

KRAS 遺伝子の 1 塩基変異を識別する新規定量 PCR 法

(近畿大産理工) 藤田亮祐・園川舞華・久野雅明・藤井政幸

A Novel Quantitative PCR Method Discriminating Single Nucleotide Mutation of KRAS gene
(Faculty of Humanity Oriented Science and Engineering, Kindai University) ○Ryosuke Fujita,
Maika Sonokawa, Masaaki Hisano and Masayuki Fujii

In the present study, quantitative analysis discriminating single nucleotide mutation of KRAS gene by allele specific real time PCR using chemically modified primers is described. Taq DNA polymerases which do not have 3'-exonuclease activity and HiFi taq DNA polymerase which has 3'-exonuclease activity, namely proof-reading activity were investigated. Consequently, PCR using regular phosphate or phosphorothioate primers was not specific enough for a quantitative analysis discriminating single base mutation. On the other hand, PCR using 2'-OMeRNA modified primers was highly specific for a quantitative analysis discriminating single base mutation between *KRAS^{wt}* and *KRAS^{G12D}* genes.

Keywords : *allele specific real time PCR, KRAS^{G12D}, chemically modified primers*

一塩基多型(SNPs)や癌ドライバー遺伝子における一塩基変異の解析は個別化医療の基盤技術として重要性を増している。また、PCR 技術は遺伝子解析を含めあらゆるバイオサイエンスの分野で汎用されている。しかしながら、野生型遺伝子と一塩基変異遺伝子を同時に発現している場合、両者を識別して定量解析することは困難である。

本研究では 3'-末端にホスホロチオエート骨格および 2'-OMeRNA 等を導入した化学修飾プライマーを利用して *KRAS^{wt}* と *KRAS^{G12D}* を識別できる PCR 技術を開発することを目的として検討を行った。

KRAS model DNA Template T1 (227G)/ T2 (227A):

acttggtgtagttggagctg(g/a)tggcgtaggcaagagtgccctgacgatacagctaattcagaatcatttggtagcgaatatgatcc
aacaataga

Reverse: 5'-tctattgttgatcatattcgt-3'

Forward: POg: 5'-acttggtgtagttggagctgg-3' POa: 5'-acttggtgtagttggagctga-3'

PSg: 5'-acttggtgtagttggagctg^g-3' PSa: 5'-acttggtgtagttggagctg^a-3'

POMg: 5'-acttggtgtagttggagctgG-3' POMa: 5'-acttggtgtagttggagctGA-3'

POM2g: 5'-acttggtgtagttggagctGg-3' POM2a: 5'-acttggtgtagttggagctGa-3'

POM3g: 5'-acttggtgtagttggagcUgg-3' POM3a: 5'-acttggtgtagttggagcUga-3'

uppercase letter = 2'-OMeRNA、lowercase letter = DNA, ^ = phosphorothioate

[primers] = 0.2 μM, [template] = 8.3 x 10⁻⁸ μM, thermal cycle; 95 °C, 120 sec, 95 °C. 15 sec, 58 °C, 30 sec, 72 °C, 15 sec, 45 cycles.

結果として、ノンブルーフリーディングポリメラーゼと 2'-OMeRNA 修飾プライマーの組み合わせ、フリーディングポリメラーゼと 2'-OMeRNA 修飾プライマーの組み合わせにおいて、プライマー3'-末端と完全にマッチしたテンプレートのみが増幅され、*KRAS^{wt}* と *KRAS^{G12D}* を識別できる定量PCRが可能であることが示された。同時に、この PCR 法はその他の変異 KRAS 遺伝子の識別にも有効であることも示された。