

化学修飾プライマーとブルーフリーディングポリマーゼを用いる変異KRAS遺伝子の高感度、高精度定量PCR

Highly Sensitive and Discriminative qPCR of KRAS Mutations Using Chemically Modified Primers and Proofreading Polymerase

Ryosuke Fujita, Mai Oishi, Maika Sonokawa, Saki Hashima and Masayuki Fujii
Faculty of Science and Engineering, Kindai University

Abstract. 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}, KRAS^{G12D}, KRAS^{G12A} and KRAS^{G12V} genes.

Allele Specific Quantitative PCR Using Proofreading Polymerase and Chemically Modified Primers

野生型KRAS (WT) の場合、3'-exonuclease活性を持つHiFi Taq DNAポリマーゼは、プライマーとテンプレートの間に mismatch が存在すると、その mismatch を修正しようとするため、PCRが進行しない。

変異型KRAS (mutant) の場合、HiFi Taq DNAポリマーゼは、プライマーとテンプレートの間に mismatch が存在しても、その mismatch を修正しないため、PCRが正常に進行する。

実験

- PCR反応
 - アンプレート (最終濃度 3.3 × 10⁻⁸ μM)
 - マスターミックス (最終濃度 0.2 μM)
 - サブストラクチャー (最終濃度 0.2 μM)
 - TaKaRa Premix Taq (TaKaRa Ex Taq Version 2.0)TM
 - dGreen for real Time PCRTM
- 熱サイクル: 98°C, 30s → 98°C, 10s → 55°C, 30s → 72°C, 60s × 30cyc → 98°C, 30s → 55°C, 30s → 72°C, 30s × 30cyc

図1. HiFi Taq DNAポリマーゼの3'-exonuclease活性によるPCRの進行抑制。野生型KRAS (WT) の場合、HiFi Taq DNAポリマーゼは、プライマーとテンプレートの間に mismatch が存在すると、その mismatch を修正しようとするため、PCRが進行しない。

変異型KRAS (mutant) の場合、HiFi Taq DNAポリマーゼは、プライマーとテンプレートの間に mismatch が存在しても、その mismatch を修正しないため、PCRが正常に進行する。

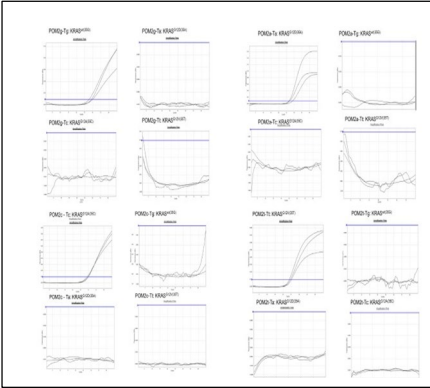
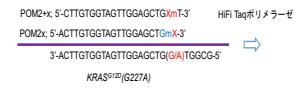


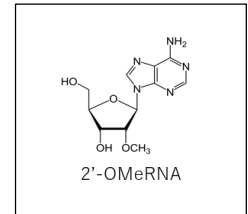
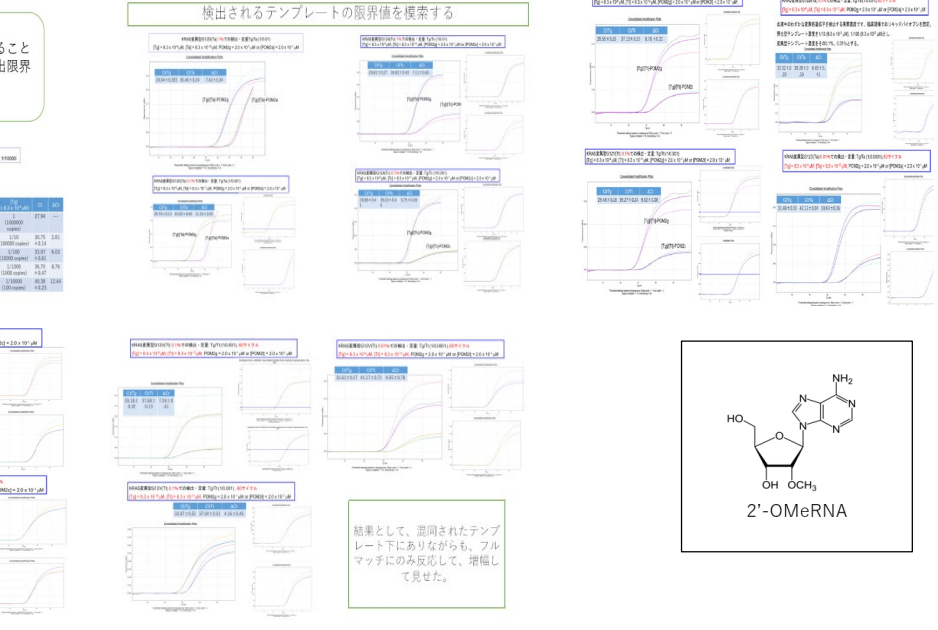
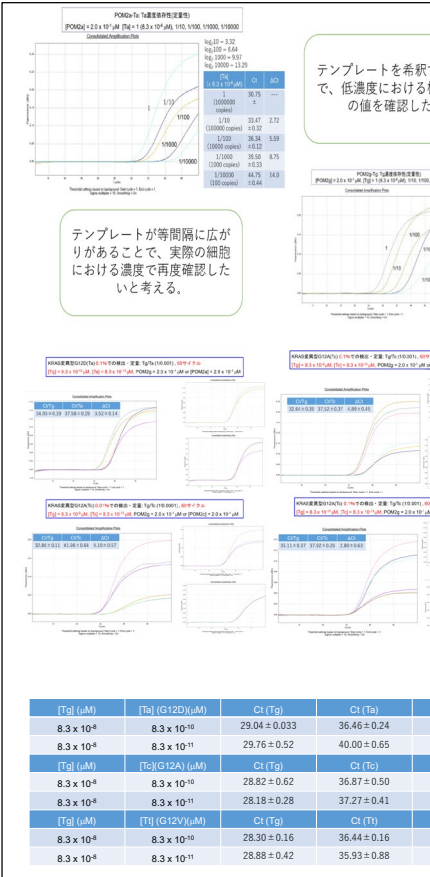
Table 1. qPCR by TaKaRa Ex Taq Polymerase and 2'-OMeRNA Modified Primers

