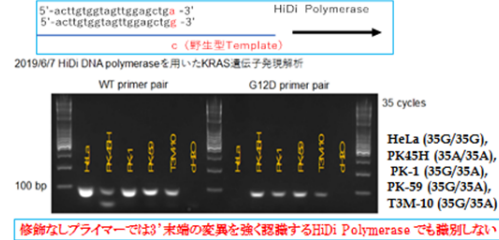


【Abstract】

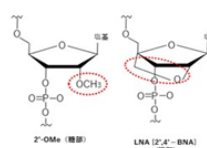
2'-OMeRNA修飾及びLNA構造を有するプライマーとHiDi DNA PolymeraseTM (myPOLS Biotec GmbH) により完全な対立遺伝子特異的PCRが達成された。3'末端から3番目、4番目の位置に2'-OMeRNA修飾及びLNA構造を有し、3'末端に変異点を持つプライマーを用いたPCR反応では、KRASwt(35G)とKRASG12D(35A)を完全に識別できる可能性があることがわかった。一例として3'末端から3番目の位置にLNA構造、3'末端に正常なGを持つプライマーPOL3gを用いたPCRでは、KRASwt(35G)のテンプレートはCt値 43.10 ± 0.18 で増幅されたが、変異体KRASG12D(35A)のテンプレートは全く増幅されなかった。一方、3'末端から3番目の位置がLNA構造で、3'末端が正常なAを持つプライマーPOL3aによるPCRでは、KRASG12D(35A)のテンプレートは33.33 ± 0.51 のCt値で増幅されたが、変異体KRASwt(35G)のテンプレートは全く増幅されなかった。これは完全な対立遺伝子特異的PCRの最初の例であり、癌の診断パネルへの応用が期待される。

【Introduction】

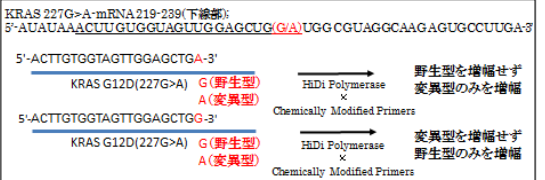
一般的な遺伝子発現の解析、PCR反応において同一細胞内で発現している一塩基変異を認識して野生型及び変異型を特異的に増幅することは困難とされている。当研究室でも認識性能が高いとされるHiDiポリメラーゼを用いて変異KRASG12D特異的核酸医薬の開発を目指す過程で、5種の癌由来細胞にて野生型KRASwt(227G)と変異型KRASG12D(227G>A)のmRNA発現量のRT-qPCRによる定量解析を試みたが、一塩基変異を識別することは困難であった(下図参照)。



Chemically Modified Primers



標的結合性や塩基認識能を向上させることが知られているMethyl基やLNA構造を有する化学修飾プライマーとノンブルーフリーディング機構のHiDi-Polymeraseを組み合わせることで同一細胞内に混在する野生型及び変異型遺伝子を高精度に識別して定量解析が可能になるのではありませんかと予想し、本研究では高感度な一塩基識別PCR法の開発を目指した。

