas, aun en muestras donde la

mayoría de las secuencias no contienen la mutación.

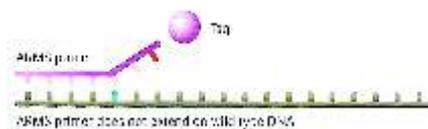
ARMS Amplification Refractory Mutation System Reaction



ARMS primers are designed to anneal with DNA containing the mutation and allow Taq DNA polymerase to initiate a PCR reaction



ARMS primers do not amplify wild type DNA



La detección de estas secuencias amplificadas se lleva a cabo usando Scorpions. Las moléculas Scorpions son moléculas bi funcionales que contienen un primer de PCR unido covalentemente a una sonda. El fluoróforo en la sonda, interactúa con un quencher, también incorporado en la sonda, que reduce la fluorescencia por cercanía física, cuando se encuentra en su conformación más estable.

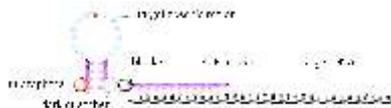
Durante la PCR, cuando la sonda se une al amplicon, el fluoróforo y el quencher se separan y esto lleva al incremento en la fluorescencia en el tubo de reacción.

Scorpions Reaction



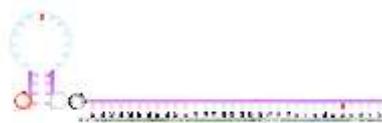
Step 1: The Scorpion primer binds to a se-

quence upstream of the probe target region



Step 2:

- The Scorpion primer is extended by DNA polymerase and the target region is copied
- The newly copied region is complementary to the probe at the 5' end of the Scorpion
- The blocking molecule stops DNA polymerase from copying the probe region

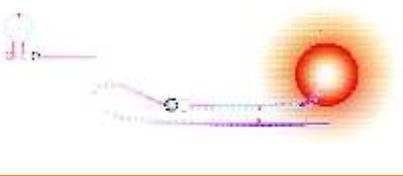


Step 3: The temperature increase within the real-time PCR instrument and the newly extended Scorpions primer denatures



Step 4:

- The PCR reaction cools and the extended Scorpion undergoes an internal rearrangement to hybridise itself
- The fluorophore is no longer in close proximity to its quencher and it begins to fluoresce
- Any un-extended Scorpions re-anneal and are quenched



En síntesis, acoplando la tecnología ARMS y las sondas Scorpions se obtiene una técnica específica y de alta sensibilidad para detectar las mutaciones de los oncogenes en un background de DNA genómico, con resultados totalmente confiables.



Bibliografía

- Scorpions is a registered trademark owned by DxS Limited
- ARMS is a registered trademark owned by AstraZeneca Limited
- Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. RE. Board, AM. Wardley, JM. Dixon, AC. Armstrong, S. Howell et al. (2010). Breast Cancer Res Treat., April 2010; 120(2): 461-7.
- Multiplexed assays for detection of mutations in PI3KCA. RE. Board, NJ. Thelwell, PF. Ravetto, S. Little, C. Dive, D. Whitcombe, et al. (2008). Clin Chem. April 2008; 54(4) 757-760.
- Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. Y. Samuels, LA. Diaz Jr, O. Schmidt-Kittler, JM. Cummins, L. DeLong, et al. (2005). Cancer Cell, June 2005; 7: 561-573.
- Frequent Mutation of the PIK3CA Gene in Ovarian and Breast Cancers. DA. Levine, F. Bogomolny, J. Yee, A. Lash, RR. Barakat, PI. Borgen, J. Boyd. (2005). Clin Cancer Res., April 2005; 11(8): 2875-2878.
- Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. G. Wu, M. Xing, E. Mambo, X. Huang, J. Liu, Z. Guo, A. Chatterjee, D. Goldenberg, SM. Gollin, et al. (2005). Breast Cancer Research, May 2005; 7(5).

ACTIM™ FECAL BLOOD

Detección de sangre oculta en materia fecal



- No requiere dieta previa
- Higienico y limpio
- Sencillo
- Rápido
- Presentación: Equipo por 20 determinaciones



ETC Internacional S.A. Tel (54 11) 4639 3488
 etcventa@etcint.com.ar etcinfo@etcint.com.ar
 www.etcint.com.ar Autorizado por ANMAT
 Certificado N° 4106/00