Primers	Ct/Tg (35G)	Ct/ Ta (35A)	Ct/ Tc (35C)	Ct/ Tt (35T)	ΔCt
POM2-1	NA	NA	-	-	-
POM2c	NA	NA	25.95 ± 0.20	NA	∞
POM2a	NA	22.67 ± 0.92	NA	NA	∞
POM2g	25.41 ± 0.84	NA(G-T)	NA	NA	∞
POM2t	NA	NA	NA	24.77 ± 0.81	∞
PSM2a	NA	NA	25.31 ± 0.30	NA	∞
PSM2c	NA	23.63 ± 0.19	NA	NA	∞
PSM2g	24.02 ± 0.85	NA(G-T)	NA	NA	∞
PSM2t	NA/	NA	NA	24.69 ± 0.15	∞
POM2+c	21.51 ± 0.39	23.49 ± 0.23	-	-	1.98
POM2+a	19.74 ± 0.20	21.06 ± 0.31	-	-	1.32
POM2+g	18.44 ± 0.07	21.09 ± 0.25	-	-	2.65
POM2+t	20.05 ± 0.32	23.86 ± 0.64	-	-	3.81

結論



プライマー-POM2c, PSM2cは3'-末端がマッピングしているときの伸長され、ミスマッチの時は3'-exonuclease活性により3'末端が削除されて、3'-末端にGmが現れると伸長反応は停止する。従って、プライマー-POM2c, PSM2cは3'-末端の1塩基多型を識別して、マッピング配列の内増幅する。プライマー-POM2+c, PSM2+c(3'-末端)はテンプレートにマッピングしており、ブルーフリーディングを受けずに伸長される。



結論



2'-OMeRNA修飾プライマーとブルーフリーディング活性を持つTaKaRa Ex Taqポリマーゼを用いたPCR反応で、一塩基変異を完全に識別して目的塩基のみを正確に定量化することが可能であることが分かった。全ての実際の組み合わせにおいて極めて正確に高精度で一塩基変異を識別できるため、リキンドイオプシンにおける血液サンプルや不均一な組織中に混在している目的塩基を0.1%の精度で検出できる。癌遺伝子バレル線やウイルス変異株の高感度検出等に有用なPCR法として期待できる。

[Tg] (μM)	[Tg] (G12D) (μM)	Ct (Tg)	Ct (Tg)	ΔCt
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹⁰	33.32 ± 0.29	39.78 ± 0.29	6.45 ± 0.41
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹⁰	31.49 ± 0.33	42.12 ± 0.04	10.64 ± 0.36
8.3 × 10 ⁻¹⁰	8.3 × 10 ⁻¹⁰	34.05 ± 0.19	37.58 ± 0.29	3.52 ± 0.14
[Tg] (μM)	[Tg] (G12A) (μM)	Ct (Tg)	Ct (Tg)	ΔCt
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹⁰	32.64 ± 0.35	37.52 ± 0.37	4.89 ± 0.44
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹⁰	32.85 ± 0.11	41.96 ± 0.64	9.1 ± 0.57
8.3 × 10 ⁻¹⁰	8.3 × 10 ⁻¹⁰	35.11 ± 0.37	37.91 ± 0.26	2.80 ± 0.63
[Tg] (μM)	[Tg] (G12V) (μM)	Ct (Tg)	Ct (Tg)	ΔCt
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹⁰	30.17 ± 0.31	37.68 ± 0.13	7.50 ± 0.41
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹⁰	31.61 ± 0.17	41.17 ± 0.71	9.55 ± 0.78
8.3 × 10 ⁻¹⁰	8.3 × 10 ⁻¹⁰	32.87 ± 0.51	37.04 ± 0.51	4.16 ± 0.44

[Tg] (μM)	[Tg] (G12D) (μM)	Ct (Tg)	Ct (Tg)	ΔCt
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹⁰	29.04 ± 0.033	36.46 ± 0.24	7.42 ± 0.24
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹¹	29.76 ± 0.52	40.00 ± 0.65	10.24 ± 0.28
[Tg] (μM)	[Tg] (G12A) (μM)	Ct (Tg)	Ct (Tg)	ΔCt
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹⁰	28.82 ± 0.62	36.87 ± 0.50	8.05 ± 0.28
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹¹	28.18 ± 0.28	37.27 ± 0.41	9.09 ± 0.54
[Tg] (μM)	[Tg] (G12V) (μM)	Ct (Tg)	Ct (Tg)	ΔCt
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹⁰	28.30 ± 0.16	36.44 ± 0.16	7.35 ± 0.21
8.3 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻¹¹	28.88 ± 0.42	35.93 ± 0.88	7.05 ± 0.45