

ペプチド核酸（PNA）を利用した遺伝子変異の検出

PNAはDNAと類似の構造を持つ非天然の化合物（図1）で、相補的なDNA配列と強固な二本鎖を形成します。そのため、特定のDNA配列と二本鎖を形成するPNAを作製しPCR反応に添加すると、そのDNA増幅を阻害することができます。この方法（PCR Clamping）は、既知の特定の遺伝子変異の検出に利用可能です。

本実験では、野生型及び変異型のEGFP遺伝子を鋳型DNAとしてPNA存在下でPCRを行い、PNAの添加がPCRに与える影響を評価しました。

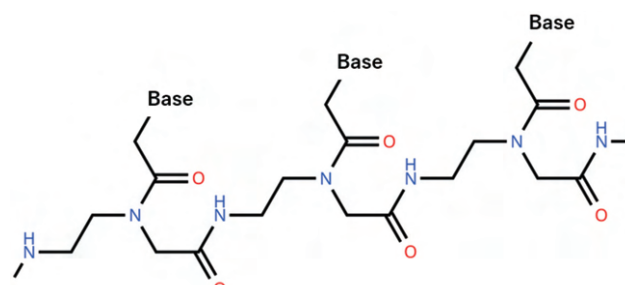


図1 PNAの構造

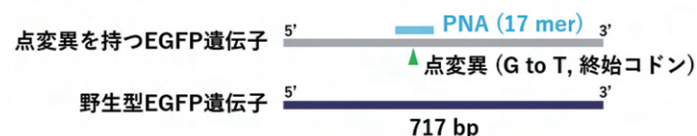
方法

EGFP及びその変異型遺伝子（GAA→TAA、Glu90Ter変異）を含むプラスミドを作製し、PCRの鋳型DNAとしました。PNAは変異部位を中心として17 merとなる様に設計しました（図2-1）。

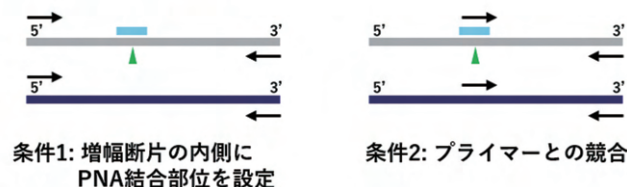
野生型及び変異型EGFP遺伝子を鋳型DNAとして、プライマー、PNAを添加しPCRを行いました（図2-2）。条件1では、PNA結合部位を増幅領域の内側に設定することにより、PNA依存的な伸長反応の阻害を評価しました。一方、条件2では、PNAとプライマーの競合によるPCRの阻害を評価しました。

各実験で得られたPCR産物はアガロースゲル電気泳動で分析しました。

1. 鋳型DNAとPNAの設計



2. PCR用プライマーの設計



条件1: 増幅断片の内側にPNA結合部位を設定

条件2: プライマーとの競合

図2 実験方法

実験条件の詳細は裏面をご参照ください。

結果

本実験では、1塩基の変異を含むEGFP遺伝子の増幅を選択的に阻害するため、17 merのPNAを設計しPCRに用いました。その結果、条件1・条件2の両方の条件で、変異型遺伝子の特異的な増幅阻害を検出できました（図3）。

PNAは1塩基の違いを厳密に識別できるので、PCRにおいて特定の配列を持つ鋳型DNAの増幅を特異的に阻害することができます。このようなPNAの特性を利用することにより、特定の遺伝子変異を持つDNAの検出が可能になります。

参考文献：PNA Clamping in Nucleic Acid Amplification Protocols to Detect Single Nucleotide Mutations Related to Cancer. Molecules. 25: 786, 2020.

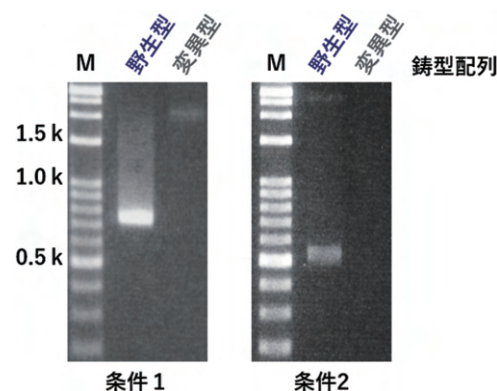


図3 PNAによる増幅阻害

補遺：実験に利用したPNAの設計とPCRの条件検討

○PNAの設計

本実験では、野生型EGFP遺伝子のGlu90コドンに導入された点変異を識別するためのPNAを設計し、PCRに利用しました。PNAは点変異部位を中心として両側に8塩基ずつ伸ばした17 merとして設計しました（図4）。

