

# 一塩基変異を完全識別する新規定量 PCR 法による KRAS 遺伝子変異及び SARS-CoV-2 変異株高感度検出

藤田亮祐・大石真衣・○藤井政幸（近畿大産業理工）

**Highly Sensitive Detection and Identification of SARS-CoV-2 Variants by A Novel Quantitative PCR Completely Discriminating Single Point Mutation of *KRAS*** (Faculty of Humanity Oriented Science and Engineering, Kindai University) Ryosuke Fujita, Mai Ohishi and Masayuki Fujii

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、頻繁に変異を繰り返す SARS-CoV-2 の変異株を高感度に検出・同定する技術は感染防止対策やワクチン、治療薬開発において極めて重要である。しかしながら、現行の PCR 法では遺伝子中の一塩基変異を完全に識別して定量解析することは困難である。

本研究では化学修飾プライマーとプルーフリーディングポリメラーゼを利用して *KRAS<sup>wt</sup>* と *KRAS<sup>G12D</sup>*, *KRAS<sup>G12A</sup>*, *KRAS<sup>G12V</sup>* 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。

結果として、フリーディングポリメラーゼと化学修飾プライマーの組み合わせによって、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<sup>wt</sup>* と *KRAS<sup>G12D</sup>*, *KRAS<sup>G12A</sup>*, *KRAS<sup>G12V</sup>* を完全識別できる定量 PCR が可能であることが示された。この PCR 法では一サンプル中テンプレート 10 コピーまで濃度依存的に増幅することが可能で、野生型遺伝子に 0.01%混在する変異型遺伝子を干渉されることなく完全に識別して定量的に検出できることも示された。

Table 1. Quantitative Detection *KRAS* Mutation by qPCR Using Chemically Modified Primers

Primers	Ct/Tg (35G)	Ct/Ta (35A)	Ct/Tc(35C)	Ct/Tt(35T)
POM2t	NA	NA	NA	24.77 ± 0.81
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

さらに、同 PCR 法を用いて SARS-CoV-2 のオミクロン株 BA.1、オミクロン株 BA.2、オミクロン株 BA.5 を高感度に検出し、同時に同定することに成功した。フォワード、リバース両プライマーの 3'-末端で一塩基変異が識別可能であり、下記の表のとおり、SARS-CoV-2 surface glycoprotein mRNA の 1355 および 1486 の 2 つの変異点を同時に識別することにより 3 種の変異株オミクロン株 BA.1、オミクロン株 BA.2、オミクロン株 BA.5 を検出・同定することに成功した。

Table 2. Detection of SARS-CoV-2 Variants by qPCR Using Chemically Modified Primers

Primers	○ BA.5 (ΔCt)	○ BA.1 (ΔCt)	○ BA.2(ΔCt)
F1355BA5 R1486BA2	20.57 ± 0.07	NA	NA
F1355o R1486BA1	NA	25.32 ± 0.35	NA
F1355o R1486BA2	NA	NA	26.48 ± 0.19