

Mutāciju *KRAS* gēna 12. un 13. kodonā kvantitatīva noteikšana, izmantojot masspektrometriju

*Laura Ozoliņa, Miki Nakazawa-Miklaševiča,
Zanda Daneberga, Dagnija Kalniete,
Jānis Gardovskis, Edvīns Miklaševičs*

Rīgas Stradiņa universitāte, Onkoloģijas institūts, Latvija

Ievads. Mutācijas *KRAS* gēna 12. un 13. kodonā ir virzītājmūtācijas dažādas lokalizācijas audzējiem. Šīs mutācijas noteikšana ir nozīmīga, jo tā ietekmē mērķterapijas izvēli. Mutācijas 12. un 13. kodonā bieži sastopama kolorektālā vēža audos, tāpēc kvantitatīvi nosakot mutācijas asins plazmā, var izdarīt secinājumus par cirkulējošo vēža šūnu daudzumu un noteikt terapijas efektivitāti. Šī audzēju DNS asins plazmā ir ļoti nelielā koncentrācijā, tāpēc ar standarta laboratorijas izmeklēšanas metodēm to nav iespējams noteikt un ir nepieciešams lietot jutīgāku metodi mutācijas noteikšanai.

Darba mērķis. Darba mērķis bija izvērtēt UPLC / MS metodes pielietojamību mutāciju noteikšanai cirkulējošās vēža šūnās asins plazmā.

Materiāls un metodes. Darba mērķis bija izvērtēt UPLC / MS metodes pielietojamību mutāciju noteikšanai asins plazmā cirkulējošās vēža šūnās. DNS izdalīja no formalinā fiksētiem un parafinā guldītiem kolorektālā vēža audiem, izmantojot DNA FFPE *Tissue Kit* (*Qiagen*). Tika izmantoti maisījumi, kas sastāvēja no mutāciju saturošiem DNS fragmentiem un DNS fragmentiem ar neizmainītu genotipu. Pavisam tika pagatavoti 8 maisījumi ar atšķirīgu mutanto šūnu DNS koncentrāciju: 45%, 25%, 12,5%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%. Mutācijas tika apstiprinātas, izmantojot *Sanger* sekvenēšanas metodi. Tika veikta amplifikācija ar polimerāzes ķēdes reakciju un šķelšana ar restrikcijas enzīmu *AluI*. MS paraugu analīzi ar SYNAPT G2-S HDMS + ACQUITY UPLC veica *Waters* firmas darbinieki Lielbritānijā.

Rezultāti. Veicot masspektrometrijas rezultātu analīzi, DNS fragmenti ar neizmainītu genotipu tika noteikti visos paraugos, taču mutanto DNS fragmentu izdevās noteikt tikai tajā paraugā, kurā mutanto šūnu koncentrācija bija 45%.

Secinājumi. Izmantotais protokols nav pietiekami jutīgs, lai būtu izmantojams mutāciju noteikšanai cirkulējošās audzēja šūnās asins plazmā, tomēr rezultāti liecina par iespēju, optimizējot izmantoto protokolu, iegūt augstāku jutību mutanto DNS fragmentu noteikšanā *KRAS* gēna 12. un 13. kodonā.

A