PCR Clamping用のPNAは、変異部位が配列の中央付近になる様に設計することが重要です。

○PNAによる増幅阻害（図2-2 条件1）

PNAによる配列特異的な増幅阻害を検出するため、PCR条件の検討を行いました。

野生型及び変異型遺伝子を鋳型DNA（5.0 pg/μL）とし、プライマー（0.25 μM）及びPNA（5.0 μM）存在下でPCRを行ったところ、ポリメラーゼのアニーリング・伸長温度を45～48℃としたときに変異型遺伝子断片の特異的な増幅阻害が確認されました（図5、図2の実験ではアニーリング・伸長：45℃）。

PNAの中心に設計した点変異により野生型EGFP遺伝子-PNA間のT_mは大きく低下しており、同条件では野生型遺伝子断片の増幅は阻害されません。

PNA/DNA duplexにおいて、1塩基のミスマッチにより生じるT_m値の差（減少量）は、8～21℃であることが知られています。

○PNAとプライマーの競合（図2-2 条件2）

変異型遺伝子を鋳型DNAとすると、野生型の遺伝子配列を持つプライマーの結合が、変異型の遺伝子配列を持つPNAによって強く阻害されます（図6）。

プライマーとPNAの競合によるPCR阻害を検出するため、PCR反応液に対し、0.25, 1.0, 5.0 μMのPNAを添加しPCRを行いました。その結果、PNAを1.0～5.0 μM添加した条件で変異型遺伝子の特異的な増幅阻害が確認されました（図7、図2の実験ではPNA濃度 5.0 μM）。

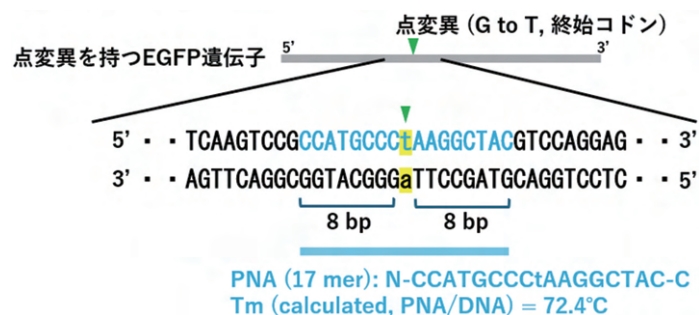


図4 PNAの設計

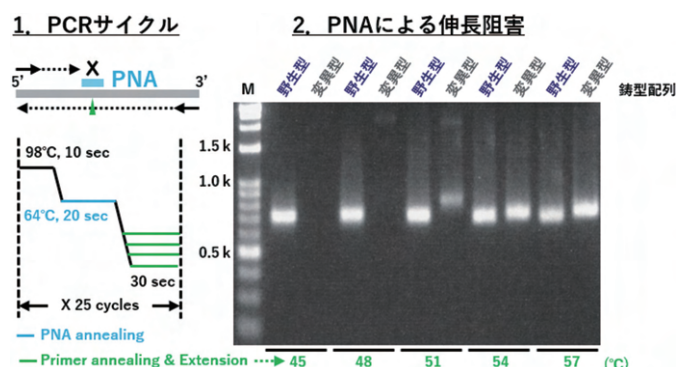


図5 PNAによる伸長阻害

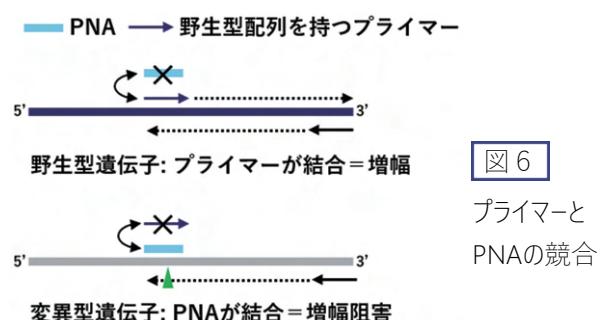


図6

プライマーと
PNAの競合

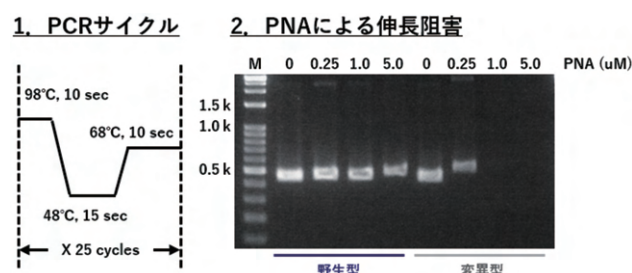


図7 PNAの濃度検討