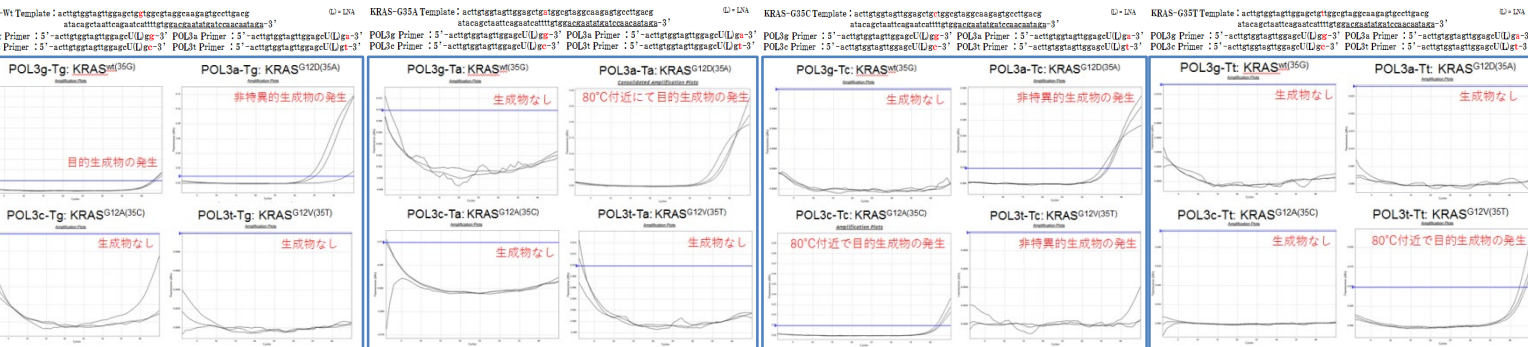


【Methods】

Table with 2 columns: Name (名称) and Sequence (配列). Lists primers for KRAS-PCR Template, Forward (POL1x-4, POM1x-4), and Reverse. Includes a note: (L) = LNA, (M) : 2'-O-Methyl, C34(L) = LNA_mC, x = a, g, c, t

DNAテンプレート (終濃度8.3 x 10⁻⁸ M)、フォワードプライマー (終濃度0.2 M)、リバースプライマー (終濃度0.2 M)、HiDi 2x PCR Master MixTMを10µl、dsGreen for real-Time PCR TMを混合して全量20 µlとし、HiDiポリメラーゼの推奨の熱サイクル (45Cycle) によりPCRを行った。各PCRは3回実施し、その平均値、標準偏差を求めた。

【Result】 qPCR by HiDi Polymerase and POL3 Primers



【Summary】

Table 1. qPCR by HiDi Polymerase and 2'-OMeRNA (Nm) Modified Primers

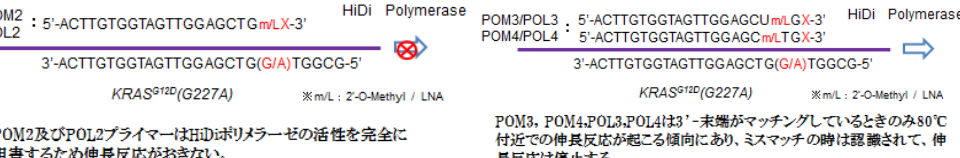
Table with 8 columns: Primers, Ct/Tg (35G), Ct/Ta (35A), ΔCt, Ct/Tc (35c), ΔCt, Ct/Tt (35T), ΔCt. Shows high specificity for modified primers.

Table 2. qPCR by HiDi Polymerase and LNA (N_L) Modified Primers

Table with 8 columns: Primers, Ct/Tg (35G), Ct/Ta (35A), ΔCt, Ct/Tc (35c), ΔCt, Ct/Tt (35T), ΔCt. Shows high specificity for LNA modified primers.

HiDiポリメラーゼと未修飾プライマー-POを組み合わせたPCRではCt値差があることから認識しているが、ミスマッチでも伸長しているため完全に識別したPCRは困難であることが示された。3'末端から2番目にMethyl修飾及びLNA構造のあるPOM2/POL2プライマーを用いた反応ではミスマッチ、フルマッチともに伸長しなかった。一方、3'末端3番目以降にMethyl修飾やLNAを有するPOM3/POL3及びPOM4/POL4プライマーを用いた反応ではフルマッチでのみ80°C付近で伸長反応があった。

【Conclusion】



HiDi DNA ポリメラーゼTMとPOM3/POM4およびPOL3/POL4の組み合わせにより野生型KRASと変異型KRASを完全に識別できる可能性があることがわかった。ただし、一部の變異型DNAテンプレートとの組み合わせでのフルマッチの生じる反応においては45<Ct値であったため、DNAテンプレート濃度やサイクル数などの条件を見直し現在検証中である。また、一連の結果よりHiDi DNA ポリメラーゼTMはTaKaRa Taq ポリメラーゼTMよりも一塩基変異を識別する精度が高いことが実証された。一塩基範囲を100:0で完全に識別することは既存の方法では達成できなかった結果であり、アレル特異的PCR法として癌遺伝子変異解析パネル診断等に有用に利用されることが期待される。